



Universidad de la República

Facultad de Ciencias

**Análisis bioquímicos de la glutatión transferasa
heterodimérica de *Echinococcus granulosus***

Br. Natalia Da Costa Leites

Trabajo presentado para acceder al título de Licenciado en Bioquímica

Orientadoras: Mag. Paula Arbildi y Dra. Verónica Fernández Mancebo

Montevideo, Uruguay

2020

Tabla de contenido

1	Introducción	5
1.1	Echinococcus granulosus.....	5
1.2	Metabolismo de xenobióticos.....	6
1.3	Glutación transferasas.....	8
1.3.1	Consideraciones generales.....	8
1.3.2	GSTs clase Sigma y Omega	10
1.3.3	GSTs en parásitos	11
1.3.4	Antecedentes en el estudio de GST en <i>E. granulosus</i>	13
2	Materiales y métodos	14
2.1	Producción y purificación de EgGST2-3r	14
2.1.1	Producción de EgGST2r	14
2.1.2	Purificación por cromatografía de afinidad a IMAC(Ni ²⁺)	14
2.1.3	Cromatografía Gel Filtración	15
2.2	Ensayo de actividad GST.....	15
2.3	Determinación de los parámetros cinéticos	15
2.4	Análisis de la estabilidad enzimática.....	16
2.5	Determinación de la actividad enzimática	16
2.5.1	Efecto de la temperatura en la actividad GST	16
2.5.2	Efecto de la fuerza iónica en la actividad GST	16
2.5.3	Efecto del pH en la actividad GST.....	16
2.6	Análisis estadístico	17
3	Resultados y discusión	17
3.1	Producción y purificación de EgGST2-3r	17
3.2	Factores que afectan la estabilidad y actividad enzimática de EgGST2-3r	18
3.2.1	Efectos de la fuerza iónica en la estabilidad y actividad enzimática.....	19
3.2.2	Efectos del pH sobre la estabilidad y actividad enzimática.....	20

3.2.3	Efecto de la temperatura en estabilidad y actividad enzimática	20
3.3	Determinación de los parámetros cinéticos de EgGST2-3r.....	21
4.	Conclusiones.....	24
	Bibliografía	24
	Anexo	32

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi familia, en especial a mis padres, que siempre me han motivado y me han apoyado en cada etapa de la carrera, no ha sido un camino fácil y sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Este nuevo logro es en gran parte gracias a ellos, es por esto que quiero dedicarles este trabajo.

En segundo lugar quisiera agradecer a mi tutora y cotutora, Veronica y Paula, quienes con sus conocimientos y apoyo me guiaron a través de cada una de las etapas de este trabajo.

Agradecerles la paciencia y dedicación, que a pesar hubo momentos de incertidumbre y en los que todo parecía cuesta arriba, me impulsaron a sacar el trabajo adelante. También agradecerle a Gabriela por su buena disposición y contribución final al trabajo.

Me gustaría también agradecerle a Marco, que siempre estuvo a mi lado y me dio para adelante con este trabajo, con su apoyo y cariño todo se hizo más fácil.

A mis amigas de facu Karen y Natalia, con quienes compartí largas jornadas de estudio, noches sin dormir, alegrías y tristezas, todo con el mismo objetivo de culminar la carrera. Gracias a ellas el camino se hizo más ameno y llevadero.

1 Introducción

1.1 Echinococcus granulosus

La equinococosis quística es una zoonosis causada por la larva del parásito *Echinococcus granulosus*, perteneciente al filo Platyhelminthes, clase Cestode y familia Taeniidae o tenidos (Thompson, 1995).

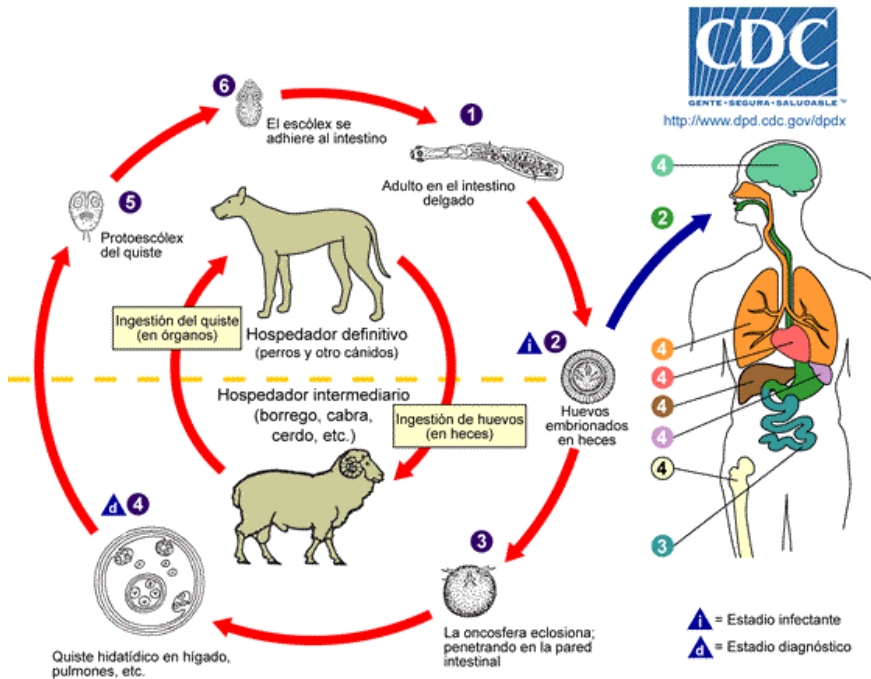


Figura 1. Ciclo biológico de *Echinococcus granulosus*. Imagen obtenida de CDC. URL: http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/spanish/DPDx/images/ParasiteImages/A-F/Echinococcosis/Echinococcus_LifeCycle.gif

Para completar su ciclo vital (Figura 1), necesita 2 hospederos mamíferos: un hospedero definitivo (perro u otro cánido) y un hospedero intermediario (bovino, porcino, ovino u otros mamíferos). El estadio adulto (Figura 2), de 2 a 7 mm de longitud, vive adherido a las vellosidades del intestino delgado del cánido. Presenta un pequeño órgano de fijación especializado periforme, el escólex, que está provisto de 4 ventosas y en su zona apical, de un rostello que posee entre 30 a 40 ganchos dispuestos en doble corona. Tiene un cuello corto y delgado el cual es seguido de una estróbila conteniendo 3 segmentos o proglotidas, uno inmaduro, otro maduro y el final grávido. El segmento grávido, de aproximadamente 2 mm, contiene entre 500 y 1500 huevos (Figura 3) (Thompson, 1995).

Las proglótidas grávidas salen en las heces del perro contaminando con los huevos, su pelo, el suelo, verduras, pastos y el agua. De esta forma son ingeridos por los hospederos intermediarios, que pueden ser bovinos, ovinos y porcinos. El hombre suele ser un hospedero accidental, al igual que otros mamíferos (Atias, 2011; Osimani, 1982).

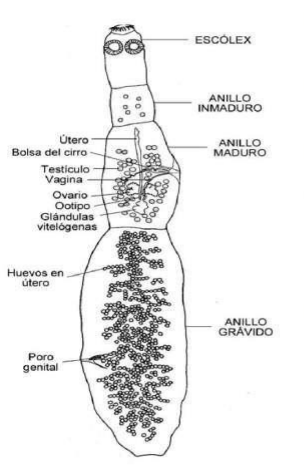


Figura 2. Morfología de *E. granulosus* en su estadio adulto.

Imagen obtenida de URL:

<http://microbiologianutriupc.blogspot.es/tags/echinococcus-granulosus/>



Figura 3. Huevo de *E. granulosus*. Imagen obtenida de CDC.

URL:

<http://www.cdc.gov/dpdx/echinococcosis/gallery.html#adults>

Una vez que el huevo es ingerido por el hospedero intermediario, el embrión hexacanto se libera en el duodeno y atraviesa la pared intestinal con sus ganchos. Así, vía sanguínea es transportado al hígado, el cual actúa como primer filtro, aunque puede llegar al corazón y al pulmón. Los órganos mayormente afectados por la larva de *E. granulosus* son el hígado y los pulmones (Atias, 2011; Osimani, 1982). Una vez en su órgano blanco, comienza a desarrollarse el metacestodo, inicialmente como una pequeña vesícula (entre 60 y 70 μm de diámetro) que consiste en una capa interna celular (capa germinal) y una capa externa acelular (capa laminar). Al cabo de una semana se forma la hidátide, que es una esfera de tamaño variable conteniendo un líquido incoloro y transparente (líquido hidático). Embebidos en el líquido hidático se encuentran vesículas prolíferas, protoescólex y vesículas hijas. El tamaño del quiste en el cuerpo humano es muy variable y se encuentra en el rango entre 1 y 15 cm, aunque puede llegar a tamaños mayores. Si bien el tiempo exacto requerido para el desarrollo de los protoescólex dentro de los quistes no se ha esclarecido aun, se estima que en el ser humano es aproximadamente 10 meses post-infección (Eckert and Deplazes, 2004).

1.2 Metabolismo de xenobióticos

Los organismos vivos se encuentran continuamente expuestos a especies químicas extrañas. Estos compuestos, llamados xenobióticos, no pueden servir como fuente de energía ni como precursores de biomoléculas. Si bien algunos son inocuos, otros interaccionan perjudicialmente

con el organismo, causando por ejemplo, toxicidad, mutaciones carcinogénicas, etc. Las células de los mamíferos poseen un grupo de enzimas capaces de biotransformar una amplia gama de diferentes estructuras químicas, usualmente denominadas enzimas metabolizadoras de xenobióticos (Matoušková et al., 2016). Estas enzimas convierten al compuesto xenobiótico lipofílico no-polar, en uno más hidrosoluble, por lo tanto menos tóxico para el organismo y más fácilmente excretable. Si bien este sistema lleva a la inactivación de numerosos xenobióticos potencialmente peligrosos para el organismo, en ocasiones pueden participar en la bioactivación de dichos compuestos (Waxman, 1990).

El metabolismo de los xenobióticos comprende su biotransformación y transporte en el organismo. La biotransformación de estas moléculas tiene lugar en dos fases donde la oxidación, reducción e hidrólisis del xenobiótico representa la fase I de la biotransformación, conduciendo a la inserción o la exposición de restos hidrófilos reactivos en las estructuras de estas moléculas. El sistema citocromo P450 está implicado en la gran mayoría de estas reacciones en particular en la monooxigenación de sus sustratos. En la fase II, los xenobióticos o sus metabolitos de fase I experimentan reacciones de conjugación con compuestos endógenos, por ejemplo, glutatión (GSH), ácido glucurónico o glicina. El transporte activo de los xenobióticos y de sus metabolitos o conjugados se realiza a través de las membranas y es mediado por transportadores especializados que representan la fase III del metabolismo de xenobióticos (Cvilink et al., 2009; Matoušková et al., 2016; Meyer et al., 1996; Xu et al., 2005). Dichos transportadores no solo participan en la excreción de metabolitos que pasaron por las fases I y II, sino que también pueden actuar como barrera para el ingreso a la célula de múltiples drogas (Xu et al., 2005).

Los helmintos parásitos presentan un metabolismo de xenobióticos que difiere de lo descrito para mamíferos. Se considera que los helmintos parásitos tienen reducida la capacidad de neutralizar las toxinas externas en comparación con la de los mamíferos (Barrett, 2009; Cvilink et al., 2009). En este sentido, la fase I de estos parásitos está dominada por reacciones de reducción y de hidrólisis debido al bajo número de enzimas oxidativas, a diferencia de los mamíferos (Arbildi et al., 2011; Barrett, 2009). Por su lado, entre las enzimas de fase II del metabolismo en helmintos, las enzimas glutatión transferasas (GSTs) juegan el rol principal en esta fase, conjugando el tripéptido glutatión (GSH; gama-glutamyl-cisteinil-glicina) a moléculas hidrófobas (Arbildi et al., 2011; Frova, 2006; Sheehan et al., 2001). Finalmente, se han descrito diversos transportadores de membrana que integran la fase III, tanto en nematodos como en platelmintos incluyendo en *E. granulosus* (Greenberg, 2013; Nicolao et al., 2014).

1.3 Glutación transferasas

1.3.1 Consideraciones generales

Las enzimas GSTs son una superfamilia de enzimas bisustráticas multifuncionales y ampliamente distribuidas, implicadas en procesos de detoxificación y biosíntesis celular. Catalizan la conjugación del nucleófilo celular GSH a una amplia variedad de compuestos electrófilos hidrofóbicos, en general promoviendo su inactivación, degradación y/o excreción (Board and Menon, 2013; Hayes et al., 2005). Se clasifican en 3 grandes familias dependiendo de su ubicación sub-celular: solubles o citosólicas, mitocondriales o MAPEG y microsomales o Kappa (Board and Menon, 2013). En los mamíferos, las enzimas GSTs están presentes en todos los órganos y tejidos, aunque en el hígado se encuentra en mayor proporción.

Las GSTs citosólicas integran la familia más diversa y de mayor tamaño, responsable de casi el 90% de la actividad GST total en la célula. También es el grupo más profundamente estudiado identificándose en todos los organismos aeróbicos reportados hasta la fecha. Según la similitud de sus secuencias, se las han catalogado en siete clases diferentes, denominadas: Alfa, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega y Zeta (Kalinina et al., 2014). Estas clases, además, se las pueden agrupar en base al residuo catalítico involucrado en la interacción con el GSH. Las clases Alfa, Mu, Pi y Sigma, evolucionadas más recientemente, utilizan el aminoácido tirosina ubicado sobre el extremo N-terminal para activar el GSH. Por otra parte, las clases Theta, Omega y Zeta, de origen más primitivo, utilizan serina o cisteína para activar el GSH, también localizado sobre el extremo N-terminal (Higgins and Hayes, 2011).

La mayoría de las GST solubles son biológicamente activas como dímeros cuyos monómeros, de aproximadamente 23-30 kDa, promedian un largo de entre 200 y 250 aminoácidos. Estos dímeros pueden estar formados por subunidades idénticas (homodímeros) o distintas pero pertenecientes a la misma clase (heterodímeros) (Frova, 2006), lo que permite la formación de un mayor número de GSTs a partir de un número limitado de genes (Sheehan et al., 2001). A pesar de la gran diversidad entre las secuencia proteica, las GSTs muestran una llamativa conservación de la estructura, exhibiendo una misma organización dimérica y plegamiento 3D, donde las diferencias se centran particularmente en la zona del sitio activo y en la interface entre ambas subunidades (Sheehan et al., 2001). Cada monómero está formada por 2 dominios bien diferenciados: un dominio N-terminal compuesto de hojas beta y hélices alfa como elementos secundarios, y un dominio C-terminal completamente formado por hélices alfa (Frova, 2006). Es de gran importancia la estructura primaria del N-terminal ya que, a pesar de las diferencias entre clases, esta región es la más conservada de la molécula y contiene el residuo catalítico de la

enzima: tirosina, serina o cisteína, dependiendo del tipo de GST (Frova, 2006; Sheehan et al., 2001; Torres-Rivera and Landa, 2008).

La transferasa dimérica exhibe dos sitios catalíticos independientes, cada uno conteniendo los sitios de unión a sus dos ligandos: GSH y ligando hidrofóbico (responsable de la especificidad de sustratos de la enzima) (Higgins and Hayes, 2011). El sitio de unión a GSH (sitio G) es específico, construido principalmente por residuos del dominio N-terminal. El sitio de unión al sustrato hidrofóbico (sitio H) está formado mayoritariamente por residuos con cadenas laterales no polares ubicadas en el dominio C-terminal. La activación del GSH por la GST, ocurre en el sitio G junto a los residuos catalíticos: tirosina y serina permiten la estabilización del anión tiolato del GSH, y cisteína actúa formando un disulfuro mixto con el del GSH (Torres-Rivera and Landa, 2008). Esta reacción se encuentra estrechamente relacionada con las reacciones redox (Torres-Rivera and Landa, 2008) y la actividad enzimática canónica se determina midiendo la conjugación de GSH al sustrato universal 1-cloro-2,4-dinitrobenzenceno (CDNB) (Habig et al., 1974). Si bien inicialmente las GSTs se consideraban exclusivamente como enzimas detoxificantes, ese enfoque ha cambiado con el tiempo. Las sucesivas caracterizaciones de las enzimas de esta familia en múltiples organismos, las han relacionado con reacciones de carácter fisiológico como la biosíntesis de leucotrienos y prostaglandinas, y el catabolismo de aminoácidos (Hayes et al., 2005). Algunas isoformas exhiben actividad GSH peroxidasa capaces de reducir hidroperóxidos lipídicos generados como consecuencia del estrés oxidativo (Harrispe et al., 2010; Hayes et al., 2005). Otras se encuentran estrechamente relacionado con la regulación de la apoptosis o con la protección de las células contra el exceso de óxido nítrico (Fabrini et al., 2009). También se les ha detectado propiedades no catalíticas, en las cuales las GSTs participan como ligandinas en procesos de detoxificación pasiva, o como moduladores en procesos de señalización (Frova, 2006). Es probable que debido a estas funciones benefactoras tan heterogeneas, es que las GSTs se encuentran expresadas en la mayoría de los organismos desde las plantas y bacterias hasta en los seres humanos.

El mecanismo cinético de estas enzimas diméricas bisustráticas es complejo y depende de la enzima analizada (Ivanetich et al., 1990; Ivanetich and Goold, 1989; Jakobson et al., 1977; Pabst et al., 1974; Schramm et al., 1984; Tang and Chang, 1995). En estado estacionario las GSTs de mamíferos se caracterizaron por un mecanismo secuencial aleatorio, mostrando una cinética bifásica dependiente de la concentración de sustrato. Aunque la unión aleatoria para ambos sustratos en estas enzimas es válida, la probabilidad de que se una primero el GSH es alta debido a que la concentración de GSH en la célula es de 1 a 10 mM. De esta forma, a altas concentraciones de GSH predominaría una vía secuencial ordenada donde el GSH se une

primero, en cambio a bajas concentraciones de GSH predominaría una vía ping-pong donde el sustrato electrofílico se une primero (Ivanetich et al., 1990; Torres-Rivera and Landa, 2008).

1.3.2 GSTs clase Sigma y Omega

Como se mencionó anteriormente, dentro de la familia citosólicas se encuentran las clases Sigma y Omega ambas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Las GSTs de clase Omega se han identificado en plantas, insectos, mamíferos y algunas especies de microbios y representan una antigua rama de la superfamilia de GST citosólicas (Board, 2011). Por cristalografía de rayos X, estas enzimas muestran el plegamiento típico de las glutatión transferasas (Board et al., 2000). Exhibe una extensión en el extremo N-terminal característica de esta clase que consiste en 19-20 aminoácidos conteniendo un segmento rico en prolina cuya función se desconoce (Board et al., 2000; Board and Menon, 2016). Presentan una cisteína como residuo catalítico y exhiben actividad débil con CDNB (sustrato universal) así como son esencialmente inactivas con unos cuantos compuestos que son sustratos característicos de otras clases de GSTs (Board, 2011). Una de sus propiedades más relevantes es la actividad tiol-transferasa dependiente de GSH. En este contexto, en las condiciones de estrés, estas enzimas glutatilonan algunas proteínas como mecanismo para evitar su oxidación (Menon and Board, 2013). Dicha actividad es consistente con el hecho de que el residuo catalítico es una cisteína que sirve como centro nucleofílico. Asimismo, tiene la capacidad de deglutatilar dichas moléculas u otras que contienen puentes disulfuros, incluyendo polipéptidos S-tiolados. Por ejemplo, el estrés oxidativo produce aductos S-tiolados en algunas proteínas celulares, llevando a la inactivación en las funciones enzimáticas de los polipéptidos que fueron afectados. De esta manera, las GSTs de clase Omega se encargan de reducir estos aductos S-tiolados reconstituyendo así la función enzimática (Board et al., 2000; Board and Menon, 2016; Menon and Board, 2013). Otra actividad característica de estas GSTs es que catalizan reacciones de dehidroascorbato reductasa (Board and Menon, 2016). Esta actividad permite la recuperación del ácido ascórbico que es una importante molécula antioxidante involucrada en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno como superóxido, ozono y peróxido de hidrógeno (Yang et al., 2009).

Las GSTs de clase Sigma también se han identificado en vertebrados e invertebrados. Evolutivamente, divergieron antes del grupo alfa/mu/pi (Frova, 2006; Pearson, 2005). Es la clase de GST más heterogénea, mostrando diferencias en la distribución de los tejidos así como en la actividad bioquímica, sugiriendo distintos roles fisiológico según la especie. Por ejemplo, la HPGDS en mamíferos catalizan la síntesis de prostaglandina D2, un eicosanoide clave involucrado en la respuesta inflamatoria (Frova, 2006; Hervé et al., 2003; LaCourse et al., 2012)

en cambio, la S-cristalina del cristalino en cefalópodos carecen de actividad catalítica (Flanagan and Smythe, 2011). Las enzimas de la clase Sigma poseen una tirosina como residuo catalítico en su dominio N-terminal que activa al GSH formando y estabilizando el ión tiolato nucleofílico, mediante un puente de hidrogeno con el grupo hidroxilo de su cadena lateral (Flanagan and Smythe, 2011). Se plantea que, salvo para las S-cristalinas, la propiedad característica de las enzimas de clase Sigma es la síntesis de prostaglandinas, convirtiendo el producto de la ciclooxigenasa, PGH₂ en PGD₂ y PGE₂ en forma dependiente de GSH y de cationes divalentes (calcio y magnesio) en la interfaz del dímero (Flanagan and Smythe, 2011). Esto lleva a pensarlas como relevantes en la regulación de la respuesta inmune (Hervé et al., 2003; LaCourse et al., 2012).

1.3.3 GSTs en parásitos

Históricamente se consideraba que los helmintos exhibían escasos sistemas detoxificantes (Precious and Barrett, 1989). Si bien el sistema monooxigenasa CYP fue ampliamente detectado en la naturaleza, los esfuerzos para su detección en helmintos fueron infructuosos por varias décadas, llevando a que se les considere organismos excepcionales por la ausencia de dicho sistema (Precious and Barrett, 1989). Más recientemente se revirtió esta creencia por estudios de genómica. Por ejemplo, se identificaron, varios de estos genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, y en algunos helmintos relevantes para la salud pública como *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *Trichinella spirallis*, *Haemonchus contortus*, *Onchocerca volvulus*, *Ascaris summ*, entre otros (Brophy et al., 2012; Cvilink et al., 2009; Cwiklinski et al., 2015; Lindblom and Dodd, 2006; Matoušková et al., 2016; Prchal et al., 2015; Pushparajah et al., 2008; Saeed et al., 2002). Sin embargo, la información disponible sugiere que, en los helmintos parásitos, la fase I de la biotransformación está dominada por reacciones de reducción y de hidrólisis así como por un bajo número de enzimas oxidativas (Arbildi et al., 2011; Barrett, 2009; Cvilink et al., 2009). En cambio, en la bioquímica de la fase II del metabolismo de xenobióticos, las enzimas GSTs juegan un papel clave, por lo que se las proponen como la principal vía de detoxificación enzimática de compuestos potencialmente tóxicos (Sheehan et al., 2001). Por ejemplo, algunas interceptan los compuestos dañinos generados por los radicales libres ya sea producidos por su propio metabolismo como los que derivan de las defensas de su hospedero (Torres-Rivera and Landa, 2008). Además, se localizó actividad GST en diversos tejidos parasitarios, aunque, generalmente, se encontraron en aquellos tejidos expuestos o involucrados en la interacción con el entorno, tanto del estadio adulto como del larvario (Torres-Rivera and Landa, 2008).

Cada helminto parásito expresa varias GSTs relacionadas con diferentes clases. Es oportuno mencionar que, en términos generales, se acepta extrapolar la clasificación de las GSTs de mamíferos a las de helmintos, porque a pesar de la baja identidad entre las secuencias, presentan una alta similitud a nivel estructural. En este contexto, se han identificado GSTs de las clases Mu, Pi, Sigma y Omega en la mayoría de los parásitos helmintos (Dowling et al., 2010; Harispe et al., 2010; Iriarte et al., 2012; LaCourse et al., 2012; Liebau et al., 2008; Vibanco-Perez et al., 2002; Walker et al., 1993). Se caracterizaron a nivel molecular y bioquímico, tanto en trematodos como en nematodos, y algo menos en cestodos (Dowling et al., 2010; Harispe et al., 2010; Iriarte et al., 2012; LaCourse et al., 2012; Liebau et al., 2008; Vibanco-Perez et al., 2002; Walker et al., 1993).

Como ya se mencionó, las GSTs de los parásitos helmintos parecen tener un papel clave para la supervivencia en su hospedero. Por ejemplo, se identificaron GSTs parasitarias capaces de conjugar GSH a productos secundarios de la peroxidación de lípidos, tanto en platelmintos como en nematodos (Harispe et al., 2010; Liebau et al., 2008; Vibanco-Perez et al., 2002). Asimismo, algunas GSTs parasitarias, utilizadas como antígenos vacunales, otorgan cierto grado de protección contra la correspondiente infección helmíntica (Riveau et al., 2018). Otras tienen la capacidad de predisponer al sistema inmune del hospedero a polarizarse a un perfil menos agresivo permitiendo al parásito, establecerse y sobrevivir en él (Dowling et al., 2010; Sommer et al., 2003). Por ejemplo, las GSTs parasitarias de clase Sigma son capaces de sintetizar prostaglandinas D2 y E2 así como de inducir su producción por parte de las células inmunes del hospedero (Dowling et al., 2010). Las prostaglandinas son importantes mediadores lipídicos claves en la regulación de la respuesta del hospedero. Así, estas enzimas podrían alterar la función de las células dendríticas, afectando así la diferenciación de las células T, por ejemplo, atenuando el desarrollo de una respuesta inmune Th 17 (Flanagan and Smythe, 2011; Meyer et al., 1996).

Además, otras GSTs como las de clase Omega, exhiben funciones relacionadas con la protección frente al estrés oxidativo. Por un lado, estas GSTs, por su actividad tioltransferasa, están involucradas en la glutationilación reversible de las proteínas, es decir, en la formación de disulfuros mixtos entre el GSH y residuos de cisteína de ciertas proteínas evitando su oxidación (Board and Menon, 2016). Por otro lado, estas enzimas también presentan actividad dehidroascorbato reductasa dependiente de GSH, que contribuyen a mantener el balance redox de la célula (Board and Menon, 2016). Se identificaron GSTs de clase Omega en *O. volvulus*, *Clonorchis sinensis*, *Fasciola hepática* y *S. mansoni* (Chemale et al., 2006; Girardini et al., 2002; Kim et al., 2016; Liebau et al., 2008) y se comprobó en dos de ellas que exhibían ambas

actividades (tioltransferasa y dehidroascorbato reductasa) sugiriendo que podrían estar involucradas en la respuesta antioxidante del parásito (Girardini et al., 2002; Kim et al., 2016).

1.3.4 Antecedentes en el estudio de GST en *E. granulosus*

En el caso particular del cestodo *E. granulosus*, se ha detectado actividad GST tanto en la fracción citosólica de protoescolex de *E. granulosus* (Morello et al., 1982) como de parásitos intactos (Repetto et al., 1986). Posteriormente, se obtuvo una fracción de 25 kDa con actividad GST (EgGST1) purificada de un extracto de protoescolex, mediante afinidad a GSH (Fernandez and Hormaeche, 1994). El análisis filogenético mostró que EgGST1 se agrupa con las enzimas de clase Mu de mamíferos (Fernandez et al., 2000) y su caracterización bioquímica sugiere que podría actuar como enzima detoxificante en el contexto de la infección, en particular, por su capacidad de conjugar carbonilos reactivos y por su actividad peroxidasa dependiente de GSH (Harispe et al., 2010). Además, la caracterización cinética de EgGST1 mostró un mecanismo cinético consistente con un mecanismo secuencial aleatorio concordante con las enzimas de clase Mu de mamíferos (Arbildi et al., 2017b).

Asimismo, se identificaron otras dos GSTs diferentes en este parásito, llamadas EgGST2 y EgGST3, las cuales se expresan activamente en el parásito (Iriarte et al., 2012). Los estudios filogenéticos mostraron claramente que EgGST2 pertenece a la clase Sigma de las GST de mamíferos, aunque EgGST3 no pudo ser clasificada dentro de ninguna de las clases descritas. De hecho EgGST3 parece formar parte de una nueva clase de GST, debido a que filogenéticamente se encuentra entre la clase Sigma y Omega (Iriarte et al., 2012). El dominio N-terminal mostró algunos residuos característicos de la clase Omega, incluido el posible residuo catalítico, y el dominio C-terminal se agrupó filogenéticamente con las GSTs de clase Sigma (Iriarte et al., 2012). Recientemente, se demostró que EgGST2 y EgGST3 podrían naturalmente formar dímeros entre ellos (Arbildi et al., 2017a) y se realizó la caracterización bioquímica de su forma recombinante EgGST2-3r (Lopez-Gonzalez et al., 2018). Se observó que la actividad canónica disminuía considerablemente con todos los inhibidores convencionales, así como también con algunas drogas antihelmínticas, como los fenoles halogenados, sugiriendo una posible función de detoxificación pasiva (Lopez-Gonzalez et al., 2018). Adicionalmente, EgGST2-3r mostró actividad peroxidasa con productos secundarios de la peroxidación de lípidos (Lopez-Gonzalez et al., 2018).

El presente trabajo tiene como objetivo general contribuir a la comprensión de los posibles roles de las enzimas GSTs de *E. granulosus* en la biología de este cestodo así como en la infección por

el mismo. En particular en este trabajo se presenta el análisis de las propiedades enzimáticas de la forma recombinante EgGST2-3r, heterodímero compuesto por EgGST2 y EgGST3. Con este fin se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1- Estudiar los factores que afectan la estabilidad y velocidad enzimática de EgGST2-3r. En particular, se analizarán cómo se afectan estos parámetros a diferentes fuerzas iónicas, pH y temperaturas.
- 2- Determinar los parámetros cinéticos de EgGST2-3r

Vale la pena mencionar que datos generados en este trabajo forman parte de un artículo publicado (Arbildi et al., 2017a) que se anexa a este trabajo.

2 Materiales y métodos

2.1 Producción y purificación de EgGST2-3r

2.1.1 Producción de EgGST2r

Se creció durante una noche en agitación (200 rpm) a 37°C una colonia de *E. coli* BL21 (DE3) transformada con las construcciones pET28-EgGST2 y pET5a-EgGST3 en 10 mL de medio Luria Bertani (LB) conteniendo 50 mg/L de kanamicina y 200 mg/L de ampicilina. El cultivo nocturno se inoculó en 600 mL del mismo medio conteniendo además 0.25% de glucosa. Se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una $D_{600nm} = 0.6$ (aproximadamente 3 hs). Se adicionó 0.4 mM de Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó a 20°C con agitación durante 3 hs. Se cosecharon las células por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min a 10°C, y el pellet celular se resuspendió en 80 mL de solución de lisado (PBS, Tritón-X 100 1% y DTT 5 mM). Las paredes celulares se rompieron por sonicación utilizando un sonicador Omni-Ruptor 4000 (OMNI international inc), durante 15 minutos a 40% de potencia y 30% de pulso, en hielo. La fracción soluble se obtuvo por centrifugación (5000 rpm, 10 min, 15°C). Posteriormente, el sobrenadante se centrifugó 2 veces más a 13000 rpm durante 10 min a 15°C. La proteína recombinante se purificó a partir de la fracción soluble en 2 etapas: primero por cromatografía de afinidad a Niquel y luego por gel filtración.

2.1.2 Purificación por cromatografía de afinidad a IMAC(Ni²⁺)

El heterodímero recombinante posee una cola de poli-histidina en la subunidad EgGST2, posibilitando su purificación por afinidad a niquel, empleando una columna Ni-NTA (Invitrogen). Brevemente, se utilizó la columna Ni-NTA equilibrada con amortiguador nativo (NaHPO₄ 50 mM (pH 8), NaCl 500 mM) para sembrar el sobrenadante con el heterodímero recombinante por

decantación. Luego de lavar con 25 volúmenes de amortiguador nativo conteniendo imidazol 20 mM, EgGST2-3r se recuperó con solución de elución (amortiguador nativo conteniendo imidazol 500 mM). El proceso de purificación se siguió evaluando los eluidos con el reactivo de Bradford, conservando las fracciones que contenían mayor concentración de proteína.

2.1.3 Cromatografía Gel Filtración

El exceso de imidazol se retiró de las fracciones de alta concentración proteica obtenidas de la purificación por Ni-NTA, por cromatografía de gel filtración utilizando una columna Superdex 75 (GE-Healthcare) equilibrada con 20 mM Tris-HCl pH 8 conteniendo 50 mM NaCl. La concentración proteica de EgGST2-3r purificada, se estimó por el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando seroalbumina bovina (Sigma) como estándar.

La calidad y pureza de la preparación de EgGST2-3r se siguió por electroforesis SDS-PAGE 15% desnaturalizante (Green and Sambrook, 2012), sembrando una alícuota de las fracciones obtenidas en las diferentes etapas del proceso de purificación. La electroforesis se realizó en un buffer de corrida (Tris 11mM, glicina 100 mM, SDS 1%) a 120V durante aproximadamente 2 hs. Finalmente el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue (Green and Sambrook, 2012).

2.2 Ensayo de actividad GST

La actividad canónica fue determinada como se describió previamente (Harispe et al., 2010), en amortiguador fosfato 100 mM (pH6.5) con 1 mM de 1-cloro-2,4-dinitro-benceno (CDNB) y 4 mM de glutatión (GSH) a 25°C (volumen final 1 mL). La reacción se inició por adición de la enzima (0.4 mM) y los cambios en absorbancia a 340 nm (ϵ 9.6 mM⁻¹cm⁻¹) se siguieron por 1 minuto en espectrofotómetro T70 UV/Vis (PG instruments Ltd). El CDBN fue preparado en etanol, y la concentración final de etanol en la mezcla de reacción fue constante (0.9% v/v). El ensayo no enzimático fue restado del ensayo con la enzima. Cada medida fue realizada por triplicado, y cada experimento se realizó en forma independiente por lo menos dos veces.

2.3 Determinación de los parámetros cinéticos

Se determinaron las velocidades iniciales bajo condiciones en las que la concentración de uno de los sustratos se varió mientras que la del otro se mantuvo constante. Similar a la sección anterior, la mezcla de reacción contenía 0.4 mM de EgGST2-3r y diferentes concentraciones de CDBN (10 – 75 mM) y GSH (0.5 - 4mM). Para obtener los parámetros aparentes $V_{max\ app}$ y K_{app} , se graficó, por un lado, las velocidades iniciales en función de la concentración de cada sustrato ajustando las curvas a la ecuación hiperbólica del modelo de Michaelis-Menten (Ec. 1)

(Copeland, 2000). Por otro lado, se utilizó la linealización de Hanes-Woolf (Ec. 2) graficando la relación de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial versus la concentración de sustrato. La $k_{cat\ app}$ se calculó utilizando la Ec. 3.

$$v = V_{max}[S]/([S] + K_M) \quad \text{Ec. 1}$$

$$([S]/v) = ([S]/V_{max}) + (K_M/V_{max}) \quad \text{Ec. 2}$$

$$k_{cat} = V_{max}/[E] \quad \text{Ec. 3}$$

2.4 Análisis de la estabilidad enzimática

Se analizó la estabilidad de la enzima recombinante incubando a EgGST2-3r en diferentes condiciones de pH, fuerza iónica y temperatura por 10 minutos. Por un lado, EgGST2-3r se incubó en 0.1 M MES, 0.052 M Tris, 0.052 M etanolamina a diferentes pH (5 – 10) y fuerza iónica constante (Ellis and Morrison, 1982) a temperatura ambiente. Por otro lado, se incubó en amortiguador fosfato con diferentes fuerzas iónicas (50 – 500 mM) a temperatura ambiente. Finalmente en amortiguador fosfato 100 mM a diferentes temperaturas (20 – 60°C). Luego, se determinó espectrotométicamente (FLUOstar Optima, BMG Labtech), la actividad canónica remanente frente a GSH y CDNB en un volumen final de 200 uL (placa de microtitulación). Se determinó el porcentaje de actividad remanente en función al punto de mayor actividad.

2.5 Determinación de la actividad enzimática

2.5.1 Efecto de la temperatura en la actividad GST

Se determinó la actividad en condiciones estándar frente a GSH y CDNB a diferentes temperaturas (20 – 60°C) en espectrofotómetro T70 UV/Vis (PG instruments Ltd), termostáticamente controlado. El amortiguador fue termostatzado a la temperatura correspondiente previo a la reacción. Se determinó el porcentaje de actividad en función al punto de mayor actividad.

2.5.2 Efecto de la fuerza iónica en la actividad GST

Se determinó la actividad en condiciones estándar frente a GSH y CDNB variando la fuerza iónica del amortiguador (50 – 500 mM) en espectrofotómetro T70 UV/Vis (PG instruments Ltd) a 25°C. Se determinó el porcentaje de actividad en función al punto de mayor actividad.

2.5.3 Efecto del pH en la actividad GST

Se determinó la actividad en condiciones estándar frente a GSH y CDNB variando el pH (5 -8), empleando amortiguadores de fuerza iónica constante (0.1 M MES, 0.052 M Tris, 0.052 M

etanolamina) (Ellis and Morrison, 1982) en espectrofotómetro T70 UV/Vis (PG instruments Ltd) a 25°C. Se determinó el porcentaje de actividad en función al punto de mayor actividad.

2.6 Análisis estadístico

En todos los casos se empleó el software Prisma Graph Pad v.5.03 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com), comparando con el test One way ANOVA.

3 Resultados y discusión

3.1 Producción y purificación de EgGST2-3r

La proteína recombinante heterodimérica EgGST2-3 (EgGST2-3r) se purificó de células *E. coli* (DE3) previamente co-transformadas para la producción de ambas subunidades (Arbildi et al., 2017a). El proceso de purificación se siguió por electroforesis en gel de poliacrilamida (Figura 3.1). El extracto bacteriano crudo del cultivo inducido (carril T, Totales) muestra una banda muy marcada del peso molecular aparente esperado, aproximadamente 26 kDa (EgGST-2 25.5 y EgGST-3 26.7 kDa) donde la mayor parte se presenta en forma soluble (carril I, Insoluble versus carril S, Soluble). Los carriles P (percolado) y L (lavados) muestran que la proteína fue retenida en su totalidad por la columna de Ni-agarosa, la cual eluyó con alto grado de pureza (carril E). Por cada litro de medio de cultivo se obtuvo 20 mg de proteína pura. La actividad específica de EgGST2-3r, determinada en condiciones estándar, se mantuvo entre 3.0-3.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ entre diferentes lotes. En paralelo se confirmó que EgGST2-3r purificada está constituida por ambas subunidades, rEgGST2 y rEgGST3 utilizando Western blot y MALDI TOF/TOF (Arbildi et al., 2017a).

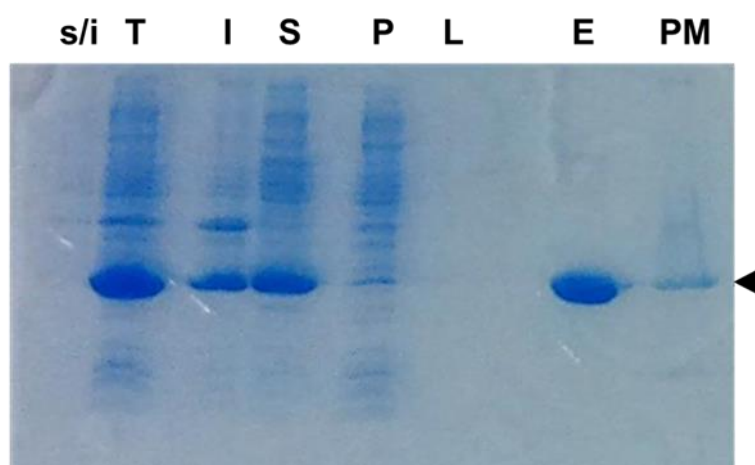


Figura 3.1. Seguimiento del proceso de purificación del heterodímero EgGST2-3r. Las fracciones obtenidas durante la purificación se analizaron por 15% SDS PAGE en condiciones reductoras y se visualizaron con Coomassie Blue. Carriles: bacterias sin inducir (s/i), fracción total obtenida posterior a la inducción y al sonicated (T), fracción insoluble resuspendida (I), fracción soluble (S), percolado del pasaje por columna de Ni-NTA (P), último lavado de la columna de afinidad (L), muestra de la elución de la columna (E). PM corresponde al peso molecular de 26kDa.

3.2 Factores que afectan la estabilidad y actividad enzimática de EgGST2-3r

En una reacción enzimática, la estabilidad y actividad pueden ser afectadas por un número de condiciones de la solución, por ejemplo: pH, fuerza iónica, temperatura, entre otros (Copeland, 2000). El pH, en general, afecta la actividad catalítica de varias maneras. Como todas las proteínas, las enzimas tienen una estructura terciaria nativa sensible al pH. Si bien el rango de pH donde las enzimas nativas son estables depende de cada proteína, la mayor parte de ellas son estables cerca del pH fisiológico (pH 7.4) y su desnaturalización ocurre a pHs extremadamente bajos o altos. A pesar de esto, algunas muestran su máxima actividad enzimática a valores de pH muy lejanos al fisiológico. Típicamente, si bien la proteína puede mantener su conformación en un relativo amplio rango de pH (entre 4 y 5 unidades), la velocidad de la reacción enzimática puede variar significativamente. La dependencia de la actividad enzimática con el pH es de práctica importancia para optimizar las condiciones de ensayo así como también brinda información útil con respecto al rol de los grupos ácido-base involucrados en el cambio de la enzima (Copeland, 2000). Generalmente, la catálisis enzimática muestra un comportamiento tipo gaussiano (acampanado) frente a variaciones de pH, cuyo máximo (máximo valor de velocidad enzimática o V_{max}) corresponde al pH óptimo. La disminución de la actividad a ambos lados del máximo podría deberse a que la variación de pH afecte la estabilidad de la enzima, provocando pérdida de la activación catalítica. Asimismo, la naturaleza del buffer de reacción puede afectar la actividad (Scopes, 2002).

La mayoría de las catálisis químicas muestran un aumento en la actividad con el aumento de la temperatura, y las enzimas no son la excepción. Sin embargo, las enzimas al ser proteínas experimentan la desnaturalización térmica a elevadas temperaturas. Por lo tanto, la actividad de una enzima típica aumentará conforme aumenta la temperatura, hasta un rango de temperatura determinado, y luego disminuirá significativamente debido a la desnaturalización de la proteína. Puesto que la temperatura de la mezcla de reacción puede tener un dramático

efecto en los parámetros cinéticos de la reacción de catálisis de la enzima, es crítico controlar cuidadosamente la temperatura durante las medidas de velocidad inicial (Copeland, 2000).

3.2.1 Efectos de la fuerza iónica en la estabilidad y actividad enzimática

Inicialmente, se analizó el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad enzimática de EgGST2-3r en el rango de fuerza iónica entre 50 y 500 mM. Para ello se incubó la enzima durante 10 minutos en soluciones amortiguadoras con diferentes fuerzas iónicas a temperatura ambiente, determinando luego, la actividad enzimática remanente en condiciones estándar. En la figura 3.2 (A) se muestra que hay una tendencia al aumento de la actividad remanente entre 50 mM y 200 mM (de 80 a 100 %) y luego esta se mantiene constante hasta 500 mM. Posteriormente se analizó la actividad enzimática canónica de EgGST2-3r en soluciones amortiguadoras con diferentes fuerzas iónicas (entre 66.63-666.34 mM) a 25°C. En la figura 3.2 (B) se muestra que en el rango de fuerza iónica estudiado, la actividad de EgGST2-3r no fue afectada manteniéndose relativamente constante en un rango de 70-100%. Los resultados obtenidos muestran que tanto la estabilidad como actividad enzimática de EgGST2-3r no se ven significativamente afectadas ante el cambio de concentración de las soluciones amortiguadoras, en el rango analizado.

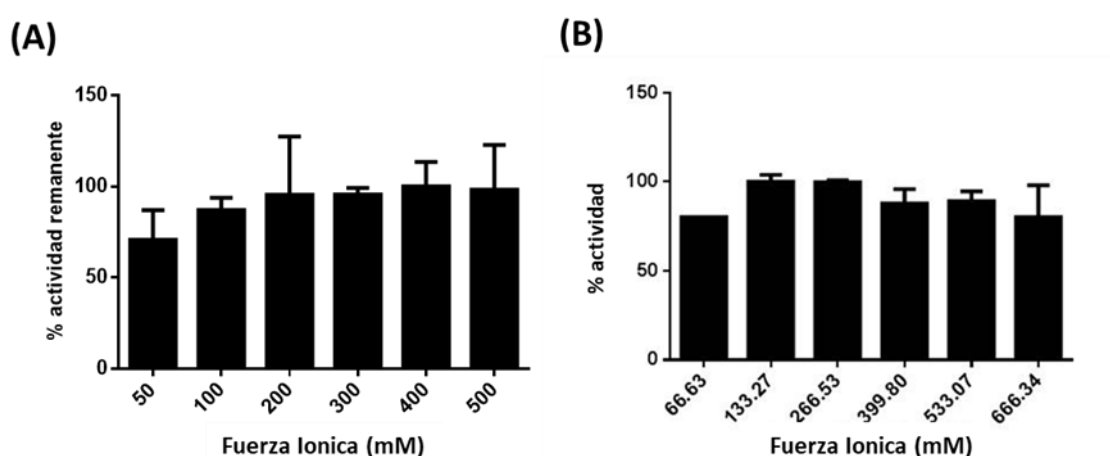


Figura 3.2. Efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad y actividad de EgGST2-3. Se determinaron las velocidades iniciales de la reacción de conjugación de GSH y CDNB en amortiguador fosfato (pH 6.5) empleando 0.4 mM de EgGST2-3 **(A)** en condiciones estándar luego de preincubar la enzima por 10 min en soluciones con diferentes fuerzas iónicas (50–500 mM) y **(B)** variando la fuerza iónica (66.63 – 666.34 mM) durante la medida de velocidad.

3.2.2 Efectos del pH sobre la estabilidad y actividad enzimática

Se analizó el efecto del pH sobre la estabilidad enzimática de EgGST2-3r. Para ello se incubó la enzima durante 10 minutos en soluciones amortiguadoras a diferentes pH (5-10) y posteriormente se determinó la actividad enzimática remanente en condiciones estándar. Si bien, como se mostró en la sección anterior, no se observaron efectos importantes de la variación de la fuerza iónica sobre la estabilidad o velocidad de la enzima, para este ensayo se emplearon soluciones amortiguadoras de fuerza iónica constante.

En la figura 3.3 (A) se muestra que en el rango de pH estudiado la actividad de EgGST2-3r no fue afectada manteniéndose relativamente constante en un rango de 80-100%. Sin embargo, para el valor de pH 5 se observó diferencia significativa con los valores de pH 6.5 y 9.5. Asimismo, se analizó el efecto de pH (rango entre 5-8) sobre la actividad enzimática de EgGST2-3r. La velocidad de la reacción de conjugación del GSH al CDBN se determinó en soluciones amortiguadoras a diferentes pH (fuerza iónica constante) a 25°C. En la figura 3.3 (B) se muestra que la actividad enzimática aumenta conforme se aumenta el pH en el rango de 5 a 7 (de 6 a 93%), valor donde se obtiene el máximo de actividad enzimática y luego decae nuevamente a pH 8.

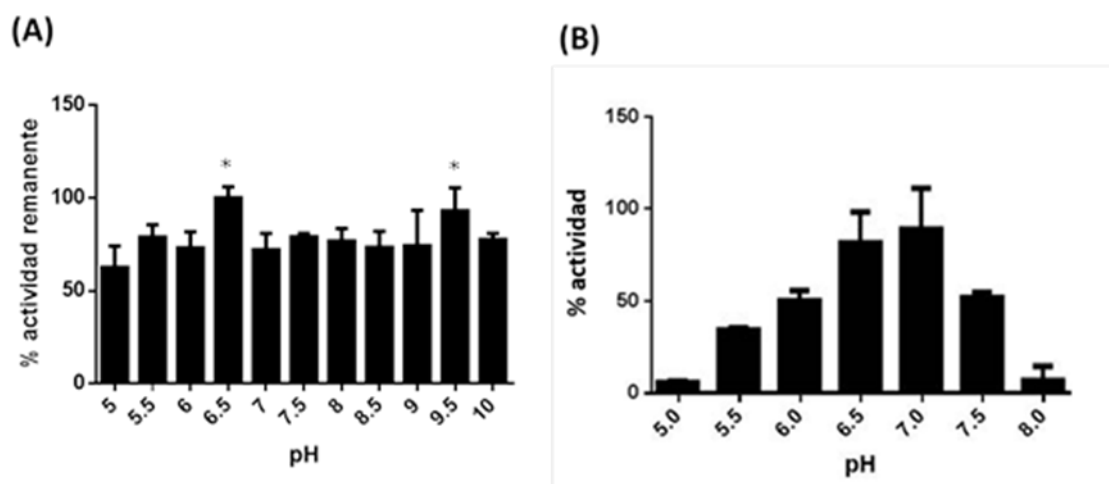


Figura 3.3. Efecto del pH sobre la estabilidad y actividad de EgGST2-3. Se determinó la velocidad inicial de la reacción canónica en amortiguador fosfato a fuerza iónica constante empleando 0.4 mM de EgGST2-3 **(A)** en condiciones estándar luego de pre-incubar la enzima durante 10 min en soluciones de diferentes valores de pH (5-10) y **(B)** a diferentes el pH (5-8). [nota: en (A),* corresponde a diferencia significativa con pH5 con $p < 0.05$]

3.2.3 Efecto de la temperatura en estabilidad y actividad enzimática

Se analizó el efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática de EgGST2-3r. Para ello se preincubó la enzima durante 10 minutos en soluciones amortiguadoras (de fuerza iónica

constante) a diferentes temperaturas entre 20 y 60°C, determinando luego, la actividad enzimática remanente en condiciones estándar. La figura 3.4 (A) muestra que en el rango de temperatura de 20 a 40°C la actividad de EgGST2-3r se mantuvo relativamente constante en un rango de 95-100%. Sin embargo, a 60°C se observó diferencia significativa con el resto de los valores de temperaturas trabajados, llegando a una actividad remanente de 8%. Esta caída en la actividad, seguramente se deba a la desnaturalización de la proteína.

A continuación, se analizó el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de EgGST2-3r. La actividad de la reacción canónica se determinó en soluciones amortiguadoras (de fuerza iónica constante) a diferentes temperaturas (20-60°C). La figura 3.4 (B) muestra que la actividad enzimática aumenta conforme se aumenta la temperatura en el rango de 20 a 25°C (de 66 a 100%), valor donde se obtiene el máximo de actividad enzimática y luego decae nuevamente, manteniéndose constante para el rango de 30 a 60°C (entre 40 y 68%).

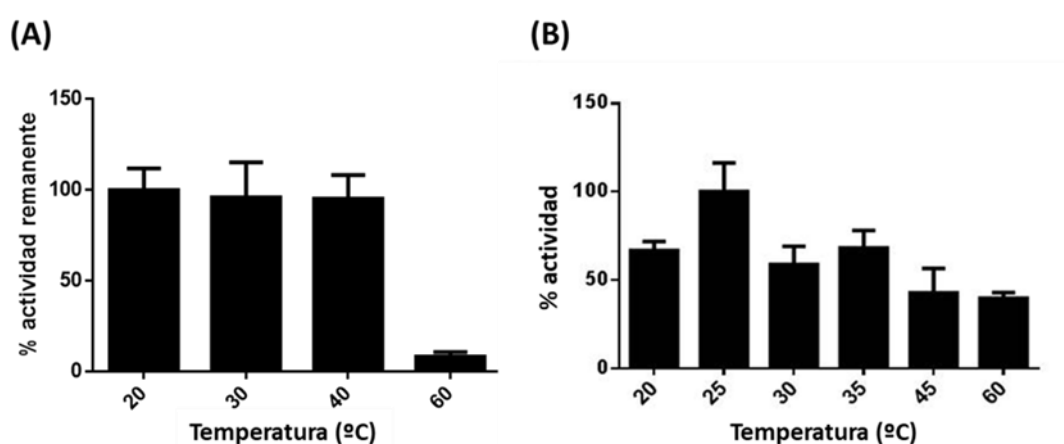


Figura 3.4. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad de EgGST2-3. Se determinó la velocidad inicial de la reacción canónica en amortiguador fosfato (pH 6.5) empleando 0.4 mM de EgGST2-3 (A) en condiciones estándar luego de preincubar la enzima a diferentes temperaturas (20–60°C) y (B) variando la temperatura (20 – 60°C).

3.3 Determinación de los parámetros cinéticos de EgGST2-3r

La cinética enzimática ofrece una rica información sobre los mecanismos catalíticos de la enzima y de la interacción de la enzima con los ligandos, como los sustratos y los inhibidores. En este trabajo se presentan los primeros estudios realizados con el fin de dilucidar el mecanismo cinético de EgGST2-3r. Los datos del gráfico de velocidad inicial versus la concentración de sustrato siguen una cinética hiperbólica que se ajusta a la ecuación de Michaelis-Menten y permite obtener los parámetros cinéticos K_M y k_{cat} (Copeland, 2000):

$$v = V_{\max} [S] / ([S] + K_M) \quad \text{Ecuación de Michaelis-Menten}$$

$$k_{\text{cat}} = V_{\max} / [E] \quad \text{Ecuación para determinar } k_{\text{cat}}$$

Es decir, mediante el gráfico de las velocidades iniciales en función de la concentración de sustrato se puede calcular la $V_{\max}$ y la constante de Michaelis-Menten (K_M). La constante k_{cat} se calculó a partir de los valores de $V_{\max}$ dividida la concentración de enzima total, como se mencionó en la sección materiales y métodos (Copeland, 2000).

El valor de K_M varía considerablemente de una enzima a la otra, y para una enzima en particular con diferentes sustratos. Se define K_M como la concentración de sustrato que resulta en la mitad de la máxima velocidad de la reacción enzimática. Otra manera de establecer esto, es que K_M representa la concentración de sustrato a la cual la mitad de los sitios activos de las moléculas de enzima presentes en la muestra están ocupados (saturados) por las moléculas de sustrato. El valor de k_{cat} es en ocasiones referido como el número de recambio de la enzima, dado que define el número de eventos catalíticos que ocurren por unidad de tiempo. El mismo se puede calcular directamente dividiendo el valor experimental de $V_{\max}$ sobre la cantidad de enzima presente en la reacción. El significado de k_{cat} se define como la máxima velocidad a la cual una reacción enzimática puede proceder a una concentración fija de enzima e infinita disponibilidad de sustrato. Debido a que k_{cat} se relaciona con las etapas químicas subsecuentes a la formación del complejo enzima-sustrato, cambios en k_{cat} , provocados por cambios en la enzima en determinadas condiciones de reacción, define perturbaciones que afectan las etapas químicas en la catálisis enzimática. En otras palabras, cambios en la k_{cat} reflejan perturbaciones en las etapas químicas subsecuentes a la unión inicial del sustrato (Copeland, 2000).

La eficiencia catalítica de una enzima, se calcula como la relación entre las constantes cinéticas k_{cat}/K_M . Dicho parámetro generalmente es utilizado para comparar la eficacia entre las diferentes enzimas aunque también es útil para comparar la eficiencia de una enzima en particular frente a diferentes sustratos (Copeland, 2000). La relación k_{cat}/K_M es generalmente una buena medida de los efectos de la unión del sustrato.

Dado que EgGST2-3r es una enzima bisustrática, su mecanismo cinético es muy complejo lo que dificulta la obtención de sus parámetros cinéticos, aunque se podría obtener una aproximación (parámetros aparentes) realizando los estudios en condiciones de saturación de uno de sus sustratos (GSH y CDNB) (Marangoni, 2003). Con el fin de estudiar los parámetros cinéticos de EgGST2-3r, se generó una matriz de datos de velocidad de reacción variando tanto la concentración de GSH como la de CDNB en forma independiente, asumiendo como concentraciones saturantes de los sustratos canónicos: 4 mM de GSH y 1 mM de CDNB (Harispe et al., 2010; Morello et al., 1982). La Figura 3.5 muestra las velocidades iniciales en función de la concentración de cada sustrato, ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten para

determinar los parámetros cinéticos aparentes de EgGST2-3r. De los dos co-sustratos que se estudiaron, el CDNB no alcanzó concentraciones de saturación posiblemente por su baja solubilidad en soluciones acuosas tendiendo a precipitar en la celda de reacción. Las curvas de velocidad de saturación por sustrato describen hipérbolas que no presentan desviaciones del modelo de Michaelis Menten (Ec. 3.1) confirmándose mediante la linealización de Hanes-Woolf (Ec. 3.2). Del ajuste de las hipérbolas generadas se obtuvieron las K_M^{app} para cada uno de los sustratos, siendo 0.39 y 3.72 mM para GSH y CDNB respectivamente. A través de la evaluación de las velocidades iniciales en condiciones estándar a diferentes concentraciones de EgGST2-3r, se determinó la V_{max} 0.03 mM/min variando GSH con CDNB fija y la k_{cat} aparente 1.73 s^{-1} (López-González, 2016). Los valores de K_M aparentes obtenidos en este trabajo, no difieren mucho de los valores reportados para el análogo rEgGST1 (0.32mM y 3.67mM respectivamente) (García, 2007). Asimismo, los parámetros son similares a aquellos determinados para GST Sigma Sm28GST (0.37 y 3.36 mM respectivamente) de *S. mansoni* (Walker et al., 1993). Sin embargo, se reportaron valores de K_M aparente para CDNB muy diferentes para la GST Mu de *E. multilocularis* (EmGST1, 0.32 mM) (Liebau et al., 1996) y para la Sigma de *T. solium* (recTsMσGST, 0.16 mM) (Nguyen et al., 2010), que pueden deberse a las variaciones en las secuencias de aminoácidos. Es decir, cambios no conservados en las zonas críticas de la proteína, por ejemplo, en los residuos involucrados en la interacción con los sustratos, brindará diferentes propiedades catalíticas y por consecuencia, diferencias en los parámetros cinéticos.

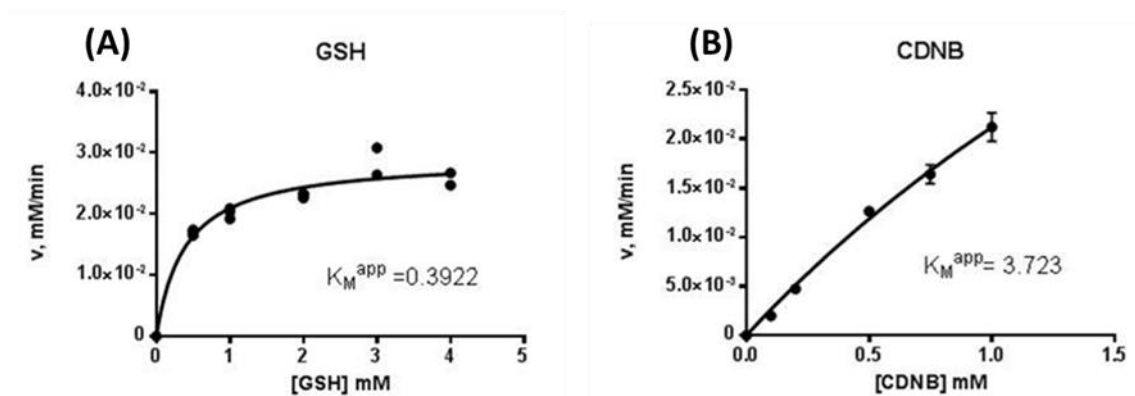


Figura 3.5. (A) Velocidad enzimática a diferentes concentraciones de GSH dejando fija la concentración de CDNB. **(B)** Velocidad enzimática a diferentes concentraciones de CDNB dejando fija la concentración de GSH.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se presenta la producción y el análisis enzimológico de la enzima recombinante de *E. granulosus* EgGST2-3r, enzimáticamente activa. Se determinaron sus parámetros cinéticos siendo la K_M aparente para el GSH 0.39 mM y para el CDNB 3.72 mM, la V_{max} 0.03 mM/min variando GSH con CDNB fija y se informó la k_{cat} aparente 1.73 s^{-1} .

Por otra parte, se analizó el efecto de la temperatura, la fuerza iónica y el pH en la estabilidad y en la actividad de la enzima EgGST2-3r. La estabilidad de la enzima no se vio afectada por las distintas condiciones de pH o fuerza iónica analizadas en este trabajo. Asimismo, la estabilidad de EgGST2-3r permaneció incambiada hasta una temperatura de 40°C, aunque disminuyó drásticamente a los 60°C. Por su lado, los estudios de dependencia de la velocidad de reacción con estos factores, por un lado, mostraron que la fuerza iónica no influye en ella, al menos en el rango aquí analizado. Además, permitió concluir que la mayor actividad de catálisis se alcanzó a pH 7 y a 25°C. A la temperatura fisiológica (37°C), si bien la velocidad de reacción no es la máxima, se podría considerar que es una condición favorable para EgGST2-3r, ya que la enzima está activa pero no estaría sobreexigida.

Del presente trabajo se hizo evidente analizar el patrón de sustratos y el perfil de inhibidores así como también valorar otras actividades enzimáticas. Esto fue realizado por Verónica López en el contexto de su tesis de maestría y fue publicado en *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol: 211, pp. 26-30. (2017).

Por otro lado, sería conveniente averiguar el aporte de cada subunidad que compone el heterodímero estudiado, en los datos obtenidos en este trabajo así como el realizado por Verónica López. Para ello sería necesario obtener las formas recombinantes de los correspondientes homodímeros y realizarles los mismos ensayos. Sin embargo, luego de varios años de esfuerzos e intentos, todavía no se ha logrado obtener los homodímeros recombinantes de manera soluble.

Bibliografía

- Arbildi, P., La-Rocca, S., Fernandez, V., 2011. Glutathione transferases in helminth parasites, in: Esteves, A. (Ed.), *Research in Helminths*. Transworld Research Network, Kerala, India, pp. 57–72.
- Arbildi, P., La-Rocca, S., Lopez, V., Da-Costa, N., Fernandez, V., 2017a. *Echinococcus granulosus*: Evidence of a heterodimeric glutathione transferase built up by phylogenetically distant subunits. *Mol. Biochem. Parasitol.* 211, 26–30.

- <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.12.006>
- Arbildi, P., Turell, L., Lopez, V., Alvarez, B., Fernandez, V., 2017b. Mechanistic insights into EgGST1, a Mu class glutathione S-transferase from the cestode parasite *Echinococcus granulosus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 633, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2017.08.014>
- Atias, A., 2011. Parasitología médica. Mediterráneo, Chile.
- Barrett, J., 2009. Forty years of helminth biochemistry. *Parasitology* 136, 1633–1642. <https://doi.org/10.1017/S003118200900568X>
- Board, P.G., 2011. The omega-class glutathione transferases: Structure, function, and genetics. *Drug Metab. Rev.* 43, 226–235. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.561353>
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermini, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A. V, Rosner, M.H., Chrnyk, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F., Pandit, J., 2000. Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *J. Biol. Chem.* 275, 24798–24806. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001706200>
- Board, P.G., Menon, D., 2016. Structure, function and disease relevance of Omega-class glutathione transferases. *Arch. Toxicol.* 90, 1049–1067. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1691-1>
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3267–3288. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.019>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54.
- Brophy, P.M., MacKintosh, N., Morphew, R.M., 2012. Anthelmintic metabolism in parasitic helminths: Proteomic insights. *Parasitology* 139, 1205–1217. <https://doi.org/10.1017/S003118201200087X>
- Chemale, G., Morphew, R.M., Moxon, J. V., Morassuti, A.L., LaCourse, J., Barrett, J., Johnston, D.A., Brophy, P.M., 2006. Proteomic analysis of glutathione transferases from the liver fluke parasite, *Fasciola hepatica*. *Proteomics* 6, 6263–6273. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600499>
- Copeland, R.A., 2000. *Enzymes. A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2nd ed, Wiley-VCH. John Wiley & Sons, Inc, New York. <https://doi.org/10.7313/upo9781904761761.009>
- Cvilink, V., Lamka, J., Skálová, L., 2009. Xenobiotic metabolizing enzymes and metabolism of

- anthelmintics in helminths. *Drug Metab. Rev.* 41, 8–26. <https://doi.org/10.1080/03602530802602880>
- Cwiklinski, K., Dalton, J.P., Dufresne, P.J., LaCourse, J., Williams, D.J.L., Hodgkinson, J., Paterson, S., 2015. The *Fasciola hepatica* genome: Gene duplication and polymorphism reveals adaptation to the host environment and the capacity for rapid evolution. *Genome Biol.* 16, 71. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0632-2>
- Dowling, D.J., Hamilton, C.M., Donnelly, S., LaCourse, J., Brophy, P.M., Dalton, J., O'Neill, S.M., 2010. Major Secretory Antigens of the Helminth *Fasciola hepatica* Activate a Suppressive Dendritic Cell Phenotype That Attenuates Th17 Cells but Fails To Activate Th2 Immune Responses. *Infect. Immun.* 78, 793–801. <https://doi.org/10.1128/IAI.00573-09>
- Eckert, J., Deplazes, P., 2004. Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern. *Clin. Microbiol. Rev.* <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>
- Ellis, K.J., Morrison, J.F., 1982. Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* 87, 405–426.
- Fabrini, R., De Luca, A., Stella, L., Mei, G., Orioni, B., Ciccone, S., Federici, G., Lo Bello, M., Ricci, G., 2009. Monomer-dimer equilibrium in glutathione transferases: A critical re-examination. *Biochemistry* 48, 10473–10482. <https://doi.org/10.1021/bi901238t>
- Fernandez, C., Hormaeche, C.E., 1994. Isolation and biochemical characterisation of a glutathione S-transferase from *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Int. J. Parasitol.* 24, 1063–1066.
- Fernandez, V., Chalar, C., Martínez, C., Musto, H., Zaha, A., Fernandez, C., 2000. *Echinococcus granulosus*: Molecular cloning and phylogenetic analysis of an inducible glutathione S-transferase. *Exp. Parasitol.* 96, 190–194. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4571>
- Flanagan, J.U., Smythe, M.L., 2011. Sigma-class glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.* 43, 194–214. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.560157>
- Frova, C., 2006. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomol. Eng.* 23, 149–169. <https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2006.05.020>
- García, G., 2007. Tesina de Grado para Lic. Bioquímica: Caracterización enzimológica de una GST recombinante de *Echinococcus granulosus*. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Girardini, J., Amirante, A., Zemzoumi, K., Serra, E., 2002. Characterization of an omega-class glutathione transferase from *Schistosoma mansoni* with glutaredoxin-like dehydroascorbate reductase and thiol transferase activities. *Eur. J. Biochem.* 269, 5512–5521.

- Green, M.R., Sambrook, J., 2012. Chapter 19, in: Green, M.R., Sambrook, J. (Eds.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, p. capítulo 19, pp 1599–1604.
- Greenberg, R.M., 2013. ABC multidrug transporters in schistosomes and other parasitic flatworms. *Parasitol. Int.* 62, 647–653. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.02.006>
- Habig, W., Pabst, M., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-Transferase. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Harispe, L., García, G., Arbildi, P., Pascovich, L., Chalar, C., Zaha, A., Fernandez, C., Fernandez, V., 2010. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop.* 114, 31–36. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.12.003>
- Hayes, J.D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R., 2005. Glutathione Transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64296-4>
- Hervé, M., Angeli, V., Pinzar, E., Wintjens, R., Faveeuw, C., Narumiya, S., Capron, A., Urade, Y., Capron, M., Riveau, G., Trottein, F., 2003. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. *Eur. J. Immunol.* 33, 2764–2772. <https://doi.org/10.1002/eji.200324143>
- Higgins, L.G., Hayes, J.D., 2011. Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents. *Drug Metab. Rev.* 43, 92–137. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.567391>
- Iriarte, A., Arbildi, P., La-Rocca, S., Musto, H., Fernandez, V., 2012. Identification of novel glutathione transferases in *Echinococcus granulosus*. An evolutionary perspective. *Acta Trop.* 123, 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.010>
- Ivanetich, K.M., Goold, R.D., 1989. A rapid equilibrium random sequential bi-bi mechanism for human placental glutathione S-transferase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 998, 7–13. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(89\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0167-4838(89)90111-8)
- Ivanetich, K.M., Goold, R.D., Sikakana, C.N.T., 1990. Explanation of the non-hyperbolic kinetics of the glutathione S-transferases by the simplest steady-state random sequential Bi Bi mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 39, 1999–2004. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90621-Q](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90621-Q)
- Jakobson, I., Askelof, P., Warholm, M., Mannervik, B., 1977. A Steady-State-Kinetic Random Mechanism for Glutathione S-Transferase A from Rat Liver. A Model Involving Kinetically Significant Enzyme-Product Complexes in the Forward Reaction. *Eur. J. Biochem.* 77, 253–262. <https://doi.org/doi:10.1111/j.1432-1033.1977.tb11664.x>
- Kalinina, E. V., Chernov, N.N., Novichkova, M.D., 2014. Role of glutathione, glutathione

- transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes. *Biochem.* 79, 1562–1583. <https://doi.org/10.1134/s0006297914130082>
- Kim, J.-G., Ahn, C.-S., Kim, S.-H., Bae, Y.-A., Kwon, N.-Y., Kang, I., Yang, H.-J., Sohn, W.-M., Kong, Y., 2016. *Clonorchis sinensis* omega-class glutathione transferases play major roles in the protection of the reproductive system during maturation and the response to oxidative stress. *Parasites and Vectors* 9, 337–342. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1622-2>
- LaCourse, J., Perally, S., Morphew, R.M., Moxon, J. V., Prescott, M., Dowling, D.J., O'Neill, S.M., Kipar, A., Hetzel, U., Hoey, E., Zafra, R., Buffoni, L., Arévalo, J., Brophy, P.M., 2012. The Sigma class glutathione transferase from the liver fluke *fasciola hepatica*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1666. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001666>
- Liebau, E., Höppner, J., Mühlmeister, M., Burmeister, C., Lüersen, K., Perbandt, M., Schmetz, C., Büttner, D., Brattig, N., 2008. The secretory omega-class glutathione transferase OvGST3 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*. *FEBS J.* 275, 3438–3453. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06494.x>
- Liebau, E., Müller, V., Lucius, R., Walter, R.D., Henkle-Dührsen, K., 1996. Molecular cloning, expression and characterization of a recombinant glutathione S-transferase from *Echinococcus multilocularis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 49–56. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02578-9](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02578-9)
- Lindblom, T.H., Dodd, A.K., 2006. Xenobiotic Detoxification in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 305, 702–730. <https://doi.org/10.1002/jez.a.324>
- López-González, V., 2016. Hidatidosis : Caracterización de nuevas glutatión transferasas. Tesis de Maestría en PEDECIBA-Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Lopez-Gonzalez, V., La-Rocca, S., Arbildi, P., Fernandez, V., 2018. Characterization of catalytic and non-catalytic activities of EgGST2-3, a heterodimeric glutathione transferase from *Echinococcus granulosus*. *Acta Trop.* 180, 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.01.007>
- Marangoni, A.G., 2003. Two-substrate reactions, in: *Enzyme Kinetics. A Modern Approach*. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, pp. 90–101. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11599-9_15
- Matoušková, P., Vokřál, I., Lamka, J., Skálová, L., 2016. The Role of Xenobiotic- Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends Parasitol.* 32, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.02.004>
- Menon, D., Board, P.G., 2013. A role for glutathione transferase omega 1 (GSTO1-1) in the

- glutathionylation cycle. J. Biol. Chem. 288, 25769–25779.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487785>
- Meyer, D.J., Muimo, R., Thomas, M., Coates, D., Isaac, R.E., 1996. Purification and characterization of prostaglandin-H E-isomerase, a sigma-class glutathione S-transferase, from *Ascaridia galli*. Biochem. J. 313, 223–227.
- Morello, A., Repetto, Y., Atias, A., 1982. Characterization of glutathione S-transferase activity in *Echinococcus granulosus*. Comp. Biochem. Physiol. B. 72, 449–452.
- Nguyen, H.A., Bae, Y.-A., Lee, E.G., Kim, S.H., Diaz-Camacho, S.P., Nawa, Y., Kang, I., Kong, Y., 2010. A novel sigma-like glutathione transferase of *Taenia solium* metacestode. Int. J. Parasitol. 40, 1097–1106. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.03.007>
- Nicolao, M.C., Denegri, G.M., Cárcamo, J.G., Cumino, A.C., 2014. P-glycoprotein expression and pharmacological modulation in larval stages of *Echinococcus granulosus*. Parasitol. Int. 63, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.09.017>
- Osimani, J.J., 1982. Parasitología Médica, 1ra ed. Librería Médica, Montevideo, Uruguay.
- Pabst, M., Habig, W., Jakoby, W., 1974. Glutathione S-transferase A. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. J. Biol. Chem. 249, 7140–7148.
- Pearson, W.R., 2005. Phylogenies of glutathione transferase families. Methods Enzymol. 401, 186–204. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01012-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8)
- Prchal, L., Bártíková, H., Bečanová, A., Jirásko, R., Vokřál, I., Stuchlíková, L., Skálová, L., Kubíček, V., Lamka, J., Trejtnar, F., Szotáková, B., 2015. Biotransformation of anthelmintics and the activity of drug-metabolizing enzymes in the tapeworm *Moniezia expansa*. Parasitology 142, 648–659. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001711>
- Precious, W.Y., Barrett, J., 1989. Xenobiotic metabolism in helminths. Parasitol. Today 5, 156–160. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90080-X](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90080-X)
- Pushparajah, D.S., Umachandran, M., Plant, K.E., Plant, N., Ioannides, C., 2008. Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. Mutagenesis 23, 299–308. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen012>
- Repetto, Y., Aldunate, J., Letelier, M.E., Morello, A., 1986. Glutathione S-transferase activity in intact protoscolices of *Echinococcus granulosus*. Biochem. Soc. Trans. 14, 132–133. <https://doi.org/10.1042/bst0140132>
- Riveau, G., Schacht, A.M., Dompnier, J.P., Deplanque, D., Seck, M., Waucquier, N., Senghor, S., Delcroix-Genete, D., Hermann, E., Idris-Khodja, N., Levy-Marchal, C., Capron, M., Capron, A., 2018. Safety and efficacy of the rSh28GST urinary schistosomiasis vaccine: A phase 3

- randomized, controlled trial in Senegalese children. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006968. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006968>
- Saeed, H.M., Mostafa, M.H., O'Connor, P.J., Rafferty, J.A., Doenhoff, M.J., 2002. Evidence for the presence of active cytochrome P450 systems in *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium* adult worms. *FEBS Lett.* 519, 205–209. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02755-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02755-2)
- Schramm, V.L., McCluskey, R., Emig, F.A., Litwack, G., 1984. Kinetic studies and active site-binding properties of glutathione S-transferase using spin-labeled glutathione, a product analogue. *J. Biol. Chem.* 259, 714–722.
- Scopes, R.K., 2002. Enzyme Activity and Assays. *Encycl. Life Sci.* <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000712>
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Sommer, A., Rickert, R., Fischer, P., Steinhart, H., Walter, R.D., Liebau, E., 2003. A dominant role for extracellular glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus* is the production of prostaglandin D2. *Infect. Immun.* 71, 3603–3606. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3603-3606.2003>
- Tang, S.-S., Chang, G.-G., 1995. Steady-state kinetics and chemical mechanism of octopus hepatopancreatic glutathione transferase. *Biochem. J.* 309, 347–353. <https://doi.org/doi:10.1042/bj3090347>
- Thompson, R.C.A., 1995. Biology and systematics of *Echinococcus*, in: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. (Eds.), *Echinococcus and Hydatid Disease*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 1–50.
- Torres-Rivera, A., Landa, A., 2008. Glutathione transferases from parasites: A biochemical view. *Acta Trop.* 105, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.08.005>
- Vibanco-Perez, N., Jimenez, L., Mendoza-Hernandez, G., Landa, A., 2002. Characterization of a recombinant mu-class glutathione S-transferase from *Taenia solium*. *Parasitol. Res.* 88, 398–404. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0580-5>
- Walker, J., Crowley, P., Moreman, A.D., Barrett, J., 1993. Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 61, 255–264. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90071-5](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90071-5)
- Waxman, D.J., 1990. Glutathione S-Transferases: Role in Alkylating Agent Resistance and Possible Target for Modulation Chemotherapy-A Review. *Cancer Res.* 50, 6449–6454.
- Xu, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport

by xenobiotics. Arch. Pharm. Res. 28, 249–268. <https://doi.org/10.1007/BF02977789>

Yang, H.L., Zhao, Y.R., Wang, C.L., Yang, Z.L., Zeng, Q.Y., Lu, H., 2009. Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. J. Integr. Plant Biol. 51, 993–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2009.00848.x>

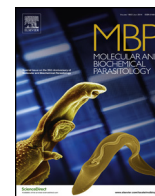
Anexo

Artículo:

"Echinococcus granulosus: Evidence of a heterodimeric glutathione transferase built up by phylogenetically distant subunits"

Autores: Arbildi, Paula; La-Rocca, Silvana; Lopez-Gonzalez, Veronica; Da-Costa, Natalia; Fernandez, Veronica

Publicado en: Molecular and Biochemical Parasitology, vol: 211, pp. 26-30. (2017).



Short communication

Echinococcus granulosus: Evidence of a heterodimeric glutathione transferase built up by phylogenetically distant subunits



Paula Arbildi, Silvana La-Rocca, Veronica Lopez, Natalia Da-Costa, Veronica Fernandez*

Cátedra de Inmunología, Facultad de Química, UdelAR, Av. Alfredo Navarro 3051, piso 2, Montevideo, CP 11600, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2015

Received in revised form

12 December 2016

Accepted 14 December 2016

Available online 21 December 2016

Keywords:

Echinococcus granulosus

Glutathione transferase

Heterodimer

Enzyme activity

ABSTRACT

In the cestode parasite *Echinococcus granulosus*, three phylogenetically distant cytosolic glutathione transferases (GSTs) (EgGST1, 2 and 3) were identified. Interestingly, the C-terminal domains of EgGST3 and EgGST2 but not EgGST1, exhibit all amino acids involved in Sigma-class GST dimerization. Here, we provide evidence indicating that EgGST2 and EgGST3 naturally form a heterodimeric structure (EgGST2–3), and also we report the enzymatic activity of the recombinant heterodimer. EgGST2–3 might display novel properties able to influence the infection establishment. This is the first report of a stable heterodimeric GST built up by phylogenetically distant subunits.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are a ubiquitous superfamily of different multifunctional proteins, generally known as phase II detoxification enzymes. They are involved in detoxification by clearing cytotoxic and genotoxic compounds and in oxidative damage protection [1,2]. GSTs catalyze the nucleophilic addition of the thiol of reduced glutathione (GSH, gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine), to a wide range of exogenous and endogenous hydrophobic electrophiles. Moreover, they can act non-enzymatically as ligands, through binding to small hydrophobic non-substrate ligands (planar aromatic compounds with anionic centers), preventing the accumulation of such molecules at lipophilic sites within the cell and therefore facilitating their elimination [3,4]. Depending on their amino acid sequences, mammalian cytosolic GSTs (cGSTs) can be grouped into at least seven different classes: Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Zeta and Omega [5]. Proteins in a same class share at least 40% sequence identity, whereas members of different classes share less than a 25% [6]. The three-dimensional structure seems to be conserved with in all proteins within the family. Two domains can be identified, the highly conserved N-terminal domain and the less conserved C-terminal domain. The former, similar to the thioredoxin domain, contains the GSH binding site (G-site), while the latter contains the hydrophobic-substrate binding site (H-site) [7]. All cGSTs share similar folding and three-dimensional structure, but differences

between classes lead to class-specific characteristics of their catalytic mechanisms. Notably, the enzymatic mechanism of these proteins is affected by the catalytic residue at the G-site and its localization within the folded structure (i.e., Tyr residues for Sigma, Ser for Theta and Cys for Omega) [8]. On the other hand, cGSTs described to date are generally active as dimers [7]. Research on the structure dimerization region (interface) between cGST subunits has revealed that subunits interact with each other in a “lock and key” manner. The dimerization regions are conserved within the members of a same cGST class, but differ between subunits from different classes [7]. Conserved residues that enable dimerization of proteins of the same class have been described for this region [1]. However, these residues render inter-class subunits incompatible, only enabling subunits from the same class to form dimers.

In *Echinococcus granulosus*, causative agent of hydatid disease, we have identified three cytosolic cGSTs, EgGST1, 2 and 3 [9,10], where EgGST1 and EgGST2 were classified as Mu and Sigma respectively. In contrast, EgGST3 seems to belong to a new cGST class, since it phylogenetically lies in-between Sigma and Omega classes [10]. In a previous work, we have demonstrated that the EgGST3 C-terminal domain groups independently with the Sigma class ones, and, moreover, it exhibits all amino acids described to be involved in dimerization of this class [10]. Taking all this collectively, made us think that EgGST3 and EgGST2 can form dimers with each other.

In this article, we provide evidence indicating that two phylogenetically distant *E. granulosus* cGSTs, EgGST2 and EgGST3, can form a heterodimeric structure (EgGST2–3), and we report a basic biochemical characterization of the resulting recombinant protein in

* Corresponding author.

E-mail address: vfernandez@fq.edu.uy (V. Fernandez).

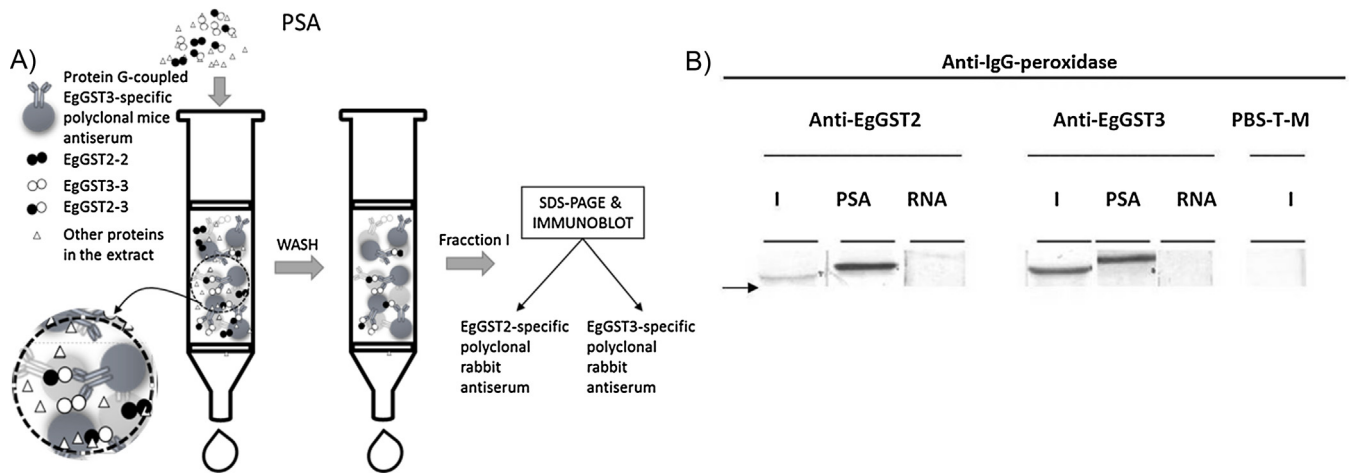


Fig. 1. Detection of EgGST2-3 in protoscolex of *E. granulosus* using immunoprecipitation and immunoblot.

A) Scheme of the strategy used for the detection of EgGST2-3 in the parasite. Protoscolex Somatic Antigen (PSA), prepared as described by Baz et al. [23], was incubated with Protein G-coupled EgGST3-specific polyclonal mice antiserum. After washing with PBS, the resin containing the immunoprecipitated material, was resuspended in SDS-PAGE sample buffer [11], boiled and the proteins in the soluble fraction was electrophoresed.

B) Protein samples were resolved by 15% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a PVDF membrane which was incubated with rabbit anti-EgGST2 (Anti-EgGST2) or rabbit anti-EgGST3 (Anti-EgGST3) or the antiserum diluent (PBS with 0.05% Tween 20 and 1% skim milk, PBS-T-M) as previously described [10]. The membrane was soaked in the secondary antibody solution (anti-IgG-peroxidase; goat anti-rabbit IgG-HRP, SIGMA) and revealed with 3,3'-Diaminobenzidine/H₂O₂ [11]. The samples correspond to: Protoscolex Somatic Antigen (PSA); PSA proteins that were retained in the G-protein resin, containing anti-EgGST3 (I); and PSA proteins that were retained in the G-protein resin containing no antibodies (RNA).

order to show that the recombinant heterodimeric protein is functional as a GST enzyme. The association between these two subunits might be the source of novel properties that facilitate infection and/or parasite establishment in the host.

Immunoprecipitation and immunoblot assays were performed on material from *E. granulosus* protoscolex (Fig. 1A) in order to determine if the parasite expresses the heterodimeric EgGST, containing EgGST2 and EgGST3 subunits, naturally. For this purpose, protoscolex somatic antigen (PSA) was incubated with G-protein-coupled EgGST3-specific polyclonal mice antiserum. Then, resin-retained proteins, containing at least one EgGST3 subunit, were analyzed by immunoblot using specific polyclonal rabbit antisera. Fig. 1B shows that both EgGST2 and EgGST3 are present in the starting material (PSA) as well as in the anti-EgGST3 precipitation fraction (fraction I), as evidenced by anti-EgGST2 and anti-EgGST3 staining, respectively. It is noteworthy that the specific rabbit antisera have no cross-reactivity between each other [9] as well as the specific mice antisera (data not shown). Similar results were obtained from samples that were immune-precipitated with anti-EgGST2 (data not shown). This suggests the existence of EgGST2-EgGST3 interaction that we believe that is due to the fact that they are forming a heterodimer EgGST2-3 because EgGST2 belongs to Sigma class and EgGST3 C-terminal domain contains all amino acids described to participate in the dimerization of such class [10]. Likewise, we think that ligandine activity would not be involved in this co-purification because as we mentioned above, it implies the uptake and distribution of planar aromatic compounds with anionic centers [4]. Therefore, we consider that the data showed here are in line with the hypothesis that a heterodimer of both subunits is actually present in the parasite.

Expression of the recombinant heterodimer protein in a prokaryote system (*E. coli*) was done using pET series plasmids (Novagen). The pET28-EgGST2 construct (conferring Kanamycin resistance) had been previously obtained [10], where the rEgGST2 subunit is expressed as a His-tagged protein, enabling purification with Nickel-affinity method. The pET5-EgGST3 construct (conferring Ampicillin resistance) was obtained by subcloning the EgGST3-coding gene into pET5a (between *Nde* I and *Bam*

HI restriction sites) from a previously described construct [10] using standard methods [11]. Construct integrity was assessed by automatic sequencing (Institute Pasteur, Montevideo). The recombinant EgGST2-3 (rEgGST2-3) heterodimer was obtained by co-expressing of both subunits in *E. coli* BL21 (DE3), using simultaneous transformation with the pET28-EgGST2 and pET5-EgGST3 constructs, in Luria Bertani medium containing both Kanamycin (50 mg/l) and Ampicillin (200 mg/l), and induction with Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.4 mM) at 20 °C. After harvesting the cells, rEgGST2-3 was purified in two stages. First, Ni-NTA Purification System (Invitrogen) was used, eluting with 250 mM Imidazol. Then, a gel filtration in Superdex-75 (GE-Healthcare), equilibrated in 20 mM Tris-HCl (pH 8) containing 50 mM NaCl was performed. Protein concentration was measured with the Bradford method using Bovine Serum Albumin as a standard [11]. Each liter of culture medium yielded 20 mg of protein. This heterologous expression of both subunits in *E. coli* that yielded the heterodimeric enzyme suggests that the similarities between the two interfaces are wide enough to allow dimerization. The rEgGST2-3 activity was 3.0–3.3 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ (range of different batches), determined under standard conditions, i.e., 25 °C in a 1 ml reaction volume in 0.1 M phosphate buffer (pH 6.5), containing 0.4 mM of rEgGST2-3, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), and 4 mM GSH [13].

The stability of rEgGST2-3 was evaluated as described by Wang et al., [12] using 10% PEG-6000. The rEgGST2-3 protein in 20 mM Tris (pH8) 50 mM NaCl, was treated under different ionic strength conditions (25–300 mM NaCl) and different pH (7–9), and the remaining protein concentration in the soluble fraction was measured. Additionally, the stability under different storage temperatures was analyzed (4, –20, and –80 °C) in presence of glycerol (0–50%) as a short to medium-term preservative. GST activity was determined under standard conditions [13] before and after the treatment, as a measurement of rEgGST2-3 integrity (data not shown). From then on, rEgGST2-3 was stored in 20 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM NaCl, at 1 mg/ml protein concentration at –20 °C until use.

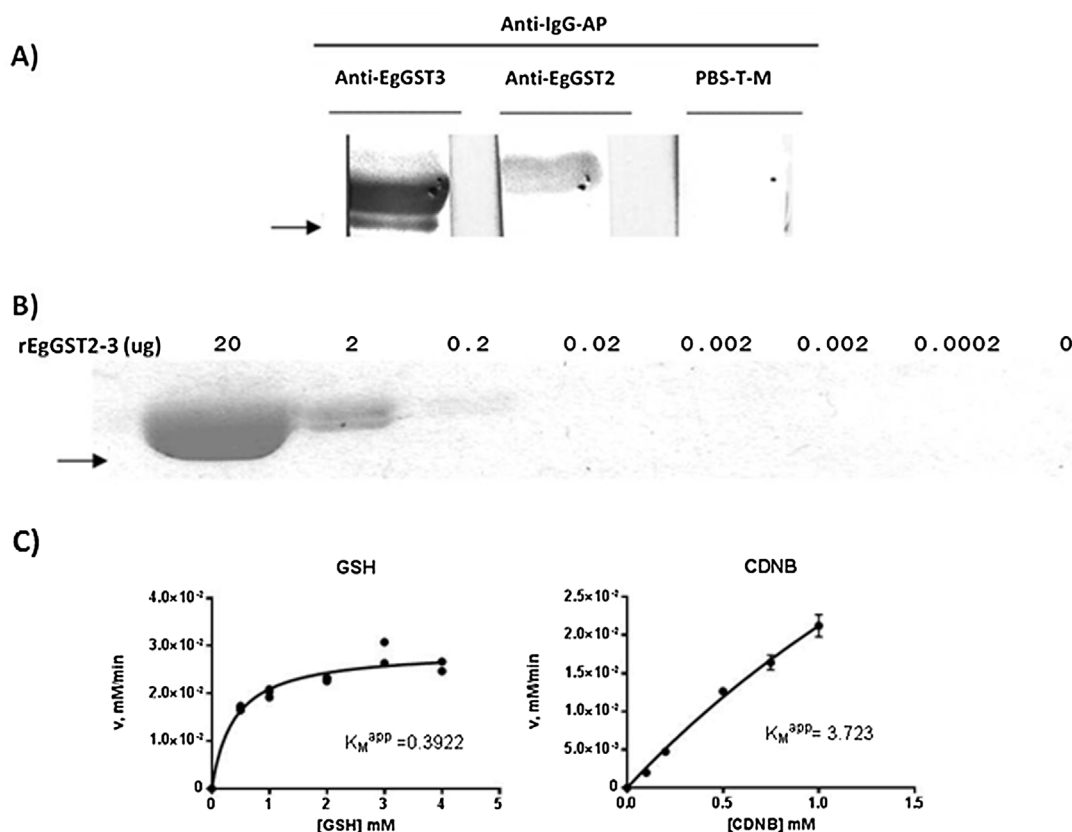


Fig. 2. Identity and Enzyme properties of rEgGST2-3.

A) Immuno-detection of rEgGST2-3 subunits (20 μ g/well) using Western blot as previously described [10]. Briefly, the same antisera were used (Anti-EgGST2 or Anti-EgGST3), as well as a goat anti-rabbit IgG-alkaline phosphatase (SIGMA) secondary antibody (Anti-IgG-AP). The reaction was revealed with BCIP/NBT. B) Coomassie blue stained-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 12%) [11], of rEgGST2-3 in serial dilutions (1/10), starting from 20 μ g under reducing conditions. The arrow shows the relative electrophoretic mobility of the standard protein (Chymotrypsinogen A, 24 kDa, MP-Biomedicals). C) The rEgGST2-3 activity was determined under standard conditions as previously described [13]. The non-enzymatic formation of product was concomitantly monitored and subtracted from the overall reaction. Steady state kinetics were performed under standard conditions with varying concentrations of GSH (0–4 mM) and CDNB (0–1 mM) substrates, allowing for the determination of apparent kinetic parameters in Michaelis – Menten plots. Results represent at least two independent experiments.

The quality of the rEgGST2-3 preparation was assessed by SDS-PAGE under reduced conditions with Coomassie Brilliant Blue (Fig. 2B). The purified recombinant protein showed two bands above 25 kDa, consistent with calculated molecular weights of the subunits (25.7 kDa and 26.5 kDa for rEgGST3 and His-tagged rEgGST2 respectively). The identity of each subunit was confirmed both by Western blot analysis (Fig. 2A) and by MALDI-TOF/TOF. For the last assay, significant scores ($p < 0.05$) for both subunits were obtained (Fig. S1, supplementary data) with a sequence coverage of 56% for His-tagged rEgGST2 and 62% for rEgGST3. Then, the rEgGST2-3 preparation was analyzed for the presence of the corresponding homodimers. The Ni-NTA resin only retains proteins containing the rEgGST2 subunit (the only subunit that was fused to the His-tail), thus discarding the presence of rEgGST3-3 in the sample. Furthermore, the ratio of subunits was visually assessed by serial dilutions of the rEgGST2-3 preparation on an SDS-PAGE gel. Fig. 2B shows that both subunits are present in the same ratio, since the bands become invisible at the same dilution, which suggests that the sample is free from the rEgGST2-2 homodimer. Together, these results show that the subunits in the recombinant protein preparation are present in the rEgGST2-3 heterodimer form, in agreement with our expectations, since homodimers would be found in inclusion bodies in this expression system [10].

The main biochemical properties of rEgGST2-3 were analyzed. In order to evaluate the effects of pH (5–8), temperature (25–60 °C), and ionic strength (66.63–666.34 mM) on enzyme activity of rEgGST2-3, GST standard reaction was measured using a thermostatically controlled spectrophotometer. The maximum enzyme

activity was found at 25 °C and pH 6.5–7.0, and the ionic strength did not affect the activity in the studied range (Supplementary Fig. 2).

We determined the apparent kinetic parameters of the recombinant heterodimer. The enzymatic reaction catalyzed by rEgGST2-3 was fitted to a Michaelis–Menten kinetic model (Fig. 2C) by non-linear regression using GraphPad Prism v5.03 software for Windows (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com). Out of the two co-substrates, only GSH could reach saturating concentrations, since CDNB tends to precipitate in the reaction cell. The apparent K_m values for CDNB and GSH were found to be 3.72 mM and 0.39 mM, respectively. The apparent V_{max} was 0.03 mM/min, determined by varying GSH at 1 mM CDNB, anyway CDNB's high apparent K_m precludes saturating conditions (Fig. 2C). The kinetic parameters found for the rEgGST2-3 are similar to those determined for other parasitic GSTs, particularly for Sm28GST, which belong to Sigma-class cGST [14]. CDNB was not found to be a favorable substrate for the heterodimeric enzyme, despite having a strong affinity for GSH. Whether one or both subunits of heterodimeric enzyme account for the observed activity remains to be determined. It is worth noting that Omega-class cGSTs have been reported to have poor or no activity with compounds such as CDNB [15]. The apparent k_{cat} , determined by evaluating the initial velocities in standard conditions at different concentrations of rEgGST2-3, was 1.73 s^{-1} .

Cytosolic GSTs comprise a great family of widespread dimeric enzymes (homo and heterodimers). To date, no data supporting the existence of monomers with enzyme activity exists. However, each

subunit is catalytically competent since each polypeptide chain contains a complete active site [16]. Even though, all cGSTs share a common three-dimensional folding, they display exclusive characteristics in terms of enzyme activity, partly due to their catalytic residues. For instance, in the Sigma class, the hydroxyl group of the catalytic tyrosine residue acts as a hydrogen bond donor for the GSH sulfur atom, decreasing its pKa and stabilizing the thiolate that, in turn, acts as the nucleophile target for the electrophilic substrate [7]. On the other hand, the catalytic cysteine residue of Omega-class cGSTs seems to form a mixed disulphide bond with glutathione, enabling it to be transferred as in a glutaredoxin-catalyzed reaction [17]. As thoroughly discussed by Iriarte et al. [10], these mechanisms of catalysis could correspond to the GST activity of EgGST2 and EgGST3, respectively. In this study, we have showed that *E. granulosus* produces a heterodimeric cGST made of these two phylogenetically distant subunits. Moreover, we were able to express the recombinant heterodimer in a heterologous system, and reported the main kinetic parameters of the recombinant form of the heterodimeric enzyme, showing that the enzyme is functional and catalyzes the canonic reaction. However, we cannot determine whether the measured activity is due to both subunits of the heterodimeric enzyme or just one of them. Additionally, cGSTs have other catalytic activities, some of which are class-specific and may contribute to parasitic diseases. For example, in *S. mansoni* the Omega-class cGST [18] appears to be involved in the antioxidant response of the parasite, owing to its thioltransferase and dehydroascorbate reductase activities, while the Sigma-class one seems to participate in immune response evasion by means of GST-dependent prostaglandin D2 production, thus inhibiting migration of activated Langerhans cells to lymph nodes [19]. In the case of EgGST2-3, these two types of activities might occur simultaneously in a single molecule. We are currently studying substrate specificities and inhibitor sensitivities as well as other activities of this heterodimeric cGST.

Considering such evidences: what advantages could the parasite get from expressing the EgGST2-3 heterodimeric enzyme? In living cells, the importance of producing the homodimeric and heterodimeric enzymes, either simultaneously or separately, could be linked to the transport or reservoir functions of cGSTs. In this sense, the interface between the monomers in the heterodimeric form could have a different spatial conformation from that of the corresponding homodimers, generating different binding sites and adding to a greater variety of ligands [6]. Moreover, since both subunits would have different substrate specificities, the formation of a heterodimer would create a single enzyme encompassing both specificities. In this sense, it has been proposed that the activity of the heterodimers can be predicted by averaging of the activities of the corresponding homodimers [20]. However, there are other studies indicating cooperativity between the two subunits of a cGST [21,22]. For example, it has been described that the key residue for dimerization of one subunit stabilizes the helix $\alpha 2$ of the other subunit which places the bound glutathione to catalysis center [21]. Moreover, it has been reported that both glutathione binding sites of a cGST seem to be communicated in a cooperative manner [21,22]. Therefore, other possibility is that the interaction between the different subunits could affect the conformation of either or both active sites, affecting for example the affinity or catalytic efficiency towards a given substrate as well as acquiring specificity for other substrates. In the same way, one might think that a heterodimeric enzyme could have affected the sensitivity to inhibitors with respect to the corresponding homodimers. In this regard, Hayes and Pulford [1] propose that an advantage of heterodimeric enzymes is that the catalytic product of one subunit could be “captured” by the other subunit, thus preventing product inhibition. This scenario is relevant because the parasite could eventually express three different enzymes to cope with a wider

range of substrates and reducing the number of possible inhibitory compounds.

All aspects discussed here could suggest that the formation of a cGST heterodimer may have great significance for *E. granulosus* at a physiological level, as well as survival in the host environment. This might allow the parasite to react to different circumstances, favoring the expression of the heterodimer or either homodimer as required for each situation or developmental stage. Even though heterodimeric cGSTs have been reported in mammals [1], EgGST2-3 is the first one found in helminth parasites. Furthermore, all naturally occurring heterodimers so far have been restricted to same-class subunits [1]. This is the first report of a functional heterodimeric cGST whose subunits are phylogenetically distant (i.e. highly divergent subunits).

Acknowledgments

We would like to thank Dr. G. Mourglia for helpful discussions and MSc. G. Lin for proofreading and suggestions on the manuscript language. We would also like to thank Dr. G. Salinas (Institute Pasteur, Montevideo) for providing us with the spectrophotometer T70+ UV/Vis (PG instruments Ltd). This work was supported by grants from Universidad de la Republica (CSIC-344, Uruguay), PEDECIBA (Uruguay), and ANII (FCE-6436, Uruguay).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.12.006>.

References

- [1] J.D. Hayes, D.J. Pulford, The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30 (1995) 445–600.
- [2] D. Sheehan, G. Meade, V.M. Foley, C. a. Dowd, Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily, *Biochem. J.* 360 (2001) 1–16.
- [3] M.C.J. Wilce, M.W. Parker, Structure and function of glutathione S-transferases, *Biochim. Biophys. Acta* 1205 (1994) 1–18.
- [4] J.U. Flanagan, M.L. Smythe, Sigma-class glutathione transferases, *Drug Metab. Rev.* 43 (2011) 194–214.
- [5] W.R. Pearson, Phylogenies of glutathione transferase families, *Methods Enzymol.* 401 (2005) 186–204, [http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01012-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01012-8).
- [6] J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey, Glutathione transferases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45 (2005) 51–88.
- [7] C. Frova, Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives, *Biomol. Eng.* 23 (2006) 149–169.
- [8] H.J. Atkinson, P.C. Babbitt, Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold, *Biochemistry* 48 (2009) 11108–11116.
- [9] V. Fernández, C. Chalar, C. Martínez, H. Musto, A. Zaha, C. Fernández, *Echinococcus granulosus*: molecular cloning and phylogenetic analysis of an inducible glutathione S-transferase, *Exp. Parasitol.* 96 (2000) 190–194.
- [10] A. Iriarte, P. Arbildi, S. La-Rocca, H. Musto, V. Fernández, Identification of novel glutathione transferases in *Echinococcus granulosus*. An evolutionary perspective, *Acta Trop.* 123 (2012) 208–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.05.010>.
- [11] J. Green, M.R. Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2012.
- [12] Y. Wang, R.F. Latypov, A. Lomakin, J. a. Meyer, B. a. Kerwin, S. Vunnum, et al., Quantitative evaluation of colloidal stability of antibody solutions using PEG-induced liquid–liquid phase separation, *Mol. Pharm.* 11 (2014) 1391–1402.
- [13] L. Harispe, G. García, P. Arbildi, L. Pascovich, C. Chalar, A. Zaha, et al., Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*, *Acta Trop.* 114 (2010) 31–36.
- [14] J. Walker, P. Crowley, a D. Moreman, J. Barrett, Biochemical properties of cloned glutathione S-transferases from *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 61 (1993) 255–264.
- [15] P.G. Board, The omega-class glutathione transferases: structure, function, and genetics, *Drug Metab. Rev.* 43 (2011) 226–235.

- [16] U.H. Danielson, B. Mannervik, Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat, *Biochem. J.* 231 (1985) 263–267.
- [17] P.G. Board, M. Coggan, G. Chelvanayagam, S. Easteal, L.S. Jermini, G.K. Schulte, et al., Identification characterization, and crystal structure of the omega class glutathione transferases, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 24798–24806.
- [18] A.K. Whitbread, A. Masoumi, N. Tetlow, E. Schmuck, M. Coggan, P.G. Board, Characterization of the omega class of glutathione transferases, *Methods Enzymol.* 401 (2005) 78–99.
- [19] V. Angeli, C. Faveeuw, O. Roye, J. Fontaine, E. Teissier, a Capron, et al. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 1135–1147.
- [20] A. Gustafsson, B. Mannervik, Benzoic acid derivatives induce recovery of catalytic activity in the partially inactive Met208Lys mutant of human glutathione transferase A1-1, *J. Mol. Biol.* 288 (1999) 787–800.
- [21] U.M. Hegazy, B. Mannervik, G. Stenberg, Functional role of the lock and key motif at the subunit interface of glutathione transferase p 1-1, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 9586–9596.
- [22] G. McManus, M. Costa, A. Canals, M. Coll, T.J. Mantle, Site-directed mutagenesis of mouse glutathione transferase P 1-1 unlocks masked cooperativity, introduces a novel mechanism for 'ping pong' kinetic behaviour, and provides further structural evidence for participation of a water molecule in proton abstraction from glutathione, *FEBS J.* 278 (2011) 273–281, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07944.x>.
- [23] A. Baz, A. Richieri, A. Puglia, A. Nieto, S. Dematteis, Antibody response in CD4-depleted mice after immunization or during early infection with *Echinococcus granulosus*, *Parasite Immunol.* 21 (1999) 141–150.