

Caracterización funcional de la
proteína tipo Kunitz de *Echinococcus*
granulosus EgKu-5

Gonzalo Andrés Pérez Oyenard

Tesis de Licenciatura en Bioquímica

Facultad de Ciencias

Tutor: Dra. Cecilia Fernández

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química

Universidad de la República

La instalación exitosa en el duodeno del perro es crucial en el ciclo vital de *Echinococcus granulosus*. La presencia de enzimas digestivas genera un ambiente exigente para este proceso, por lo que *E. granulosus* debe desplegar estrategias para poder sobrevivir; sin embargo, la base molecular de estas estrategias no ha sido dilucidada. A partir de un relevamiento del transcriptoma de la forma infectante para el perro nuestro grupo identificó un grupo de proteínas presuntamente secretadas, cuyas secuencias poseen similitud con inhibidores de proteasas de serina de tipo Kunitz: *EgKu-1* a *EgKu-8*. Nuestra hipótesis es que estas moléculas podrían favorecer la instalación del parásito en el duodeno del perro.

En este trabajo se logró clonar, producir y purificar la proteína recombinante correspondiente a uno de los integrantes de esa familia: ***EgKu-5***. Sin embargo, la recombinante se recuperó en cuerpos de inclusión y se obtuvieron bajos rendimientos de proteína activa luego de las etapas de purificación y renaturalización. Una vez purificada, se verificó que esta proteína es un inhibidor de alta afinidad de tripsina, por lo que su función fisiológica podría ser la inhibición de enzimas tipo tripsina presentes en el duodeno del perro. Asimismo, el comportamiento de ***EgKu-5*** como un inhibidor de alta afinidad permitió titular la concentración de recombinante activa en la fracción purificada y determinar su constante global para la inhibición de tripsina.

Los hechos documentados y analizados en este trabajo podrían constituir un avance en nuestra comprensión de las relaciones entre el parásito y su hospedero definitivo.

Índice

1. Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*, un parásito cestodo

1.1.1 Anatomía y ciclo vital	1
1.1.2 Instalación de <i>E. granulosus</i> en el hospedero definitivo	5
1.1.3 Entorno fisicoquímico de la infección en el hospedero definitivo	6

1.2 La tripsina, una proteasa de serina

1.2.1 Características generales	7
1.2.2 Unión de la tripsina a sus sustratos	8
1.2.3 Mecanismo catalítico de la tripsina	10

1.3 Inhibidores proteicos de proteasas de serina

1.3.1 Descripción general	12
1.3.2 Inhibidores canónicos	13
1.3.3 Mecanismo estándar de inhibición	
1.3.3a Características generales	15
1.3.3b Interacción del lazo de unión canónico con la enzima	19
1.3.4 La familia I2 de inhibidores canónicos	20

1.4 Inhibidores de proteasas como estrategia de defensa en parásitos intestinales.	22
--	----

1.5 Inhibidores Kunitz en <i>Echinococcus granulosus</i>	23
--	----

2. Objetivos de este trabajo	25
------------------------------	----

3. Materiales y Métodos

3.1 Clonado de la secuencia codificante para la proteína *EgKu-5* madura en un vector de expresión procariota

3.1.1 Amplificación por <i>PCR</i>	26
3.1.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN	28
3.1.3 Adenilación de productos de <i>PCR</i>	29
3.1.4 Ligación de productos de <i>PCR</i> al vector de clonado <i>pGem-T Easy</i>	29
3.1.5 Transformación de <i>E.coli</i> con plásmidos recombinantes	29
3.1.6 <i>Screening</i> rápido de colonias transformadas	30
3.1.7 Extracción de ADN plasmídico	32
3.1.8 Clonado direccional de <i>EgKu-5</i> en el vector de expresión pET28a (+)	32
3.1.9 Secuenciación del plásmido pET-<i>EgKu-5</i>	33

3.2 Producción y análisis de *EgKu-5* recombinante

3.2.1 Análisis de la expresión de <i>EgKu-5</i> recombinante	34
3.2.2 Producción de <i>EgKu-5</i> recombinante	34
3.2.3 Purificación de <i>EgKu-5</i> recombinante por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturalizantes	36
3.2.4 Solubilización de <i>EgKu-5</i> recombinante de cuerpos de inclusión y su posterior renaturalización	38
3.2.5 Análisis por SDS-PAGE	39
3.2.6 Cuantificación de proteínas	39

3.3 Estudio de la capacidad inhibidora de proteasas de *EgKu-5* recombinante

3.3.1 Ensayos de inhibición de tripsina	40
3.3.2 Titulación de inhibidor activo	41
3.3.3 Tratamiento de datos	41

4. Resultados	
4.1 Clonado de la secuencia codificante para <i>EgKu-5</i> en un vector de expresión	
4.1.1 Amplificación de la secuencia codificante para <i>EgKu-5</i>	43
4.1.2 Clonado de <i>EgKu-5</i> en el vector <i>pGem-T Easy</i>	44
4.1.3 Clonado de <i>EgKu-5</i> en el vector de expresión pET 28 a(+).	45
4.1.4 Secuenciación del plásmido pET- <i>EgKu-5</i>	47
4.2 Producción y análisis de <i>EgKu-5</i> recombinante	
4.2.1 Expresión de <i>EgKu-5</i>	48
4.2.2 Purificación de <i>EgKu-5</i>	49
4.3 Estudio cinético de la inhibición de tripsina bovina con <i>EgKu-5</i>	53
5. Discusión	
5.1 Clonado, producción y purificación de <i>EgKu-5</i>	57
5.2 <i>EgKu-5</i> recombinante como inhibidor de tripsina	58
5.3 El posible rol fisiológico de <i>EgKu-5</i>	59
6. Conclusiones y Perspectivas	61
7. Referencias Bibliográficas	62

1. Introducción

1.1 *Echinococcus granulosus*, un parásito cestodo

1.1.1 Anatomía y ciclo vital

El género *Echinococcus*, perteneciente a la familia Taeniidae, sub-familia Eucestoda, incluye varias especies, entre ellas *Echinococcus granulosus*. El ciclo de vida de estos parásitos requiere dos hospederos mamíferos para completarse (Figura 1), uno definitivo, en el cual reside el estadio adulto en el intestino delgado, y uno intermediario en el cual la larva (quiste hidático) se instala generalmente en las vísceras. El hospedero definitivo habitual de *Echinococcus granulosus* es el perro, mientras que son capaces de actuar como hospederos intermediarios numerosas especies tanto herbívoras como omnívoras (en particular, la oveja y el hombre). Las infecciones generadas por el parásito - echinococosis en el hospedero definitivo y equinocosis quística en el hospedero intermediario (llamada también hidatidosis en el hombre) - coexisten necesariamente y se encuentran ampliamente distribuidas alrededor del globo, teniendo una gran importancia tanto clínica como económica.

A diferencia de otras especies pertenecientes a la familia Taeniidae, los adultos de *Echinococcus* poseen un cuerpo pequeño, de 2 a 7 mm., en el cual se destacan dos regiones anatómicas: la estróbila y el escólex (Figura 2). Carecen de sistema digestivo por lo que se nutren por difusión a través de su superficie corporal especializada, el tegumento. El escólex es un órgano de fijación altamente especializado ubicado en la parte anterior del individuo. Posee cuatro ventosas que le permiten fijarse en las microvellosidades del duodeno del hospedero definitivo (Figuras 3 y 4). El escólex también tiene dos rondas de ganchos, unos más largos y otros más curvos, formando el llamado rostelo; también intervienen en la fijación pero sólo penetran superficialmente el epitelio mucoso. Cercano al rostelo se encuentra la llamada *glándula rostelar* cuya secreción se cree importante en la interacción con el hospedero; no ha sido caracterizada (aunque se sabe que es rica en cistina) [1].

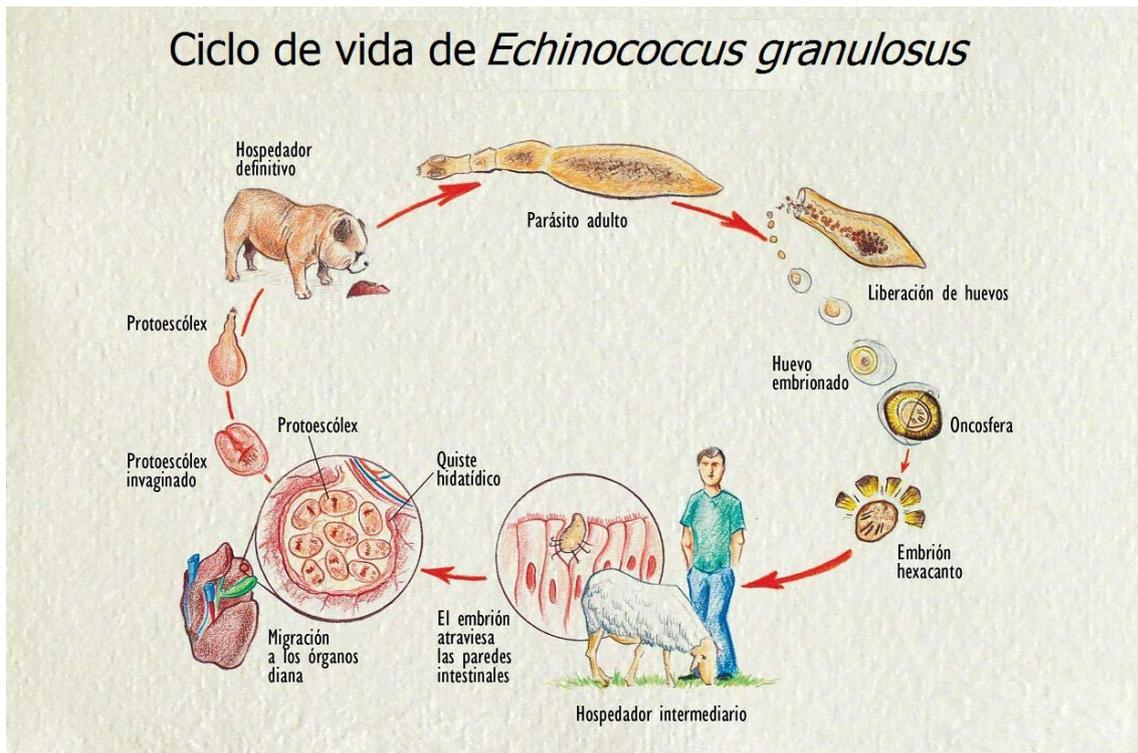


Figura 1. Imagen modificada de [2].

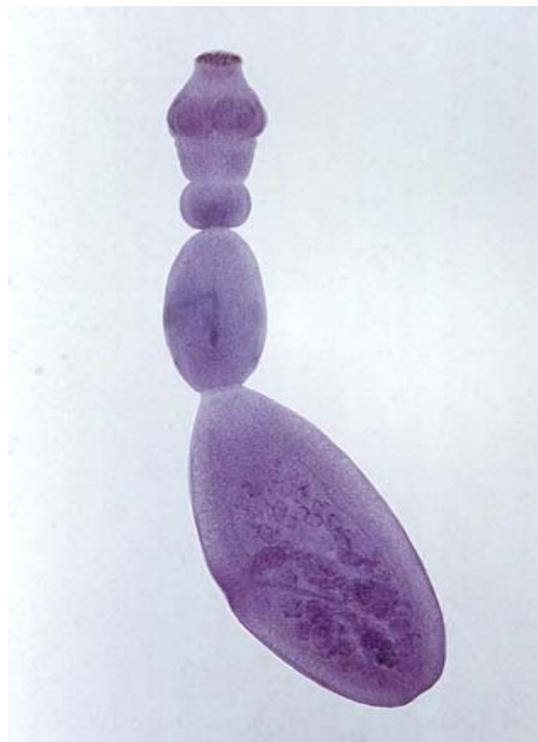


Figura 2. Microscopía óptica de un *E. granulosus* adulto. Se aprecia claramente la diferenciación del escólex y la estróbila (compuesta por tres proglótides). El proglótide grávido corresponde a casi la mitad del tamaño del individuo. Imagen tomada de [3].



Figura 3. Microscopía óptica del escólex de un adulto maduro. Se aprecian tres de las cuatro ventosas. Imagen tomada de [2].

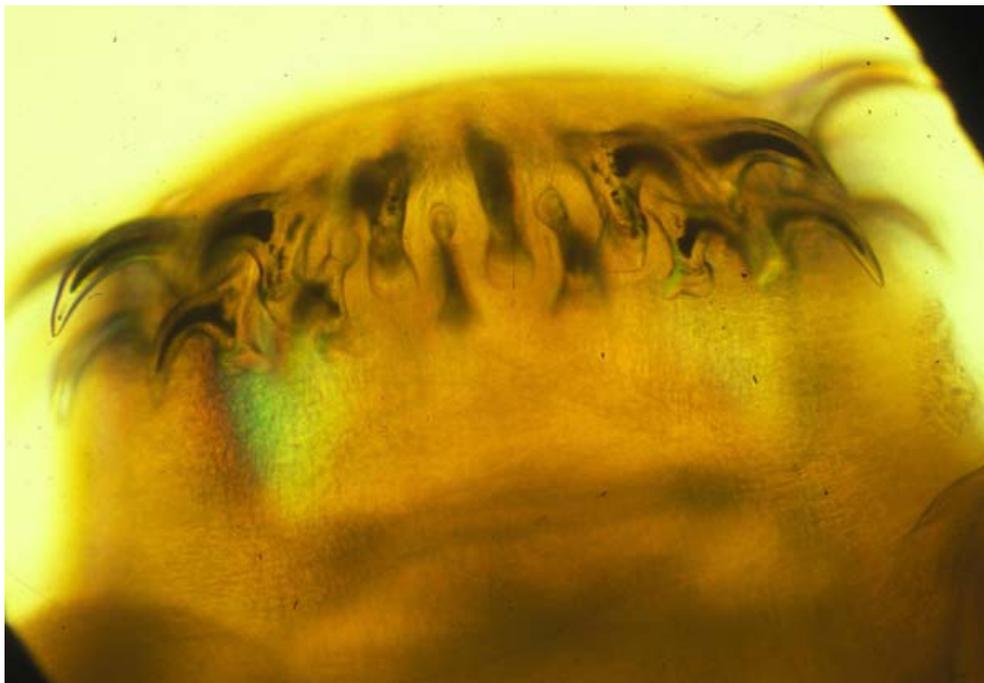


Figura 4. Microscopía óptica del escólex de un adulto maduro. Se observa claramente el rostellum. Imagen tomada de [2].

La estróbila consiste en un número de unidades reproductoras, los proglótides, cada uno de los cuales posee órganos reproductores independientes. En los individuos maduros, el último de los proglótides, denominado *proglótide*

grávido, ocupa casi la mitad de la longitud total del cuerpo (Figura 2) y es la única unidad reproductora madura. Se encuentra cargado de huevos siendo, estrictamente, un saco ovífero. El proglótide grávido se desprende del cuerpo y los huevos son expulsados del hospedero definitivo por vía anal con las heces. Estos huevos son capaces de sobrevivir en el ambiente durante largos períodos de tiempo y de infectar a los hospederos intermediarios cuando son ingeridos por ellos. Varios factores del sistema digestivo del hospedero hacen que el huevo eclosione liberando al embrión (oncósfera). Este atraviesa la mucosa y viaja por el sistema sanguíneo siendo retenido generalmente en la primera red capilar, el hígado. Si no es detenido en el hígado continúa hasta el pulmón [1] o hasta encontrar un obstáculo en cualquier parte del organismo (cerebro, riñones, bazo, corazón, músculos, hueso, etc). Una vez detenida, la oncósfera comienza a proliferar pasando a estado de larva, el quiste hidático, que puede alcanzar entre 10 y 20 centímetros de diámetro (Figura 5).

Dentro del quiste hidático se producen, mediante reproducción asexual de la capa interna también llamada *capa germinativa*, miles de gusanos larvarios, *protoscólex*, cada uno capaz de convertirse en un individuo adulto. El ciclo se cierra cuando el hospedero definitivo ingiere gusanos larvarios al alimentarse de vísceras infectadas.

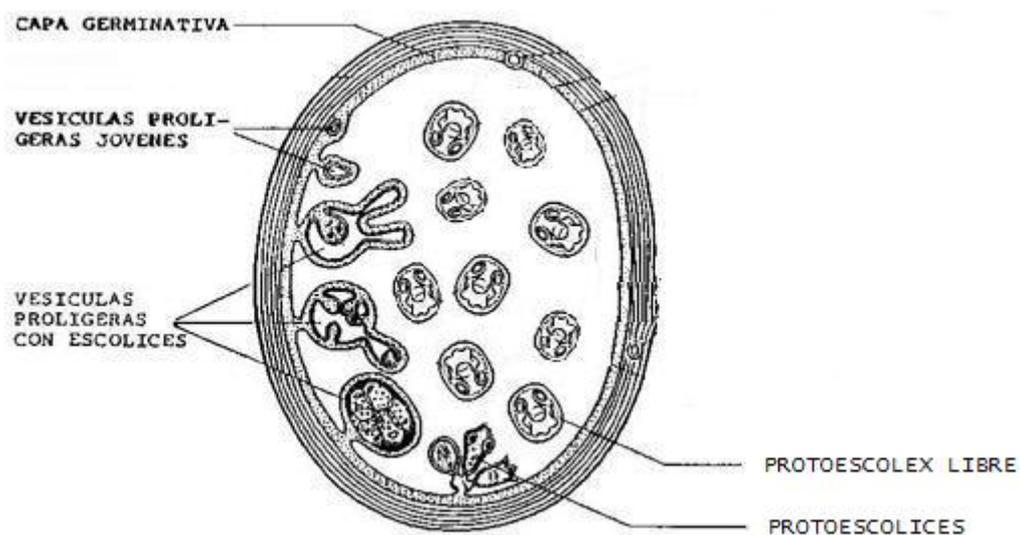


Figura 5. Representación esquemática de la estructura de un quiste hidático. Imagen tomada de [2].

1.1.2 Instalación de *E. granulosus* en el hospedero definitivo

Previo a ser ingeridos por el hospedero definitivo, la porción apical de los protoscólex se encuentra invaginada dentro de una capa de mucopolisacáridos de la región basal del tegumento que los protege del medio ácido del estomago hasta que son estimulados a evaginarse en el intestino delgado. El estímulo que causa la evaginación es desconocido hasta el momento, aunque es sabido que los protoscólex son sensibles a cambios en el ambiente, como la temperatura, la presión osmótica y el pH. Las enzimas digestivas y la bilis no son necesarias pero su presencia aumenta la tasa de evaginación (Ver sección 1.1.3) [1].

Luego de la evaginación el metabolismo de los protoscólex aumenta, comenzando la síntesis de proteínas no estructurales, algunas de las cuales favorecen su establecimiento en el hospedero, y estructurales necesarias para su desarrollo a adultos. Para esto, los protoscólex poseen una rica reserva energética en forma de glicógeno la cual consumen rápidamente antes del establecimiento entre las microvellosidades del intestino delgado. Una vez establecidos (Figura 6), los protoscólex comienzan a nutrirse por difusión mediante el tegumento, cuyas células poseen extensiones citoplasmáticas en la región apical similares a microvellosidades llamadas *microtricas*. Estas modificaciones del tegumento aumentan la superficie de intercambio favoreciendo la absorción de nutrientes [1].



Figura 6. Microscopia óptica de *E. granulosus* adulto instalado entre las microvellosidades del intestino delgado. Imagen tomada de [2].

1.1.3 Entorno fisicoquímico de la infección en el hospedero definitivo

El ambiente fisicoquímico del duodeno se diferencia del resto del sistema digestivo debido a las secreciones tanto del epitelio intestinal, como del páncreas y del sistema biliar, que favorecen la digestión y absorción de alimentos. Las sales biliares reducen la tensión superficial permitiendo la emulsión de las grasas y vitaminas liposolubles, por otro lado, la secreción pancreática es un fluido acuoso alcalino (pH superior a 7.5) que contiene enzimas importantes para la digestión tanto de carbohidratos como de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunas de estas enzimas son sintetizadas en su forma activa, como la α -amilasa, ribonucleasa, desoxiribonucleasa, colagenasa y leucina aminopeptidasa. Otras son sintetizadas como zimógenos; es el caso de la carboxipeptidasa, elastasa, lipasa, fosfolipasa, quimotripsina, y tripsina [4]. Esta última es de principal interés para este trabajo por lo que será tratada con más detalle en la siguiente sección.

1.2 La tripsina, una proteasa de serina

1.2.1 Características generales

La tripsina (E.C.3.4.21) pertenece a la familia S1 de proteasas de serina, subfamilia S1A, cuyo prototipo es la quimotripsina [5]. Se caracteriza por clivar enlaces peptídicos cuyo extremo C-terminal está constituido por residuos aminoacídicos de arginina o lisina, con una preferencia de dos a diez veces superior por arginina. Es generada a partir del clivaje de un precursor inactivo, el tripsinógeno, el cual es sintetizado en la porción exócrina del páncreas, por parte de la enteroquinasa en la luz del duodeno. El tripsinógeno está formado por una única cadena polipeptídica de 245 aminoácidos. Durante su activación, la enteroquinasa escinde los enlaces peptídicos entre los residuos 14-15 y 147-148. Las tres cadenas peptídicas resultantes permanecen unidas por enlaces disulfuro, formando dos dominios del tipo barril- β antiparalelo. Es entre estos dos dominios topológicos que se encuentra el sitio activo de la tripsina [6] (Figura 7).

Este sitio activo está constituido por un *bolsillo hidrofóbico* donde la enzima interacciona con el sustrato y por una *tríada catalítica* formada por los aminoácidos Histidina, Serina y Ácido aspártico, los cuales son los encargados de la catálisis. Estos residuos se encuentran bastante alejados en la secuencia primaria, en las posiciones 57, 195 y 102 respectivamente, aunque muy cercanos en la estructura tridimensional: los residuos histidina y ácido aspártico pertenecen al dominio I (superior en la Figura 7) mientras que la serina se encuentra en el dominio II (inferior en la Figura 7).

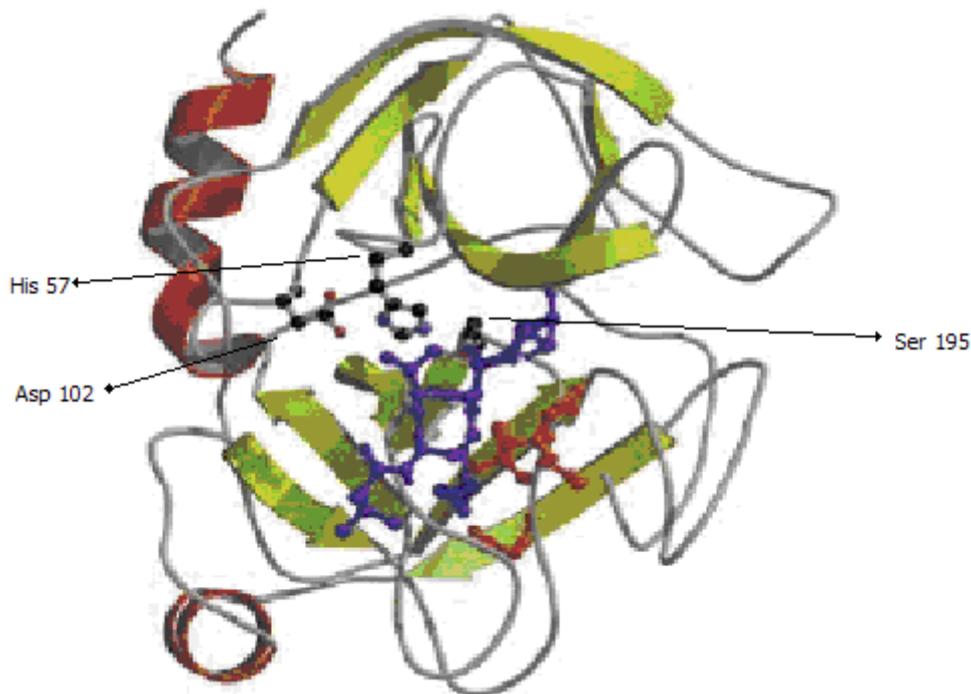


Figura 7. Representación estructural esquemática de tripsina. En negro: aminoácidos de la triada catalítica, Serina 195, Histidina 57 y Ácido aspártico 102. En violeta y rojo claro: péptido a ser clivado; en amarillo y rojo oscuro: elementos de estructura secundaria: hebras beta y alfa hélices, respectivamente. Se distinguen el dominio I (parte superior) y el II (parte inferior). Imagen tomada de [7].

1.2.2 Unión de la tripsina a sus sustratos

La nomenclatura más aceptada en relación con las interacciones enzima-sustrato para las proteasas de serina hace referencia a S_n como el sitio de la enzima, formado por uno o más residuos, que interactúa con el aminoácido P_n del sustrato [8]. Se denomina residuo P_1 al que se encuentra hacia el extremo amino terminal del enlace peptídico que es hidrolizado. En el caso de un sustrato de tripsina, se trata de una arginina o una lisina. Los aminoácidos P_2 a P_n son aquellos que se encuentran hacia el extremo N-terminal de P_1 , mientras que los aminoácidos P'_1 a P'_n son aquellos que se encuentran hacia el extremo carboxilo terminal.

El sitio S_1 es un bolsillo adyacente a la Ser^{195} , formado por los residuos 189 al 192, 214 al 216 y 224 al 228 [9]. Tiene la forma de un cilindro profundo con el residuo Asp^{189} en su base. Sus paredes están constituidas por tres hebras β conectadas por dos lazos superficiales y un puente disulfuro entre las Cys^{191} y Cys^{220} . La conformación resultante permite que el sitio S_1 únicamente acomode, mediante interacciones de baja energía, residuos aminoacídicos con una cadena lateral larga y básica, como los de la arginina y la lisina (Figura 8).

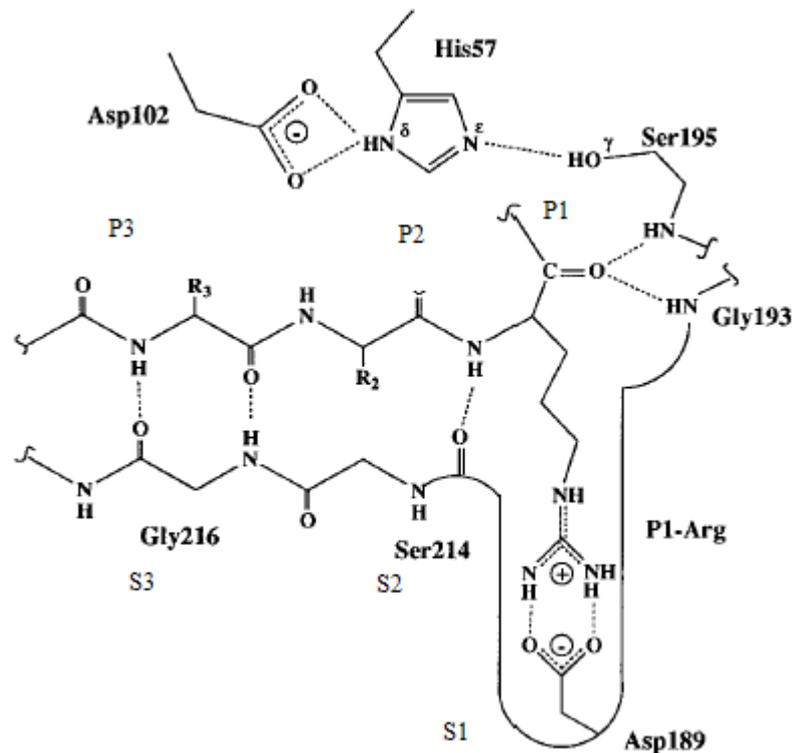


Figura 8. Esquema de algunas de las interacciones entre los sitios S_1 , S_2 y S_3 de la enzima con los sitios P_1 , P_2 y P_3 de un sustrato que posee un residuo de arginina en la posición P_1 . Tomado de [9].

Los residuos Gly^{193} y Gly^{216} son claves para la especificidad de la tripsina ya que permiten el acceso de las cadenas de arginina y lisina al fondo del bolsillo. Sustituciones en estos aminoácidos generan grandes cambios en la especificidad y eficiencia catalítica de la tripsina. El residuo Asp^{189} en la base del sitio S_1 es el principal determinante de la especificidad por arginina y lisina.

1.2.3 Mecanismo catalítico de la tripsina

La hidrólisis de los enlaces peptídicos es energéticamente favorable; sin embargo, su cinética es relativamente lenta debido a que: i) los enlaces amida son muy estables por efectos de resonancia electrónica, ii) el agua no presenta un buen carácter nucleófilo y iii) las aminas actúan mal como grupo saliente [10]. Todas las enzimas proteolíticas resuelven estos tres obstáculos mediante diferentes mecanismos catalíticos.

La tripsina posee el mecanismo catalítico típico de las proteasas de serina. Este se puede dividir en dos etapas: la primera es la formación de un complejo *acilenzima* con la liberación del polipéptido ubicado hacia el extremo carboxilo terminal del sitio de clivaje y la segunda, la separación del complejo *acilenzima* con la consiguiente liberación del resto del polipéptido clivado (Figura 9).

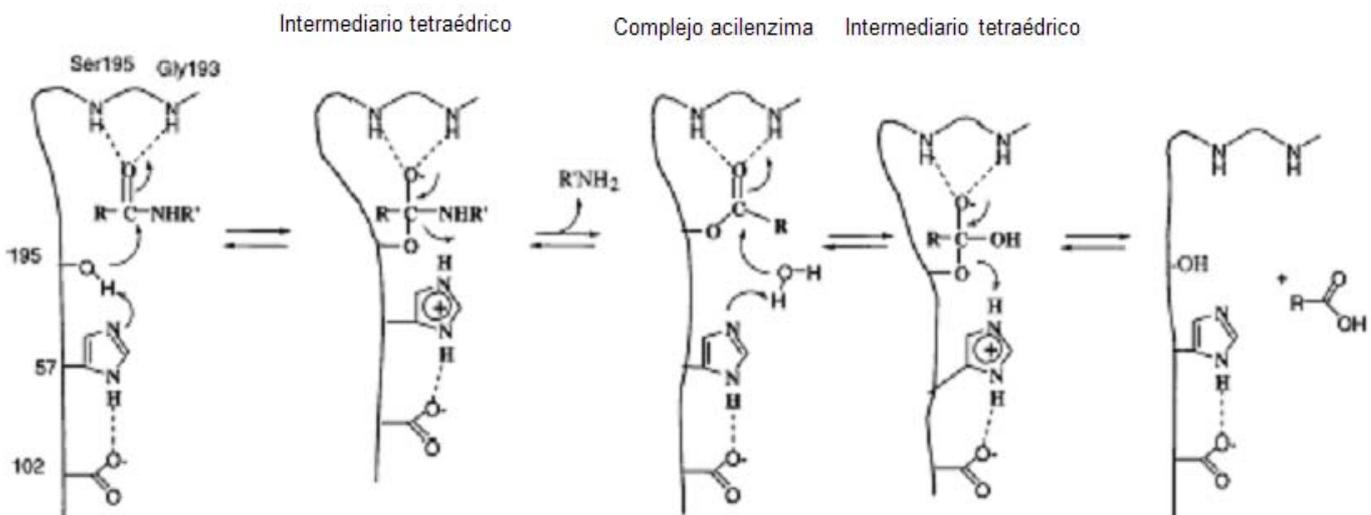


Figura 9. Mecanismo catalítico aceptado para proteasas de serina [10]. Se muestra el hueco del oxianión de la enzima y su interacción con un sustrato genérico.

La primera etapa de la catálisis comienza con la activación del grupo carbonilo del enlace peptídico que será clivado por medio de la formación de puentes de hidrógeno en los que intervienen los grupos amídicos de los residuos Gly¹⁹³ y

Ser¹⁹⁵. Estos residuos forman el llamado *hueco del oxianión* el cual, además de realizar la función mencionada, estabiliza al primer intermediario tetraédrico (ver a continuación).

Una vez activado el grupo carbonilo, se produce el ataque nucleofílico por parte del grupo hidroxilo (OH) de la Ser¹⁹⁵. La His⁵⁷ favorece el ataque nucleofílico actuando como base a través de su grupo imidazol, cargándose positivamente al tomar el protón del grupo hidroxilo. Este proceso impide la localización de una carga positiva sobre el hidroxilo de la Ser¹⁹⁵ la cual impediría la formación del intermediario tetraédrico [11]. La carga positiva sobre la His⁵⁷ es estabilizada por el último aminoácido de la tríada catalítica, el Asp¹⁰². Los residuos His⁵⁷ y Asp¹⁰² se encuentran a una distancia menor a 2.6 Å y comparten la carga positiva formando un puente de hidrógeno de baja barrera (LBHB, del inglés *Low Barrier Hydrogen Bond*). La distribución de esta carga no es simétrica existiendo estudios que indican que se encuentra localizada 85% sobre el residuo His⁵⁷ [10].

El producto del ataque nucleofílico es el primer intermediario tetraédrico, el cual se encuentra cargado negativamente sobre el oxígeno del carbono cuaternario. Este es estabilizado, como se comentó, por los residuos Gly¹⁹³ y Ser¹⁹⁵ del *hueco del oxianión* mediante dos puentes de hidrógeno que involucran 6.5 kcal/mol de energía aproximadamente. La vida media de este intermediario es muy breve: colapsa con la expulsión del grupo saliente siendo este paso favorecido por His⁵⁷-H⁺, actuando como ácido, que protona al grupo saliente. Es posible que el residuo protonado se acerque al grupo saliente para favorecer su protonación [10]. La primera etapa de la catálisis finaliza con la formación de la *acilenzima*.

En la segunda etapa, la *acilenzima* es hidrolizada por el camino reverso de la acilación con la diferencia de que en este paso actúa una molécula de agua como nucleófilo en vez de la Ser¹⁹⁵. La etapa comienza con la activación del grupo carbonilo por parte de los residuos Gly¹⁹³ y Ser¹⁹⁵ a través de la formación de puentes de hidrógeno. Posteriormente, se produce el ataque nucleofílico sobre el carbonilo por la molécula de agua, asistida por la His⁵⁷

actuando como base. Este último paso conduce a la generación del segundo intermediario tetraédrico, el cual también es estabilizado por los residuos del hueco del oxianión. Finalmente, el intermediario colapsa y el grupo hidroxilo de la Ser¹⁹⁵ se separa del polipéptido saliente. Este último paso es favorecido por la acción de la His⁵⁷ actuando como ácido [10].

1.3 Inhibidores proteicos de proteasas de serina

1.3.1 Descripción general

La actividad de las enzimas proteolíticas las convierte en un peligro potencial para los sistemas vivos si no se encuentra bajo un estricto control. Para ello, existen diferentes estrategias que incluyen la regulación de la expresión, la activación de proteoproteasas, la degradación de las enzimas y la regulación de la actividad proteolítica mediante inhibidores [12]. Casi la totalidad de los inhibidores conocidos son proteínas, sólo algunos microorganismos secretan inhibidores no proteicos.

Un inhibidor de proteasas interactúa con su enzima blanco a través de una porción de su estructura, la cual es necesaria y suficiente para la inhibición. Debido a que la estructura de un inhibidor puede contener varias porciones que inhiban diferentes enzimas, la clasificación de inhibidores actualmente aceptada (propuesta por Rawlings [13]) se refiere a dominios inhibidores o *unidades inhibidoras*, más que a proteínas inhibidoras. Se reconocen 48 familias de unidades inhibidoras, las cuales se agrupan a su vez en 26 clanes, siendo cada clan una línea evolutiva independiente.

La forma en que estas unidades inhibidoras interactúan con sus enzimas blancos varía enormemente. Sin embargo, se reconocen dos tipos de mecanismos de inhibición: reacciones irreversibles y uniones reversibles [13].

Los inhibidores irreversibles son específicos de endopeptidasas ya que su mecanismo involucra el clivaje de un péptido interno que dispara un cambio conformacional del inhibidor. Este impide la finalización del proceso de clivaje,

por lo que la enzima permanece unida al inhibidor en forma de complejo acilenzima. Debido a que estos inhibidores no se regeneran luego de interactuar con su enzima blanco son conocidos como *suicidas*. Un ejemplo son las serpinas que constituyen la familia I4 en la clasificación de Rawlings [13].

Los inhibidores reversibles se unen al sitio activo de la enzima a través de múltiples interacciones débiles, de manera similar a como lo haría un sustrato ideal, estableciendo un equilibrio entre la enzima y el inhibidor libres y el complejo enzima / inhibidor. De esta forma, disminuyen la actividad proteolítica de la enzima blanco al competir con el sustrato por el sitio catalítico, negando el acceso del sustrato a este último (inhibidor y sustrato son mutuamente excluyentes).

1.3.2 Inhibidores canónicos

Los llamados *inhibidores canónicos* representan el mayor grupo de inhibidores proteicos reversibles de proteasas de serina; se encuentran distribuidos esencialmente en todos los grupos de organismos. Son inhibidores relativamente pequeños (desde 14 hasta 200 aminoácidos) rígidos y estables. No forman un conjunto uniforme sino que, según Rawlings y cols, se reconocen 19 familias en base a la topografía de puentes disulfuro, localización del sitio reactivo y similitud de secuencia (Figura 10) [13]. El segmento responsable de la inhibición, llamado lazo de unión (*protease-binding loop*), es similar en todos estos inhibidores, y su conformación se denomina canónica. Este lazo, que está extendido y expuesto al solvente, es complementario al sitio activo de la enzima blanco (Figura 11). Dentro del lazo de unión, se encuentra el denominado *sitio reactivo* $P_1 - P'_1$, el cual es el encargado de la inhibición enzimática a través de un mecanismo conocido como estándar [14].

El aminoácido que marca la especificidad del inhibidor acomoda su cadena lateral dentro del *hueco del oxianión* del sitio catalítico de la enzima, de manera similar a como lo haría un sustrato. Dada esta analogía, se reconoce que este

aminoácido ocupa la posición P_1 , mientras que la nomenclatura utilizada para el resto de los aminoácidos del inhibidor es similar a la de cualquier sustrato.

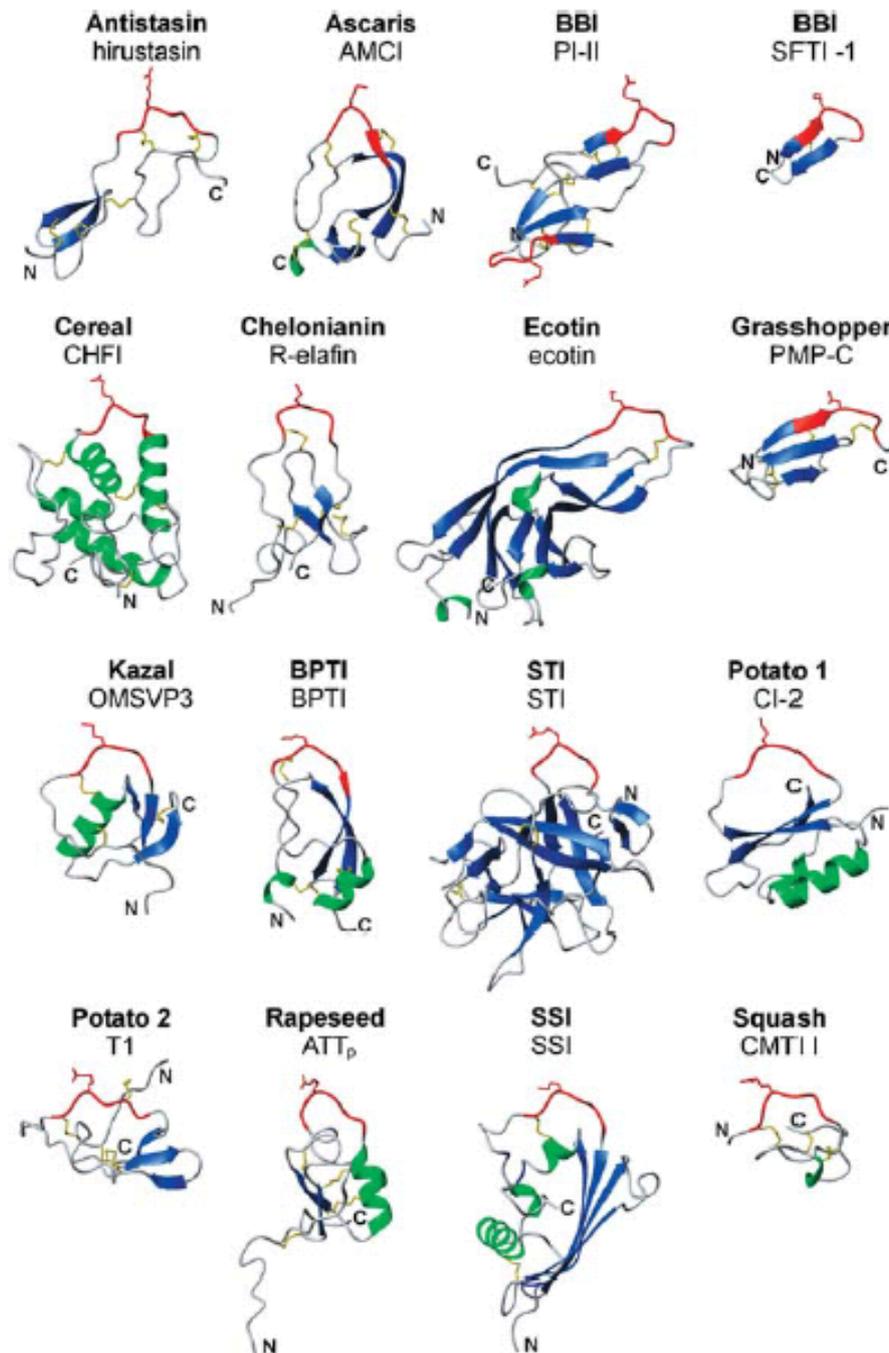


Figura 10. Estructura de representantes de diferentes familias de inhibidores canónicos de proteasas de serina; se destacan estructuras secundarias, alfa hélices en verde, hebras beta en azul, y el lazo de unión a la proteasa en rojo [12].

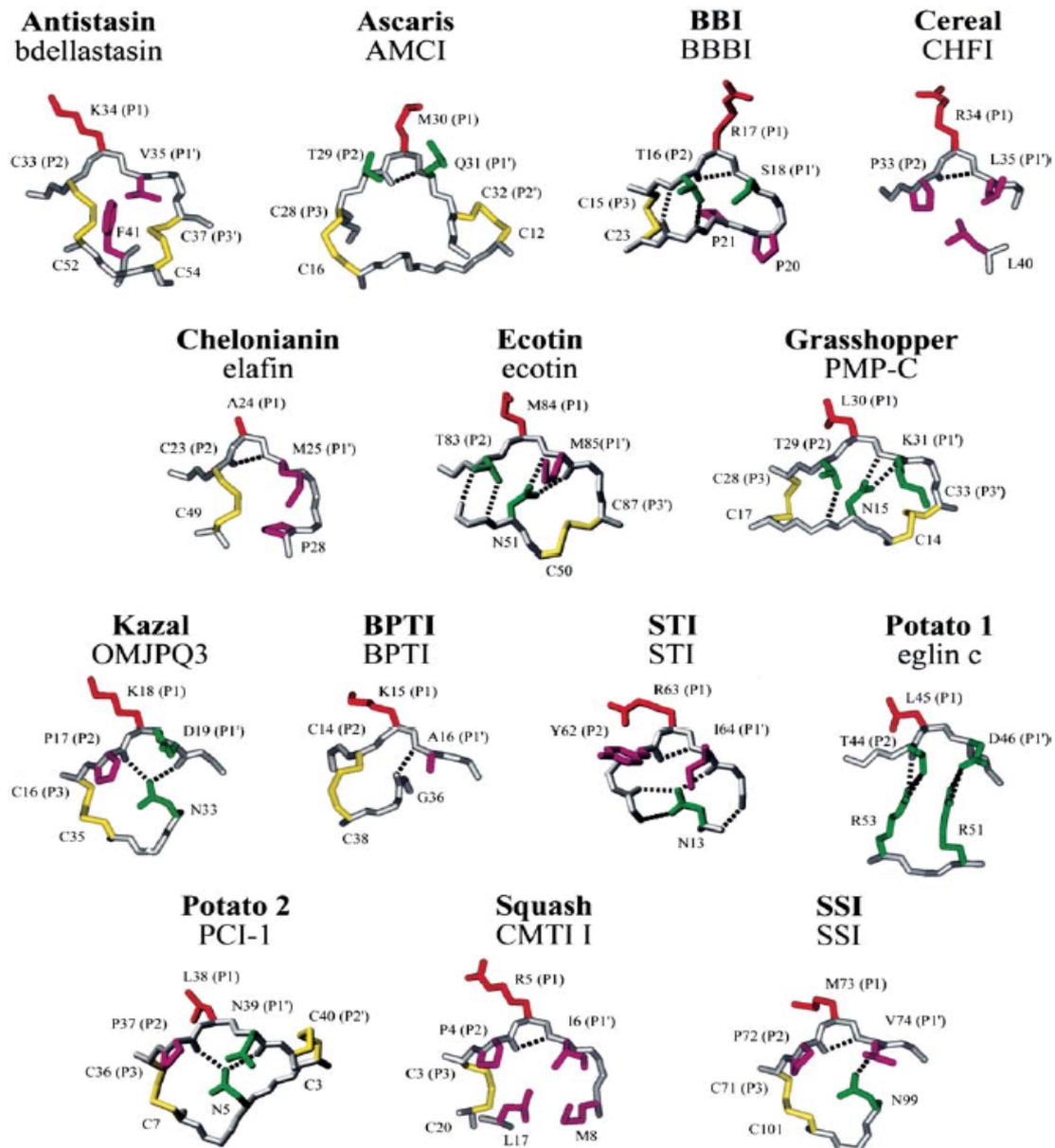


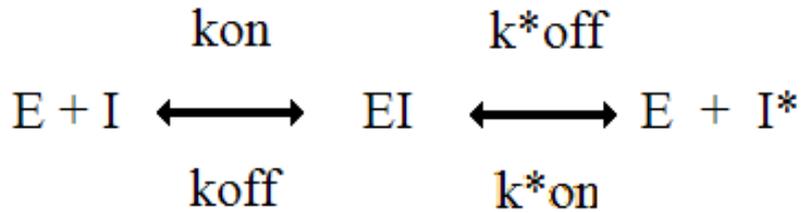
Figura 11. Estructura del lazo de unión de diferentes inhibidores canónicos [12].

1.3.3 Mecanismo estándar de inhibición

1.3.3a Características generales

El ajuste de la interacción enzima-inhibidor al llamado *mecanismo estándar* se encuentra demostrado de forma concluyente sólo para inhibidores canónicos de proteasas de serina. Como se mencionó previamente (ver secciones 1.3.1 y 1.3.2), estos inhibidores se comportan como sustratos ideales de sus enzimas blancos. En el complejo enzima-inhibidor, se establecen numerosas interacciones débiles (van der Waals y puentes de hidrógeno) entre el lazo de

unión del inhibidor y el sitio activo de la enzima. El sitio reactivo $P_1-P'_1$ no es totalmente inerte al ataque proteolítico y la interacción enzima-inhibidor puede representarse como una hidrólisis y resíntesis del mismo:



Donde E es la proteasa, I es el inhibidor, I* es el inhibidor con el sitio reactivo clivado, EI es el complejo enzima-inhibidor, k_{on} y k^*_{on} son, respectivamente, las constantes de velocidad de asociación de segundo orden de la enzima con I e I* y k_{off} y k^*_{off} son, respectivamente, las constantes de disociación de primer orden de los complejos de la enzima con I e I*. A bajas concentraciones y a pH neutro, esta hidrólisis es extremadamente lenta, y el sistema se comporta como un equilibrio simple entre la enzima y el inhibidor libres, y el complejo enzima-inhibidor [12]. La constante de equilibrio entre el inhibidor modificado (con el sitio reactivo clivado) y el inhibidor virgen (con el enlace $P_1-P'_1$ intacto) es cercana a la unidad, indicando que un 50% de las moléculas de inhibidor se encuentran clivadas. Un análisis termodinámico de esta hidrólisis revela que no genera un aumento significativo de la entropía [12].

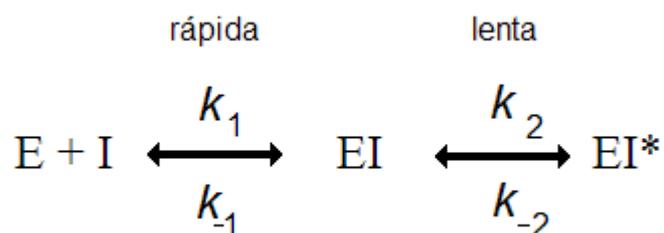
Para caracterizar la afinidad de los inhibidores canónicos, al igual que para todos los inhibidores reversibles, se utiliza el parámetro *constante de inhibición*, K_i , el cual es el recíproco de la constante de asociación (K_a) del equilibrio que establecen el inhibidor, la enzima y el complejo enzima-inhibidor. Para los inhibidores canónicos, K_i es igual a la relación k_{off}/k_{on} . La magnitud de la inhibición depende de las concentraciones relativas en las que se encuentran sustrato e inhibidor (ver 3.3.3) [14], ya que uno compite con el otro por el sitio de unión a la enzima, siendo el complejo EI mucho más estable que el complejo ES.

La *velocidad catalítica máxima*, $V_{M\acute{a}x}$, de una concentración determinada de enzima es independiente de la presencia de inhibidor (puesto que el equilibrio inhibidor-enzima es desplazado a concentraciones altas de sustrato), aunque su presencia aumenta la concentración de sustrato a la cual se alcanza $V_{M\acute{a}x}$. Esto determina que la K_M *aparente*, es decir, la concentración de sustrato a la cual determinada concentración de enzima alcanza la mitad de su velocidad máxima en presencia de un inhibidor competitivo, difiera del valor de K_M (constante de Michaelis-Menten) en un factor $(1 + [I]/K_i)$, es decir:

$$K_{M, \text{app}} = K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Para la mayoría de los inhibidores competitivos, la concentración necesaria para producir una inhibición significativa es mucho mayor que la de la enzima, por lo tanto la concentración de inhibidor unido a la enzima es despreciable con respecto a la de inhibidor total. En el caso de los inhibidores de alta afinidad, los efectos de la inhibición se observan a concentraciones de enzima e inhibidor del mismo orden. Como la mayoría del inhibidor está unido a la enzima, se reduce significativamente la concentración de inhibidor libre, por lo que no es posible despreciar la concentración de inhibidor unido a la hora de analizar los resultados de estudios cinéticos. Se han desarrollado muchos métodos para estimar las fracciones de inhibidor libre y unido a la enzima a fin de determinar los valores de K_i de inhibidores de alta afinidad; en este trabajo, se utilizó el tratamiento de Morrison (ver 3.3.3).

En cuanto a la cinética de la formación del complejo enzima-inhibidor, algunos inhibidores canónicos de alta afinidad, como los integrantes de la familia I2 (ver 1.3.4), interaccionan con la enzima a través de un mecanismo que involucra dos etapas, una inicial donde la enzima se une al inhibidor rápidamente formando un complejo laxo que se isomeriza lentamente en una segunda etapa al complejo final:



En este caso, la constante global de inhibición (K_i^*) queda determinada por las constantes cinéticas de las dos etapas y se relaciona con K_i (k_1/k_{-1}) de la forma:

$$K_i^* = K_i \frac{k_2}{k_2 + k_{-2}}$$

Los valores de K_i^* para inhibidores canónicos son menores a 10^{-8} M; el más bajo que se ha determinado corresponde a la asociación entre el BPTI, *Bovine pancreatic trypsin inhibitor* (ver 1.3.4) y la tripsina bovina ($K_i^* = 6 \times 10^{-14}$ M).

Los inhibidores de alta afinidad pueden ser utilizados para titular enzimas, es decir, para determinar la concentración de enzima activa en una determinada muestra. Para esto, se realizan curvas de velocidad enzimática en función de la concentración de enzima en presencia de una concentración fija y conocida de inhibidor, correspondiendo el punto final a la mayor concentración de enzima a la que se deja de apreciar inhibición. De la misma forma, puede estimarse la concentración de inhibidor activo presente en una solución utilizando una enzima previamente titulada. Este último método fue utilizado para determinar la concentración de inhibidor *EgKu-5* activo obtenido en este trabajo (ver secciones 3.3.2 y 4.3).

1.3.3b Interacción del lazo de unión canónico con la enzima

En el complejo inhibidor-enzima, entre 10 y 18 aminoácidos del lazo de unión del inhibidor y 17 a 30 del sitio catalítico de la proteasa establecen numerosas interacciones débiles, mayoritariamente enlaces de van der Waals (generalmente más de 100) y puentes de hidrógeno (entre 8 y 15). La interacción entre los residuos P_3 - P_1 y los residuos 214 y 216 en la tripsina produce una estructura secundaria de hebra antiparalela β . Además de la interacción de la cadena lateral del aminoácido en P_1 , los residuos Gly¹⁹³ y Ser¹⁹⁵ del hueco del oxianión forman dos puentes de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo de P_1 (Ver Figuras 8 y 12). El número de interacciones entre los residuos del lazo de unión de un mutante del BPTI y la tripsina se muestran en la tabla 1. El BPTI es el prototipo de la familia I2 de inhibidores canónicos (ver Figuras 10 y 11 y sección 1.3.4)

En la Figura 12 se representan las interacciones entre el lazo de unión canónico del inhibidor de tripsina de *Cucúrbita máxima* (CTMI) y la tripsina.

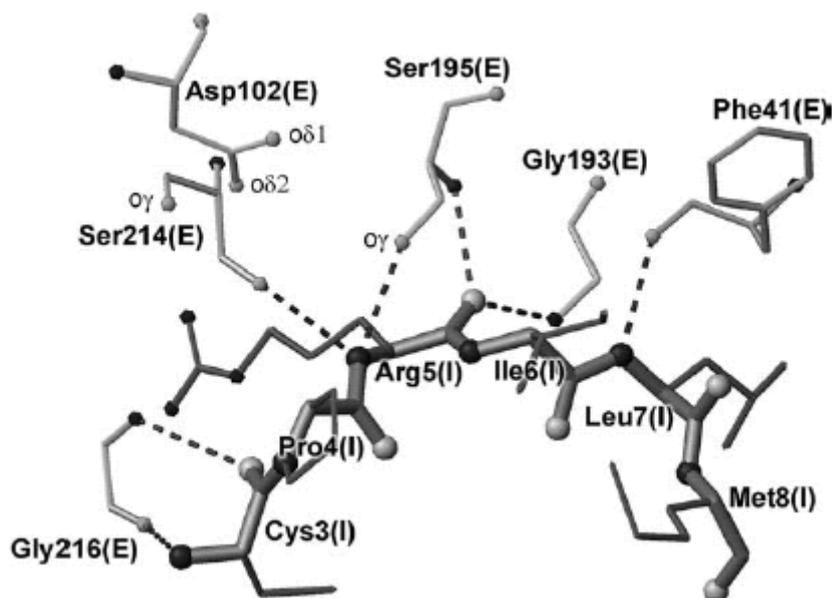


Figura 12. Representación esquemática de las interacciones entre el lazo de unión del inhibidor de tripsina de *Cucúrbita máxima* (CTMI) con la tripsina. Los residuos del inhibidor, marcados con (I), se unen a los de la enzima, marcados con (E), de manera similar a como lo haría un sustrato. Los átomos de oxígeno están representados en gris mientras que los de nitrógeno en negro. Tomado de [12].

		Van der Waals	E. de hidrógeno
P ₅	Thr 11	1	0
P ₄	Gly 12	1	0
P ₃	Pro 13	9	1
P ₂	Cys 14	16	1
P₁	Arg 15	62	7
P ₁ '	Ala 16	15	0
P ₂ '	Arg 17	21	3
P ₃ '	Ile 18	2	0
P ₄ '	Ile 19	8	1
	Total	147	15

Tabla 1. Número de interacciones de van der Waals y enlaces de hidrógeno que establecen con tripsina nueve residuos pertenecientes al sitio de unión del BPTI. En estos estudios, se usó un mutante del BPTI con arginina en la posición 15 en lugar de lisina. Nótese que la Arg¹⁵ es la que establece mayor número de interacciones. Tomado de [16].

1.3.4 La familia I2 de inhibidores canónicos

Como ya se mencionó, el prototipo de la familia I2 es el inhibidor pancreático de tripsina bovina (BPTI o aprotinina) (Figura 13) el cual fue aislado y cristalizado por Kunitz y Northrop en 1936.

Los integrantes de la familia se caracterizan por poseer un dominio Kunitz, es decir una estructura $\alpha+\beta$ formada por dos hebras β y dos segmentos cortos de α hélice en los extremos del dominio. Este dominio es muy antiguo y está ampliamente distribuido en los organismos metazoarios. Su estructura está estabilizada por la presencia de tres puentes disulfuro entre seis cisteínas conservadas (Figura 14). El lazo de unión a la proteasa (o lazo anti-proteasa) en esta familia de inhibidores se ubica entre el extremo amino terminal y la primera hebra β , en una región carente de estructura secundaria, estabilizada por el puente entre la segunda y la cuarta cisteína (ver también BPTI en la Figura 11).

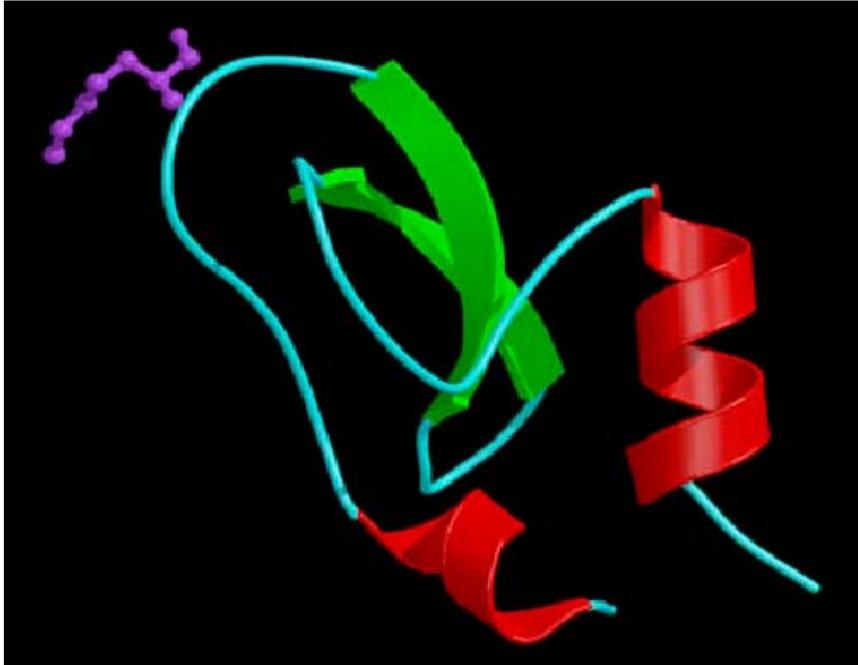


Figura 13. Estructura del BPTI, prototipo de la familia I2. En este esquema se destacan las dos hebras β en color verde, las dos α hélices en color rojo y el residuo lisina en posición P_1 en violeta. No se muestran los tres enlaces disulfuro del dominio. Tomado de [17].

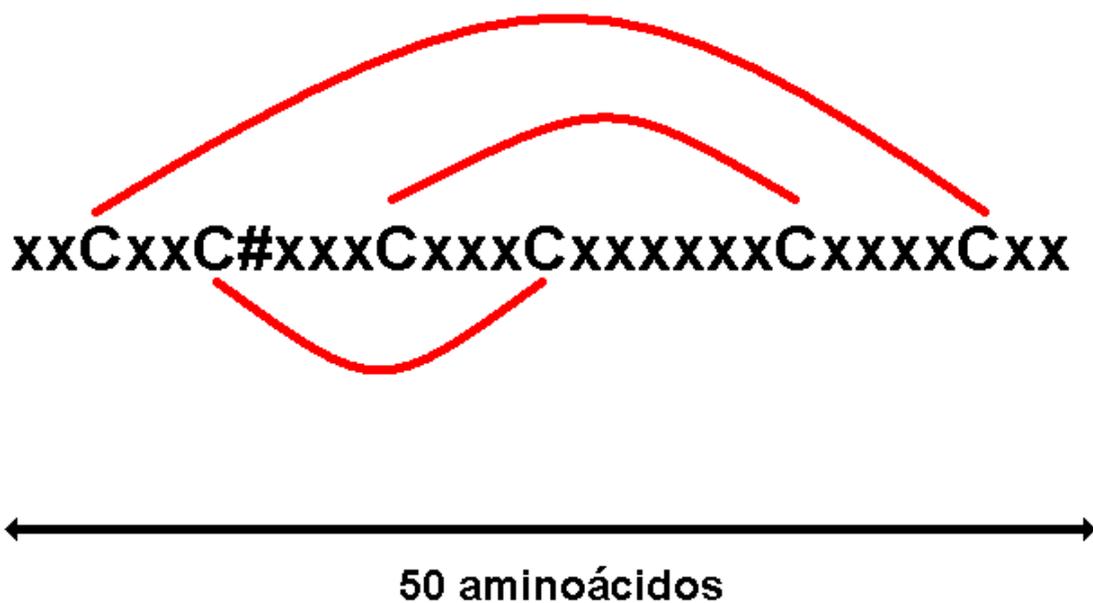


Figura 14. Representación esquemática de la estructura básica de un dominio Kunitz. 'C': cisteínas conservadas formando enlaces disulfuro, '#': Sitio reactivo. En rojo: Puentes disulfuro [18].

1.4 Inhibidores de proteasas como estrategia de defensa de parásitos intestinales

El intestino de los mamíferos se encuentra altamente especializado para la digestión y asimilación de componentes orgánicos degradados en las porciones previas del tubo digestivo. La presencia de enzimas digestivas genera un ambiente exigente para la instalación de parásitos intestinales por lo que estos organismos desarrollan diferentes estrategias para sobrevivir. La aparición y posterior evolución de estas estrategias está condicionada por los cambios que sucedan en dicho ambiente. El hospedero no es inerte a las modificaciones en las defensas del parásito, por lo que ambos evolucionan en una forma paralela y mutuamente dependiente. Esta co-evolución es una de las características más notables de la relación hospedero – parásito. Generalmente se da de una forma desigual ya que los períodos generacionales suelen ser significativamente más cortos en los parásitos que en sus respectivos hospederos.

Existen antecedentes interesantes en el grupo de parásitos gastrointestinales, al cual pertenece el adulto de *E. granulosus*, sobre estrategias que contrarrestan el ambiente nocivo en el cual ocurre la instalación. Estas se basan en la secreción de moléculas capaces de interferir con proteasas de los hospederos, tanto las que están en el sitio donde el parásito se instala, como las que son liberadas por las células del sistema inmune activadas en presencia del parásito. La mayoría de las moléculas que están caracterizadas pertenecen a la familia de las serpinas o son inhibidores canónicos de una familia cuyo prototipo es una proteína de áscaris, un nematodo intestinal (familias I4 e I8, respectivamente, según la clasificación de Rawlings [13]). También se han detectado inhibidores de proteasas de la familia I2 (con dominio Kunitz) en helmintos parásitos como *Ancylostoma* spp. [19], *Haemonchus* spp. y *Echinococcus granulosus*. Es probable que estos inhibidores cumplan un rol en la supervivencia de estos parásitos en el intestino de sus hospederos. El caso de *Echinococcus granulosus* se abordará en la siguiente sección.

1.5 Inhibidores Kunitz en *Echinococcus granulosus*

A partir de un relevamiento del transcriptoma de protoescólex de este cestodo, expuestos a pepsina en medio ácido, condiciones similares a las presentes en el estómago del perro, se identificaron 7 ADNc que corresponden a proteínas cuyas secuencias poseen similitud con inhibidores del tipo Kunitz por lo que fueron denominadas *EgKu-1* a *EgKu-7* [20]. Las proteínas maduras predichas difieren en peso molecular, punto isoeléctrico, y en el residuo de su sitio reactivo por lo que tendrían especificidades distintas si actuaran como inhibidores de proteasas de serina. Una octava proteína tipo Kunitz, *EgKu-8*, fue purificada de protoscólex sin tratar [20] y el ADNc correspondiente clonado. Un análisis de las relaciones filogenéticas entre sus dominios Kunitz permite inferir que *EgKu-1* y *EgKu-4*, *EgKu-3* y *EgKu-8*, *EgKu-6* y *EgKu-7*, se agrupan juntos, lo cual indicaría que son producto de duplicaciones génicas recientes. *EgKu-2* posee un dominio que se aparta de la familia y una extensión en su extremo C-terminal que lo distingue de los otros (Figura 15).

La porción que codifica para el extremo N-terminal de estas proteínas corresponde a un péptido señal, una condición necesaria, pero no suficiente, para ser secretadas al exterior del parásito. Nuestra hipótesis es que estas moléculas serían secretadas por el parásito a la interfase con su hospedero y neutralizarían proteasas presentes en el duodeno. Hasta el momento, hemos detectado a las proteínas *EgKu-3* y *EgKu-8* en productos de secreción de protoescólex [20].



Figura 15. Alineamiento de las 8 proteínas de la familia Kunitz de *E. granulosus* (*EgKu-1*–*EgKu-8*). Se resaltan los aminoácidos conservados, se destacan las seis cisteínas que formarían puentes disulfuro. En amarillo, se indican los residuos en la posición correspondiente al sitio P1 en los inhibidores de proteasas.

```

gtaactcgacctcgcgatcatggtttcgcacactccatgcgctcagtgagcatcattttcctt
- L D L A I M F R T L H A S V S I I F L
gcattctttgtggcctctatgctcaatctaggctactgtcgaggaaaaattagttacatc
A F F V A S M L N L G Y C R G K I S Y I
aaccgatgcaacctaccgattagttctggctgatgtcgaggctactttctccgatatggc
N R C N L P I S S G R C R G Y F L R Y G
tatgattccgaaacggatgaatgccgctcggttcgtttatgggtggatgtcgcggcaacaga
Y D S E T D E C R R F V Y G G C R G N R
aataacttcttcacctacaaggaatgcatgaaaagatgttatctgaggtttaataa
N N F F T Y K E C M K R C Y L R F K -

```

Figura 16. En minúscula: secuencia de ADNc correspondiente a *EgKu-5*. Se aislaron dos clonas, una de una genoteca preparada con ADNc de protoscólex tratados con pepsina en medio ácido (CN 64551¹) y otra de una genoteca de ADNc de protoescólex sin tratar (CN 65837¹). En mayúscula: secuencia aminoacídica traducida a partir de la nucleotídica; se muestra la metionina de iniciación (negrita). En gris: proteína madura (luego del clivaje del péptido señal predicho). En azul: residuo de arginina situado en la posición P₁.

Dentro de este grupo se encuentra la proteína *EgKu-5* la cual será el objeto de estudio de este trabajo. Esta posee un residuo de arginina en la posición que corresponde al sitio P₁ (Figura 16) lo que, en principio, permite predecir que se trata de un inhibidor de alta afinidad de proteasas de serina tipo tripsina. El transcripto correspondiente se aisló también de protoescólex sin tratar con pepsina. La secuencia codificante para *EgKu-5* madura (192 pb) permite predecir los siguientes parámetros fisicoquímicos de la proteína: un peso molecular de unos 7672 Daltons, un punto isoeléctrico de 9.6 y una carga de 9.

¹ Indican los códigos de acceso en la base de datos de ESTs de GenBank (dbEST) de las secuencias de las clonas de ADNc.

2. Objetivos de este trabajo

Un aspecto central en la adaptación parasitaria es el estudio de los fenómenos que ocurren en la interfase entre un parásito y su hospedero y, en particular, de las interacciones entre las moléculas de ambos organismos que, en último término, permiten el establecimiento de un parasitismo exitoso. Además de su importancia básica, el conocimiento de esas moléculas puede contribuir al diseño de estrategias para el control de la parasitosis.

En el marco de la hipótesis de que los inhibidores Kunitz actuarían en la interfase entre *Echinococcus granulosus* y su hospedero definitivo contribuyendo positivamente a la instalación del parásito, nuestro grupo está trabajando en la caracterización de estas moléculas.

En particular, los objetivos de este trabajo fueron: clonar la región codificante para la proteína *EgKu-5* madura, posteriormente, producirla como recombinante en *E.coli* y luego, ensayar su actividad como inhibidora de tripsina.

3. Materiales y Métodos

3.1 Clonado de la secuencia codificante para la proteína *EgKu-5* madura en un vector de expresión procariota

3.1.1 Amplificación por PCR

Se utilizó un protocolo de tipo *touchdown*, comenzando con una temperatura de hibridación que se disminuyó en un grado centígrado por ciclo durante los primeros cinco ciclos. Se eligió esta estrategia de amplificación debido a que se trabajó con moldes complejos: la mayor temperatura de hibridación durante los primeros ciclos, cuando la concentración relativa de molde blanco es baja, aumenta la especificidad de la reacción. Como el producto de reacción sería clonado en un vector de expresión para producir la proteína recombinante, se utilizó la polimerasa VENT, ya que ésta posee capacidad correctora de errores. Se usaron cinco moldes diferentes que estaban disponibles en el laboratorio al iniciarse este trabajo: ADN genómico y ADNc de cuatro materiales de distintos estadios del ciclo de vida de *E.granulosus*: protoscólex sin tratar, protoscólex tratados con pepsina en medio ácido, capa germinativa y adultos inmaduros. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l, en una solución conteniendo 1 mM dNTPs y 0.5 U de VENT ADN polimerasa (New England Biolabs) en el tampón correspondiente [20 mM Tris HCl pH 8.8, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Triton X-100, 10 mM KCl y 10 mM $(NH_4)_2SO_4$]. La concentración de Mg^{2+} en la solución se suplementó a 4 mM cuando el molde era ADNc, y 6 mM cuando era ADN genómico. En todos los casos, se utilizó 1 μ L de molde y 1 μ L de cada uno de los cebadores *forward* y *reverse* de concentración 10 μ M (4 μ M en la mezcla de reacción). El *primer forward* estaba diseñado desde el codón del primer aminoácido de la proteína madura y contenía un sitio de corte para la enzima de restricción *Bam*HI. Por su parte, el *primer reverse* hibridaba desde el codón de terminación y contenía un sitio de corte para *Hind*III (Figura 17). La amplificación se realizó utilizando el programa que se muestra en la Figura 18 en un termociclador PERKIN ELMER (GeneAmp PCR System 2400).

KU5 Forward

Secuencia (5' a 3'): AGGATCC AAA ATT AGT TAC ATC AAC

*Bam*HI K I S Y I N

Longitud: 25 %GC: 32 Tm: 50°C (37)

KU5 Reverse

Secuencia (5' a 3'): AAAGCTTAC TTA TTT AAA CCT CAG ATA ACA

*Hind*III [* K F R L Y C]

Longitud: 29 %GC: 28 Tm: 51°C (40)

Figura17: Secuencia nucleotídica de los *primers forward* y *reverse* utilizados para amplificar la secuencia codificante para *EgKu-5*. Se resaltan las secuencias de corte de *Bam*HI y *Hind*III. También se muestra la secuencia aminoacídica traducida a partir de los *primers* (en el caso del *reverse* se trata de la traducción de la cadena complementaria y * simboliza el codón de finalización); y datos de los *primers*: longitud, porcentaje de GC y temperaturas de desnaturalización (T_m) aproximadas. Estas últimas se calcularon suponiendo que cada G/C aporta 4°C y cada A/T 2°C (T_m (°C)= 4(G/C) + 2 (A/T)). Entre paréntesis aparecen las T_m correspondientes a la parte de los *primers* que hibrida desde el comienzo de la *PCR*, es decir la que no incluye el sitio de restricción.

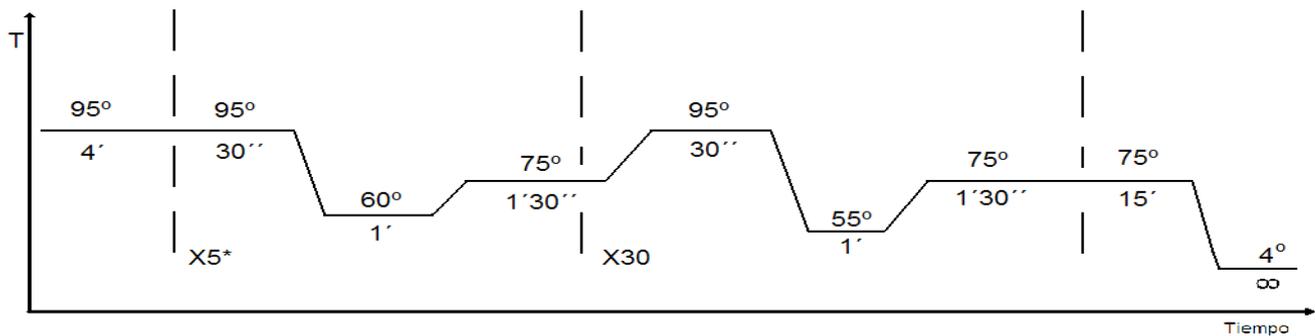


Figura 18: Programa utilizado para la amplificación por *PCR*. Inicialmente, la muestra se desnaturizó a 95 °C durante 4 min. Los primeros cinco ciclos se desarrollaron con una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 30 seg., una temperatura de hibridación de 60 °C, la cual se disminuyó 1 °C por ciclo, durante 1 min. y una temperatura de elongación de 75 °C durante 1.5 min. Los restantes treinta ciclos fueron idénticos al último (95 °C durante 30 seg., 60 °C durante 1 min. y 75 °C durante 1.5 min.). Luego, la muestra fue tratada a 75 °C durante 15 min. para permitir una completa elongación y finalmente, se conservó a 4 °C hasta ser retirada del termociclador.

3.1.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa y purificación de fragmentos de ADN

Las electroforesis de ADN se llevaron a cabo en geles de agarosa al 1% (salvo en el caso del pET- *EgKu-5* en que se usó 0.8%) en buffer TAE [5 g/l Tris base, 1 ml / l ácido acético, 0.05 M EDTA, pH 8.5]. Las muestras se sembraron en el gel luego de ser tratadas con tampón de carga TAE con glicerol y azul de Bromofenol [21]. Todos los geles contenían bromuro de etidio en una concentración $5.0 \cdot 10^{-4}$ mg/ml, aproximadamente. Las corridas se efectuaron en una cuba de electroforesis Mupid, Raduael Co. a un voltaje constante de 100 V. La visualización de las bandas se realizó iluminando los geles con luz ultravioleta [21].

Para la purificación del ADN retenido en los geles de agarosa, se utilizó el *kit* comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). El procedimiento se basa en la disolución de la agarosa a 40 °C en una solución de NaClO_4 . La solución resultante se pasa a través de una membrana de sílica en una columna, la cual retiene moléculas de ADN de un tamaño mayor a 70 pares de bases pero no nucleótidos, enzimas, sales, agarosa, bromuro de etidio u otras impurezas; la

columna se lava con una solución que contiene alcohol para eliminar la agarosa. La muestra se recuperó en 30 μ L de una solución 10 mM Tris-HCl pH 8 y 0.1 mM EDTA.

3.1.3 Adenilación de productos de PCR

El vector *pGem-T Easy* (Promega, Figura 19) que se utilizó para clonar el producto de PCR se encuentra diseñado para ligar secuencias de ADN con adenina en sus extremos 5' como poseen los productos de amplificación cuando se utilizan polimerasas con actividad transferasa terminal como la *Taq*. La ADN polimerasa VENT carece de esa actividad. A fin de ligar el producto de PCR, se procedió por lo tanto al agregado de adenina en sus extremos 5'. Esto se realizó incubando a 70 °C durante 30 min. una solución de 10 μ l que contenía: 7 μ L del producto de PCR extraído del gel de agarosa (aproximadamente unos 7 ng/ μ l ADN), 0.2 mM de dATP, 1U de *Taq* polimerasa (Fermentas) en el tampón correspondiente [10 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonidet P40 y 1.5 mM MgCl₂].

3.1.4 Ligación de productos de PCR al vector de clonado *pGem-T Easy*

La ligación al vector de clonado *pGem-T Easy* (Promega) se realizó en una solución de 10 μ L que contenía: 4 μ L del producto de la adenilación, 1 μ L de *pGem-T Easy* (50 ng/ μ L), 2 mM de ATP y 3 U de ADN ligasa T4 (Promega) en el tampón de reacción [30 mM Tris-HCl pH 7.8, 5% PEG, 20 mM DTT y 20 mM MgCl₂]. La concentración molar de inserto en la mezcla de reacción se estimó en 2 nM mientras que la del plásmido *pGem-T Easy* fue de 2.5 nM. La mezcla se incubó a 16 °C durante 12 horas.

3.1.5 Transformación de *E. coli* con los plásmidos recombinantes

La transformación de la cepa *E. coli* XL1-Blue con *pGem-T Easy* (Figura 19) y pET28 a (+) (Novagen, Figura 20) recombinados con la secuencia codificante para *EgKu-5* se realizó utilizando el método de *shock* térmico [21]. El genotipo de XL1-Blue es: *recA endA1 gyrA96 thi-1 hsd17 supE44 relA1 lac* {F' *proAB*

lacI^f ZΔM15 Tn10 (Tet^r). Las colonias XL1 transformantes se sembraron, en condiciones asépticas, en placas de LB-agar [10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar] que contenían ampicilina (100 µg/ml). Previo a su uso, se esparcieron 20 µL de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) 50 mg/ml y 100 µL de IPTG (isopropil β-tiogalactopiranosido) 100 mM sobre las placas. El reconocimiento de colonias portadoras de plásmidos *pGem-EgKu-5* se realizó mediante la visualización de la ausencia de actividad β-galactosidasa (ver apartado *Mecanismo de α-complementación*).

Por otra parte, la transformación de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3), cuyo genotipo es {B⁻ F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal*, λ(DE3)}, con el plásmido recombinante pET-EgKu-5, se realizó por el mismo método que para la cepa XL-1. Las células tratadas se plaquearon en condiciones asépticas, en placas de LB agar en presencia de kanamicina (30 µg/ml). Información detallada del sistema pET28a (+) se encuentra en el apartado *Descripción del sistema pET*.

3.1.6 Screening rápido de colonias transformadas

A fin de identificar las colonias portadoras de plásmidos recombinantes, se realizó un protocolo de *screening* rápido [21]. Se crecieron presuntas colonias recombinantes en 5 mL de caldo LB con ampicilina (100 µg/ml) durante toda la noche a 37 °C con agitación. Una alícuota de 400 µL de este cultivo se centrifugó, en una centrífuga de mesa (Spectrafuge 16 M, Labnet) a 2000 rpm durante 5 minutos. Se descartaron 200 µL del sobrenadante y las células se resuspendieron en el sobrenadante restante. A dicha solución se le agregó 50 µL de fenol saturado de Tris-HCl a pH 8, se agitó manualmente y se centrifugó a 10000 g durante 2 minutos. Una alícuota de la fase acuosa (5 µL) se corrió en una electroforesis en gel de agarosa.

Mecanismo de α -complementación

El vector de clonado *pGem-T Easy* (Promega), de 3015 pares de bases, incluye un pequeño fragmento del gen de la β galactosidasa (gen *lacZ*) de *E. coli* que contiene secuencias reguladoras y codifica para los primeros 146 aminoácidos de la porción amino terminal de la enzima (fragmento α). Dentro de esta región se encuentra un sitio de clonado múltiple que mantiene el marco de lectura del fragmento α . Este vector se utiliza junto con células hospederas que expresan la porción carboxilo terminal de la β galactosidasa (fragmento ω). Ni el fragmento α que porta el plásmido ni el fragmento ω , codificado en el genoma de la bacteria, son activos por separado sino que se asocian para dar lugar a la enzima activa. Este tipo de mecanismo, donde mutantes con deleciones en el segmento proximal del operador del gen *lacZ* son complementados por mutantes negativos para la β galactosidasa que poseen el segmento proximal del operador intacto, es llamado α -complementación.

Las bacterias transformadas no recombinantes *lac*⁺ resultantes son fácilmente reconocibles porque forman colonias azules en presencia del cromógeno X-Gal. Este último es sustrato de β galactosidasa y genera un producto azul al ser hidrolizado por la enzima. Habitualmente, la inserción de un fragmento en el sitio de clonado del plásmido impide esta α -complementación al producir un fragmento α inactivo. De esta forma, las bacterias transformadas con plásmidos recombinantes forman colonias blancas en presencia de X-gal.

La expresión del fragmento ω se encuentra regulada por el represor lac el cual puede ser desplazado por una molécula de IPTG. De este modo la presencia de IPTG es necesaria para que se de la α -complementación.

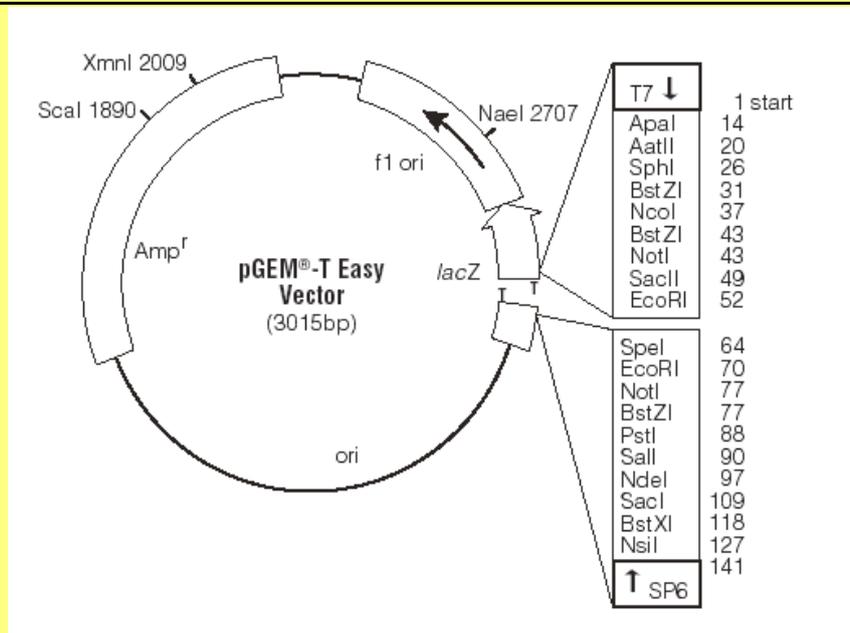


Figura 19. Estructura del plásmido *pGem-T Easy*. Se muestra el sitio múltiple de clonado, la posición de las secuencias blanco de enzimas restricción a partir del sitio de unión de la polimerasa T7, la región codificante para el fragmento α (*lacZ*), los orígenes de replicación y la secuencia que confiere resistencia a la ampicilina. Cabe destacar que este plásmido no posee sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III utilizadas en este trabajo para recuperar el fragmento clonado.

3.1.7 Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico de bacterias transformadas se realizó utilizando el *kit* comercial Plasmid Mini Kit (Qiagen). La misma se basa en el procedimiento de la lisis alcalina [21]; para la purificación del plásmido se utiliza una matriz de sílica montada en una columna como la que se usó para recuperar el ADN luego de su extracción de geles de agarosa (ver sección 3.1.2). Las bacterias (*E.coli* de la cepa XL-1) de un cultivo de 5 ml se lisaron en una solución conteniendo 200 mM NaOH y 1% de SDS y se centrifugaron. El lisado se pasó a través de la columna de sílica, la cual se lavó para luego recuperar la muestra en aproximadamente 10 μ L de 10 mM Tris-HCl pH 8 y 0.1 mM EDTA.

3.1.8 Clonado direccional de *EgKu-5* en el vector de expresión pET28a (+)

En una primera etapa, se recuperó la secuencia codificante para *EgKu-5* del plásmido *pGem-EgKu-5* con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (ambas de Fermentas). La digestión se realizó en un volumen final de 30 μ L con 20 U de *Hind*III y 15 U de *Bam*HI, en buffer de *Bam*HI [10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mg/ml BSA, 0.02 % Triton X-100, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl]. La elección de la solución tampón se basó en la actividad de cada enzima en el tampón recomendado para la otra. *Bam*HI presenta menor actividad en la solución buffer recomendada para *Hind*III que a la inversa. Se utilizaron 18 μ L de una preparación de plásmido obtenido como se describió en 3.1.7. La masa de plásmido recombinante en la mezcla de digestión se estimó en 1.8 μ g. La digestión se realizó a 37 °C durante toda la noche. El total de la digestión se corrió en un gel de agarosa y se purificó el fragmento liberado.

A continuación, se realizó la ligación del fragmento recuperado luego de la digestión al vector de expresión pET 28a(+) cortado con *Bam*HI y *Hind*III y desfosforilado para impedir su religación (cedido gentilmente por la Dra. Silvia González). La reacción se realizó en 20 μ L de una solución que contenía 2 U de ligasa T4 (Fermentas) en buffer de reacción [40 mM Tris-HCl pH 7.8, 10 mM

MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP], 15 µL de la solución del fragmento recuperado del gel y 1 µl de pET 28a(+) (50 ng/µL aproximadamente) a 16 °C durante toda la noche. Las concentraciones de inserto y plásmido en esta reacción se estimaron en 30 nM y 0.014 pM, respectivamente. Con el producto de la ligación se transformaron *E.coli* XL-1 Blue y se plaquearon como se describió en 3.1.5.

3.1.9 Secuenciación del plásmido pET-EgKu-5

Se obtuvo una minipreparación de plásmido pET-EgKu-5 utilizando el método de la lisis alcalina [21] con soluciones preparadas en el laboratorio. Se centrifugó un cultivo (10 mL) de *E.coli* XL-1 recombinantes, crecido a 37 °C durante toda la noche, a máxima velocidad durante 30 segundos. Se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 100 µL de una solución 25 mM Tris-HCl pH 8.0 conteniendo 50 mM de glucosa y 10 mM de EDTA. A esta solución se le agregó 200 µl de solución de lisis [0.2 N NaOH, 1% SDS], y luego de mezclar por inversión, 150 µL de una solución de acetato de potasio (5 M en acetato y 3 M en potasio) pH 4.5. La solución resultante se mezcló por inversión varias veces para luego mantenerse en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó durante 5 minutos a 12000 rpm y luego el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio donde se agregó 800 µl de etanol 100 % mezclándose por inversión. Se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 12000 rpm y se lavó el precipitado con 500 µL de etanol 75%. Luego de centrifugar brevemente se dejó secar el precipitado para luego resuspenderse en 50 µL de agua; 10 µL de esta minipreparación fueron enviados para ser secuenciados.

El plásmido recombinante fue secuenciado en el Institut Pasteur de Montevideo, utilizando el *primer* T7. Este hibrida flanqueando el sitio de clonado múltiple, a unos 180 nucleótidos del sitio de corte para *Bam*HI. El cromatograma se visualizó con el software BioEdit (Ibis Biosciences, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit>). El análisis de la secuencia se realizó utilizando las herramientas informáticas disponibles en EXPASY [<http://ca.expasy.org/>].

3.2 Producción y análisis de EgKu-5 recombinante

3.2.1 Análisis de la expresión de EgKu-5 recombinante

Se preparó un precultivo con colonias frescas de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con pET-EgKu5 en 2 mL de caldo LB con kanamicina (30 µg/ml). El precultivo fue incubado durante toda la noche a 37 °C. Una alícuota (200 µL) se agregó a 5 mL de LB-kanamicina, y se incubó a 37 °C con agitación (200 rpm) en un incubador orbital (Gallenkamp) hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0.5 a 0.7. Luego se agregó IPTG hasta una concentración final 1mM y se incubó durante 4 horas en las mismas condiciones. Una alícuota del cultivo resultante (1 mL) se centrifugó durante 8 minutos a 1000 g. Las células obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (ver sección 3.2.5)

La información detallada acerca de la inducción del plásmido pET 28 a(+) se encuentra en el apartado *Plásmidos de expresión de la serie pET*.

3.2.2 Producción de EgKu-5 recombinante

Para la producción de EgKu-5 recombinante se partió de cultivos de 200 ml inoculados directamente con colonias frescas, preparados como se describió en 3.2.1. Pasadas 4 horas de la inducción, el cultivo obtenido se sometió a diferentes tratamientos (3.2.3 - 3.2.4) con el fin de purificar EgKu-5.

Plásmidos de expresión de la serie pET

El sistema de expresión pET está diseñado con el fin de producir grandes cantidades de proteína recombinante dentro de una célula anfitriona. Fue desarrollado en 1986 por W. F. Studier y B. A. Moffatt, quienes crearon inicialmente un sistema de expresión de polimerasas de ARN sumamente selectivo para la polimerasa del bacteriófago T7. Es extensamente utilizado por ser de fácil manipulación y porque permite un alto nivel de producción de proteína recombinante. Se basa en la transformación de huéspedes de expresión, generalmente cepas de *E. coli* que contienen una copia cromosómica de la ARN polimerasa de T7 bajo control del operón lacUV45, con plásmidos pET recombinantes. En condiciones normales el operón lacUV45 se encuentra inhibido por el represor lac, el cual puede ser desplazado por una molécula de IPTG. Tanto la expresión del gen de la ARN polimerasa de T7 como la del gen recombinante se encuentran controladas por el operón lacUV45, por lo que el IPTG es necesario para activar la transcripción de los dos genes (Figura 21). La presencia de la ARN polimerasa de T7 es necesaria para la expresión de la secuencia recombinante ya que su promotor no es reconocido por las ARN polimerasas de la célula anfitriona. Cuando dichas células son tratadas con IPTG aumenta la expresión de la proteína recombinante hasta convertirse en alrededor del 50 % del total de las proteínas expresadas por la célula debido a la alta afinidad de la ARN polimerasa de T7 por su promotor.

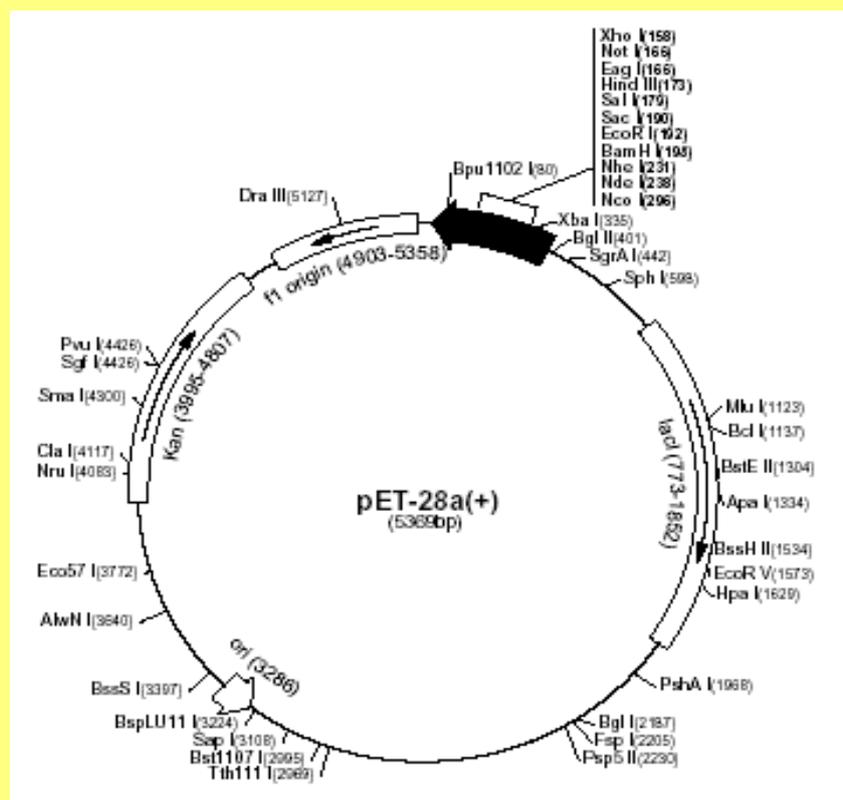


Figura 20. Estructura del plásmido pET 28(a) +. Se muestran los sitios blanco para las enzimas de restricción, el sitio de clonado múltiple, el sitio de duplicación y del gen que le confiere resistencia al antibiótico kanamicina, entre otras.

La capacidad de una expresión controlada ofrece la ventaja a este sistema de no causar inestabilidad al plásmido debido a la producción de proteínas potencialmente tóxicas para la célula hospedera.

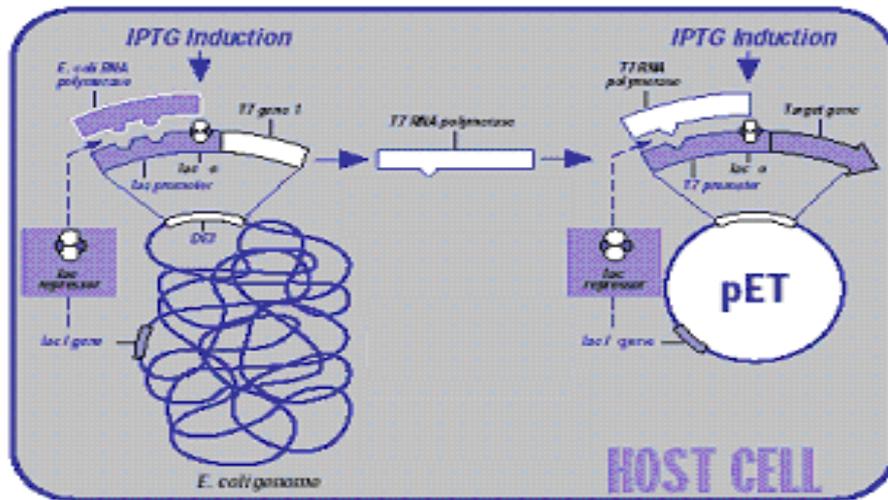


Figura 21. Esquema del funcionamiento de la inducción de la expresión de proteínas recombinantes en los vectores de expresión de la serie pET. La presencia de IPTG en una célula anfitriona induce la síntesis de ARN polimerasa de T7; esta posee alta afinidad por su promotor en el plásmido pET generando gran cantidad de transcrito de la secuencia recombinante.

Al igual que muchos sistemas de expresión, el pET ofrece la opción de agregar colas de fusión a la proteína recombinante. Estas pueden variar en su tamaño, composición y función; generalmente se utilizan para la cuantificación y/o la purificación de la proteína recombinante.

3.2.3 Purificación de *EgKu-5* recombinante por cromatografía de afinidad en condiciones desnaturizantes

La purificación de la proteína en condiciones desnaturizantes se realizó utilizando urea como agente caotrópico. Un cultivo inducido (ver sección 3.2.2) se centrifugó en una centrífuga SIGMA 3K18 a 4000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. Las células se resuspendieron en 10 ml de buffer de lisis [100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl y 8 M urea pH 8]. El lisado se centrifugó durante 15 minutos a 20000 g en una centrífuga SIGMA 2K15; el sobrenadante obtenido se incubó con la matriz de afinidad de Ni-NTA Agarosa (Invitrogen) durante 1 hora a 4 °C con agitación suave (ver el apartado *Purificación de proteínas recombinantes con cola de poli-histidina*). Posteriormente, se empaquetó una columna cromatográfica y se lavó extensamente con solución de lavado [10 mM Tris-HCl pH 6.3, 100 mM NaH₂PO₄, 8 M urea]. La elución se realizó en dos etapas mediante variación del pH, utilizando tampones de igual composición ajustados a pH más ácido, inicialmente a pH 5.9 y luego a pH 4.5,

recogiéndose en cada caso 5 fracciones de 0.5 ml. El perfil de la elución se analizó por SDS-PAGE (ver sección 3.2.5); las fracciones que contenían *EgKu*-5 se reunieron y se pasaron por una columna cromatográfica de exclusión molecular (NAP 10, General Electric) siguiendo las recomendaciones del fabricante, con la finalidad de eliminar el exceso de urea. La matriz de esta columna separa moléculas mayores a 5000 Daltons de menores de 1000 Daltons.

Purificación de proteínas recombinantes con cola de poli-histidina

La purificación de proteínas recombinantes con cola de poli-histidina se basa en la gran afinidad de la matriz de Ni-NTA por péptidos ricos en repetidos de histidina.

La matriz de Ni-NTA está compuesta por agarosa unida a ácido nitrilotriacético, el cual posee un grupo quelante tetradentado que ocupa cuatro de los seis sitios de la esfera de coordinación de un catión de níquel (Ni^{2+}). Los sitios de coordinación libres pueden ser ocupados por grupos como el imidazol. Esto permite que la matriz una fuertemente péptidos a través de residuos de histidina consecutivos (Figura 22).

La unión de proteínas recombinantes con cola 6xHis es muy fuerte, lo que permite lograr altos niveles de pureza y mayor cantidad de proteína que otros sistemas de purificación. Las proteínas retenidas en la matriz son eluidas mediante el agregado de concentraciones crecientes de imidazol o acidificando el medio.

A diferencia de lo que ocurre con otros sistemas de afinidad, la interacción de la matriz de Ni-NTA con proteínas con cola 6xHis no depende de su conformación tridimensional, por lo que puede ser utilizada para purificaciones tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes.

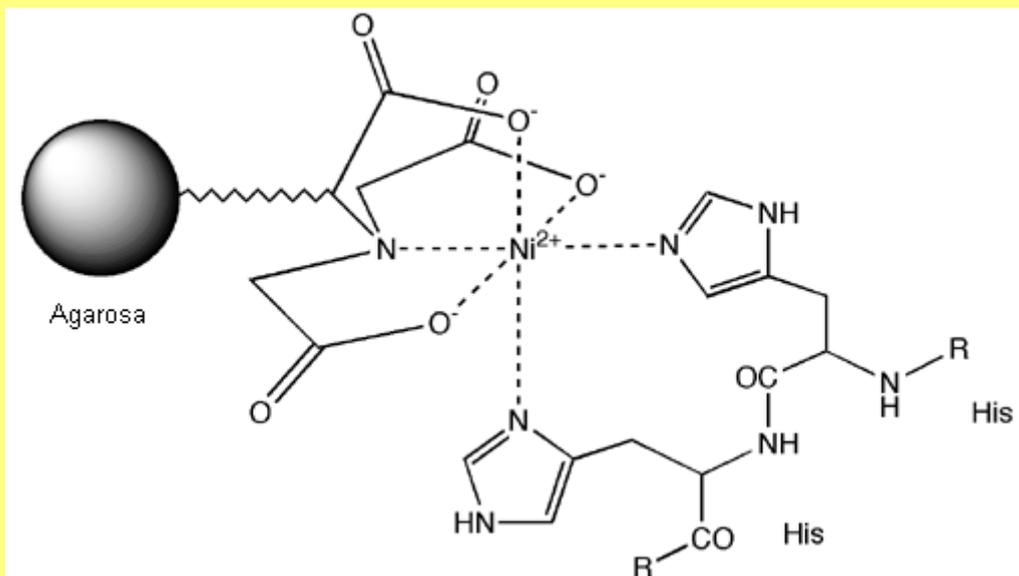


Figura 22. Esquema de la interacción entre la matriz Ni-NTA y los grupos imidazol de dos residuos consecutivos de histidina.

3.2.4 Solubilización de EgKu-5 recombinante de cuerpos de inclusión y su posterior renaturalización

Un cultivo inducido (ver sección 3.2.2) se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos; las células se lisaron y el lisado se centrifugó como se describió en 3.2.3. El residuo obtenido se trató en base al protocolo de Amy E. Schmidt et al. [22]. Se resuspendió en una solución conteniendo 10 mM de Tris-HCl pH 7.5, Nonidet P-40 al 3% y 1 mM de EDTA y se sonicó a baja intensidad con un sonicador Ultrasonic Homogeneizer 4710 Series. Los cuerpos de inclusión se recogieron por centrifugación a 20000 g durante 15 minutos y se lavaron 2 veces con agua centrifugando luego de cada lavado. Posteriormente, se solubilizaron por tratamiento con 5 ml de solución 50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM β -mercaptoetanol, 8 M Urea y 0.5 M NaCl para luego ser incubados a 4 °C durante 12 horas.

La solución resultante se centrifugó a 20000 g durante 30 minutos y se filtró a través de una membrana de teflón de 0.2 μ m (PTFE, Whatman). La solución filtrada se aplicó en una columna de 0.5 mL de Ni-NTA agarosa equilibrada con un buffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 6 M urea, 0.5 M NaCl y 10 mM β -mercaptoetanol. Luego, la columna se lavó con 5 ml de una solución 50 mM Tris-HCl pH 8, 6 M urea, 0.5 NaCl, 10 mM β -mercaptoetanol y 25 mM imidazol y posteriormente se eluyó con 5 ml del mismo buffer conteniendo 500 mM imidazol. Luego, la proteína en la fracción eluida se diluyó hasta una concentración de 0.5 mg/ml, se trató con DTT (Ditiotreitol) hasta alcanzar una concentración 50 mM y se incubó durante 12 horas a 4 °C. Luego, se dializó extensamente contra 20 volúmenes de buffer 50 mM Tris-HCl pH 9, 6 M Urea y 0.02 % azida de sodio durante 12 horas a 4 °C. La renaturalización se realizó por diálisis contra 50 mM Tris-HCl pH 9, 0.3 M NaCl, 2 M Urea, 0.02% azida de sodio, 2.5 mM glutation reducido y 0.5 mM glutation oxidado durante 48 horas a 4 °C y finalmente contra varios cambios de 50 mM Tris-HCl pH 9. Luego de la diálisis la solución se filtró nuevamente a través de un filtro de teflón de 0.2 μ m.

3.2.5 Análisis por SDS-PAGE

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio) fueron realizadas siguiendo el protocolo convencional de Laemmli [23] utilizando un gel concentrador de acrilamida al 5% (p/v) y un gel separador de 12% (p/v) de acrilamida. Las muestras se trataron con un volumen igual de tampón de muestra [Tris-HCl 0.06 M pH 6.8, glicerol 10% (v/v), SDS 2% (p/v), azul de bromofenol 0.001 % (p/v)] y se corrieron siempre reducidas. Para ello, se agregó DTT hasta una concentración final en la muestra de 0.05 M. Las muestras se hirvieron, previo a la electroforesis, durante 5 minutos en un baño de agua. Las electroforesis se realizaron en una cuba Bio-Rad Mini Protean III, a un amperaje constante de 40 mA, en buffer Tris-glicina [Tris 0.3% (p/v), glicina 1.44% (p/v), SDS 0.1% (p/v)]. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 por inmersión en una solución del colorante [0.1% (p/v) en solución fijadora: metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v)] y se destiñeron con solución de ácido acético 10% (v/v) durante toda la noche.

3.2.6 Cuantificación de proteínas

Se siguió el método de Bradford, el cual utiliza colorante Coomassie Blue G-250 como reactivo. La técnica se basa en el cambio de longitud de onda del máximo de absorción del Coomassie Blue G-250 libre (465 nm) al unirse a proteínas (595 nm). En las condiciones ensayadas, el límite de detección de esta técnica es cercano a los 50 µg/µl.

Como estándar se utilizó una solución de seroalbúmina bovina (BSA) con la que se realizó una curva de calibración. Las medidas se realizaron por duplicado, en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. La solución de reacción contenía 250 µL de reactivo de Bradford [0.1 mg/ml Coomassie Blue, 5% (v/v) etanol, 8.5 % (m/v) ácido fosfórico] y 5 µL de solución de proteína. La reacción se dejó transcurrir durante 5 minutos a temperatura ambiente, y luego

se midió la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas Titertek Multiskan MS (Labsystems).

3.3 Estudio de la capacidad inhibidora de proteasas de *EgKu-5* recombinante

3.3.1 Ensayos de inhibición de tripsina

Los ensayos de inhibición de tripsina bovina (Sigma) se llevaron a cabo a pH 8 y 37 °C; condiciones óptimas de reacción de la tripsina. La enzima utilizada había sido previamente titulada con BPTI por el Lic. Martín Fló. Tanto las soluciones de la enzima, como del sustrato y *EgKu-5* recombinante fueron preparadas en Tris-HCl 50 mM pH 8.0 conteniendo 0.01% de Tritón X-100.

Se examinó la actividad inhibidora registrando la hidrólisis del sustrato Ile-Glu-Gly-Arg-AMC (Sigma) por parte de la enzima en función del tiempo, a diferentes concentraciones de *EgKu-5*. La hidrólisis del sustrato por la tripsina libera el fluoróforo AMC (aminometil cumarina) lo que permite correlacionar la modificación en el tiempo de la intensidad de fluorescencia con la actividad proteolítica de la tripsina. El K_M de la enzima por este sustrato (85 μ M) había sido determinado previamente en el laboratorio. Previo al agregado del sustrato, se incubó la tripsina con *EgKu-5* recombinante durante 15 minutos a 37 °C para permitir la formación del complejo enzima-inhibidor, dado que los inhibidores Kunitz son lentos. Durante los experimentos la concentración de sustrato (5 μ M) se mantuvo siempre mayor que la de enzima (0.3 nM), condición saturante o de velocidad inicial de Michaelis-Menten. Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas negras para fluorimetría de 96 pocillos (Costar, Corning Life Sciences). Todas las medidas fueron realizadas por duplicado en un volumen final de 200 μ L y los cambios de intensidad de fluorescencia, medidos a una longitud de onda de excitación de 390 nm y una de emisión de 460 nm, fueron registrados en un fluorímetro de placas (FLUOstar* OPTIMA, BMG Labtechnologies).

3.3.2 Titulación de inhibidor activo

La concentración de *EgKu-5* activo se analizó mediante un experimento de titulación con tripsina variando la concentración de enzima y manteniendo las de sustrato e inhibidor constantes. Se trabajó con concentraciones de tripsina en el rango de 0.30 – 4.00 nM, mientras que la concentración de sustrato fue siempre 5 μ M (condición saturante). Todas las medidas se realizaron por duplicado, en un volumen final de 200 μ L. y se incubó la tripsina con 50 μ L de la solución obtenida en 3.2.4 durante 15 minutos a 37 °C previo al agregado del sustrato.

3.3.3 Tratamiento de datos

A partir de las medidas intensidad de fluorescencia obtenidas en la titulación de *EgKu-5* activo se calculó la velocidad inicial de hidrólisis del sustrato por parte de la tripsina. A fin de estimar el valor de $K_{I\ app}^*$, se ajustaron los valores de velocidad inicial en presencia de inhibidor (v_i) obtenidos a la ecuación de Morrison para inhibidores de alta afinidad [24]:

$$v_i = \frac{v_o}{2[E]} \left\{ ([E] - [I] - K_{I\ app}^*) + \sqrt{([I] + K_{I\ app}^* - [E])^2 - 4 K_{I\ app}^* [E]} \right\}$$

donde [E], [S] e [I] son las concentraciones de enzima, sustrato e inhibidor, respectivamente. V_o es la velocidad inicial en ausencia del inhibidor mientras que el parámetro $K_{I\ app}^*$ es la constante aparente de inhibición global que, una vez corregida por la concentración del sustrato, da una estimación de la constante de inhibición global, K_I^* :

$$K_I^* = \frac{K_{I\ app}^*}{1 + \frac{[S]}{K_M}}$$

Como se trabajó con más de una concentración de enzima, y por lo tanto con más de un valor de v_o , se tuvo en cuenta la ecuación de Michaelis-Menten:

$$v_o = \frac{V_{M\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} = \frac{k_{Cat} [E][S]}{K_M + [S]}$$

donde $V_{M\acute{a}x}$ es la velocidad de hidrólisis máxima que es capaz de alcanzar la enzima, K_M es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración de sustrato a la que se alcanza la mitad de la velocidad máxima ($K_M = V_{M\acute{a}x} / 2$), y $[E]$, $[S]$ e $[I]$ son las concentraciones de enzima, sustrato e inhibidor, respectivamente. k_{Cat} es el número de recambio de la enzima, es decir, el número de moles de sustrato transformados por minuto por mol de subunidad catalítica, siendo el inverso de éste el tiempo que requiere la catálisis (en este caso la hidrólisis) de una molécula de sustrato por parte de una molécula de enzima. De esta forma, v_o es directamente proporcional a $[E]$. Sustituyendo v_o en la ecuación de Morrison, ésta queda definida como:

$$v_i = \frac{k_{Cat} [S]}{2(K_M + [S])} \left\{ ([E] - [I] - K_1^* app) + \sqrt{([I] + K_1^* app - [E])^2 - 4 K_1^* app [E]} \right\}$$

mostrando que v_i es dependiente únicamente de $[E]$ a $[S]$ y $[I]$ constantes.

Para el tratamiento de los datos se utilizaron los programas Excel 2003 (Microsoft) y Origin 6.0 (Origin Lab).

4. Resultados

4.1 Clonado de la secuencia codificante para *EgKu-5* en un vector de expresión

4.1.1 Amplificación de la secuencia codificante para *EgKu-5*

A fin de expresar *EgKu-5* en el sistema pET se procedió a clonar direccionalmente entre los sitios *Bam*HI y *Hind*III del plásmido pET 28 a(+) la secuencia codificante para la proteína madura (ver sección 3.1.1).

Para la amplificación por *PCR* se utilizó como molde ADNc de protoescólex sin tratar y de protoescólex tratados con pepsina en medio ácido, estadios en los cuales se ha constatado la presencia del transcripto de *EgKu-5* (ver Figura 16). Con motivo de investigar la expresión de *EgKu-5* en estadios diferentes, se utilizaron también como moldes ADNc de individuos adultos inmaduros y de la capa germinativa de la larva de *E. granulosus*. Se realizó además la amplificación utilizando ADN genómico de *E. granulosus*; en principio, este molde también era adecuado ya que buscábamos expresar *EgKu-5* madura y, habitualmente, los genes de las proteínas con un único dominio Kunitz están constituidos por dos exones, uno de los cuales codifica para el péptido señal y el otro para el dominio Kunitz.

Los productos de dicha amplificación, analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se muestran en la Figura 23. En esta se observa una única banda para los moldes: ADN genómico, ADNc de protoescólex sin tratar y de protoescólex tratados con pepsina en medio ácido. El tamaño de la banda corresponde, en todos los casos, al esperado para la secuencia codificante para *EgKu-5* madura, cercano a los 200 pares de bases (Figura 16). En los carriles 2 y 4 se aprecian productos de menos de 100 pares de bases que podrían corresponder a multímeros de los *primers* utilizados.

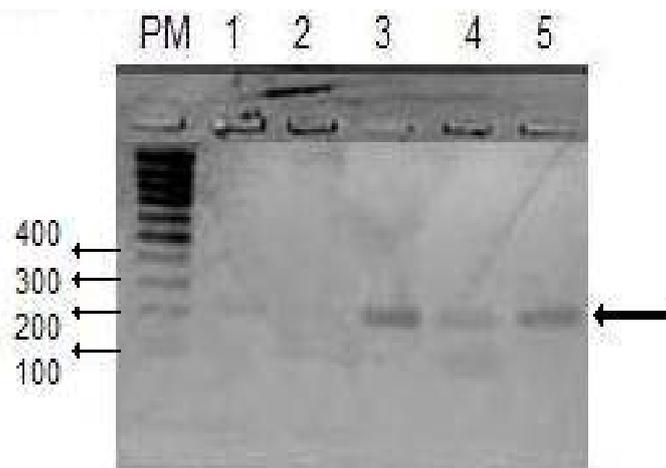


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos amplificados por PCR utilizando *primers* específicos para la secuencia codificante para *EgKu-5* madura.

Los carriles numerados corresponden a los moldes utilizados: 1) ADNc de individuos adultos inmaduros, 2) ADNc de capa germinativa, 3) ADN genómico, 4) ADNc de protoscólex sin tratar y 5) ADNc de protoscólex tratados con pepsina en medio ácido. La banda que posee el tamaño esperado para el producto se encuentra señalada con una flecha. El carril PM corresponde al marcador de peso molecular O'Gene Ruler 100 bp. DNA Ladder (Fermentas).

La reacción que mostró mayor rendimiento fue la realizada con ADN genómico. Comparando la intensidad de la banda obtenida con la de 400 pares de bases del marcador de peso molecular (30 ng de ADN) se estimó que contenía unos 30 ng de producto. Se extrajo esta banda del gel de agarosa y el producto se ligó al vector de clonado *pGem-T Easy*.

4.1.2 Clonado de *EgKu-5* en el vector *pGem-T Easy*

Se transformaron *E.coli* de la cepa XL-1 con el producto de la ligación de la secuencia codificante para *EgKu-5* a *pGem-T Easy*. Se realizó un *screening* rápido de las colonias transformadas con la finalidad de confirmar qué colonias blancas eran efectivamente recombinantes (Figura 24). La banda correspondiente al plásmido se puede identificar al comparar las muestras de los carriles 1-13, las cuales poseen el plásmido, con el carril 14 que no lo posee. Esta banda presentó una movilidad electroforética menor (es decir corresponde a un plásmido de mayor tamaño) en las muestras sembradas en los carriles 4 al 13 que en las de los carriles 1 al 3, indicando que las primeras eran recombinantes.

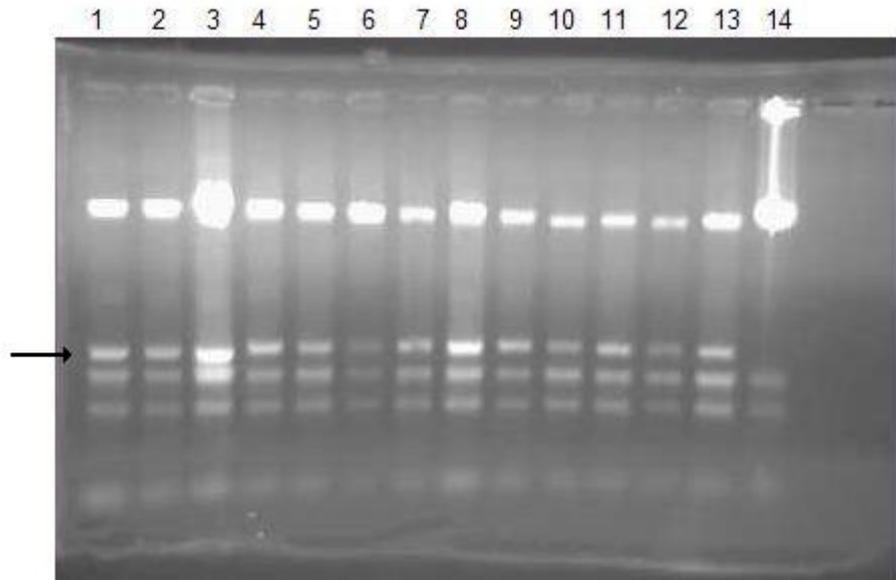


Figura 24. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del *screening* de colonias transformadas con el plásmido pGem-EgKu-5. El análisis del gel muestra que se sembró en los carriles 1 al 3 colonias transformadas con el plásmido no recombinado y en 4 al 13 colonias recombinantes; 14 colonia de *E.coli* XL-1 no transformada. La banda correspondiente al plásmido se indica con una flecha.

4.1.3 Clonado de *EgKu-5* en el vector de expresión pET 28 a(+)

El fragmento de la secuencia codificante para *EgKu-5* madura se recuperó del plásmido recombinante mediante digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. El producto de la digestión se corrió en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (datos no mostrados). La banda correspondiente al inserto se extrajo del gel y se ligó al vector de expresión pET 28 a(+), previamente digerido con *Bam*HI y *Hind*III y desfosforilado. Con el producto de esta ligación, se transformaron *E.coli* competentes de la cepa XL-1. Se realizó un *screening* rápido de las colonias transformadas. El resultado de este análisis se muestra en la Figura 25. En los carriles 5, 6 y 7 se observa que la banda correspondiente al plásmido migró una distancia similar al pET sin inserto (carril 4), en tanto en los carriles 1, 2 y 3 migró una distancia menor. De aquí se deduce que estas últimas colonias poseen plásmidos recombinantes.

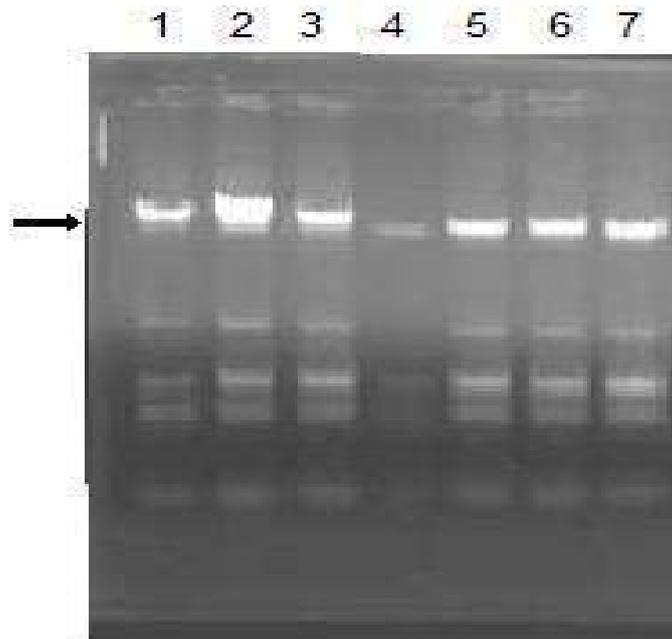


Figura 25. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del *screening* rápido de colonias *E.coli* XL-1 transformadas con pET-*EgKu*-5. La flecha señala la banda correspondiente al plásmido pET. El análisis indica que las muestras sembradas en los carriles 1 al 3 corresponden a colonias recombinantes mientras que las de los carriles 5 al 7 a colonias que no lo son. En el carril 4 se sembró una alícuota de plásmido no recombinante.

Con la finalidad de confirmar la presencia de inserto en estos plásmidos, se realizó una amplificación por *PCR* de minipreparados obtenidos a partir de colonias recombinantes, utilizando los cebadores *KU5 forward* y *KU5 reverse* (Figura 17). Los productos de *PCR* fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; en la Figura 26 se muestra el producto de una de estas reacciones. Se observó, en ambos casos, una banda de un tamaño aproximado a los 200 pares de bases, similar al de la secuencia codificante para *EgKu*-5 indicando que estos plásmidos eran recombinantes.

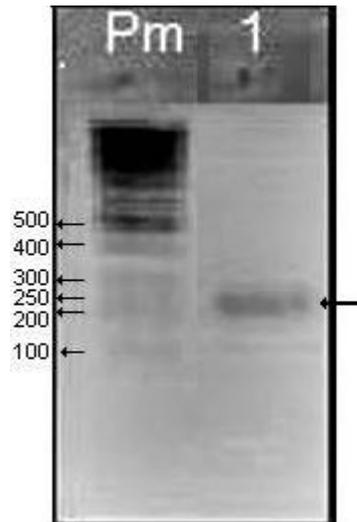


Figura 26. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de la *PCR* de pET obtenido de una colonia presuntamente recombinante utilizando los *primers* KU5 *forward* y KU5 *reverse*. Carriles: Pm) Marcador de peso molecular GeneRuler 50 bp Ladder (Fermentas), 1) Producto de *PCR* del preparado de pET obtenido de la colonia. La banda perteneciente al inserto clonado se señala con una flecha.

4.1.4 Secuenciación del plásmido pET- *EgKu-5*

Se verificó por secuenciación que se había clonado correctamente la secuencia codificante para *EgKu-5* madura en pET. En la Figura 27 se muestra la secuencia amonoacídica deducida que coincide con la esperada para *EgKu-5* recombinante. Esta posee 97 aminoácidos y los siguientes parámetros fisicoquímicos teóricos: un peso molecular de 11220 Daltons; un punto isoeléctrico de 9.86; una carga de 9 y un coeficiente de absortividad a 280 nm, asumiendo que todas las cisteínas forman puentes disulfuro, de 0.937.

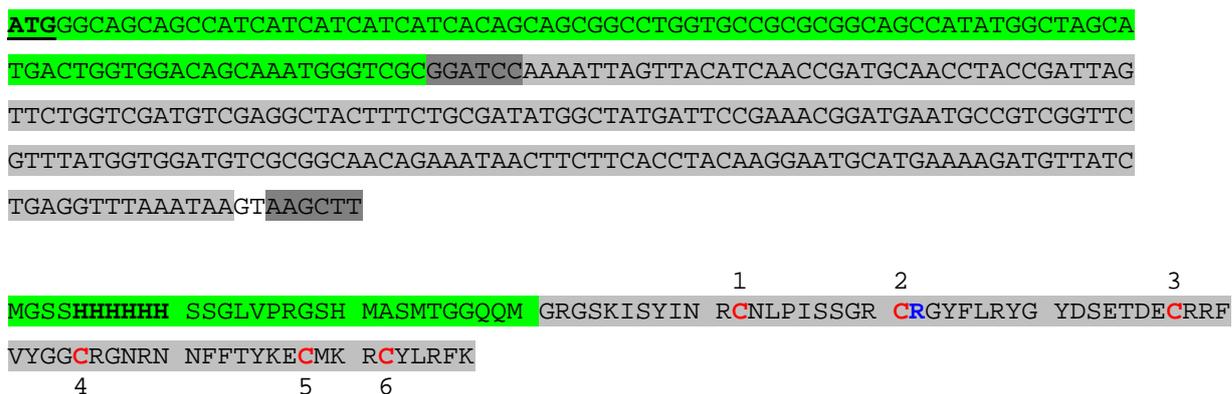


Figura 27. Arriba: Secuencia nucleotídica de *EgKu-5* recombinante en pET28a (+). Se muestra subrayado el codón de la metionina de iniciación del vector y se resalta: en verde; la porción correspondiente al vector; en gris claro, la secuencia codificante para *EgKu-5* madura y en gris oscuro, las secuencias de corte de las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III. Abajo: Secuencia aminoacídica de *EgKu-5* recombinante deducida a partir de la secuencia nucleotídica. Resaltada en gris, se muestra la secuencia de *EgKu-5* madura y, en verde, la secuencia del plásmido que se expresa fusionada al extremo N-terminal de *EgKu-5*. Se muestra también: en negrita, las seis histidinas en tándem; en rojo y numeradas, las cisteínas que forman enlaces disulfuros (en un dominio Kunitz plegado correctamente los enlaces que se forman son 1-6, 2-4 y 3-5). En azul, el residuo de arginina que correspondería a la posición P1 en un inhibidor de proteasas.

4.2 Producción y análisis de *EgKu-5* recombinante

4.2.1 Expresión de *EgKu-5*

Se transformaron *E.coli* de la cepa BL21 con el plásmido recombinante pET-*EgKu-5* (Ver sección 3.1.5) y se indujo la expresión de *EgKu-5* cultivando las colonias transformadas en presencia de IPTG (Ver sección 3.2.1).

Se analizó por SDS-PAGE el perfil de proteínas de las células transformadas, antes y después de la inducción de la expresión de *EgKu-5* (Figura 28). Al comparar el carril 1 de la Figura 28 con los carriles 2 y 3 se observa la aparición de una banda intensa, de un tamaño mayor al del BPTI (aproximadamente 6.5 kDa) luego de la inducción con IPTG, la cual corresponde a *EgKu-5*.

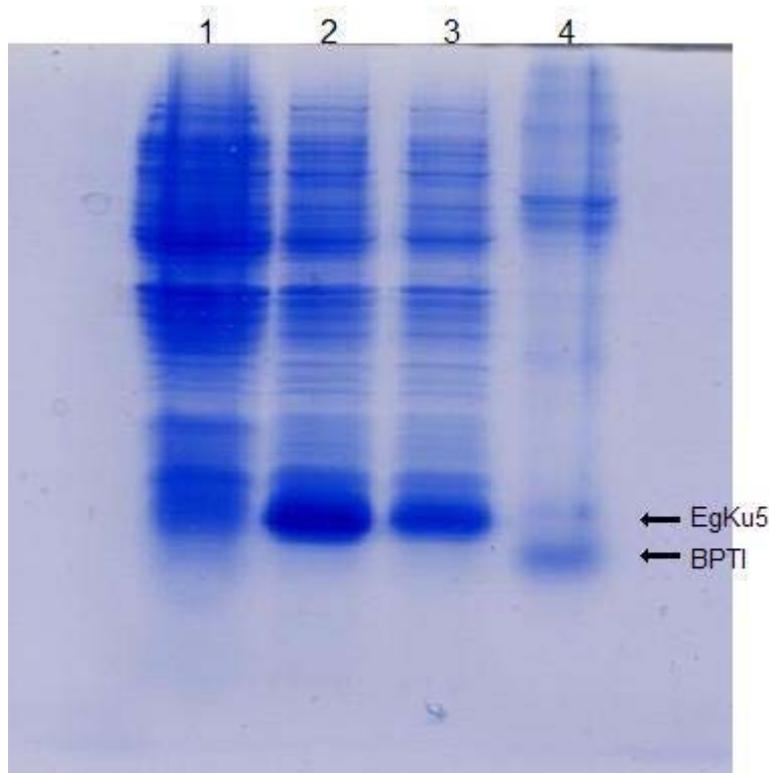


Figura 28 Análisis por SDS-PAGE al 12% de extractos de cultivos de *E.coli* de la cepa BL21 transformadas con el plásmido pET-*EgKu-5*. Las células de un mililitro de cultivo se lisaron en 500 μ L de buffer de muestra. Luego se hirieron durante 5 minutos y 15 μ L de la solución resultante se sembraron en cada carril. La banda correspondiente a *EgKu-5* se señala con una flecha. Carriles: 1) cultivo antes de inducir con IPTG, 2) y 3) dos diferentes cultivos luego de la inducción con IPTG y 4) BPTI, que se usó para estimar el tamaño de la proteína recombinante.

4.2.2 Purificación de *EgKu-5*

En primera instancia, se intentó aislar *EgKu-5* en condiciones no desnaturizantes con una matriz de Ni-NTA. En estas condiciones, la proteína recombinante se recuperó con los elementos celulares insolubles, lo que no permitió su purificación (datos no mostrados).

Por esto, se recurrió a un método de purificación en condiciones desnaturizantes (ver sección 3.2.3). Las estrategias de purificación de proteínas insolubles que se acumulan como cuerpos inclusión se basan en el agregado de un agente caotrópico (ver recuadro *Dinámica de la formación, solubilización y purificación de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión*), como la urea 8 M o el cloruro de guanidinio 6 M, para solubilizar los

agregados insolubles. Luego, en el caso del sistema pET, la proteína recombinante puede ser purificada por cromatografía de afinidad en una columna de Níquel / agarosa, al igual que en condiciones nativas, puesto que la interacción del repetido de histidinas con la matriz se mantiene en presencia de agentes caotrópicos. Por más información, referirse al apartado *Purificación de proteínas recombinantes con cola de poli-histidina* en la sección *Materiales y Métodos*.

Dinámica de la formación, solubilización y purificación de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión

En ciertas circunstancias, la expresión de proteínas recombinantes lleva a la acumulación de agregados insolubles conocidos como *cuerpos de inclusión*. Es más, estudios de expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* demostraron que la formación de cuerpos de inclusión es más la regla que la excepción.

La formación de cuerpos de inclusión no se relaciona con características de la proteína a expresar como su tamaño, hidrofobicidad relativa o la presencia de proteínas fusionadas. Se piensa que la sobreproducción por sí misma es suficiente para la formación de agregados inactivos. Basándose en estas observaciones, se propuso un modelo cinético para la formación de cuerpos de inclusión. Este modelo plantea que la tasa de formación de proteína en estado nativo depende de su velocidad de plegamiento, de la velocidad de formación de cuerpos de inclusión y de la velocidad de síntesis proteica. Este modelo implica que la formación de cuerpos de inclusión disminuye al disminuir la velocidad de expresión proteica, lo que se reafirma con datos empíricos obtenidos en condiciones no óptimas (menor temperatura o pH del medio diferente del óptimo). En el caso de las proteínas con tioles, como *EgKu-5*, la formación de cuerpos de inclusión se ve favorecida al aumentar el número de enlaces disulfuro capaces de producir una conformación no nativa con respecto a los que llevan a la conformación nativa. Además pueden formarse puentes disulfuro intercatenarios que reducen la solubilidad de los agregados (Figura 29).

La solubilización de cuerpos de inclusión requiere la utilización de agentes caotrópicos fuertes como el cloruro de guanidinio o la urea. En caso que la proteína sea capaz de generar enlaces entre tioles es necesario utilizar además agentes reductores, como el ditioneitol, el glutatión o el β -mercaptoetanol, a fin de romper esos enlaces para solubilizar los cuerpos de inclusión.

La renaturalización de la proteína, una vez solubilizada de los cuerpos de inclusión, es un aspecto tan delicado como importante para recuperar la actividad. El plegamiento a una velocidad baja conduce, en algunos casos, a que la proteína adopte su conformación nativa mientras que cambios bruscos en las concentraciones de los agentes desnaturizantes pueden llevar a su reprecipitación. Usualmente se emplea la diálisis contra *soluciones de renaturalización* para disminuir la concentración de los agentes desnaturizantes. De esta manera, la proteína se expone a concentraciones intermedias de agente desnaturizante durante períodos extensos.

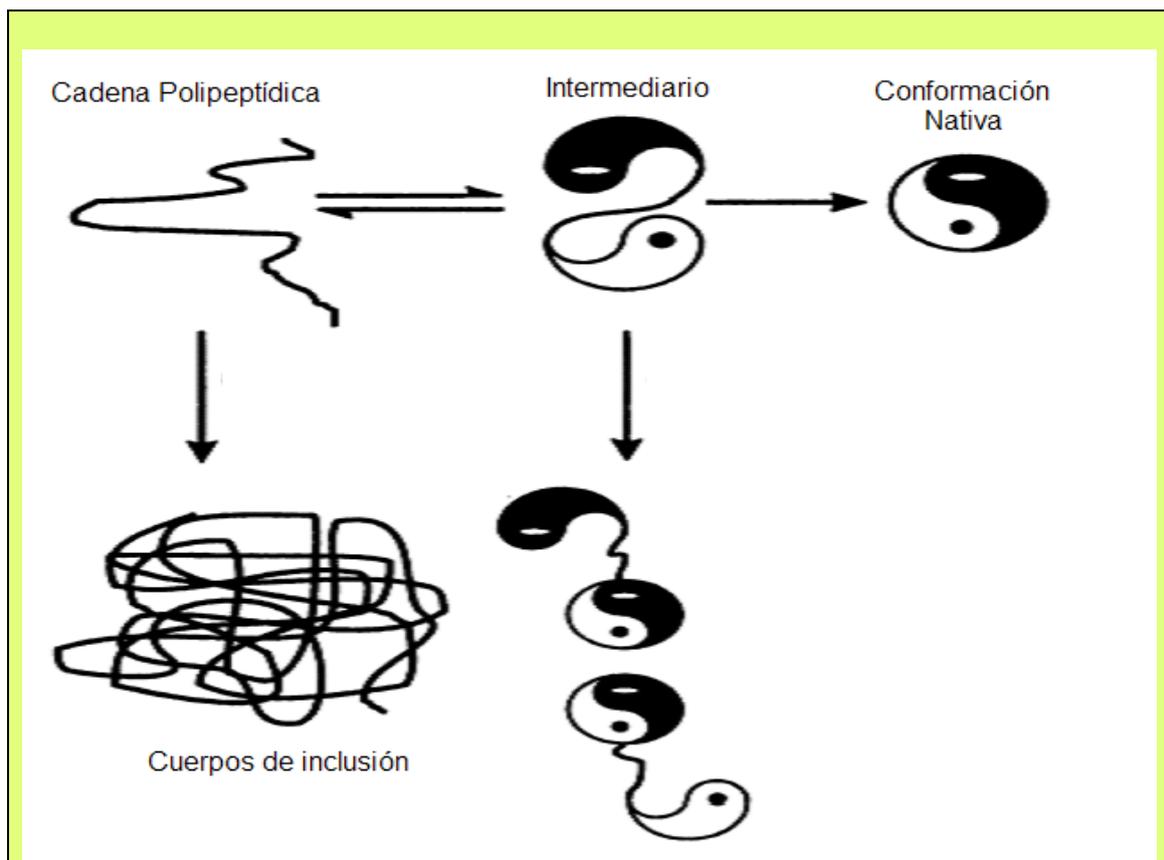


Figura 29. Representación esquemática de la dinámica de formación de cuerpos de inclusión [modificado de 25].

En la renaturalización de proteínas que posean puentes disulfuros, estos deben regenerarse correctamente. Esto comúnmente se hace mediante el agregado de tioles de bajo peso molecular, en forma de pares oxidado/reducido, en la solución de renaturalización. Al ser la formación de enlaces tiol-disulfuro altamente reversible, la presencia de tioles y disulfuros en la diálisis propicia el intercambio de puentes disulfuro hasta alcanzar el estado termodinámicamente más favorable de la proteína que es su conformación nativa. Ejemplos de estos pares son: cisteína_{ox} / cisteína_{red}, cistamina_{ox} / cistamina_{red} y di-β- hidroxietil disulfuro / β-mercaptoetanol. El buffer de diálisis de renaturalización que se utilizó en este trabajo (ver sección 3.2.4), contenía glutation_{ox} / glutation_{red} en relación 1 a 5, otro par muy utilizado.

El contenido de este apartado está tomado de la revisión de Rainer y Hauke [25].

Luego de la purificación en condiciones desnaturizantes, se analizaron por SDS-PAGE muestras correspondientes a las distintas etapas del proceso. El gel obtenido se muestra en la Figura 30.

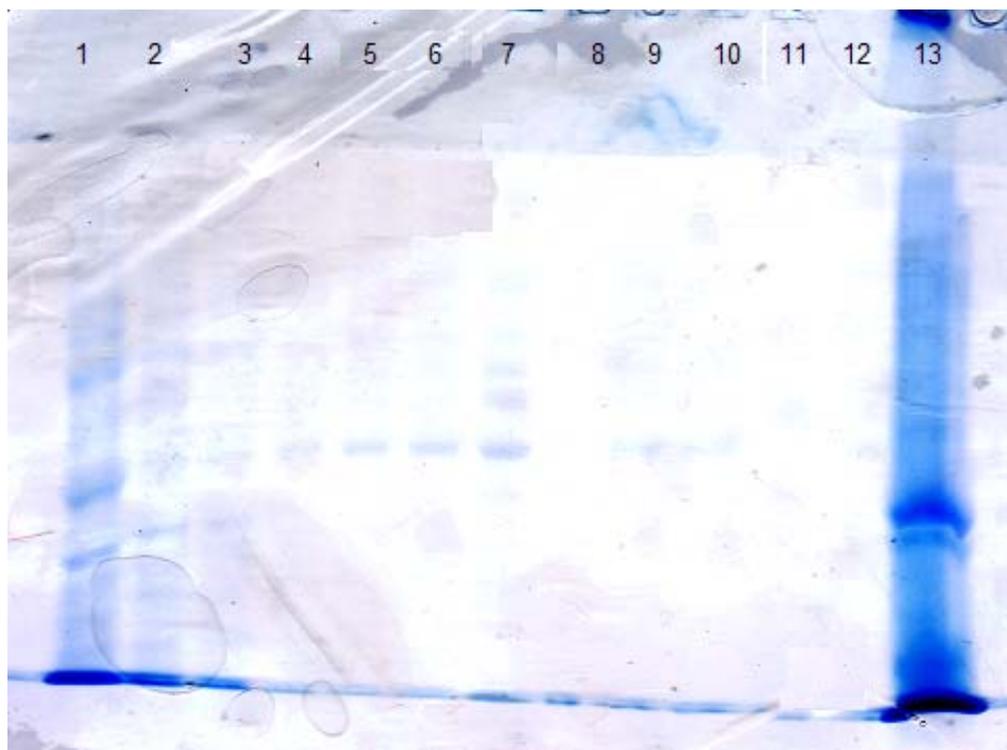


Figura 30. Análisis por SDS-PAGE al 12% de la purificación en condiciones desnaturalizantes de *EgKu-5* recombinante por cromatografía de afinidad en columna de Ni-NTA. Carriles: 1- Extracto obtenido por tratamiento de las células con solución de lisis; 2- Fracción no retenida en la matriz; 3 y 4- Primer y último lavados, respectivamente; 5, 6, 7 y 8- Fracciones eluidas a pH 5.9; 9, 10, 11 y 12- Fracciones eluidas a pH 4.5; 13- Extracto total obtenido por tratamiento con tampón de muestra de las células de una alícuota del cultivo post-inducción.

Pese a la distorsión de la corrida (especialmente en los carriles 1 y 13), en el gel de la Figura 30 se observa una banda que correspondería a la proteína recombinante *EgKu-5*, en los carriles 5 al 7 que contienen alícuotas de las fracciones eluidas a pH 5.9. Se procedió a reunir estas fracciones (4.5 ml con una concentración de proteína estimada en 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, es decir, un total de 360 μg) y se intentó eliminar la urea y llevar la solución resultante al tampón de los ensayos de actividad inhibitora (ver 3.3.1) utilizando una columna de exclusión molecular. Lamentablemente, la solución que eluyó de la columna poseía una concentración proteica menor a la apreciación de la técnica de Bradford (ver sección 3.2.6) y una actividad inhibitora de proteasas apenas apreciable (datos no mostrados). Este resultado se adjudicó a la precipitación de la proteína recombinante dentro de la columna cromatográfica al eliminarse la urea bruscamente [25].

Debido a este resultado, se repitió la producción de *EgKu-5* recombinante y se intentó purificarla con un procedimiento diferente basado en el protocolo de Schmidt et al [22]. De esta manera, la concentración de urea en la solución que contenía a la proteína recombinante se disminuyó paulatinamente por medio de diálisis, y la renaturalización se realizó en presencia del par glutatión oxidado-reducido para favorecer la formación de los enlaces disulfuros nativos (ver apartado *Dinámica de la formación, solubilización y purificación de proteínas recombinantes de cuerpos de inclusión*).

Los sucesivos pasos de diálisis se realizaron sin que se constatará la formación de precipitados, salvo en el último cambio de buffer en que se observó un precipitado de color blanco dentro de la bolsa de diálisis. Luego de filtrada, se obtuvo 5 ml de solución con una concentración proteica de 25 µg/ml lo que representa, suponiendo que la totalidad de la proteína corresponde al inhibidor, una concentración 2.3 µM de *EgKu-5*. Una alícuota de dicha solución se analizó por SDS-PAGE observándose una única banda (datos no mostrados).

4.3 Estudio cinético de la inhibición de tripsina bovina con *EgKu-5*

Previo a los ensayos de inhibición, se analizó la actividad de la tripsina en función de su concentración (Figura 31). La molaridad de la enzima corresponde a la concentración de sitios activos, determinada por titulación con BPTI.

Luego, se procedió a analizar la capacidad inhibidora de *EgKu-5* recombinante en una concentración aproximadamente equimolar a la de tripsina (se utilizó 0.3 nM de tripsina en los experimentos). No se observó inhibición hasta que la concentración de inhibidor superaba en dos órdenes a la de enzima (datos no mostrados). Este resultado podía explicarse de dos maneras: 1- *EgKu-5* no sería un inhibidor de alta afinidad de tripsina y 2- la concentración de *EgKu-5* capaz de inhibir tripsina en el ensayo sería muy inferior a la concentración de proteína total. La presencia de inhibidor inactivo en la solución de *EgKu-5* no podía ser descartada, dadas las dificultades encontradas para mantener la proteína en solución durante su purificación.

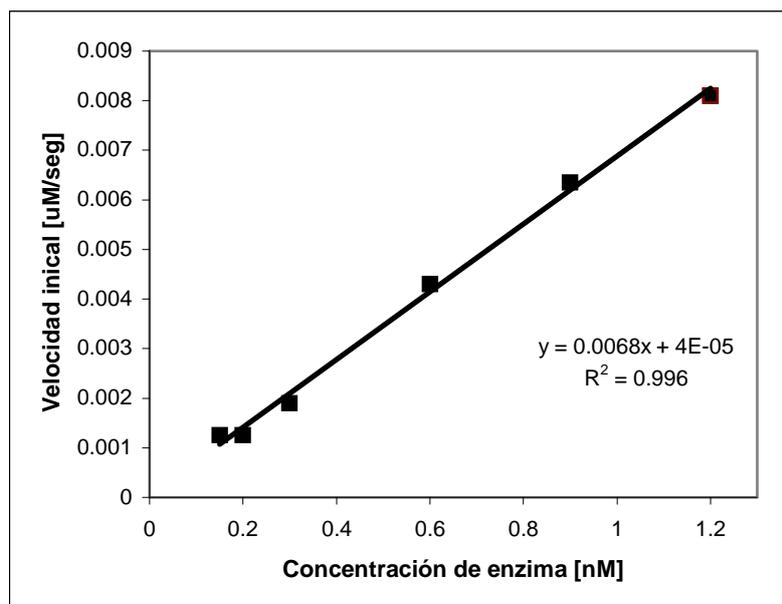


Figura 31. Velocidad inicial de hidrólisis del sustrato en función de la concentración de tripsina bovina. Se muestra el promedio de los datos obtenidos por duplicado.

Debido a lo anterior, se procedió a determinar la concentración de inhibidor activo en la solución de *EgKu-5* obtenida, utilizando la enzima previamente titulada con BPTI. En el gráfico de velocidad en función de la concentración de tripsina a una concentración fija de *EgKu-5* (Figura 32) se distinguen dos zonas: una, a bajas concentraciones de enzima donde la velocidad de hidrólisis es despreciable y otra, a concentraciones mayores de enzima, donde se aprecia una relación lineal entre la velocidad de hidrólisis y la concentración de tripsina. La forma de esta curva es típica de inhibidores de alta afinidad (ver sección 1.3.3), confirmando que *EgKu-5* es un inhibidor de alta afinidad de tripsina. La concentración de enzima a la que comienza a observarse actividad es cercana a 1.4 nM por lo que ésta se considera igual a la concentración de inhibidor *EgKu-5* activo en el pocillo de la microplaca utilizada en el experimento. Como se trabajó con una dilución 1:4, la concentración de *EgKu-5* activo en la solución purificada es de 5.6 nM.

Para una mejor visualización del resultado, las curvas de la actividad de tripsina en ausencia (Figura 31) y presencia (Figura 32) de *EgKu-5* se muestran en la Figura 33. Puesto que los inhibidores reversibles no alteran el parámetro $V_{Máx}$, era de esperarse que la pendiente de la última curva luego del punto final fuera igual a la observada en ausencia de inhibidor. Sin embargo, se aprecia una

diferencia entre las dos pendientes; esta diferencia pudo deberse a la presencia de una alta concentración de inhibidor inactivo muy superior a la de la enzima en el ensayo de titulación. Más aún, según se indicó en 4.2.2, la concentración de inhibidor inactivo es del orden μM , es decir del mismo orden que la del sustrato fluorogénico usado en el ensayo (ver 3.3.2). *EgKu-5* inactivo también oficiaría como sustrato, aunque su hidrólisis no se registra, por lo que la actividad de la tripsina sería mayor que la observada en el experimento.

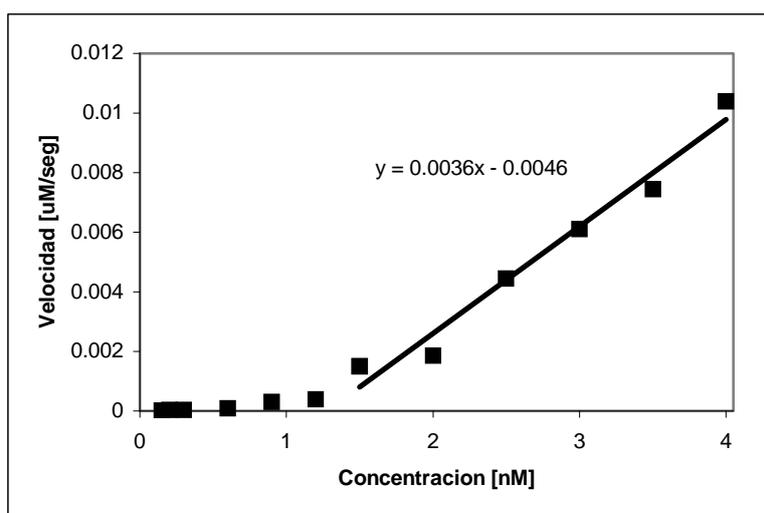


Figura 32. Velocidad inicial de hidrólisis del sustrato en función de la concentración de tripsina bovina en presencia de una concentración constante, no conocida, de *EgKu-5*. Se muestra el promedio de los datos obtenidos por duplicado.

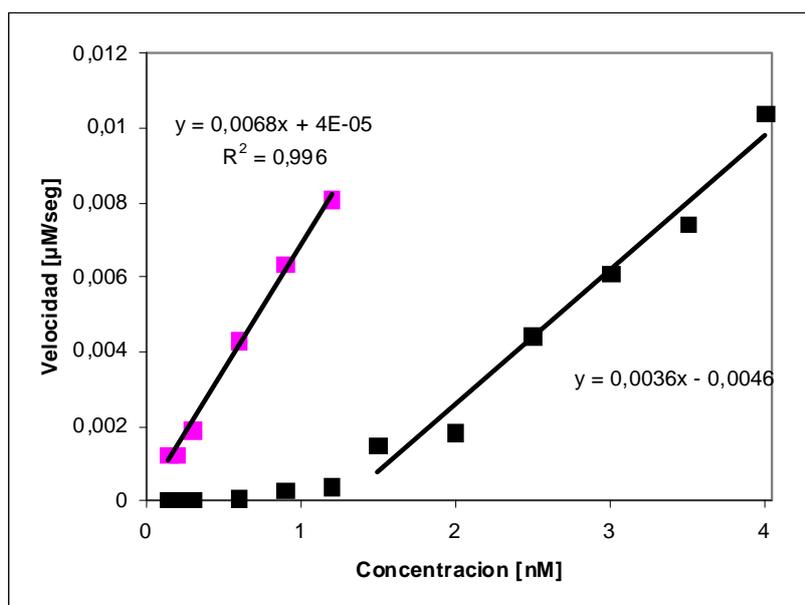


Figura 33. Comparación de las velocidades iniciales de hidrólisis del sustrato en función de la concentración de tripsina bovina en ausencia (Figura 31) y presencia (Figura 32) de *EgKu-5*.

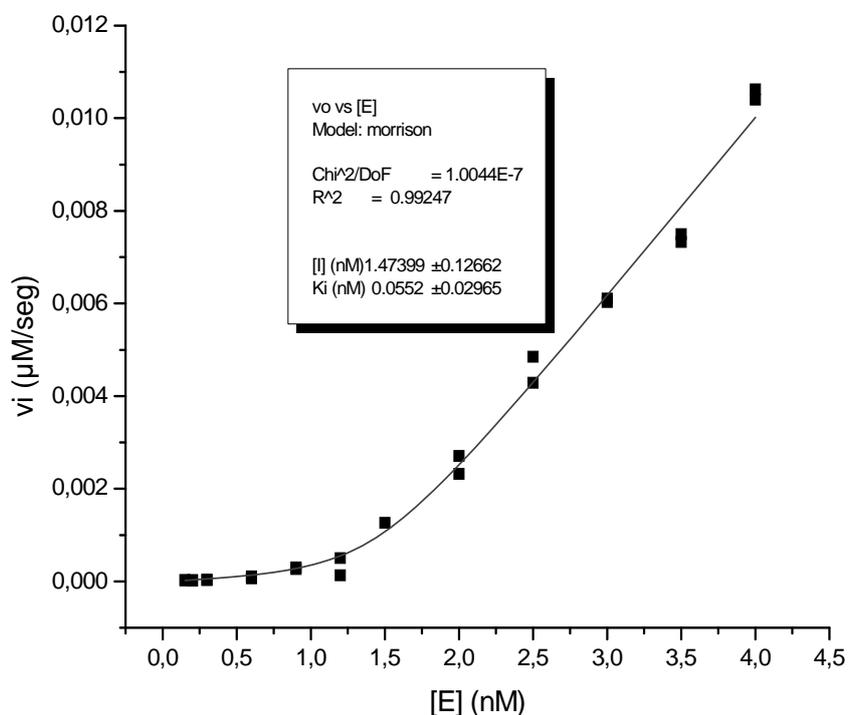


Figura 34. Velocidad inicial de hidrólisis del sustrato en función de la concentración de enzima en presencia de inhibidor. La ecuación de Morrison se ajusta a los datos experimentales (R^2 de 0.99), con los siguientes parámetros: $[I] = 1.47 \text{ nM}$ y $K_{i \text{ app}}^* = 0.055 \text{ nM}$. El ajuste se hizo utilizando todos los datos obtenidos, salvo uno de los duplicados para $[E]= 1.5 \text{ nM}$.

A fin de estimar la constante de inhibición global, los valores de velocidad inicial obtenidos se ajustaron a la ecuación de Morrison para inhibidores de alta afinidad (ver 3.3.3). En la Figura 34, se muestra que los datos experimentales se ajustan bien a esta ecuación (con un coeficiente R^2 de 0.99), para una concentración de inhibidor de 1.47 nM . La constante de inhibición aparente, $K_{i \text{ app}}^*$, correspondiente a este ajuste es de 0.055 nM , por lo que la constante de inhibición global de tripsina por *EgKu-5*, corregida por la concentración de sustrato (ver 3.3.3), es de 52 pM .

5. Discusión

5.1 Clonado, producción y purificación de *EgKu-5*

En este trabajo, se logró cumplir el objetivo de clonar la secuencia codificante para *EgKu-5* y expresar la proteína recombinante. Para esto, se utilizó el producto de una amplificación con *primers* específicos para dicha secuencia a partir de ADN genómico. La secuenciación del plásmido pET-*EgKu-5* obtenido a partir del producto amplificado mostró que el mismo correspondía a la secuencia previamente determinada con ADNc de protoescólex (Figura 16), indicando que *EgKu-5* madura está codificada por un único exón.

Durante la purificación de la proteína se constató que ésta se recuperaba en cuerpos de inclusión. Una posible explicación para este comportamiento es la alta expresión de la recombinante, característica de los sistemas pET, que no favorece el correcto plegamiento, probablemente dificultando la formación de los enlaces disulfuros correctos del dominio Kunitz. Debido a esto, fue necesario proceder al aislamiento y disolución de los agregados, a la purificación de *EgKu-5* recombinante y finalmente a su renaturalización. La remoción de urea resultó una dificultad importante ya que se constató, tanto al realizar la cromatografía de gel filtración como la diálisis, que la proteína recombinante precipitaba en su ausencia. Finalmente, se obtuvo una solución de *EgKu-5* prácticamente pura, a juzgar por su perfil en SDS-PAGE (no mostrado); a partir de un volumen de cultivo de 200 ml, se recuperaron aproximadamente 5 ml con una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ (125 μg de proteína totales) o 2.3 μM .

El factor determinante para la correcta renaturalización de *EgKu-5*, como lo es también en el BPTI, es la formación de los enlaces disulfuro nativos. En el BPTI, la creación de uno o dos de estos cataliza el plegamiento hacia la conformación nativa e impide la formación de enlaces incorrectos [25]. La formación de los enlaces disulfuro correctos depende de factores estructurales de la proteína, como la proximidad y reactividad de los grupos tiol de las cisteínas. En una proteína pequeña, como *EgKu-5* o el BPTI, el factor crucial

sería la accesibilidad de los grupos tiol. Debido a que la formación del enlace ocurre cuando los grupos tiol se encuentran, su bloqueo evita el contacto impidiendo la reacción [26]. Es interesante que, en el caso de *EgKu-5*, cuatro de las cisteínas que forman disulfuros (Figura 14) se encuentran flanqueadas por arginina, además del aminoácido P₁, cuya cadena lateral es voluminosa y cargada positivamente (las cisteínas que formarían los enlaces 1-6 y 2-4, Figura 28). La presencia de residuos cuyas cadenas laterales poseen cargas iguales dificultaría la formación de enlaces disulfuro intracatenarios resultando en una baja velocidad de plegamiento de la proteína. Este hecho, sumado a la alta concentración de proteína recombinante, puede haber favorecido la creación de enlaces disulfuro intercatenarios entre intermediarios incompletamente plegados y, posteriormente, la acumulación de cuerpos de inclusión. El mismo proceso probablemente haya ocurrido durante la remoción de la urea dónde también se observó la precipitación de *EgKu-5*.

En principio, para disminuir la formación de cuerpos de inclusión durante la producción de *EgKu-5* es necesario disminuir la sobreexpresión de proteína recombinante. Teóricamente, esto se consigue al realizar una inducción a menor temperatura o en presencia de una menor concentración de agente inductor IPTG. Como parte de este trabajo, se intentó mejorar el rendimiento de recombinante soluble modificando la temperatura, realizando la inducción a 30°C durante 12 horas, pero se siguió recuperando *EgKu-5* en forma insoluble (datos no mostrados). Por otro lado, podría descartarse que el agregado de la porción N-terminal contribuida por el vector influya en el plegamiento de la proteína recombinante, puesto que nuestro grupo ha obtenido formas recombinantes de *EgKu-1*, *EgKu-3*, *EgKu-4* y *EgKu-8* solubles utilizando el sistema pET 28a (+) con el mismo tipo de construcción.

5.2 *EgKu-5* recombinante como inhibidor de tripsina

Los ensayos utilizando concentraciones equimolares de tripsina y proteína recombinante mostraron una inhibición despreciable de la actividad enzimática. Conforme esto y considerando que la secuencia de *EgKu-5* indicaba que esta proteína sería un inhibidor de alta afinidad de proteasas de serina tipo tripsina

(ver 1.5), se procedió a titular el inhibidor activo, es decir, a estimar la concentración de proteína purificada correctamente plegada, resultando ésta de tan sólo 5.6 nM aproximadamente, es decir, que menos del 1% del total de la proteína recombinante purificada (cuya concentración fue de 2.3 μ M) alcanzó su conformación activa durante la renaturalización.

EgKu-5 se comportó como un inhibidor de alta afinidad de tripsina (Figura 35). La actividad en función de la concentración de tripsina (Figura 32) no se mantuvo en presencia de *EgKu-5* (Figura 33), siendo la pendiente casi el doble en ausencia que en presencia de inhibidor (6.8×10^{-3} y $3.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectivamente). Este efecto pudo haber sido causado por *EgKu-5* inactivo que no es capaz de inhibir a la tripsina, pero sí de ser su sustrato; en este sentido, es interesante que *EgKu-5* recombinante posea numerosos enlaces peptídicos cuyo C- terminal está constituido por una arginina o lisina (Figura 27), y que, por tanto, podrían ser clivados por tripsina. Estas reacciones de hidrólisis no se registran en el ensayo de actividad, por lo que la velocidad de la tripsina pudo haber sido subestimada, lo que explicaría que se haya obtenido una pendiente menor.

El valor de la constante global de inhibición, K_i^* , estimado utilizando la ecuación de Morrison, fue de $5.2 \times 10^{-13} \text{ M}$, el cual se encuentra en el orden de los inhibidores de alta afinidad ($<10^{-8} \text{ M}$), confirmando que *EgKu-5* es inhibidor de alta afinidad de tripsina. El ajuste de los datos del ensayo de titulación a la ecuación de Morrison permitió confirmar la concentración de inhibidor activo obtenida en la purificación.

5.3 El posible rol fisiológico de *EgKu-5*

El hecho de que *EgKu-5* se comporte como un inhibidor de tripsina de alta afinidad indica que esta proteína podría ser secretada por *E. granulosus* para inhibir enzimas como las tripsinas pancreáticas presentes en el duodeno del perro (el perro posee dos isoformas de tripsina, catiónica y aniónica). En principio, la concentración de *EgKu-5* que podría ser secretada durante la instalación del protoescólex sería despreciable comparada con la de tripsina en

el duodeno del perro. Sin embargo, podría generarse un microambiente cercano al protoescólex evaginado donde la relación entre el inhibidor y la tripsina fuera uno a uno. Esto podría ser significativo ya que la porción apical del protoescólex pierde la protección de la cubierta de mucopolisacáridos luego de la evaginación (ver 1.1.2).

En este trabajo hemos encontrado evidencia de que *EgKu-5* posiblemente se exprese en el estadio de protoescólex y no el adulto. Se corroboró la presencia del transcripto codificante de *EgKu-5* en protoescólex independientemente del estímulo de la pepsina en medio ácido. Sin embargo, los datos obtenidos no nos permiten descartar la existencia de dicho transcripto en los estadios larvario o adulto.

Como se comentó en la introducción, ubicada en el escólex de *E.granulosus* se encuentra la *glándula rostellar* cuya secreción, aunque no ha sido caracterizada, es rica en cistina. La posibilidad de que *EgKu-5*, así como las otras proteínas Kunitz, *EgKu-1* a *EgKu-8* sean secretadas por la glándula rostellar es interesante, ya que estas son ricas en residuos de cisteína.

6. Conclusiones y Perspectivas

En este trabajo se logró clonar, producir y purificar la proteína recombinante tipo Kunitz de *E. granulosus* EgKu-5. Sin embargo, se obtuvieron bajos rendimientos de proteína; en el futuro será necesario optimizar el procedimiento para preparar la recombinante activa. Se verificó que esta proteína es un inhibidor de alta afinidad de tripsina, por lo que su función fisiológica podría ser la inhibición de enzimas tipo tripsina presentes en el duodeno del hospedero definitivo.

Los hechos documentados y analizados en este trabajo constituyen un avance en nuestra comprensión de las relaciones entre el parásito y su hospedero definitivo. Es posible que esta información, contribuya a controlar la infección de *E. granulosus* en el perro y, como consecuencia, también en el humano.

7. Referencias Bibliográficas

- [1] C. A. Torres de la Llosa, 1973, Zoografía 9^{na} edición, Colombino S. A, Montevideo Uruguay.
- [2] <http://to2aclick.com/periodista/?p=144>, 2/8/08 13:30 hrs.
- [3] <http://todosobrehidatidosis.blogspot.com/>, 30/07/08 10:35 hrs.
- [4] G. J. Tórtora, S. R. Grabowski, 2002, Anatomía y fisiología, Oxford University Press México, México D.F., México.
- [5] S. Helfon, T. T. Baird, C. S Craick, 2004, Trypsin, cap. 452 en: Handbook of proteolytic enzymes, 2^{da} edición, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner, eds, pp. 1483-1488, Elsevier Academic Press, Holanda.
- [6] C. Branden, J. Tooze, 1991, Introduction to protein structure, Garland Publishing, Inc., New York, U. S. A.
- [7] http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio_008233-01.html 18/11/08 12:30 hrs.
- [8] I. Schechter, A. Berger, 1967, Biochem. Biophys. Res. Commun., 27, pp. 157-162.
- [9] J. J. Perona, C. S. Craik, 1997, J. Biol. Chem., 272, 48, pp. 29987–29990.
- [10] L. Hedstrom, 2002, Chem. Rev., 102, pp. 4501-4523.
- [11] D. L. Nelson, M. M. Cox, Lehninger, 1983, Principios de Bioquímica, 3^{ra} edición.
- [12] D. Krowarsch, T. Cierpicki, F. Jelen, J. Otlewski, 2003, Cell. Mol. Life Sci., 60, pp. 2427–2444.
- [13] N. D Rawlings, D. P. Tolle, A. J. Barret, 2004, Biochem. J, 378, pp. 705-716.
- [14] M. Laskowski Jr, R. W. Sealock, 1971, Enzymes, vol. 3, Boyer P. D., Academic Press, New York.
- [15] S. González Cotelo, 2004, tesis de Doctorado en Química de la Facultad de Química de la Universidad de la Republica: “Inhibidores tipo KUNITZ en *Echinococcus granulosus*”.
- [16] D. Krowarsch, M. Zakrzewska, A. O. Smalas, J. Otlewski,, 2005, Protein Pept. Lett. 12, pp. 403-407.
- [17] <http://merops.sanger.ac.uk/molimages/1bpi.jpg>, 19/04/09 23:30 hrs.
- [18] <http://ca.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00252>, 29/7/08, 02:52 hrs.
- [19] A. M. Milstone, L. M. Harrison, R. D. Bungiro, P. Kuzmic, M. Cappello, 2000, J. Biol. Chem., 275, pp. 29391–29399.
- [20] A diverse family of Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* involved in host-parasite cross-talk in echinococcosis. M. Fló, M. Margenat, S. González, R. Maizels, G. Salinas, B. Álvarez, C. Fernández, 2008, *Molecular and Cellular Biology of Helminth Parasites* (Hidra, Grecia).
- [21] J. F. Sambrook, T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- [22] U. K. Laemmli, 1970, Nature, 227, 2259, pp. 680-685
- [23] A. E. Schmidt, H. S. Chand, D. Cascio, W. Kisiel, S. P. Bajaj, 2005, J. Biol. Chem., 280, 30, pp. 27832-27838.
- [24] W. R. Greco, M. T. Hakala, 1979, *J Biol Chem*, 254, pp. 12104-12109.
- [25] R. Rainer, L. Hauke, 1996, FASEB J, 56, 10, pp. 49-56.
- [26] J. Arolas, F. Aviles, J. Chang, S. Ventura, 2006, Trends in Biochem. Sciences, 31, pp. 292-301.