

Estudio de la diversidad funcional de una familia de inhibidores Kunitz de *Echinococcus granulosus*

Martín Fló Díaz

**Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias-UDELAR
PEDECIBA BIOLOGÍA (sub área Bioquímica)**

Supervisores:

Dra. Cecilia Fernández y Dra Beatriz Alvarez

Diciembre 2015

Resumen

El platelminto parásito *Echinococcus granulosus* posee una familia multigénica de inhibidores tipo Kunitz monodominio (*EgKUs*). La expresión de varios de ellos es especialmente alta en los estadios que interactúan con el hospedero definitivo y algunos están presentes en secreciones de los gusanos larvarios y adultos, por lo que podrían interferir con procesos fisiológicos del perro y contribuir al establecimiento y la persistencia de la infección. Estas moléculas poseen un dominio Kunitz, formado por aproximadamente 50 aminoácidos plegados en una estructura estabilizada por tres enlaces disulfuro. Desde el punto de vista funcional, actúan como: i) inhibidores muy potentes de peptidasas de serina, presentes en todos los metazoarios; ii) inhibidores de canales catiónicos, hasta ahora descritos solamente en venenos de predadores. Resultados obtenidos por nuestro grupo antes de este trabajo habían mostrado que, entre los *EgKUs*, existirían proteínas con ambas funciones. En esta tesis, estudiamos a cinco de ellas (*EgKU-1*, *EgKU-3*, *EgKU-4*, *EgKU-7* y *EgKU-8*) con el objetivo de analizar la presunta diversidad funcional de la familia y profundizar acerca de sus posibles modos de acción en el nicho en el que el parásito se instala en el hospedero definitivo.

En los ensayos enzimáticos se utilizaron tripsina catiónica y quimotripsina-A bovinas (comerciales), así como tripsinas (catiónica y aniónica) y quimotripsina-B caninas (purificadas a partir de páncreas). Nuestros resultados muestran que existen integrantes de la familia (*EgKU-3*, *EgKU-7* y *EgKU-8*) con actividad inhibidora de peptidasas de serina. *EgKU-3* y *EgKU-8* (parálogos cercanos) se comportaron como inhibidores lentos de alta afinidad de quimotripsinas (bovina y canina) y tripsina (bovina y caninas), respectivamente ($K_i^* 10^{-11}$ M). La especificidad por la peptidasa que inhiben es consistente con el residuo que cada inhibidor tiene en el sitio P1 del bucle antipeptidasa, el cual es Leu en *EgKU-3* y Arg en *EgKU-8*. Es de destacar que *EgKU-3* es un potente inhibidor de la quimotripsina-B, ya que no se han descrito muchos inhibidores de esta isoforma. *EgKU-7*, por su parte, tiene una Arg en su P1, lo que explica su fuerte inhibición de tripsinas, pero esta inhibición mostró ser distinta a la observada para *EgKU-3* y *EgKU-8*. *EgKU-7* presenta, además del bucle antipeptidasa, una extensión C-terminal del dominio Kunitz que interactúa en forma independiente con la tripsina. El bucle antipeptidasa de *EgKU-7* y el segundo sitio de unión son susceptibles a la hidrólisis por parte de la tripsina bovina. A su vez, el bucle antipeptidasa muestra preferencia por la tripsina aniónica canina ($K_i^a 10^{-12}$ M para la tripsina aniónica canina; $K_i^a 10^{-11}$ M para las otras tripsinas) y el segundo sitio por la tripsina catiónica canina ($K_i^b 10^{-11}$ M para la tripsina catiónica canina; $K_i^b 10^{-10}$ M para las otras tripsinas). El segundo sitio fue hidrolizado por la tripsina catiónica canina (y no por la aniónica) comportándose más como un buen sustrato que como inhibidor para esta enzima. En suma, los resultados indican que las tripsinas caninas podrían ser el blanco fisiológico de *EgKU-7*. Éste sería un muy potente inhibidor de tripsina aniónica, y un potente inhibidor, a la vez que un buen sustrato, de la isoforma catiónica.

EgKU-1 y *EgKU-4* (parálogos cercanos) no inhibieron ninguna de las peptidasas analizadas. Además, estudios anteriores de modelado molecular revelaron una similitud estructural entre estas moléculas y la dendrotoxina- α , que bloquea potentemente canales de potasio activados por voltaje. Para estudiar su presunta capacidad bloqueadora de canales, realizamos experimentos de *whole cell patch-clamp* por clampeo de voltaje sobre neuronas de ganglios de

la raíz dorsal (DRG) de rata. Estos ensayos mostraron que ambas moléculas bloquean canales de potasio dependientes de voltaje (Kv; IC50 del orden 10^{-7} M). Se observó que también presentan actividad bloqueadora de canales de sodio activados por cambios de pH (ASICs; *acid sensing ion channels*; IC50 del orden 10^{-9} M), una actividad no descrita previamente para inhibidores Kunitz.

En su conjunto, los resultados confirman la diversidad funcional de los *EgKUs* y permiten proponer que la secreción de inhibidores del tipo Kunitz es una estrategia que *E. granulosus* utiliza para instalarse y permanecer en el hospedero definitivo, que le permite bloquear, mediante interacciones de alta afinidad, la función de peptidasas de serina y canales catiónicos. Desde una perspectiva más general, los resultados revelan una interesante similitud evolutiva entre los componentes de los venenos de predadores y las secreciones parasitarias, dos conjuntos de moléculas cuya función es “conquistar” a otro organismo.

Indice

1.	Introducción	8
1.1.	Infección por <i>Echinococcus granulosus</i> en el hospedero definitivo	8
1.1.1.	Descripción general del parásito.....	8
1.1.2.	Establecimiento del parásito en el hospedero definitivo	9
1.1.3.	Estructuras del parásito expuestas al hospedero	9
1.2.	Entorno del parásito en el hospedero definitivo	12
1.2.1.	El entorno previo a su instalación: la boca y el estómago	12
1.2.2.	El entorno en el que se instala: intestino delgado del perro	13
1.2.3.	Respuesta inmune del perro a la infección por <i>E. granulosus</i>	15
1.3.	Peptidasas de serina.....	16
1.3.1.	Descripción general y estructura	16
1.3.2.	MEROPS: base de datos de peptidasas	16
1.3.3.	Familia S1 de peptidasas de serina (familia de la quimotripsina)	17
1.3.4.	Estructuras responsables de la catálisis y la unión del sustrato	17
1.3.5.	Mecanismo catalítico	20
1.4.	Proteínas inhibidoras de peptidasas de serina	24
1.4.1.	Generalidades	24
1.4.2.	Clasificación de inhibidores proteicos de peptidasas – unidades inhibidoras....	24
1.4.3.	Clasificación de inhibidores proteicos de peptidasas según el mecanismo de inhibición ²⁵	
1.4.4.	Mecanismo de inhibición de inhibidores canónicos	25
1.4.5.	¿Por qué los inhibidores canónicos se hidrolizan muy lentamente?.....	30
1.4.6.	Cinética de la inhibición	32
1.5.	Inhibidores del tipo Kunitz	34
1.5.1.	Algunos inhibidores Kunitz presentan mecanismos de inhibición alternativos..	35
1.5.2.	Evolución de inhibidores que interaccionan con otros organismos	35
1.5.3.	Características estructurales de los inhibidores Kunitz que bloquean canales ..	37
1.6.	Canales iónicos.....	39
1.6.1.	Canales de potasio	40
1.6.2.	Canales de sodio activados por cambios de pH (ASICs).....	46
1.7.	Hipótesis del trabajo que guiaron el desarrollo de esta tesis.....	51
1.8.	Objetivos	54
2.	Procedimientos experimentales generales y obtención de proteínas Kunitz.....	55

2.1.	Reactivos generales.....	55
2.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	55
2.2.1.	SDS-PAGE convencional	55
2.2.2.	Tricina-SDS-PAGE.....	55
2.3.	Estimación de la concentración de proteínas	56
2.4.	Producción y purificación de <i>EgKUs</i>	57
2.4.1.	Preparación de los <i>EgKU</i> nativos.....	57
2.4.2.	Preparación de <i>EgKU</i> recombinantes.....	57
2.4.3.	Hidrólisis de la porción N-terminal de <i>EgKU-7</i> y <i>EgKU-7d</i> por tripsina	63
2.4.4.	Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF-MS	63
2.5.	Ensayos cinéticos.....	63
2.5.1.	Titulación de las enzimas	65
2.5.2.	Estudios de inhibición de alta afinidad	67
2.5.3.	Estudio de los cursos temporales de la inhibición	67
2.5.4.	Estudios de estabilidad de los inhibidores frente a tripsina	69
2.6.	Experimentos de <i>patch-clamp</i> con <i>EgKU-1</i> y <i>EgKU-4</i> sobre neuronas de ganglios de la raíz dorsal de rata.....	70
2.6.1.	Cultivo celular.....	70
2.6.2.	Experimentos de electrofisiología sobre las DRG	70
2.6.3.	Análisis de los datos y protocolo de los experimentos	71
3.	Los parálogos <i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-8</i> presentan la actividad inhibidora de peptidasas de serina típica de los inhibidores Kunitz	74
3.1.	<i>EgKU-8</i> y <i>EgKU-3</i> son inhibidores de alta afinidad de tripsinas y quimotripsinas respectivamente	74
3.2.	<i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-8</i> son inhibidores lentos con un mecanismo de inhibición en dos pasos 78	
3.3.	Discusión de los estudios funcionales con <i>EgKU-3</i> y <i>EgKU-8</i>	78
3.3.1.	<i>EgKU-8</i> como inhibidor de tripsinas	84
3.3.2.	<i>EgKU-3</i> como inhibidor de quimotripsinas.....	85
4.	<i>EgKU-7</i> es un inhibidor de tripsinas con características particulares	88
4.1.	<i>EgKU-7</i> se perfila como un inhibidor lento con dos sitios de unión	88
4.2.	<i>EgKU-7</i> es hidrolizado por la tripsina bovina	91
4.3.	<i>EgKU-7</i> es hidrolizado por la tripsina bovina en el sitio P1 y en las extensiones N y C-terminales del dominio Kunitz	97

4.4.	Si <i>Eg</i> KU-8 se trata con trombina, adquiere una cinética similar a la de <i>Eg</i> KU-7 en la inhibición de tripsina bovina	104
4.5.	El K_i^* de <i>Eg</i> KU-7 cortado con tripsina bovina es mayor que el del inhibidor intacto	104
4.6.	La actividad inhibidora de <i>Eg</i> KU-7 sobre las tripsinas caninas es diferente a la observada sobre la tripsina bovina	106
4.7.	Estudio de la actividad inhibidora de tripsinas de una forma truncada de <i>Eg</i> KU-7 (sin la extensión C-terminal)	116
4.7.1.	La inhibición de tripsina por <i>Eg</i> KU-7 sin la extensión C-terminal es algo menor que la del inhibidor entero.....	117
4.7.2.	<i>Eg</i> KU-7 sin la extensión C-terminal también es hidrolizado por la tripsina bovina	120
4.7.3.	<i>Eg</i> KU-7 sin la extensión C-terminal presenta un comportamiento monofásico en el curso temporal de la inhibición de tripsinas caninas	123
4.8.	Discusión de los estudios funcionales de <i>Eg</i> KU-7	123
4.8.1.	<i>Eg</i> KU-7 posee dos sitios de interacción con la enzima	123
4.8.2.	Los cursos temporales de la inhibición de tripsinas por <i>Eg</i> KU-7 muestran diferencias entre las tripsinas caninas y la bovina	126
4.8.3.	La estabilidad de <i>Eg</i> KU-7 frente a la hidrólisis difiere entre las distintas tripsinas	127
4.8.4.	La extensión C-terminal participa en la inhibición de tripsinas	129
5.	Los parálogos <i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4 bloquean canales iónicos	132
5.1.	Las peptidasas de serina no son el blanco fisiológico de los parálogos <i>Eg</i> KU1 y <i>Eg</i> KU-4	132
5.2.	<i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4 bloquean canales de potasio dependientes de voltaje	132
5.2.1.	El efecto de <i>Eg</i> KU-1 es mayor sobre las corrientes IKDR que sobre las IKA.....	138
5.3.	<i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4 bloquean canales de sodio dependientes de pH	147
5.4.	Discusión de los estudios funcionales de <i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4.....	150
5.4.1.	Acerca del bloqueo de canales de K^+ activados por voltaje	150
5.4.2.	¿Podemos decir algo sobre la especificidad de inhibición de Kv por parte de <i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4?	151
5.4.3.	Acerca del bloqueo de canales de Na^+ activados por cambios de pH.....	152
5.4.4.	¿Son los ASICs o los Kvs blancos fisiológicos de <i>Eg</i> KU-1 y <i>Eg</i> KU-4?	153
6.	Discusión	155
6.1.	La familia de inhibidores Kunitz de <i>Echinococcus granulosus</i>	155
6.2.	Existen familias de inhibidores del tipo Kunitz en otros cestodos.....	158
6.3.	¿Qué podemos decir acerca de los posibles blancos de los inhibidores Kunitz de <i>E. granulosus</i> ?	159

6.3.1.	Posibles blancos de los inhibidores de peptidasas de serina.....	159
6.3.2.	Posibles blancos de los bloqueadores de canales.....	160
6.3.3.	La inhibición de peptidasas y el bloqueo de canales podrían tener efectos sinérgicos.....	160
6.4.	Perspectivas	162
7.	Bibliografía	164

1. Introducción

1.1. Infección por *Echinococcus granulosus* en el hospedero definitivo

1.1.1. Descripción general del parásito

Echinococcus es un género de endoparásitos cuya clasificación (ubicación filogenética) es: Phylum Platyhelminthes, Clase Cestodos, Subclase Eucestodos, Orden Cyclophyllae, Familia Ténidos. Como todos los cestodos, requieren dos hospederos para completar su ciclo de vida, hospederos definitivos que albergan a los gusanos adultos y hospederos intermediarios donde se alojan las larvas o metacestodos (Figura 1.1). Los hospederos definitivos, carnívoros, se infectan por ingestión de estadios llamados protoescólex, contenidos en el metacestodo. Los protoescólex maduran en el intestino delgado a adultos que son hermafroditas suficientes y producen huevos (cada uno con un único embrión, oncosfera); los huevos salen al medio externo con las heces y pueden mantener su infectividad por largos períodos. Una vez ingeridos por potenciales hospederos intermediarios, liberan las oncosferas que cruzan la pared intestinal, y luego alcanzan, por sangre o linfa, órganos internos en los que se desarrollan a metacestodos que, cuando son fértiles, contienen protoescólex originados a partir de la proliferación de la capa interna del metacestodo ^{1,2}. Tradicionalmente se reconocían 4 especies en el género, incluyendo *E. granulosus*. Sin embargo, hoy el género consta de 9 especies, donde *E. granulosus (sensu strictu)* denomina solamente a la anterior “cepa ovina” o G1 de *E. granulosus sensu lato* ³. *E. granulosus sensu strictu* toma como hospedero definitivo al perro, y como hospederos intermediarios a ovejas, cabras y vacas. La infección por *E. granulosus sensu lato* larvario se denomina equinococosis quística o hidatidosis (siendo el metacestodo una hidátide o “quiste hidático”); puede afectar al ser humano, un hospedero accidental ⁴. La hidatidosis está distribuida en gran parte del mundo, con mayor importancia en áreas de Asia Central y China, Sudamérica, y África ⁵. La infección por *E. granulosus sensu lato* adulto se denomina equinococosis.

Los adultos de *Echinococcus* miden solamente unos milímetros de largo. Su cuerpo, o estróbilo, es segmentado y consta de varias unidades reproductivas (proglótides); raramente poseen más de cinco, mientras que otros ténidos miden metros y tienen cientos de proglótides. Poseen un órgano especializado para la fijación (escólex) que tiene dos ruedas de ganchos (rostelo) y cuatro ventosas. Carecen de intestino por lo que todo el intercambio metabólico se realiza a través del tegumento que es un sincitio. Los adultos de las distintas especies del género son muy específicos respecto a sus hospederos. Pese a que los factores responsables de esa especificidad no se conocen, una determinada micro topografía del intestino delgado puede ser muy conveniente para ciertas especies o linajes de *Echinococcus* e inconveniente para otros. Este tipo de factores físicos puede jugar un rol importante en el establecimiento del parásito. Sin embargo, no explica por qué algunos pueden establecerse pero no desarrollarse (un ejemplo lo constituye *E. granulosus* en gatos). Se ha propuesto que diferencias en la composición de la bilis entre los diferentes hospederos definitivos pueden influir en la especificidad. Un constituyente particular de la bilis o su concentración puede ser necesario para la evaginación, establecimiento y/o desarrollo de ciertas especies o linajes o, alternativamente, puede ser tóxico en hospederos no favorables. También pueden influir en la especificidad otros factores químicos, así como fisicoquímicos e inmunológicos. Factores de

este tipo pueden modificar también la susceptibilidad individual. Por ejemplo, el número de gusanos que inicialmente se establecen y su tasa de desarrollo pueden variar marcadamente entre los distintos individuos ^{1,2}.

El trabajo experimental de esta tesis fue realizado con *E. granulosus sensu strictu*, que es la especie de *E. granulosus sensu lato* más prevalente en el mundo y la más estudiada a nivel molecular e inmunológico. Por simplicidad, en el resto del texto, nos referiremos a ella como *E. granulosus*.

1.1.2. Establecimiento del parásito en el hospedero definitivo

El hospedero definitivo se infecta por ingestión de protoescólex viables. Estos suelen ser ingeridos dentro del quiste hidático; la acción masticatoria del hospedero rompe el quiste liberando las vesículas prolíferas (Figura 1.1.). A este proceso contribuye luego la acción de la pepsina en el estómago. Cuando son ingeridos por el perro, la región apical de los protoescólex (ventosas y ganchos) está invaginada dentro de una capa de mucopolisacáridos que cubre la región basal de su tegumento y protege al escólex hasta que es estimulada la evaginación. Los estímulos precisos que la causan no se conocen, pero se sabe que los gusanos larvarios son sensibles a cambios en el entorno; y que se evaginan en respuesta a variaciones de temperatura, presión osmótica, y a la agitación. La tasa de evaginación se potencia cuando son transferidos rápidamente desde un medio ácido hacia una solución alcalina conteniendo pancreatina. El cambio de pH y/o la generación de CO₂ reproducen los cambios ocurridos en el pasaje del estómago al intestino delgado. Las condiciones anaerobias parecen ser esenciales para la evaginación. La presencia de enzimas o bilis no lo es, pero la tasa de evaginación aumenta en presencia de bilis ^{1,2}

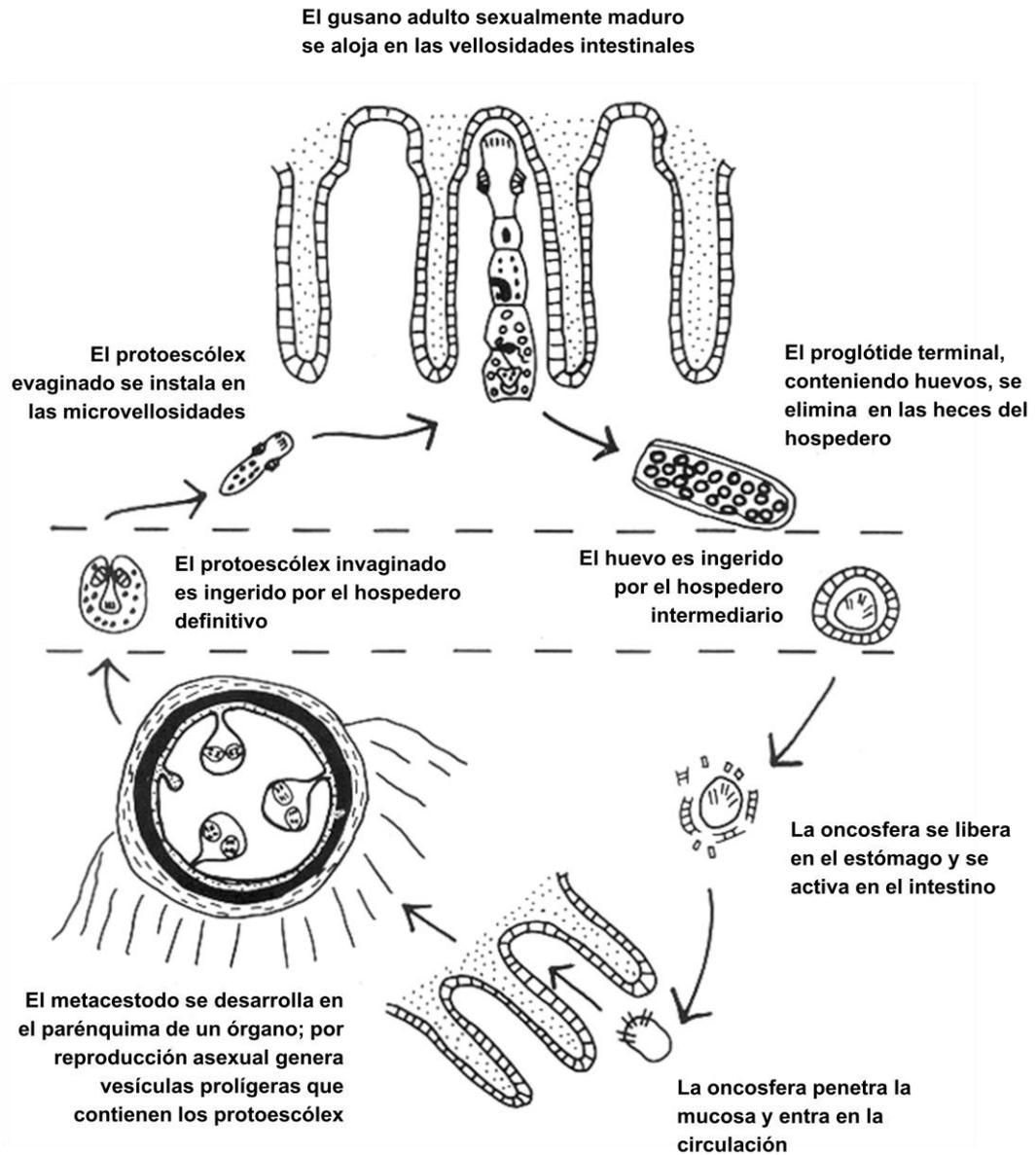
El tiempo requerido para la evaginación es variable. Aunque la mayoría de los protoescólex ingeridos se evaginan durante la primeras seis horas ¹, puede llevar tres días que el proceso se complete. Estudios en perros han mostrado que seis horas después de la infección los adultos jóvenes de *E. granulosus*, que continúan en proceso de evaginación, ya están dentro de la microvellosidades y algunos dentro de las criptas de Lieberkühn. Los protoescólex recién evaginados son inicialmente muy activos. El glucógeno que poseen actúa como reserva de energía. Estudios in vitro indican que esta reserva es utilizada rápidamente, dentro de las primeras tres horas, y que la movilidad de las larvas declina una vez que las reservas se agotan. La actividad de los protoescólex recientemente evaginados o adultos jóvenes es un obvio prerrequisito para su establecimiento en el intestino delgado del hospedero definitivo.

Los gusanos en desarrollo se fijan al epitelio intestinal principalmente por las ventosas. Los ganchos penetran sólo superficialmente en el epitelio de la mucosa, pero su forma asegura un buen anclado y evita que sean desalojados ^{1,2}.

1.1.3. Estructuras del parásito expuestas al hospedero

Aunque el adulto de *Echinococcus* puede alterar su posición y moverse hacia arriba y abajo y entre las microvellosidades adyacentes durante su desarrollo, esto no ocurre una vez que alcanza la madurez. El rostelo está profundamente insertado dentro de la cripta de Lieberkühn: el ápice del rostelo se observa totalmente extendido, los ganchos penetran superficialmente en el epitelio de la mucosa y las ventosas se adhieren al epitelio en la base de

HOSPEDERO DEFINITIVO



HOSPEDERO INTERMEDIARIO

Figura 1.1 Ciclo de vida de *Echinococcus granulosus*

El ciclo de vida de *E. granulosus* involucra un hospedero definitivo, en el cual se desarrolla la forma adulta, y un hospedero intermedio, donde se desarrolla el estadio larvario o metacestodo. Se representan los estadios infectantes para ambos hospederos y la forma totalmente desarrollada del parásito en cada uno de ellos. Tomado de Thompson (1995).

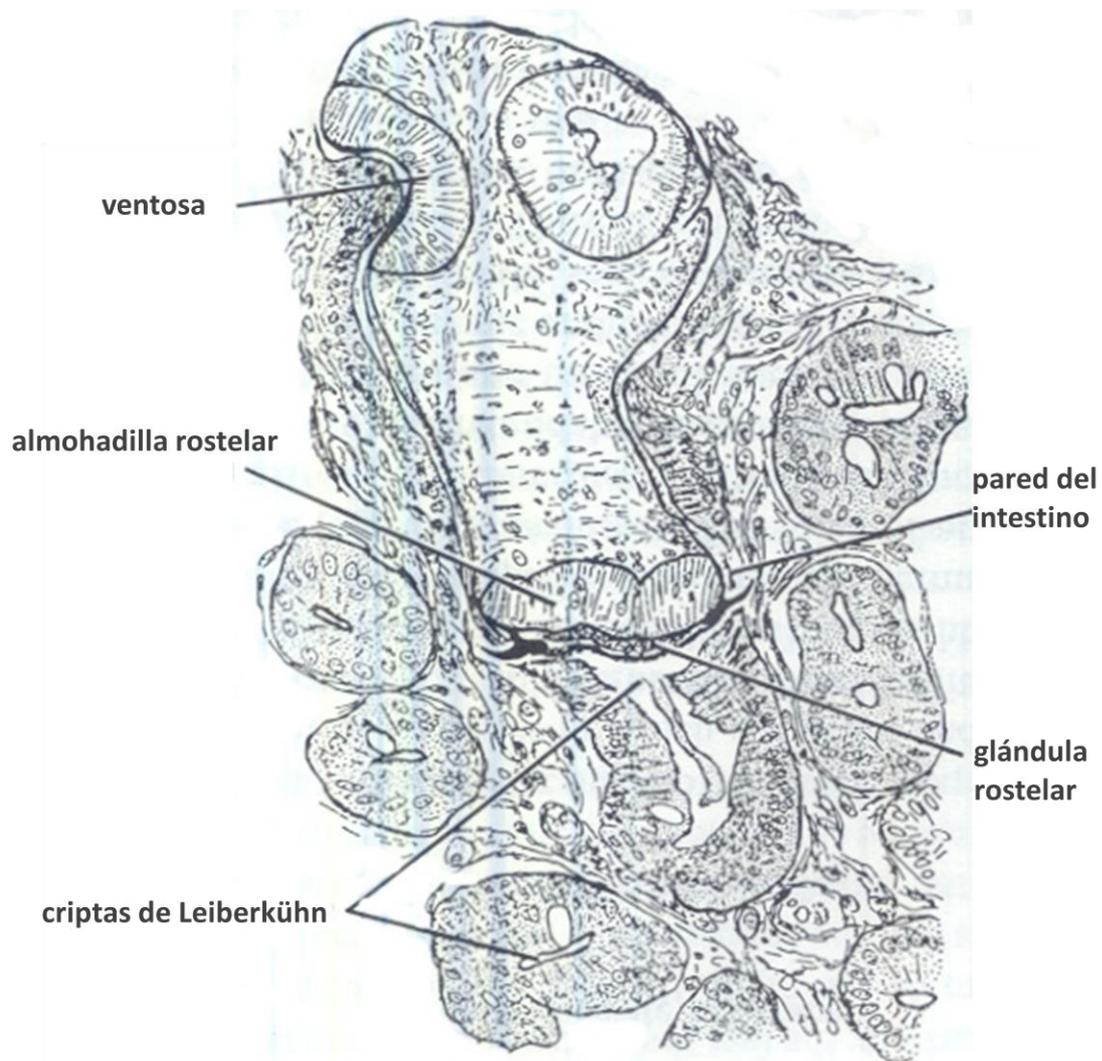


Figura 1.2 *Echinococcus granulosus* instalado en su hospedero definitivo

Se muestra un adulto de *Echinococcus granulosus* establecido en el intestino del perro. Se observa el rostellum -con ventosas, almohadilla rostellar y glándula rostellar- profundamente insertado dentro de una cripta de Lieberkühn. Tomado de Smyth y McManus (1989).

las microvellosidades (Figura 1.2). La extensión de la región apical del rostelo dentro de la cripta coincide con el comienzo de la actividad secretora de un grupo de células modificadas del tegumento, situadas en el ápice del rostelo (glandula rostelar), que liberan secreciones a la interfase entre el parásito y el hospedero. El mecanismo por el que se libera el material secretado sería análogo a los procesos secretorios holócrinos. La naturaleza de la secreción no es clara, se sabe que contiene proteínas o polipéptidos con un contenido relativamente importante de cisteína y, posiblemente, un componente lipídico. Aunque no existe ninguna evidencia directa, se ha propuesto que esta secreción tendría una función protectora ya sea inhibiendo o inactivando enzimas digestivas, o interfiriendo con mecanismo de la respuesta inmune del hospedero ¹.

Como ya se mencionó, al ser un cestodo, *E. granulosus* no posee aparato digestivo: se nutre exclusivamente a través de su tegumento, especializado para la absorción. El adulto está recubierto de proyecciones llamadas microtricas que aumentan hasta 10 veces su superficie. El protoescólex evaginado, en cambio, solo posee microtricas en la porción apical del escólex (entre los ganchos y ventosas); por este motivo, al inicio de la infección, la nutrición del parásito depende de la capacidad absorptiva de esa región que establece un contacto estrecho con el epitelio de la mucosa ².

El adulto de *E. granulosus* posee dos tipos morfológicamente distintos de microtricas, con distribución diferente, por lo que tendrían funciones fisiológicas distintas. Sobre el estróbilo, son planas y rígidas; probablemente sirvan para mantener la superficie absorptiva del parásito apartada del hospedero, a fin de mantener un flujo de nutrientes en la interfase de las dos superficies absorptivas. Sobre el rostelo apical y el escólex, las microtricas son largas, finas y flexibles; de este modo, permitirían que el escólex y el rostelo lleven a cabo un contacto estrecho con el hospedero, quizás potenciando la adhesión, mediante el establecimiento de interdigitación con la microvellosidades del epitelio intestinal ².

1.2. Entorno del parásito en el hospedero definitivo

El entorno del parásito varía a lo largo del proceso de su instalación. Al comienzo, cuando aún no se ha establecido, el parásito está enfrentado a las distintas etapas de la digestión. Una vez establecido en el intestino delgado, éste pasa a ser su entorno inmediato, durante el resto de su vida.

1.2.1. El entorno previo a su instalación: la boca y el estómago

Antes de su llegada al intestino delgado, donde se instala, el parásito se enfrenta a factores físicos y químicos vinculados al proceso digestivo en la boca y el estómago. En la boca, está expuesto a la masticación y a los efectos de la saliva secretada por las glándulas salivales. En el estómago, está expuesto a la secreción gástrica; permanece en este órgano junto con el alimento e ingresa con él al intestino delgado, en un proceso controlado por el estómago. La secreción gástrica o jugo gástrico, es un fluido amarillo pálido con 0,2-0,5% de HCl y un pH cercano a 1. El jugo gástrico está constituido por 97-99% de agua, siendo el resto mucinas, sales inorgánicas y enzimas ⁶.

La digestión de proteínas comienza en el estómago: el HCl las desnaturaliza, desplegando las cadenas polipeptídicas, de manera que sean más accesibles al ataque de la pepsina ⁶. La

pepsina es una peptidasa de ácido aspártico, específica para la hidrólisis de enlaces peptídicos cuyo grupo carboxilo es aportado por aminoácidos aromáticos como la tirosina o ácidos como el glutámico. Actúa como endopeptidasa de proteínas desnaturalizadas, generando polipéptidos largos. Es producida en las células principales de la pared como un zimógeno (precursor inactivo de mayor tamaño), el pepsinógeno. Éste es activado a pepsina por el medio ácido que desencadena la hidrólisis de un polipéptido protector, exponiendo la enzima activa, que rápidamente activa otras moléculas de pepsinógeno, es decir, el proceso es autocatalítico⁶. Esta enzima, si bien inicia la degradación de proteínas, no es esencial para la digestión y absorción del alimento, a diferencia de las enzimas pancreáticas⁷.

1.2.2.El entorno en el que se instala: intestino delgado del perro

Durante la digestión, el contenido del estomago es introducido intermitentemente a través de la válvula pilórica en el duodeno, la primera porción del intestino delgado. Es allí que se instala el protoescólex y se desarrolla el adulto de *E. granulosus*.

El intestino delgado mide entre 1.80 y 4.80 m en el perro, mueve su contenido continuamente en sentido aboral y su principal función es la absorción de nutrientes. Como ya se mencionó, la fijación del parásito a la pared evita que se desplace junto con el alimento. Para su estudio, el intestino delgado es dividido arbitrariamente en duodeno, yeyuno e íleon. No se observan diferencias macroanatómicas entre ellos, ya que las diferencias funcionales no se reflejan en la macroanatomía. Al igual que el esófago y el estómago, está formado por un epitelio mucoso, una submucosa y una capa muscular. La capa muscular le provee movilidad; está involucrada en funciones absorptivas y secretoras y constituye una barrera entre el medio externo y el medio interno del animal. La capa submucosa, interpuesta entre la mucosa y la capa muscular, proporciona soporte y contiene vasos sanguíneos, linfáticos y nervios⁷. La mucosa intestinal es una monocapa de células por encima de una capa de tejido conectivo laxo (la lámina propia), constituida por un epitelio dispuesto en forma de lámina contigua de dos dimensiones. La superficie luminal es un "cepillo". Está cubierto por un glicocálix, formado por polisacáridos aniónicos sintetizados por las células epiteliales y secretados sobre su superficie. La función principal del glicocálix es proteger a las células de las enzimas digestivas. Además, puede atrapar y retener enzimas por intercambio iónico, concentrándolas en el sitio de absorción sobre la superficie de los enterocitos⁷.

La Figura 1.3 muestra un esquema de la anatomía del epitelio, en el que se distinguen protrusiones y depresiones, conocidas como vellosidades y criptas. El epitelio del intestino delgado se renueva continuamente: se añaden células nuevas en las criptas y mueren por apoptosis cuando alcanzan el extremo de las vellosidades. En el fondo de las criptas, se ubican las llamadas células de Paneth y, contiguas a ellas, se encuentran las células madre. En el cuello de las criptas, se ubican las células en proliferación; finalmente, en las vellosidades, varios tipos de células maduras: caliciformes, enteroendócrinas y epiteliales de absorción, generalmente llamadas enterocitos. Las células madre son células pluripotenciales encargadas de reponer a las células que mueren; dan origen a dos linajes: el linaje absorptivo y el linaje secretorio. El primero comprende a los enterocitos que, aparte de absorber nutrientes, secretan hidrolasas, agua y electrolitos (los dos últimos sirven para reponer el fluido extracelular). El otro linaje comprende a las células caliciformes, las enteroendócrinas y las de Paneth. Las células caliciformes secretan mucus, las enteroendócrinas hormonas, y las de

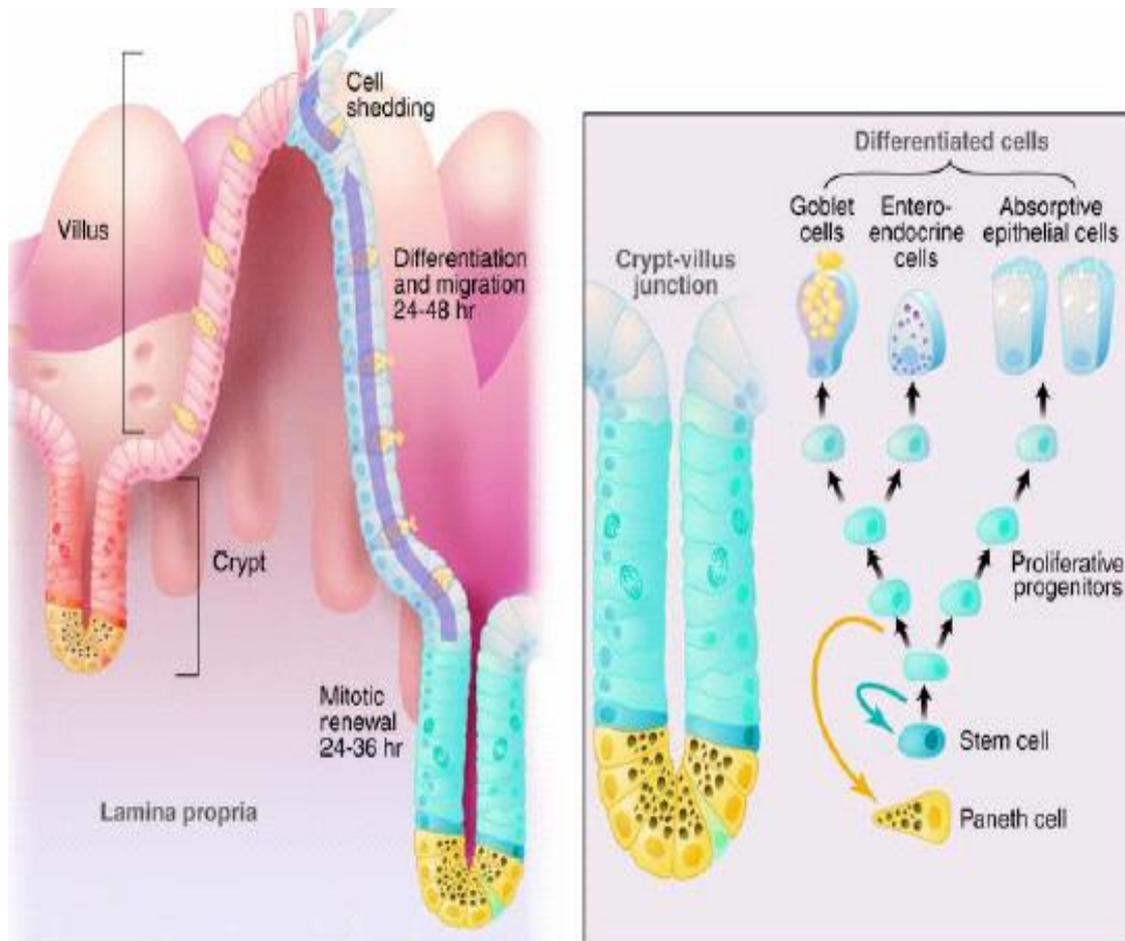


Figura 1.3. Anatomía del epitelio del intestino delgado

En el esquema de la izquierda, se muestra que el epitelio está formado por criptas y vellosidades. En el de la derecha, se representan las células madre y los dos linajes que se generan a partir de ellas; las células que proliferan inicialmente se diferencian para dar lugar a los linajes de los enterocitos y de las células secretoras. Este último está constituido por células caliciformes (*goblet cells*) y enteroendócrinas, ubicadas en las vellosidades; y por células de Paneth, en el fondo de las criptas. Tomado de Radtke y Clevers (2005)

Paneth agentes antimicrobianos como criptidinas, defensinas y lisozimas para controlar la flora microbiana del intestino ⁸.

Cuando el alimento ingresa al duodeno, las secreciones pancreática y biliar, que son alcalinas, neutralizan el ácido estomacal, cambiando el pH a alcalino. El cambio de pH inhibe a la pepsina, y es necesario para la actividad de las enzimas pancreáticas y del jugo intestinal.

La acción concreta de las secreciones de la mucosa intestinal, el páncreas y el sistema biliar contribuyen a la digestión y absorción de alimentos. La bilis, producida por el hígado y almacenada en la vesícula biliar, contiene sales biliares que bajan la tensión superficial permitiendo que se emulsionen las grasas y, por tanto, que se lleve a cabo su digestión y absorción, así como la absorción de vitaminas liposolubles. La secreción pancreática, un fluido acuoso alcalino (pH superior a 7.5) similar a la saliva en contenido de agua y de algunas proteínas, contiene enzimas importantes para la digestión de carbohidratos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Algunas son sintetizadas en la forma activa, como alfa amilasa, ribonucleasa, desoxirribonucleasa, colagenasa, leucina aminopeptidasa. Otras son sintetizadas como zimógenos; es el caso de tripsina, quimotripsina, carboxipeptidasa, elastasa, lipasa y fosfolipasa ⁶.

La acción proteolítica de la secreción pancreática se debe a tres endopeptidasas: tripsina, quimotripsina y elastasa, que completan la digestión de proteínas y polipéptidos procedentes de la degradación parcial ocurrida en el estómago. Al igual que en todos los vertebrados, la activación del tripsinógeno en el perro ocurre en un proceso de dos pasos. Al ingresar en el duodeno, el tripsinógeno es hidrolizado por la enteroquinasa, una proteasa secretada por la mucosa duodenal. La enteroquinasa hidroliza específicamente el enlace entre los residuos Lys15-Ile16 dando lugar a tripsina activa, cuyo extremo amino terminal es el residuo Ile16. Como la tripsina hidroliza enlaces peptídicos en los que el grupo carboxilo es aportado por Arg o Lys, puede hidrolizar la Lys15 de tripsinógeno, es decir autoactivarse. La tripsina también activa al quimotripsinógeno y a la proelastasa ⁶.

1.2.3. Respuesta inmune del perro a la infección por *E. granulosus*

Cuando el parásito se adhiere a las paredes del duodeno, se suma otro factor que afecta su entorno: la respuesta inmune del hospedero inducida por su presencia ^{9,10}. La información disponible acerca de esta respuesta es escasa, sobre todo en lo que se refiere a su etapa temprana. Existen algunos estudios al respecto en perros infectados experimentalmente con *E. granulosus*. Se ha observado que la mayoría de los gusanos larvarios son expulsados en las primeras horas de la infección, como consecuencia de una inflamación aguda, que es seguida de un período de inflamación subcrónica; cuando los parásitos se establecen en el fondo de las criptas, y finalmente por un proceso inflamatorio crónico ¹¹. Este último seguramente esté mediado por estrategias que *E. granulosus* ha desarrollado para evitar ser expulsado por el hospedero. Es frecuente en las infecciones por helmintos que el hospedero tolere la presencia del parásito sin una manifestación clínica notoria ¹².

En otros estudios, se observó que los perros infectados desarrollan una respuesta inmune contra el parásito, y que la cantidad de parásitos que persisten depende de la magnitud de la respuesta. En efecto, los linfocitos de sangre periférica de perros infectados presentaron una

respuesta aumentada al ser estimulados por el mitógeno Concanavalina A (Con A) y los individuos con mayor respuesta mostraron una menor tasa de infección ¹³. Además, en animales infectados, se describió la presencia de IgG e IgA específicas en suero y la proliferación de células de las placas de Peyer en respuesta a antígenos parasitarios ¹⁴. También existe evidencia de un papel de la IgE en la protección contra la infección ^{15 16}.

En estudios pioneros, Gemmel y colaboradores demostraron que la infección experimental repetida de los perros con *E. granulosus* lleva al desarrollo de resistencia, al cabo de aproximadamente siete rondas de infección-purga-reinfección ¹⁷. Recientemente, se observó que, luego de una primera infección, las células de las placas de Peyer (respuesta local) y del bazo (respuesta sistémica) de los animales infectados presentaban una marcada polarización hacia un perfil Th2 en respuesta a la estimulación por ConA. Esta polarización desapareció en los animales que desarrollaron resistencia al cabo de sucesivas rondas de infección que, en cambio, mostraron una respuesta Th1/Th2 balanceada ¹⁸.

1.3. Peptidasas de serina

1.3.1. Descripción general y estructura

Las peptidasas, es decir las enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas y polipéptidos, son muy numerosas: representan alrededor del 2% de todos los productos génicos, y cerca del 10% del total de proteínas incluidas en el catálogo de enzimas (EC) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). Forman el subgrupo 4 (EC 3.4) dentro del grupo de las hidrolasas (EC 3), donde el Nº 3 indica que hidrolizan y el Nº 4 que la hidrólisis es sobre enlaces peptídicos. Los sistemas de clasificación utilizados para otras enzimas no son adecuados para las peptidasas debido, básicamente, a que todas las peptidasas catalizan la misma reacción: la hidrólisis de un enlace peptídico. Las diferencias entre las enzimas individuales radican en la posición del enlace sésil y en la secuencia de aminoácidos de su entorno. Por esta razón, la clasificación de las peptidasas requiere un sistema específico.

1.3.2. MEROPS: base de datos de peptidasas

Un primer paso en el sentido de la clasificación fue dado por Hatley alrededor de 1960, quien propuso un sistema basado en la naturaleza química del sitio activo, es decir de los aminoácidos involucrados en la catálisis, distinguiendo peptidasas de serina, de aspártico, de cisteína, y metaloproteasas ¹⁹. No obstante su utilidad, esta clasificación es insuficiente para un conjunto tan numeroso y diverso de proteínas. En este contexto, en la década de los 90, Rawlings y Barrett, propusieron una clasificación basada en la estructura de las proteínas, de manera de agrupar a las peptidasas con estructura molecular y orígenes similares ²⁰. Así surgió la base de datos MEROPS, en la que las estructuras moleculares se utilizan para asignar a las peptidasas individuales a familias y para agrupar las familias en clanes. La versión original de esta base fue publicada en la red en 1996; su versión actual (10/15) es la 9.13 (<http://merops.sanger.ac.uk>) ^{21,22}. Una familia de peptidasas se ensambla en torno a un prototipo. Una peptidasa es asignada a una familia cuando se establece una similitud estadísticamente significativa entre la secuencia de aminoácidos de su “unidad de catálisis peptídica” (del inglés “peptidase unit”; se refiere a la parte de la peptidasa responsable de la actividad de hidrólisis) con la de un miembro de la familia. Las familias se agrupan en clanes;

un clan es un grupo de familias que pertenecen a una misma línea evolutiva. Las evidencias para esta asignación provienen, ya sea de la similitud en la estructura terciaria, determinada por cristalografía, o algunas veces, del orden idéntico de los residuos catalíticos en la secuencia lineal, o de la existencia de motivos similares en el entorno de los residuos catalíticos ²³.

1.3.3. Familia S1 de peptidasas de serina (familia de la quimotripsina)

Casi un tercio de todas las peptidasas son peptidasas de serina, es decir, tienen un residuo de serina en el sitio activo; forman el grupo EC 3.4.21. En la base de MEROPS existen actualmente 52 familias de peptidasas de serina, agrupadas en 15 clanes (dos de los ellos contienen también peptidasas de cisteína y un tercero, de cisteína y treonina); 7 de las familias no han sido aún asignadas a ningún clan. La enorme mayoría de estas enzimas se caracterizan por la presencia de tres aminoácidos esenciales para la catálisis, Asp, His y Ser, que forman la “tríada catalítica”. Son las llamadas peptidasas de serina “clásicas”. Esta tríada catalítica existe al menos en cuatro contextos estructurales diferentes, indicando que la misma maquinaria catalítica ha evolucionado, al menos, en cuatro ocasiones separadas. Por esta razón, se distinguen cuatro clanes de peptidasas de serina clásicas, tipificados respectivamente por quimotripsina A de *Bos taurus* (clan PA, que contiene 14 familias de peptidasas de serina y varias familias de peptidasas de cisteína virales), subtilisina de *Bacillus licheniformis* (clan SB, 2 familias de peptidasas de serina), carboxipeptidasa Y de *Saccharomyces cerevisiae* (clan SC, 6 familias), y peptidasa C1p de *Escherichia coli* (clan SK, 3 familias) ²⁰.

El clan de la quimotripsina es de los más numerosos. Incluye 14 familias distribuidas en eucariotas, procariotas, arqueas y virus. La familia que posee más integrantes es, a su vez, la familia S1 de la quimotripsina, con 694 peptidasas reconocidas actualmente en la base MEROPS (para 110 de las cuales existen estructuras). La subfamilia S1A por su parte, cuyo prototipo es la quimotripsina A, incluye a 619 miembros (87 estructuras) y corresponde principalmente a peptidasas de animales, involucradas en muchos procesos fisiológicos críticos, incluyendo digestión, hemostasis, respuesta inmune, así como procesos críticos en la biología celular como apoptosis y traducción de señales ²⁰.

1.3.4. Estructuras responsables de la catálisis y la unión del sustrato

La tripsina, quimotripsina y elastasa, secretadas por el páncreas en los mamíferos, integran la subfamilia S1A de la quimotripsina. Como todos los miembros del clan de la quimotripsina, su estructura primaria es de aproximadamente 240 residuos, plegados en dos dominios, con hebras β -antiparalelas que forman un barril en cada dominio; el arreglo incluye, además, α -hélices (Figura 1.4). La hendidura catalítica se ubica entre los dos barriles. En ella, generalmente se reconocen elementos responsables de la catálisis, el reconocimiento del sustrato y la activación del zimógeno. Como se describe en los párrafos siguientes, estos tres procesos están interconectados y en ellos participan componentes estructurales comunes.

Como se comentó anteriormente, estas enzimas poseen tres aminoácidos esenciales para la catálisis. En la familia de la quimotripsina, los residuos de la tríada catalítica ocupan las posiciones: His57, Ser195 y Asp102, según la numeración del quimotripsinógeno. La His57 y la Ser195 se encuentran en el sitio de unión al sustrato (Figura 1.5), el Asp102 está metido dentro de un bolsillo de la enzima cerca del sitio activo.



Figura 1.4: Modelo estructural de tripsina humana

Las hebras β -antiparalelas que forman los dos barriles β y representan una porción extensa de la estructura se muestran en verde, y los dos segmentos de hélice α en rojo. Se indican los residuos de la tríada catalítica: histidina (púrpura), serina (amarillo) y ácido aspártico (rosado). Tomado de <http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>.

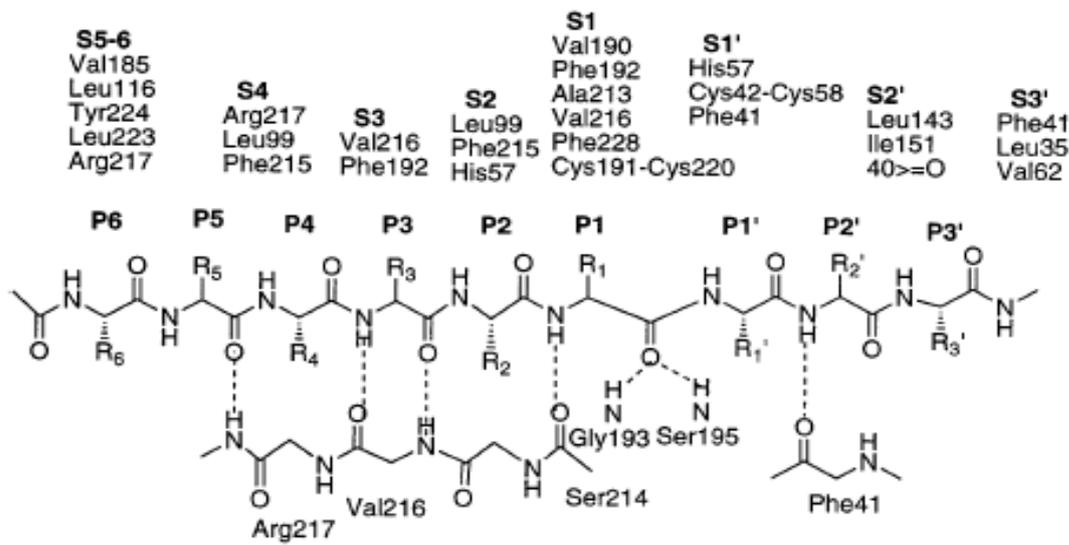


Figura 1.5 Subsitios de unión al sustrato de la elastasa de neutrófilos humanos

Se muestran con líneas punteadas los puentes de hidrógeno entre los residuos del sitio de unión de la enzima y un sustrato. Además, se indican los residuos más alejados que establecen interacciones adicionales con cada "subsitio" del polipéptido. Tomado de Hedstrom (2002).

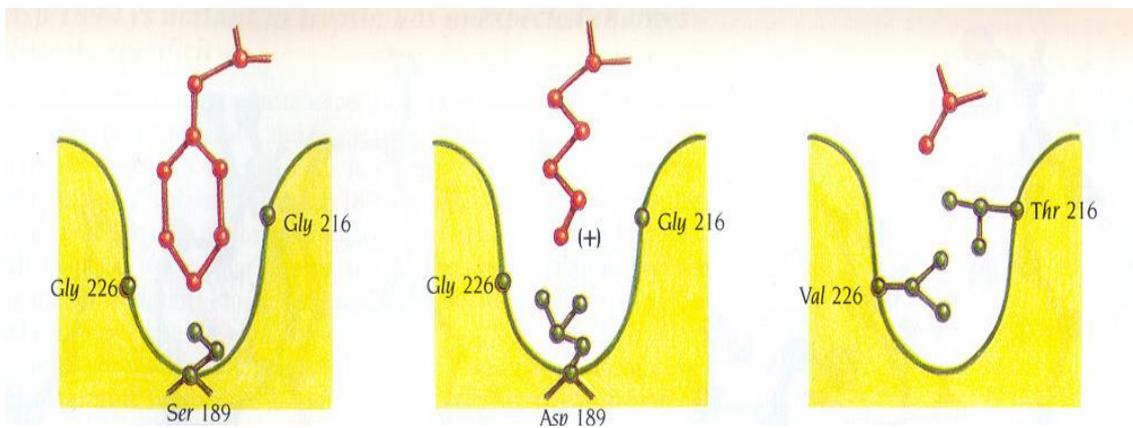


Figura 1.6 Características estructurales del bolsillo de especificidad en las hendiduras catalíticas de quimotripsina, tripsina y elastasa. Tomado de Branden y Tooze (1991).

Otro componente importante para la catálisis es el llamado “agujero del oxianión”, formado por los grupos amida de la Gly193 y de la Ser195. Estos grupos forman enlaces de hidrógeno con el átomo de oxígeno cargado negativamente del intermediario tetraédrico que, a su vez, es muy similar al estado *trans*. Además, el agujero del oxianión conecta la tríada catalítica con un puente salino que se establece entre Ile16 y Asp194, por vía de la Ser195 ²⁰.

El puente salino Ile16-Asp194 se forma cuando se activa el zimógeno y es muy importante para mantener la conformación activa de las peptidasas. Está relacionado con la pérdida de actividad de estas enzimas a pH alto, ya que al desprotonarse el N-terminal, el puente salino se separa y cambia el equilibrio conformacional hacia uno similar al del zimógeno ²⁰.

El sitio de reconocimiento del sustrato incluye un sitio para la unión del polipéptido y bolsillos para la unión de sus cadenas laterales. Se utiliza la nomenclatura descrita originalmente por Schechter y Berger ²⁴, donde se designa como P1-P1' a los aminoácidos situados, respectivamente, del lado del acilo y del grupo saliente del enlace escindible del sustrato. Los residuos adyacentes se numeran de manera creciente al alejarse del enlace escindible. Y se designa como S1, S1', etc. a los correspondientes sitios de unión de la enzima.

El sitio S1 es un bolsillo adyacente a la Ser195, formado por los residuos 189-192, y 214-228. Este último contiene los residuos 214-216, que forman una hoja β antiparalela al interactuar con los residuos P1-P3 del sustrato peptídico por medio de puentes de hidrógeno. El sitio S1 se conoce como “bolsillo de especificidad”. De todos modos, la interacción sustrato-peptidasa se extiende más allá del sitio S1; incluye, al menos, interacciones con otros residuos del sitio de unión al polipéptido y, frecuentemente, involucra otros adicionales; en la Figura 1.5 se muestra como ejemplo a la elastasa de neutrófilos humanos.

La especificidad de sustrato en el clan de la quimotripsina está determinada esencialmente por la interacción P1-S1, que usualmente establecen los residuos en las posiciones 189, 216 y 226. Tanto la quimotripsina como la tripsina, poseen Gly en las posiciones 216 y 226, pero difieren en la cadena lateral del residuo 189, que es Ser en la quimotripsina, y Asp en la tripsina. En el caso de elastasa, las cadenas laterales de los residuos Val (226) y Thr (216) llenan el bolsillo de la hendidura catalítica ²⁵ (Figura 1.6). Por esta razón, estas enzimas hidrolizan a continuación de residuos diferentes, determinados por las cadenas laterales que pueden acomodarse en el bolsillo de especificidad: cargados positivamente para la tripsina, aromáticos para la quimotripsina y pequeños no cargados para la elastasa ²⁰.

Como ya se mencionó, estas enzimas son sintetizadas como zimógenos, con una extensión N-terminal. Los zimógenos de quimotripsina y tripsina poseen cuatro segmentos con una conformación diferente a la enzima activa: el extremo N-terminal hasta el residuo 19, y segmentos que involucran los residuos 142-152, 184-193, y 216-223; al conjunto de estas regiones se le denomina “el dominio de activación”. Este dominio incluye residuos del sitio S1 (189, 216) y el agujero del oxianión (193), lo que explica la baja actividad catalítica del zimógeno ²⁰.

1.3.5. Mecanismo catalítico

Las peptidasas de serina presentan un mecanismo catalítico común, que se muestra en la Figura 1.7. Una vez que interactúan con el sustrato formando un complejo no covalente de

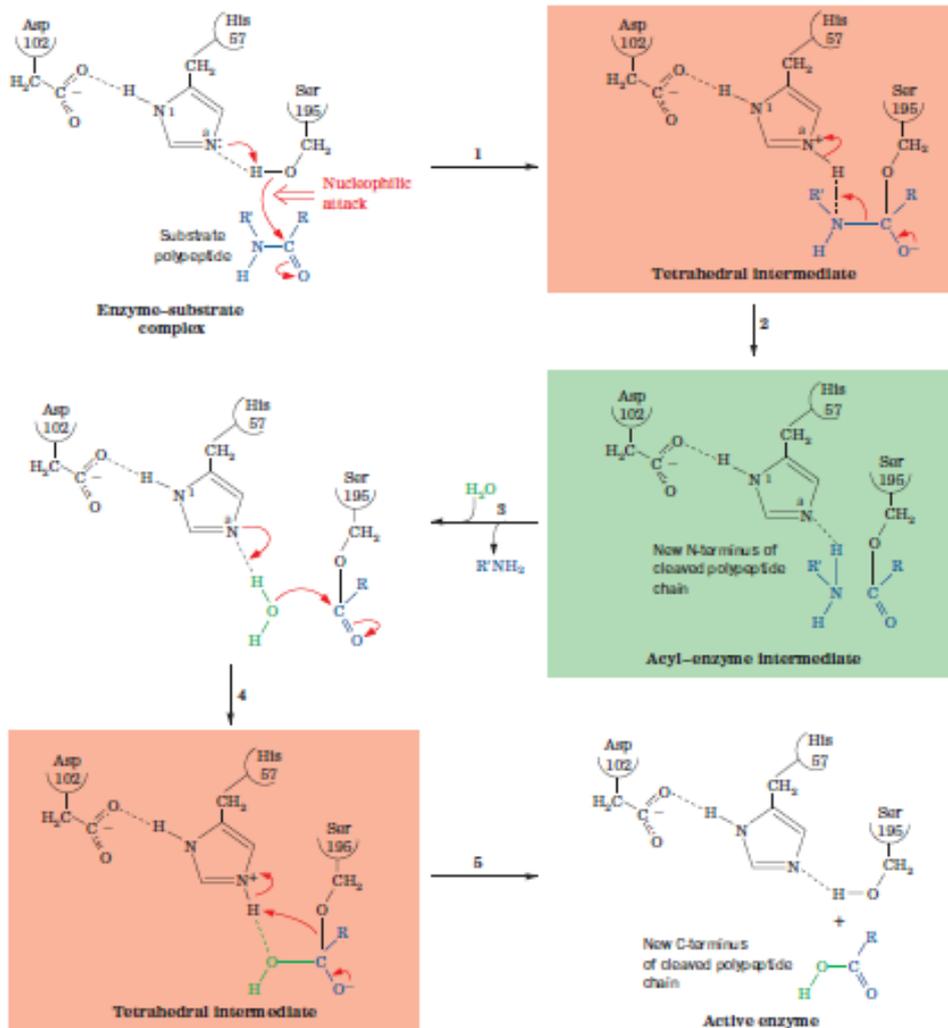


Figura 1.7 Mecanismo catalítico de las proteasas de serina

(1) La Ser195 del sitio activo realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del enlace peptídico escindible, dando lugar al intermediario tetraédrico. (2) El intermediario tetraédrico se descompone hacia el intermediario acil-enzima; luego, una molécula de agua reemplaza el grupo amino recién formado que está unido al N3 de la His57. (3) En este paso, se forma un segundo intermediario tetraédrico mediante una reacción que es la inversa del paso 2. (4) Finalmente, ocurre la reacción inversa del paso 1, liberándose el extremo carboxilo del producto y reconstituyéndose la enzima. Tomado de voet y cols 2008

Michaelis, la Ser195 realiza un ataque nucleofílico sobre el grupo carbonilo del enlace peptídico escindible formándose el intermediario tetraédrico por catálisis covalente. El N3 del anillo imidazólico de la His57 toma un protón que proviene de la Ser195, formándose un ión imidazolium His57-H⁺, ayudado por el efecto polarizante del ión carboxilato no solvatado del Asp102; en ese momento, se forma el estado de transición. Se ha propuesto que cuando la His57 se protona, se modificaría su pKa asemejándose al del Asp102. La similitud de pKa de los átomos aceptor y dador de protones determinaría que el hidrógeno fuera compartido entre ellos (A.....H.....B); por consiguiente, se formaría un enlace de hidrógeno mucho más fuerte que uno convencional (“débil”), de los llamados “de baja barrera” (LBHB, del inglés ‘*low barrier hydrogen bond*’) ²⁶. La formación de este tipo de enlaces de hidrógeno libera más energía que la formación de uno convencional (−40 a −80 KJ/mol vs −12 a −30 KJ/mol). Cuando un enlace de H débil en el complejo enzima-sustrato inicial se transforma en uno de baja barrera por alteración del pKa de un grupo catalítico de la enzima, la energía liberada puede contribuir a catalizar la reacción. En este caso, podría usarse para facilitar la formación del intermediario tetraédrico. No obstante, y pese a que el puente de H entre Asp102 e His57 cumpliría varios de los requisitos para el establecimiento de un LBHB en el intermediario tetraédrico, su formación no está absolutamente demostrada. Más aún, existen datos experimentales que indican que el H⁺ está, en un 85%, localizado sobre la His57 ²⁰. Por otro lado, los resultados de un estudio teórico indican que, tanto en la enzima libre como en el intermediario tetraédrico, el H⁺ estaría estabilizado por una interacción electrostática, contrariamente a la hipótesis anterior de que se trataría de un puente de H débil en la enzima libre y de uno del tipo LBHB en el intermediario tetraédrico ²⁷

En cuanto al intermediario tetraédrico, aunque su existencia es transitoria, existen evidencias experimentales definidas de su formación. Los elementos más claros se obtuvieron mediante estudios por difracción de rayos X de cristales de complejos entre la tripsina e inhibidores como el inhibidor de tripsina del páncreas bovino (BPTI, del inglés “*bovine pancreatic trypsin inhibitor*”); estos complejos son útiles para estudiar el mecanismo catalítico ya que la conformación del intermediario tetraédrico es similar a la de complejos de la tripsina con ese tipo de inhibidores. Comparaciones detalladas entre varias estructuras de complejos revelaron la base estructural del mecanismo catalítico de estas enzimas. La distorsión conformacional que ocurre al formarse el intermediario tetraédrico mueve el oxígeno carbonílico del enlace peptídico a ser hidrolizado dentro del sitio activo de manera que ocupe el agujero del oxianión, previamente no ocupado. Por otro lado, la distorsión permite la formación de enlaces de hidrógeno entre la enzima y el residuo que aporta el grupo amino del enlace escindible, que no se formaría si el carbonilo mantuviera la conformación trigonal normal (Figura 1.8) ²⁵.

Luego, el intermediario tetraédrico se descompone originando otro intermediario, la enzima acilada, (Figura 1.7). La formación de la enzima acilada ocurre junto con la hidrólisis del péptido; el N3 del anillo imidazólico de la His57 dona su protón al grupo amino recién hidrolizado que, a su vez, queda unido por un puente de hidrógeno al N3 de la His57. Este grupo amino es reemplazado por agua que libera el extremo C-terminal del sustrato por medio de un ataque nucleofílico. Como resultado de ello, se recupera la Ser195 y, por tanto, la enzima activa (Figura 1.7). Por difracción de rayos-X, se han obtenido evidencias del mecanismo de hidrólisis. La molécula de agua aparece por encima del plano del grupo

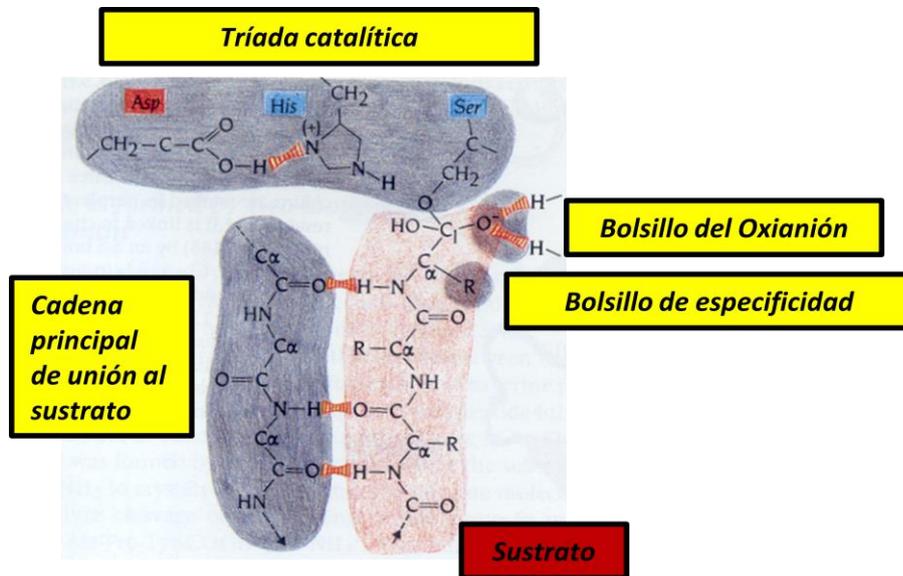


Figura 1.8 Intermediario tetraédrico

Se muestra un esquema del intermediario tetraédrico en el paso de desacilación. Los recuadros amarillos señalan las estructuras de la enzima que participan en el mecanismo catalítico. Tomado de Branden y tooze (1991).

carbonilo del péptido, en una posición adecuada para realizar el ataque nucleofílico que lleva a la hidrólisis de la enzima acilada ²⁵.

1.4. Proteínas inhibidoras de peptidasas de serina

1.4.1. Generalidades

Las enzimas proteolíticas, como ya se comentó, son esenciales para la vida de todos los organismos. Sin embargo, si no están debidamente reguladas pueden ser dañinas para los individuos. Los inhibidores forman parte de los mecanismos utilizados para regular su actividad. Por otro lado, las enzimas proteolíticas están vinculadas a muchos procesos fisiológicos. Entre ellos, cumplen funciones en la defensa de la integridad del organismo, por ejemplo en la coagulación y en la regulación de la respuesta inmune. Además, muchos organismos invasores presentan cócteles de peptidasas, que utilizan para invadir a los hospederos de manera de utilizar rápidamente sus proteínas constitutivas. Por otro lado, en muchos organismos invasores existen inhibidores de enzimas proteolíticas, en general proteínas, que forman parte de las herramientas que utilizan para la invasión. Por tanto, en las interacciones entre organismos, ya sea entre predador y presa o entre hospedero y parásito, existe una lucha evolutiva, tanto en la evolución de peptidasas como en la de inhibidores de peptidasas ^{28 29}. En esta sección, nos centraremos en los inhibidores de peptidasas de serina canónicos, que son aquellos que siguen el mecanismo de inhibición llamado estándar (ver más adelante), haciendo particular énfasis en los inhibidores de tipo Kunitz. Además analizaremos la evolución que presentan los inhibidores de peptidasas en organismos invasores.

1.4.2. Clasificación de inhibidores proteicos de peptidasas – unidades inhibidoras

Se han descrito una gran cantidad de inhibidores de proteasas de serina. Para clasificarlos Rawlings y colaboradores propusieron un sistema similar al utilizado para las peptidasas. No obstante, un inconveniente importante para clasificar las proteínas inhibidoras de peptidasas en función de similitudes en su secuencia de aminoácidos es que la mayoría de ellas tienen múltiples dominios inhibidores en una única molécula. Como estas unidades repetidas están presentes en un número variable, no es posible ensamblar buenos alineamientos de las secuencias completas que permitan obtener medidas de similitud de secuencia. Por esta razón, el sistema propuesto clasifica el dominio inhibidor (“unidades inhibidoras”) y no las secuencias completas de las proteínas. La mayoría de las proteínas que contienen más de una unidad inhibidora están formadas por un único tipo de unidad (son homotípicas), habiéndose descrito pocos casos donde las unidades son diferentes (se dice que las proteínas son heterotípicas) ²⁸.

Siguiendo la clasificación de Rawlings y cols, en la base MEROPS se clasifica a los inhibidores de peptidasas en 77 familias según parámetros de similitud de secuencia aminoácidica. Y, según los datos de estructura terciaria, 51 de estas familias se agrupan en 38 clanes, considerando que cada línea evolutiva está definida por un único tipo de plegamiento.

Es interesante que cada clan está formado por pocas familias. Esto contrasta con las peptidasas, en las que cada clan reúne numerosas familias. Si bien el método para clasificar las unidades inhibidoras es similar al utilizado para las peptidasas, la clasificación de los inhibidores presenta al menos tres diferencias principales respecto a la de las peptidasas: 1)

Una unidad inhibidora puede contener muy pocos aminoácidos, las más pequeñas posee 14 aminoácidos, mientras que las peptidasas presentan alrededor de 200. 2) Los residuos del sitio activo de las unidades inhibidoras frecuentemente no son conservados, como ocurre con los residuos del sitio activo de las peptidasas, no siendo posible identificar a partir de la secuencia si un inhibidor presenta actividad inhibidora. 3) Las unidades inhibidoras de docenas de familias se han duplicado y vuelto a duplicar durante la evolución existiendo proteínas que contienen múltiples copias de las mismas; en cambio, existen muy pocos casos en los que una misma proteína presente más de una unidad proteolítica ²⁸.

Muchos inhibidores de peptidasas contienen enlaces disulfuro y, en algunas familias, éstos estabilizan el bucle antipeptidasa. Existe una gran conservación en el patrón de enlaces disulfuro en los diferentes clanes y familias, indicando que se trata de un patrón evolutivo distintivo ²⁸.

1.4.3. Clasificación de inhibidores proteicos de peptidasas según el mecanismo de inhibición

Aunque existe una enorme diversidad de formas de interacción entre los inhibidores y sus enzimas, se reconocen dos tipos generales de interacciones, reversibles e irreversibles. Los inhibidores reversibles pertenecen en su gran mayoría al grupo de los llamados inhibidores canónicos y, en menor medida, al de los inhibidores no canónicos.

Los inhibidores canónicos se unen a su enzima blanco como sustratos ideales, a través de un bucle de unión convexo, que es complementario al sitio activo de la enzima y establece con él interacciones de alta afinidad. El mecanismo de unión se conoce como estándar ³⁰. Los inhibidores no canónicos interactúan con sus enzimas blancos a través de su extremo N-terminal, y establecen interacciones secundarias importantes fuera del sitio activo que afectan significativamente la fuerza, velocidad y especificidad de las interacciones entre la enzima y el sustrato. Son ejemplos de inhibidores no canónicos la hirudina y la hemadina en la familia I14. Mejoran la especificidad y la afinidad de la inhibición de trombina (peptidasa de serina) por la unión no únicamente al sitio activo de la enzima sino también a sitios externos más distantes.

³¹ ³²

El ejemplo típico de inhibidores irreversibles lo constituyen las serpinas. Al igual que los inhibidores canónicos, interactúan con su blanco de manera similar a un buen sustrato; sin embargo, la ruptura de un enlace peptídico particular en el bucle de unión lleva a cambios estructurales que impiden que el inhibidor y la enzima se separen, lo que determina que la inhibición sea irreversible. Generalmente, se establece un enlace covalente entre la enzima y el inhibidor por lo que este tipo de inhibidores funcionarían como etiquetas de afinidad (también se los llama "suicidas") ³⁰.

1.4.4. Mecanismo de inhibición de inhibidores canónicos

El mecanismo estándar de inhibición es característico de inhibidores canónicos; existen 19 familias de inhibidores canónicos de peptidasas de serina agrupadas en 13 clanes, que presentan un plegamiento proteico diferente, indicando que este mecanismo de inhibición ha coevolucionado en varios eventos independientes. En estos inhibidores el dominio proteico expone el bucle antipeptidasa que adopta la conformación "canónica" sobre una gran variedad de dominios proteicos muy estables ²⁸ (Figura 1.9). Estos dominios son pequeños (de 20 a 200

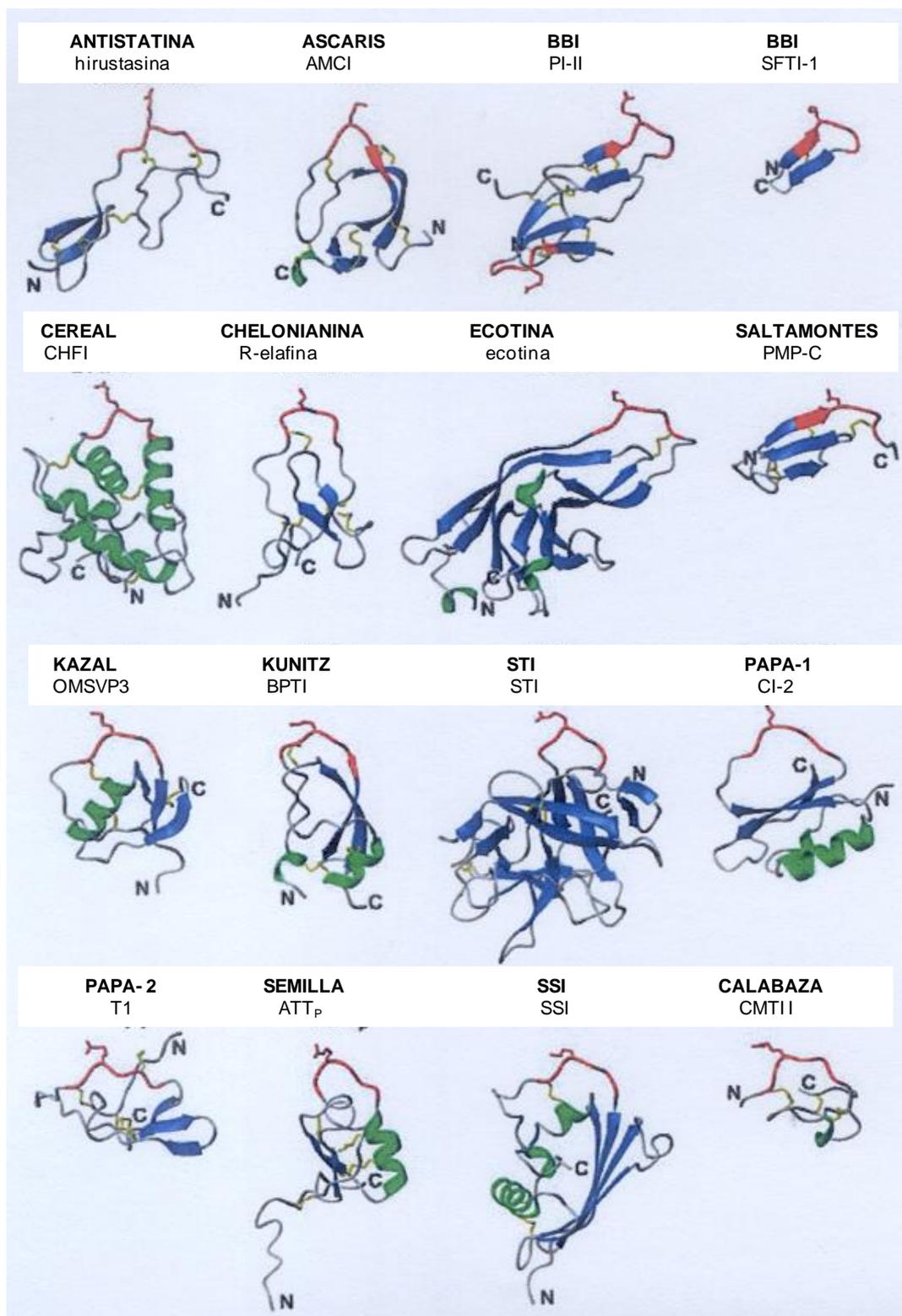


Figura 1.9 Estructuras representativas de inhibidores canónicos de proteasas de serina

En cada esquema, el bucle de unión con la enzima y la cadena lateral del aminoácido en P1 (sitio activo) están coloreados en rojo; los elementos de estructura secundaria en azul (hebras plegadas β) y en verde (hélices α). Tomado de Krowarsch y cols (2013).

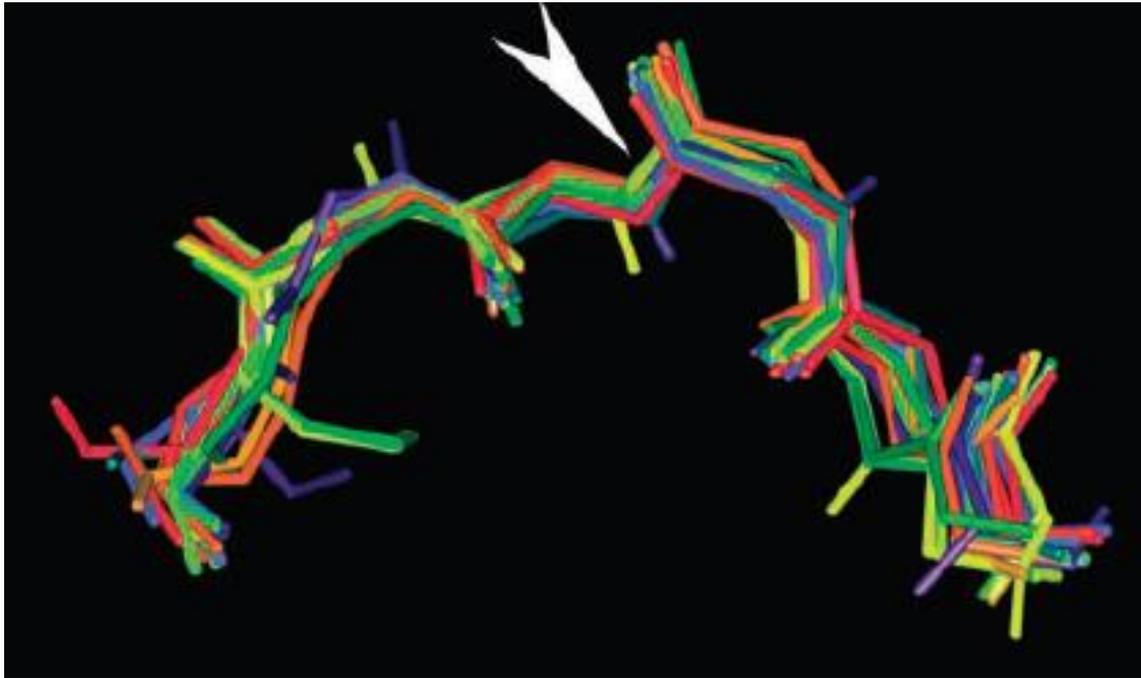


Figura 1.10 Superposición de la estructura del bucle anti-peptidasa de 23 inhibidores diferentes en complejo con las peptidasas

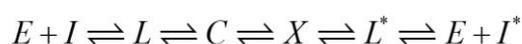
Las estructuras provienen de inhibidores pertenecientes a doce familias distintas que no se relacionan ni en secuencia ni en plegamiento. Los inhibidores están formando complejos con 9 peptidasas de serina, algunas pertenecientes a la familia de la quimotripsina y otras a la de la subtilisina. La flecha blanca indica el sitio de hidrólisis. La superposición se basó únicamente en la estructura de los seis residuos que conforman el bucle anti-peptidasa (Tomado de Radisky y Koshland, 2002).

aminoácidos), y tienen en común únicamente el bucle antipeptidasa (Figura 1.10) ^{33, 34}. Su estabilidad es en general alta; resisten la desnaturalización por temperatura y agentes químicos. Por ejemplo, el BPTI resiste 95° C y guanidinio 6M. Suelen presentar puentes disulfuro que son muy importantes para su estabilidad. No obstante, en el caso del BPTI, se observó que, si bien son fundamentales para su gran estabilidad, la estructura del dominio no cambia mucho en su ausencia en condiciones no desnaturalizantes. El bucle antipeptidasa tiene una conformación característica desde P3 a P3'. Está fuertemente estabilizado por interacciones adicionales entre los residuos que flanquean el sitio reactivo y el core del inhibidor. En la mayoría de los inhibidores canónicos pequeños, por ejemplo en el BPTI, el residuo en P2 forma un disulfuro conectado a un core hidrofóbico. Además, residuos laterales establecen puentes de hidrógeno que anclan el bucle al cuerpo principal de la molécula (Figura 1.11) ³⁴.

La región central de bucle convexo de unión a la peptidasa contiene el péptido P1-P1' expuesto al solvente, llamado sitio reactivo. El soporte estructural del sitio reactivo juega un rol importante en el mantenimiento de la conformación del bucle. La cadena lateral del residuo en P1, que está completamente expuesta en todas las estructuras de inhibidores canónicos libres, queda embebida en el bolsillo S1 después de la formación del complejo enzima-inhibidor, (Figura 1.11). Si la forma, el tamaño, la carga, la polaridad o ramificaciones de la cadena lateral de P1 no permiten que se establezca una interacción adecuada con la enzima, se afecta de manera importante la asociación. Por esta razón, en inhibidores canónicos, la posición P1 determina en gran medida la asociación con las peptidasas. Los residuos contiguos a P1 también pueden contactarse con la enzima y modificar la asociación ³⁰.

Prácticamente cualquier aminoácido puede ocupar la posición P1, con la excepción de Ile, Cys, Gly y Pro, por su parte, no favorecen la interacción con muchas peptidasas. Además, las cadenas laterales cargadas de Asp, Glu e His se oponen fuertemente a la formación del complejo enzima-inhibidor ³⁰. Como se ha mencionado, los residuos en P1 determinan en gran medida la especificidad de inhibición. Por ejemplo, los inhibidores que poseen Lys y Arg en P1 suelen inhibir tripsina; aquellos que contienen Tyr, Phe, Trp, Leu y Met, quimotripsina; y aquellos que tienen Ala y Ser, elastasa ³⁵.

La interacción de inhibidores canónicos con la enzima blanco sigue el siguiente esquema,



donde el inhibidor (I) interacciona con la enzima (E) formando rápidamente el complejo enzima-inhibidor (L) que usualmente se disocia muy lentamente en enzima libre e inhibidor, o puede llevar a la formación de un intermediario estable enzima-inhibidor (C). Si bien el intermediario C es muy estable, puede generar muy lentamente intermediario L o puede ocurrir muy lentamente la hidrólisis específica del enlace peptídico P1-P1', dando lugar al intermediario (X) de E con el inhibidor hidrolizado (I*). En el intermediario X puede ocurrir la resíntesis del enlace peptídico hidrolizado generándose el intermediario estable C, o pasarse a un intermediario poco estable de la enzima con el inhibidor hidrolizado (L*). Este intermediario puede liberar el I* o generar intermediario X. Finalmente, el I* libre puede interaccionar con la

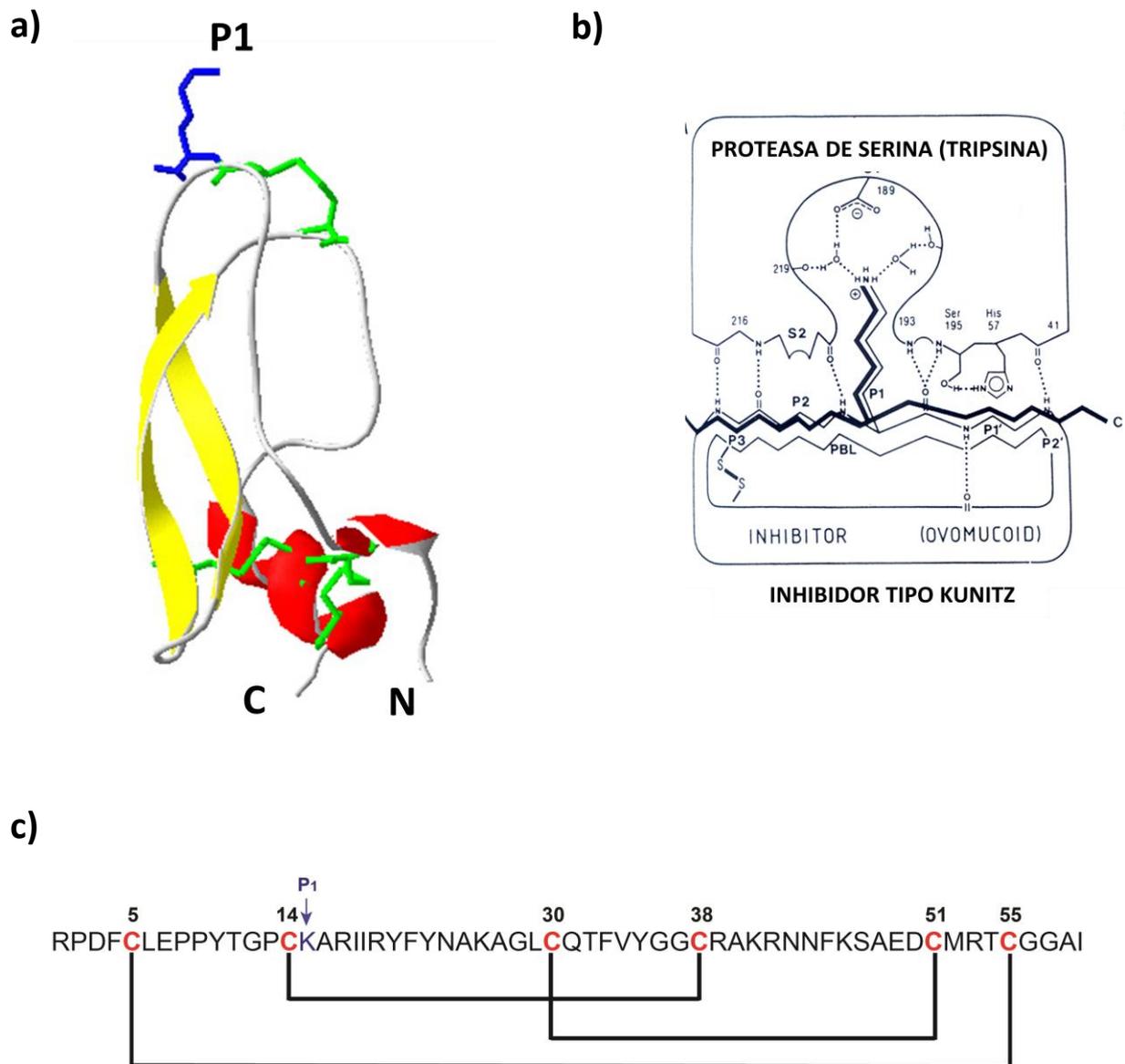


Figura 1.11 Estructura e interacción con la enzima de inhibidores tipo Kunitz

a) Diagrama de la estructura del inhibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI), el prototipo de los inhibidores tipo Kunitz; se indican los elementos de estructura secundaria en amarillo (hebra β) y rojo (hélices α). En verde se muestran los enlaces disulfuro, y la cadena lateral del aminoácido en posición P1 en azul. Tomado de Ascenzi y cols (2003). **b)** Representación esquemática del complejo de la tripsina con el BPTI. La interacción del bucle de unión del inhibidor (marcado en negrita) con la enzima de manera similar al sustrato, determina que se forme una estructura β antiparalela entre los residuos P1 y P3 del inhibidor y los aminoácidos en las posiciones S2 y S3 de la enzima. La Ser195 de la tripsina contacta con el carbono carbonílico del aminoácido en posición P1. Tomado de Bode y Huber (1992). **c)** Se muestra la secuencia del BPTI indicando en rojo las cistinas y con líneas negras la topología de los enlaces disulfuro. Con la flecha azul se indica el sitio P1.

enzima e ir en el sentido de la resíntesis del enlace peptídico P1-P1'. La constante global de hidrólisis $K_{hid} ([I^*]/[I])$ es de uno a pH fisiológico pero crece cuando aumenta o baja el pH ³⁵.

En los cristales de complejos enzima-inhibidor, el bucle con el sitio reactivo del inhibidor se asocia con los residuos catalíticos de manera similar al sustrato. Para las proteínas tipo tripsina, el segmento amino terminal del enlace peptídico escindible se acomoda como una hebra antiparalela β a través de enlaces de hidrógeno formados por P3 y P1, mientras que el lado carboxiterminal interacciona a través de otros enlaces de hidrógeno por P2'. El sitio reactivo del inhibidor se ubica próximo a los residuos catalíticos de la peptidasa, con el carbono carbonílico de P1 fijado en un contacto de van der Waals con el O_γ de la Ser195. El grupo carbonilo siempre se proyecta dentro del agujero del oxianión donde forma dos enlaces de hidrógeno con Gly193 N y Ser195 N. El enlace peptídico escindible permanece prácticamente intacto, con una leve deformación del plano del oxígeno carbonílico en algunos complejos; estos complejos enzima-inhibidor se asemejan a un complejo de Michaelis distorsionado ³⁴.

Los contactos entre la superficie del inhibidor nativo y la peptidasa son esencialmente complementarios; la formación del complejo se acompaña de un ligero rearrreglo conformacional, pero da como resultado un considerable congelamiento del bucle de unión. El bucle del inhibidor no ocupa totalmente la hendidura de unión. El espacio residual que queda entre el bucle del inhibidor y la hendidura es frecuentemente llenado con unas pocas moléculas del solvente, lo que permite cierta libertad para adaptarse al estrés del entorno ³⁴.

El bucle de unión del inhibidor es empaquetado fuertemente, quedando bastante rígido. Las interacciones establecidas entre los subsitios de la peptidasa y del core del inhibidor son energéticamente favorables, por lo que estabilizan termodinámicamente el complejo, generando un valle energético. Aparentemente, este conjunto de interacciones evitan la deformación del sitio reactivo y enlentecen la catálisis de la hidrólisis del enlace peptídico y la disociación del inhibidor escindido. Las barreras energéticas son una propiedad del inhibidor, de la peptidasa y del complejo peptidasa-inhibidor. La relación k_{cat}/K_M se utiliza para comparar la especificidad de las enzimas con distintos sustratos, cuanto mayor es el valor, más específica es la enzima con el sustrato correspondiente. Es interesante mencionar que el valor de k_{cat}/K_M para la hidrólisis del enlace peptídico P1-P1' a pH neutro es muy alto, lo que indicaría una gran especificidad en su hidrólisis, pero como los valores de k_{cat} y K_M de los inhibidores son varios órdenes de magnitud más bajos que los correspondientes para sustratos normales, en las concentraciones usadas a pH neutro, su hidrólisis es extremadamente lenta, y el sistema se comporta básicamente como un equilibrio simple entre la enzima y el inhibidor libre ³⁵.

1.4.5. ¿Por qué los inhibidores canónicos se hidrolizan muy lentamente?

No se conoce el mecanismo preciso de la interacción del inhibidor con la peptidasa, es decir la base molecular de la resistencia a la proteólisis que presentan estos inhibidores, que se hidrolizan muy lentamente; por ejemplo el BPTI presenta una vida media de 36 años cuando interacciona con la tripsina bovina ³⁶. Para explicarla, se plantean tres hipótesis: 1) que la estructura del complejo enzima-inhibidor es muy rígida e impide que ocurra la proteólisis; 2) que la incorrecta orientación del grupo reactivo genera un complejo no productivo; y 3) que el inhibidor es hidrolizado en su sitio anti-peptidasa, pero la interacción entre el inhibidor

escindido y el sitio activo de la enzima favorece que ocurra una rápida religación. Esta última hipótesis es la más aceptada³³. A continuación se mencionan algunas de las evidencias que la apoyan.

En 1967 Finkenstandt y Laskowski observaron que, aunque la resíntesis del enlace peptídico es desfavorable para muchos sustratos, para un inhibidor natural de peptidasas de serina, el inhibidor de tripsina de soja (SBTI), el enlace peptídico del sitio reactivo se hidroliza lentamente cuando está unido a la enzima y puede ser resintetizado. Desde entonces, se estableció que el SBTI es uno de muchísimos inhibidores descritos que presentan el mecanismo estándar de inhibición (o mecanismo de inhibición de Laskowski): actúan uniéndose muy fuertemente al sitio activo de la enzima como si fueran sustratos, pero resisten la hidrólisis durante mucho tiempo. Como los inhibidores escindidos permanecen físicamente asociados a las enzimas, su resíntesis es mucho más favorable que la de los productos libres en solución. A pesar de la prevalencia del mecanismo de inhibición de Laskowski, su base molecular no se comprende en profundidad³⁷.

Además, se han encontrado otras evidencias de la resíntesis del enlace peptídico P1-P1'. Un buen ejemplo es el de la interacción del inhibidor 2 de quimotripsina de cebada (CI2) con la subtilisina. El inhibidor CI2 es hidrolizado muy lentamente por la subtilisina con una tasa de hidrólisis de $3.8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$. Al analizar por SDS-PAGE los productos de la incubación de CI2 con subtilisina a distintos tiempos, se observó a los pocos minutos la aparición de una banda de mayor tamaño que la subtilisina y CI2, que se mantuvo constante durante las dos horas que duró el experimento. Esta banda, que representaba el 10% del total de la enzima, correspondió a un intermediario de la reacción de hidrólisis: la enzima acilada luego de reaccionar con el inhibidor. Esta observación sugirió que se establece rápidamente un equilibrio entre el complejo de Michaelis y la enzima acilada, en el cual el complejo de Michaelis es termodinámicamente favorecido respecto a la enzima acilada. Además, al menos en el caso de CI2, el paso lento de la hidrólisis sería la desacilación³³. El sitio reactivo del bucle de CI2, que se ubica sobre una plataforma de hoja β , se mantiene en su lugar por una densa red de enlaces de hidrógeno que involucra residuos presentes principalmente en el bucle. Varios estudios de NMR muestran que la red permanece intacta en el inhibidor hidrolizado, y estabiliza el nuevo N-terminal. Se presume que esta red de enlaces de hidrógeno enlentece la disociación del CI2 hidrolizado de la enzima y permite una correcta orientación del nuevo N-terminal de manera de favorecer la religación. Además, la posición de la amina obstaculiza la entrada de la molécula de agua para la activación nucleofílica. Estos resultados indican que la combinación de la red de enlaces de hidrógeno en la enzima acilada, y la correcta orientación de la amida que se religa permiten que ocurra la reacción de religación, mientras que cada elemento por sí solo no sería suficiente³³.

Finalmente, se logró verificar que la tripsina es capaz de resintetizar el bucle antipeptidasa del BPTI: se incubó con tripsina de rata BPTI hidrolizado en el sitio reactivo (con tripsina bovina), y se observó que esta tripsina rápidamente sintetizaba el enlace peptídico escindido del inhibidor.³⁷

1.4.6. Cinética de la inhibición

El equilibrio entre una enzima y un inhibidor reversible está definido por una constante de equilibrio, que es una medida de la afinidad de su interacción. La efectividad de un inhibidor se expresa normalmente por la constante K_i , que es una constante de disociación, el recíproco de la constante del equilibrio de asociación ³⁸.

La magnitud de la inhibición depende, en el caso de un inhibidor competitivo, de las concentraciones relativas de sustrato e inhibidor, ya que uno compite con el otro por el sitio de unión de la enzima. La V_{Max} alcanzada a una concentración determinada de enzima es igual en presencia de inhibidor que en su ausencia (ya que el equilibrio enzima-inhibidor es desplazado a concentraciones altas de sustrato), pero se requiere mayor concentración de sustrato para alcanzarla. En otras palabras, la K_M aparente (K_{Mapp}) aumenta en presencia de un inhibidor competitivo, en un factor $(1+[I]/K_i)$, es decir $K_{Mapp}=K_M(1+[I]/K_i)$ ³⁸.

Para la mayoría de los inhibidores competitivos, la concentración necesaria para producir una inhibición significativa es mucho mayor que la de enzima; por lo tanto, la concentración de inhibidor unido a la enzima es despreciable con respecto a la de inhibidor total y se puede decir que la concentración de inhibidor libre es igual a la de inhibidor total ($[I_L]=[I_T]$). Esta consideración, que es análoga a la realizada acerca de la concentración de sustrato en la cinética enzimática clásica, se tiene en cuenta en los cálculos para la determinación de K_i ; el método para estimar la K_i es denominado método clásico.

En el caso de los inhibidores de alta afinidad, los efectos de la inhibición se observan a concentraciones de enzima e inhibidor del mismo orden. Como la mayoría del inhibidor está unido a la enzima, se reduce significativamente la concentración de inhibidor libre, y no es posible suponer que ($[I_L]=[I_T]$); por este motivo, no son válidas las suposiciones del tratamiento clásico para el cálculo de K_i ³⁸. En materiales y métodos, se describe un método para calcular el K_i de inhibidores de alta afinidad utilizando la ecuación de Morrison.

Los inhibidores de alta afinidad pueden ser utilizados para titular enzimas, es decir, para determinar la concentración de enzima activa en una determinada muestra. Para esto, se realizan curvas de velocidad en función de la concentración de enzima en presencia y ausencia de inhibidor ³⁸.

Una característica que presentan frecuentemente los inhibidores de alta afinidad es que, además de ser de alta afinidad, son inhibidores lentos. Es decir, a una concentración fija de inhibidor, la inhibición aumenta en el tiempo, en una escala de minutos u horas, hasta que se alcanza un equilibrio entre el inhibidor, la enzima libre y el complejo EI. Esto se puede observar mediante el seguimiento del curso temporal de la reacción (formación de producto vs tiempo): en ausencia de inhibidor, se observa un comportamiento lineal, pero en presencia de inhibidor, la velocidad de formación de producto disminuye progresivamente con el tiempo, con una constante exponencial k_{obs} , hasta alcanzar una fase lineal cuando se establece el equilibrio ³⁹.

En la Figura 1.12, se presentan distintos mecanismos posibles para un fenómeno de inhibición lenta. El esquema a) muestra la reacción de la enzima no inhibida. El esquema b) muestra un equilibrio reversible simple entre la enzima y el inhibidor, gobernado por las tasas de

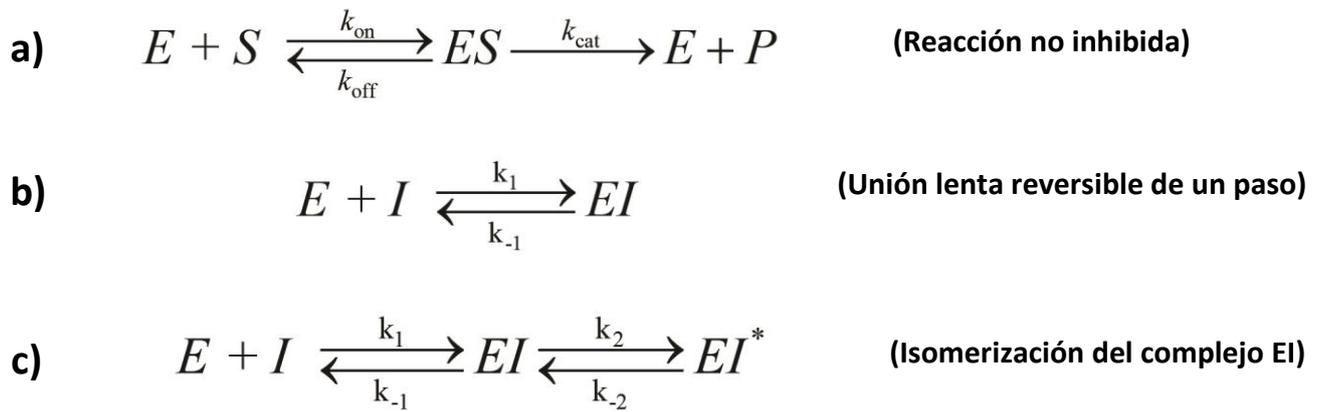


Figura 1.12 Mecanismos posibles de inhibición de enzimas por inhibidores de unión lenta

a) Reacción enzimática en ausencia de inhibidor. **b)** Mecanismo de unión del inhibidor a la enzima en un único paso con una tasa de asociación (k_1) y de disociación (k_{-1}); ambas constantes son bajas en el caso de una inhibición lenta. **c)** Mecanismo de unión del inhibidor a la enzima en dos pasos: en el primero, se alcanza rápidamente el equilibrio entre la enzima y el inhibidor dando lugar al complejo EI; en el segundo paso, ocurre una isomerización del complejo y se genera EI*, dando lugar a una unión de alta afinidad.

asociación y disociación dadas por las constantes k_1 y k_{-1} respectivas. Este es el comportamiento esperado para cualquier inhibidor reversible competitivo, exceptuando que, en el caso de una inhibición lenta, los valores de k_1 y k_{-1} son mucho menores³⁹. En el esquema c), se ilustra un segundo mecanismo de unión lenta. Aquí el inhibidor se encuentra con la enzima en una conformación inicial que lleva a la formación de un complejo binario de baja afinidad. Generalmente se asume que este complejo inicial se forma en condiciones de equilibrio rápido y, por lo tanto, la afinidad del complejo inicial EI está definida por la relación de las constantes k_1 y k_{-1} (k_{-1}/k_1), que es igual al K_i de formación del complejo. Luego, se genera el complejo EI*, a través de un paso de isomerización (k_2), mucho más lento que el primer paso de asociación reversible que lleva a la formación del complejo de encuentro EI. Esta isomerización da como resultado una unión de mucho más afinidad entre el inhibidor y la nueva conformación de la enzima. El paso para revertir la isomerización, es decir para pasar de EI* a EI, está gobernado por la constante de pseudo primer orden k_{-2} y la formación del complejo final EI* por la constante de formación k_2 ³⁹.

Como se describe en Materiales y Métodos, se puede discernir qué mecanismo de inhibición presenta un inhibidor lento, a partir de la gráfica de las constantes aparentes de velocidad k_{obs} vs concentración de inhibidor. Ésta muestra un comportamiento lineal si se trata de un inhibidor como el del mecanismo b), y un comportamiento hiperbólico si el inhibidor sigue el mecanismo c). En Materiales y Métodos, se explica cómo analizar estos datos para poder determinar el valor de K_i^* y las constantes involucradas³⁹.

1.5. Inhibidores del tipo Kunitz

El inhibidor pancreático de tripsina bovina (BPTI, del inglés “bovine pancreatic trypsin inhibitor”), aislado y cristalizado por Kunitz y Northrop, fue el primer inhibidor descrito de la familia Kunitz (familia I2, según la clasificación de Rawlings y colaboradores), integrada por inhibidores de peptidasas de serina de la familia S1²⁸.

Los genes que codifican para inhibidores del tipo Kunitz son muy antiguos y están ampliamente distribuidos entre los animales. Estarían presentes desde la radiación de los metazoarios; y en muchos organismos existen varias copias parálogas²⁸.

Los inhibidores tipo Kunitz poseen una forma compacta en la que se distingue un núcleo hidrofóbico mantenido principalmente por enlaces disulfuro entrecruzados con la topología 1:6, 2:4 y 3:5 característica de la familia. La posición de las Cys en la secuencia aminoacídica del inhibidor también es característica de la familia: están ubicadas en 5, 14, 30, 38, 51 y 55 considerando la numeración del BPTI (Figura 1.11).

El BPTI presenta una estructura de hebras β antiparalelas, con un segmento helicoidal corto hacia el extremo N-terminal, y una región más larga y más regular de α -hélice en el extremo C-terminal (Figura 1.11). Las estructuras cristalizadas hasta ahora de otros inhibidores tipo Kunitz (por ejemplo, las dendrotoxinas α y K, el dominio 2 del inhibidor de la vía del factor tisular de la coagulación (TFPI, del inglés “tissue factor pathway inhibitor”), el inhibidor de tripsina de la anémona de mar), indican que la estructura básica del BPTI puede ser generalizada para todos los integrantes de la familia. Cuando se superponen las estructuras en 3D, los dominios correspondientes son semejantes, aunque no idénticos. La variación más importante se ve en

la conformación del segmento 39–41 (considerando la numeración del BPTI) que corresponde al final de la hoja β . Otras áreas donde existen diferencias estructurales están ubicadas en la región C-terminal y en la porción 24–29 (considerando la numeración del BPTI), que corresponde al segundo bucle que presenta la estructura, además del bucle de interacción con la enzima ⁴⁰ (Figura 1.11.a).

1.5.1. Algunos inhibidores Kunitz presentan mecanismos de inhibición alternativos

La gran plasticidad de los inhibidores del tipo Kunitz permite que algunos tengan mecanismos alternativos de inhibición de peptidasas. En general, se encuentran en las secreciones de organismos que interaccionan con otros organismos. Esto se debería a la gran presión selectiva a la que están expuestas estas proteínas, que las llevaría a adoptar variantes alternativas. A continuación se describe brevemente un par de ejemplos.

El TFP1 (péptido anticuagulante de la garrapata) es un inhibidor del tipo Kunitz (lento y de alta afinidad) del Factor Xa (FXa, peptidasa vinculada a los procesos de coagulación). Inhibe sin necesidad de cofactores, a diferencia de otros tipos de inhibidores del FXa. Sin embargo, el TFP1 presenta una rareza en la inhibición, que no es común en los inhibidores del tipo Kunitz. Es capaz de interaccionar, además del sitio activo, con al menos tres regiones alejadas (exositos) del sitio activo de la enzima ⁴¹.

Otro inhibidor Kunitz atípico es la triptogalinina (también de garrapata) que presenta un motivo inusual de cisteínas. Este péptido inhibe varias peptidasas de serina con alta afinidad; se lo llamó triptogalinina debido a su alta afinidad por β -triptasa. Está filogenéticamente relacionado a un inhibidor Kunitz de *Rhipicephalus appendiculatus*, que también presenta alta afinidad por β -triptasa. Usando modelado basado en homología, los autores observaron que el N-terminal de la triptogalinina es independiente del resto de la proteína y posee un desorden intrínseco que permitiría un incremento de su flexibilidad, lo cual explicaría su gran afinidad por varias peptidasas de serina ⁴².

1.5.2. Evolución de inhibidores que interaccionan con otros organismos

Los inhibidores de peptidasas son una de las herramientas que muchos organismos invasores, ya sean parásitos o depredadores, utilizan para eludir las defensas del organismo que invaden. Por tanto, en la lucha evolutiva entre el organismo invadido y el invasor, estos inhibidores de peptidasas presentan una alta tasa de duplicación génica, formando familias con una gran diversidad funcional dirigida a una gran variedad de blancos, de manera de perturbar procesos fisiológicos mediante la unión a receptores, bloqueo de canales iónicos y la inhibición de enzimas.

1.5.2.1. Evolución de familias de inhibidores de venenos de animales

Los venenos de animales han sido extensamente estudiados. Se ha visto que, a lo largo de la evolución, su composición fue sometida a un ajuste continuo para cumplir una función eficiente, ya sea matando o paralizando presas o repeliendo agresores. Los diferentes componentes de los venenos trabajan sinérgicamente, de manera que la mezcla provee una acción eficiente. La composición de los venenos es altamente específica para cada especie y depende de muchos factores, incluyendo sexo, nutrición, hábitat, clima, etc ⁴³.

Varios de los componentes de los venenos son proteínas pequeñas que se caracterizan por presentar un motivo común de cisteínas en su estructura primaria. Varios cientos de estas moléculas con una estructura similar, estabilizada por residuos de cisteína, pueden estar presentes en el mismo veneno. La especificidad de acción de cada molécula está definida por una combinación única de residuos de aminoácidos que varían en regiones que forman bucles entre los disulfuros. Estas familias de proteínas aparecen en venenos de anémonas, víboras, arañas, escorpiones y caracoles ⁴³.

Se ha propuesto que durante la optimización evolutiva de venenos de diferente composición química intervienen al menos cuatro fenómenos: 1) Diversidad funcional basada en la producción de moléculas que afectan diferentes blancos. 2) Selectividad y eficiencia, es decir, selección de toxinas como armas de alta precisión, con un efecto muy específico y poderoso. 3) Sinergismo entre componentes de estructuras diferentes con mecanismos de acción que se potencian unos con otros cuando se combinan. En este caso, la concentración activa de los componentes actuando por separado decrece significativamente. 4) "Diversidad molecular", es decir, producción de un gran número de componentes con estructura y función similar, pero que difieren en especificidad y mecanismo de acción ⁴³.

En los venenos de animales existen varias familias de proteínas ricas en cisteínas, que presentan una gran diversidad funcional. La mayoría tienen la función de inhibir diferentes peptidasas, pero se ha observado que poseen funciones alternativas, como el bloqueo de canales catiónicos. Un ejemplo de este tipo de diversidad es el de la familia de inhibidores del tipo Kunitz, presente en los venenos de especies muy distantes evolutivamente, indicando una convergencia evolutiva en este sentido. A continuación describimos algunos ejemplos, destacando la presencia de bloqueadores de canales catiónicos.

El ejemplo más estudiado corresponde a los venenos de diferentes víboras, en los que se ha observado la presencia de muchos inhibidores tipo Kunitz, algunos con actividad inhibidora de peptidasas y otros, como las dendrotoxinas, que presentan baja o nula actividad inhibidora de peptidasas, y tienen la función alternativa de bloquear canales. La más estudiada es la α -dendrotoxina de mamba verde (*Dendroaspis angusticeps*) que bloquea ciertos subtipos de canales de potasio dependientes de voltaje ^{44 45}. Otro ejemplo del mismo veneno es la calcicludina que es un bloqueador de canales de calcio ^{46 47}. En el caracol marino *Conus striatus*, se describió la conkunitzina-S1, un inhibidor del tipo Kunitz con solo dos puentes disulfuro, que bloquea canales de potasio ⁴⁸. En otras especies de *Conus* (*Conus californicus* y *Conus bullatus*), se encontraron varios inhibidores del tipo Kunitz que presentan las seis cisteínas características del dominio, pero sus funciones no han sido estudiadas aún ⁴⁹. En arañas, se describieron superfamilias de inhibidores Kunitz de al menos 45 miembros, entre ellos HWTX-XI de *Ornithoctonus huwena* que se comporta como un excelente inhibidor de tripsina y además bloquea canales de potasio ⁵⁰. En avispa y abejas, también se han encontrado inhibidores del tipo Kunitz; en la avispa *Anoplius samariensis*, se describió uno que posee alta similitud de secuencia con las dendrotoxinas, pero aún no se ha caracterizado su actividad ⁵¹. Finalmente, de la secreción de la piel del sapo *Hyla annectans*, se aisló la anntoxina, un inhibidor Kunitz que presenta solo dos puentes disulfuro, y se observó que bloquea canales de sodio dependientes de voltaje ^{52, 53}.

1.5.2.2. Familias de inhibidores Kunitz en secreciones de parásitos

Se ha observado que también los parásitos utilizan integrantes de la familia de inhibidores del tipo Kunitz con el objetivo de controlar a sus hospederos. Es el caso de la mosca hematófaga *Simulium vittatum* y de varias garrapatas (ver más adelante; ⁵⁴), así como de varios gusanos. Por ejemplo, a la proteína 21k purificada de larvas del nematodo *Anisakis simplex* no se le detectó actividad inhibidora de peptidasas, pero se observó que es un potente alérgeno. Otro ejemplo es el de AceKI-1 del nematodo *Ancylostoma ceylanicum*, conocido como el gusano de ganchos. AceKI-1 es muy buen inhibidor de quimotripsina y elastasa pancreática ^{55 56}. También en platelmintos se describieron inhibidores del tipo Kunitz: Fh-Ktm en *Fasciola hepática*, que inhibe quimotripsina ⁵⁷; y varios en *Echinococcus* spp. y otros cestodos ⁵⁸. EgKU-1 y EgKU-8 de *Echinococcus granulosus* fueron caracterizados funcionalmente observándose que EgKU-8 es un excelente inhibidor de tripsina, en tanto EgKU-1 no presenta actividad inhibidora de peptidasas y presenta características estructurales comunes con los inhibidores Kunitz bloqueadores de canales (ver más adelante, ⁵⁸). Hasta el momento, no se ha observado en endoparásitos la presencia de actividad bloqueadora de canales catiónicos. En exoparásitos, como las garrapatas, se ha visto que existen familias de inhibidores del tipo Kunitz que muestran una gran diversidad de secuencia ⁵⁴. En un estudio filogenético y de expresión, los inhibidores Kunitz de *Ixodes scapularis* fueron agrupados en tres grupos (I, II y III) en base al arreglo de cisteínas. Los autores observaron que el grupo I, formado por inhibidores de peptidasas, representa el ancestro común de todas las familias de inhibidores Kunitz de garrapatas. En cambio, las proteínas de los grupos II y III, cuya expresión aumenta durante la ingesta de sangre, solo están presentes (y expandidas) en el género *Ixodes*. Al analizar los residuos responsables de la actividad, encontraron que varias de estas proteínas habrían perdido la función de inhibir peptidasas de serina y, en su lugar, bloquearían y/o modularían canales iónicos. Postularon que la aparición y expansión de los grupos II y III en *Ixodes* posiblemente se relaciona con el hecho que estas garrapatas se alimentan durante varios días sobre los hospederos vertebrados ⁵⁹.

1.5.3. Características estructurales de los inhibidores Kunitz que bloquean canales

Los elementos responsables del bloqueo de canales no están tan claramente definidos como los involucrados en la actividad inhibidora de peptidasas. Sí se sabe que el bucle antipeptidasa no participa en el bloqueo de canales ⁶⁰. Como se ha mencionado, los inhibidores con actividad bloqueadora de canales más estudiados son las dendrotoxinas, que bloquean canales de potasio dependientes de voltaje, y en particular la α -dendrotoxina (α -DTX). Estudios de cristalografía y NMR muestran que, a pesar de que posee solo un 35% de similitud con el BPTI en su secuencia primaria, la α -DTX tiene una conformación estructural similar, presentando diferencias en los bucles entre las cisteínas y en la orientación del extremo N-terminal ⁶¹.

Al comparar las secuencias de las dendrotoxinas y de los inhibidores Kunitz que inhiben peptidasas, se propuso que algunos de los residuos de Lys en las dendrotoxinas estarían involucrados en el bloqueo de canales de potasio (Figura 1.13). Se realizaron estudios de mutagénesis para identificar los residuos importantes para la interacción de las dendrotoxinas con los canales de potasio. Mutaciones en el triplete de Lys que están en la región β -turn de la α -DTX en las posiciones 28-30 (equivalentes a 26-28 en el BPTI), por Ala-Ala-Gly, llevaron a una disminución de su actividad en solamente cuatro veces, indicando estas lisinas no serían los

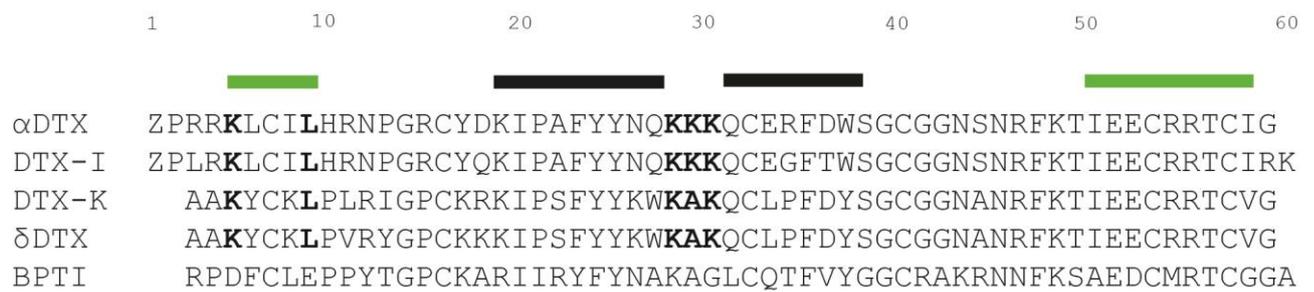


Figura 1.13 Alineamiento de dendrotoxinas

Con la barra verde se indica la región que forma hélices α y con la barra negra la región que forma hebras β . Resaltado con negritas se muestra los principales residuos involucrados con la actividad bloqueadora de canales.

residuos esenciales para la actividad. Resultados similares se observaron en la DTX-I que también posee el triplete de lisinas: la acetilación de los residuos 28 y 30 no afectó su actividad, y la de la Lys29 llevó a un descenso de la actividad de diez veces ⁶¹.

Por otro lado, la acetilación de la Lys5 de la α -DTX produce una marcada pérdida de la actividad bloqueadora, sugiriendo que este residuo está vinculado en la unión al canal. Si se sustituye también la Leu9, se produce una pérdida mayor de la afinidad por los canales de potasio. Con la DTX-K y la δ -DTX se obtuvieron resultados similares. En proteínas de otras familias que bloquean Kv también se describió la participación en el bloqueo de un residuo de Lys y un residuo hidrofóbico (Leu, Tyr o Phe) próximos; por tanto, esta sería una característica común de este tipo inhibidores ⁴⁴.

Además de la participación de ciertos residuos, se ha observado la importancia de la carga superficial positiva de la molécula en el bloqueo de canales. En un estudio realizado con DTX-I y DTX-K, se vió que al bloquear con iodoacetamida la formación del enlace disulfuro entre las Cys16 y Cys40 (equivalente al enlace Cys-14-Cys38 en el BPTI), la conformación total de la molécula es muy similar a la de la proteína nativa y la afinidad por el canal se reduce de 5 a 10 veces. Pero la afinidad baja alrededor de 100 veces cuando se impide la formación del disulfuro con ácido iodoacético que introduce cargas negativas alrededor de los residuos 16 y 40 ⁶¹.

El mecanismo por el cual ocurre el bloqueo de los canales no está claro. Se asumía que la cadena lateral del residuo de Lys5 en la α -DTX tapaba el poro, pero se observó que la δ -DTX se une cerca de la entrada del poro pero no actúa como un tapón ⁴⁴. Tampoco está clara la razón de la preferencia por los canales que presentan las diferentes DTX. Se ha propuesto que los residuos próximos al N-terminal son importantes para la α -DTX, la δ -DTX y la DTX-K, y que diferentes residuos adicionales en cada molécula participan en la unión de cada toxina a sus respectivos blancos ⁴⁴.

1.6. Canales iónicos

En las décadas del 50 y 60, Hodgking y Huxley propusieron la existencia de poros para explicar los componentes separados de Na⁺ y K⁺ y las corrientes de fuga que observaron en experimentos sencillos sobre el axón gigante de calamar. Al hacerlo demostraron que la membrana celular puede distinguir y controlar la permeación de Na⁺ y K⁺. Estos poros son los canales iónicos, proteínas de membrana que median el flujo de iones en la bicapa lipídica, a través de un agujero lleno de agua en la membrana. El flujo a través de los canales iónicos es pasivo, no requiriendo los iones energía metabólica para atravesar el canal. La dirección y el eventual equilibrio de este flujo no están determinados por el canal en sí mismo, sino por las fuerzas difusionales y electrostáticas que se generan entre los dos lados de la membrana ⁶². Como durante la evolución los canales han estado involucrados en el control del flujo de iones en las células, han asumido roles fundamentales en la fisiología de los organismos, desde bacterias a mamíferos. En procariotas, los canales selectivos para ciertos iones son cruciales para la supervivencia y crecimiento de las células. En organismos pluricelulares, los canales se han convertido en una forma primordial de señalización intercelular, particularmente entre las neuronas ^{63, 64}. Los canales iónicos son selectivos para los iones que dejan pasar y son capaces de generar señales eléctricas a través de la membrana; puede pensárselos como catalizadores

para el pasaje de iones a través de ésta, y se ha propuesto que presentan la misma relación con las señales eléctricas que las enzimas con el metabolismo ⁶³.

A través de cada canal pasan una gran cantidad de iones por unidad de tiempo, de manera que la apertura de canales puede generar un cambio rápido en el potencial de la membrana, que puede ser utilizado por la célula como una señal. La apertura del canal puede ser muy rápida. Además, los canales presentan un gran control sobre la permanencia de su estado abierto, ya que un poro abierto innecesariamente puede ser energéticamente muy costoso para la célula. Todos los canales que se han estudiado tienen estados conformacionales diferentes que son relativamente estables, cada uno de los cuales representa un estado funcional. Por ejemplo, cada canal iónico tiene un estado abierto y un estado cerrado. La transición del estado cerrado al abierto se llama “disparo”. Algunos canales están regulados por la unión de ligandos, como neurotransmisores, hormonas, e incluso iones que se unen en el entorno extracelular del canal; o mensajeros secundarios dentro de la célula que son activados por transmisores y actúan del lado citoplasmático del canal. Otros canales iónicos se regulan por cambios en el potencial de membrana o por cambios mecánicos en una región de la membrana plasmática. Un tercer estado conformacional es el inactivado, en el que el canal no está activo, y no puede pasar al estado abierto. Por tanto, se cree que en respuesta a agentes reguladores, el canal puede ciclar conformacionalmente entre tres conformaciones: canal cerrado pero activable (en reposo), abierto (activado) y no activable (inactivado) ^{62, 63}.

En las siguientes secciones vamos a profundizar en la estructura y funcionamiento de los canales de K^+ activados por voltaje (Kv) y los canales de Na^+ activados por cambios de pH (ASICs, del inglés “acid sensing ion channels”), ya que son los más relevantes para esta tesis.

1.6.1. Canales de potasio

Los canales de K^+ están muy expresados en las células excitables y cumplen funciones en el control de su excitabilidad. También están presentes en células no excitables. Se los ha descrito en epitelios, donde son importantes para el transporte. Por ejemplo, en riñón y colon el transporte de sales y agua depende de varios tipos de canales de K^+ . Entre éstos, se han descrito canales del tipo Kv, particularmente Kv1.3 que son los más abundantes en estos epitelios, y otros como Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.6 ⁶⁵. Sin embargo, el papel de los canales de potasio activados por voltaje en epitelios es todavía oscuro. Dado que el potencial de membrana de estas células es el normal fisiológico, -60 mV, y los canales como Kv1.3 nos son activados hasta un potencial de -45 mV, no se explica muy bien su rol en los epitelios ⁶⁵. También se han observado diferentes tipos de canales de potasio en el músculo del intestino y se les ha asignado un rol en la regulación de la actividad eléctrica en el músculo ⁶⁶.

Por otro lado, se han caracterizado canales iónicos en células del sistema inmune y se ha visto que el flujo de iones a través de sus membranas es esencial en varias de sus funciones. Estos canales iónicos, que dependen tanto del voltaje como de segundos mensajeros, son cruciales para la activación, proliferación y migración de las células. Las células inmunes expresan casi exclusivamente canales de K^+ del tipo Kv1.3 y KCa3.1 y su bloqueo está asociado con la inhibición selectiva de la activación y proliferación de las células. En linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas de ratón, se ha visto que los canales de K^+ dependientes de voltaje controlan la restauración del potencial de membrana; junto con los canales KCa3.1,

modulan las señales de Ca^{2+} requeridas para la expresión de numerosos genes importantes para la función de estas células. De manera que los cambios dinámicos en la expresión de canales iónicos en respuesta a estímulos extracelulares son esenciales para la activación y diferenciación terminal de las células inmunes, y pueden modular respuestas inmunes específicas ⁶⁷.

1.6.1.1. Arquitectura de los canales de potasio

El prototipo de canal de K^+ consta de cuatro subunidades ensambladas de manera de formar el camino por el cual penetra el ión a través de la membrana. Cada subunidad está conformada por dos hélices transmembrana y un bucle corto entre ellas (llamado bucle P). Esta arquitectura canónica de dos hélices transmembrana y un bucle (denominada 2TM/P) es la característica esencial universal de los canales de K^+ ; además, cada subfamilia está caracterizada por distintos anexos a la arquitectura 2TM/P. Por ejemplo, en canales de potasio dependientes de voltaje, están presentes cuatro hélices transmembrana (S1-S4) además de 2TM/P; a esta familia se la denomina 6TM/P. El dominio S4 es altamente cargado y es el responsable del sensado de voltaje. Existen otras variantes, como por ejemplo los canales 4TM/P, que presentan dos motivos de 2TM/P, y 8TM/P (híbrido de 6TM/P + 2TM/P) (Figura 1.14; ⁶³).

El dominio 2TM/P formador del poro está flanqueado por los dominios de interacción de la proteína con el citoplasma: el dominio de tetramerización (T1) amino terminal y uno carboxilo terminal, localizados en el citosol. En los canales Kv, la secuencia primaria del dominio T1 está muy conservada y permite agrupar los en doce subfamilias (Kv1 a Kv12) ^{63, 68}. Si se coexpresan subunidades de una misma subfamilia, éstas pueden coensamblarse y formar un canal funcional heterotetramérico (incluso pueden ensamblarse subunidades de especies diferentes). Sin embargo, las subunidades de diferentes subfamilias no son capaces de ensamblarse ⁶⁹. El core del dominio T1 consta de aproximadamente 130 aminoácidos ubicados inmediatamente antes de la primera hélice transmembrana S1; su rol estructural es estabilizar al canal tetramérico. Los dominios T1 de todos los canales Kv comparten un andamiaje estructural común con una simetría cuaternaria rotacional. La interfaz de la subunidad es fuertemente polar. En la tetramerización de los dominios T1 de todos los Kv, excepto los Kv1, participan iones Zn^{2+} , uno por T1. A lo largo del eje del tetrámero de T1 existe una cavidad llena de agua. Sin embargo, esta cavidad no forma parte del camino de penetración de los iones, que se cree atraviesan el poro a través de 4 espacios idénticos entre las subunidades, localizados entre la porción C-terminal del tetrámero de T1 ubicada frente a la cara interna de la membrana y esta última (Figura 1.16 b; ⁶³).

1.6.1.2. Filtro de selectividad

La apertura de los canales de K^+ permite el flujo de los cationes a través de la membrana. Aunque el flujo es rápido, los canales son altamente selectivos. El sitio que determina la selectividad está ubicado en la parte más fina del camino de penetración del ión, conocido como filtro de selectividad. La estructura del filtro fue caracterizada por cristalografía en un canal procarionta KcsA (2TM/P, Figura 1.14) ⁷⁰. La secuencia en la región del poro de este canal es prácticamente idéntica a la de los canales eucariotas por lo que la estructura de KcsA constituye un modelo de todos los canales de K^+ . Los principales constituyentes del filtro son los oxígenos carbonílicos de la cadena principal de los residuos aminoácidos Thr75, Val76,

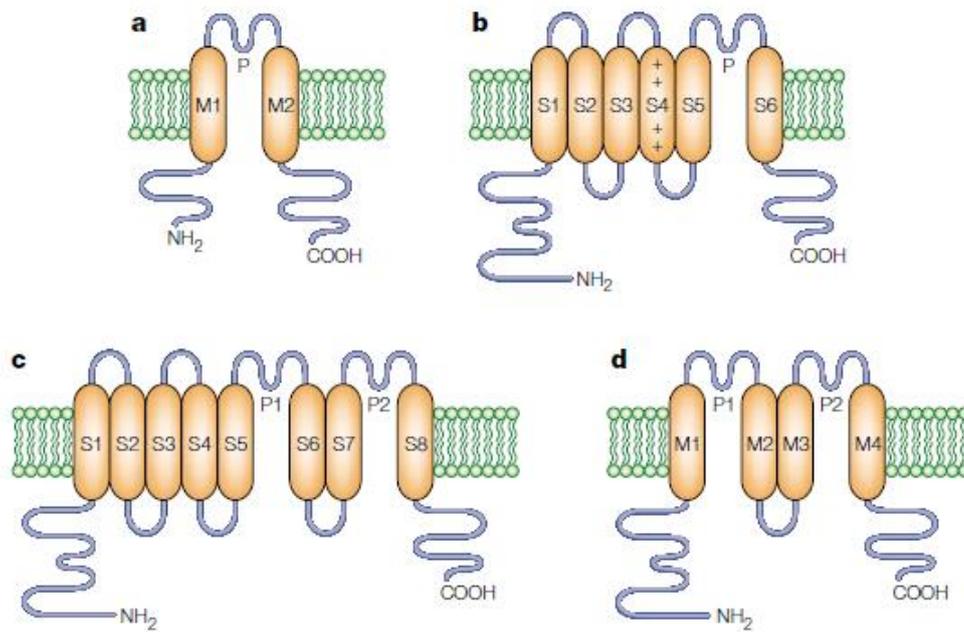


Figura 1.14. Las cuatro clases principales de canales de K⁺

a) Canales 2TM/P, constan de dos dominios transmembrana (TM) con un bucle P entre ellos. Son ejemplos los canales de K⁺ de rectificación interna y canales bacterianos como los KcsA. **b)** Canales 6TM/P, son predominantemente los canales de K⁺ dependientes de voltaje. **c)** Canales 8TM/2P, son híbridos de a) y b), descritos inicialmente en levaduras. **d)** Canales 4TM/2P, constan de dos repetidos de 2TM/P. En los canales que lo poseen, el dominio S4 funciona como sensor de voltaje. Tomado de Senyon Choe 2002

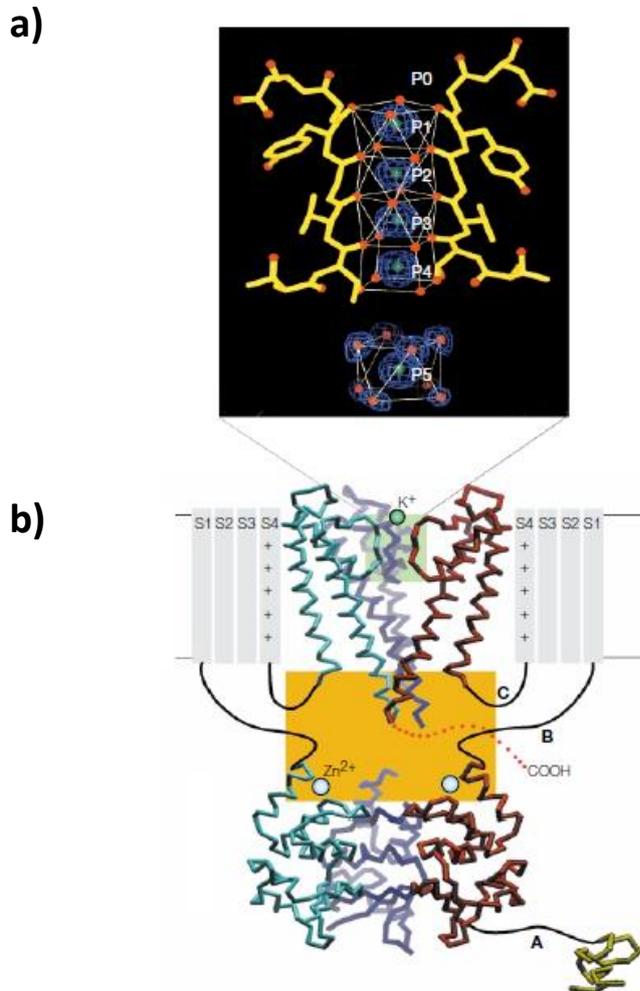


Figura 1.15 Estructura de canales de potasio dependientes de voltaje

a) Diagrama del filtro de selectividad del canal KcsA (KcsA es un canal de K^+ procariota activado por H^+ , el primer canal de K^+ cuya estructura fue resuelta por cristalografía). P1–P5 representan sitios de unión al K^+ ; el sitio P0 no se muestra. Cada sitio está formado por ocho átomos de oxígeno (en rojo) que rodean a cada ión de K^+ (en verde) que pasa a través del canal. Los oxígenos de los sitios P1–P4 son proteicos, aportados por el canal; los del sitio P5 son aportados por ocho moléculas de agua inmovilizadas.

b) Representación esquemática de la estructura de un canal de K^+ dependiente de voltaje. En la mitad superior, se observa el dominio transmembrana (TM), que incluye el core 2TM/P de la estructura de KcsA. La hélice TM S4 (el sensor de voltaje) es muy cargada ya que posee muchos residuos básicos. El dominio citoplasmático contiene la porción amino terminal de tetramerización (T1). Próximos al extremo carboxi-terminal de T1, se observan iones de Zn^{2+} (en azul) en las cuatro subunidades. La estructura de inactivación está representada en amarillo, conectada al tetrámero T1. A y C conectan las estructuras y dominios aislados, pero su posición relativa no se conoce. La caja transductora (naranja) corresponde a la región entre la cara interior de la membrana y la porción carboxi-terminal del tetrámero T1, que constituye el vestíbulo citoplasmático potencial. Otros componentes de la caja de transducción son A y C, y el extremo carboxi-terminal de S6 (rojo punteado). Todos ellos están probablemente involucrados en la transducción de cambios conformacionales que llevan al disparo del canal dependiente de voltaje, a su inactivación y a su interacción con proteínas intracelulares.

Tomado de Senyon Choe 2002.

Gly77, y Tyr78 y la cadena lateral de Thr75 de la secuencia consenso Thr-Val-Gly-Tyr-Gly, muy conservada, característica del bucle P. El ion K^+ pasa a través de cinco puntos de control a lo largo del filtro, cada uno de los cuales consiste en cuatro átomos de oxígeno que ocupan las esquinas de un cuadrado (Figura 1.15; ⁶³).

Además, existen seis sitios de unión al K^+ , cuatro internos (P1-P4) y dos externos (P0 y P5). Los cuatro sitios de unión internos se localizan a medio camino entre dos cuadrados de oxígenos, de tal manera que ocho átomos de oxígeno pueden coordinar un ion de K^+ en el centro de un cubo determinado por dos cuadrados (Figura 1.15; ⁶³).

No está del todo claro el porqué de la selectividad del canal por el K^+ . Para explicarla se han planteado varios modelos, la mayoría basados en consideraciones termodinámicas, que calculan cuánto más favorable es la unión del K^+ con respecto al Na^+ dentro del filtro de selectividad y no tienen en cuenta el camino que siguen los iones para llegar al sitio de unión. Algunos investigadores plantearon una explicación cinética según la cual la selectividad a favor del K^+ y contra el Na^+ en la cara intracelular de los canales de K^+ , se debe a que la velocidad de asociación del Na^+ con el filtro es mucho menor que la del K^+ . En la entrada del filtro existe una gran barrera energética contra la entrada de Na^+ y prácticamente no existe barrera para el K^+ . Estudios recientes de cristalografía y simulaciones de dinámica molecular contradicen estudios previos, y muestran que hay sitios de unión muy favorables para iones pequeños (Na^+ y Li^+) en el filtro de selectividad. Pero estos sitios presentan una ubicación diferente que el de K^+ : en lugar de ser jaulas entre ocho oxígenos carbonílicos, el Na^+ (y Li^+) se encuentran dentro del plano de cada cuadrado de cuatro carbonilos, lo que permite una excelente coordinación para iones pequeños. Esta hipótesis, basada en experimentos y modelos de dinámica molecular, plantea que uno de los determinantes para excluir al Na^+ del filtro es una gran barrera energética formada por iones de K^+ ocupando sus sitios de unión con los ocho carbonilos, que impiden que el Na^+ pueda unirse en el plano de los carbonilos. Es probable que esta no sea toda la explicación ya que existe evidencia de la falta de conductividad de Na^+ en ausencia de K^+ para canales del tipo KcsA; sin embargo, hay algunos canales de K^+ que conducen Na^+ en ausencia de K^+ ⁷¹.

1.6.1.3. *Disparo, activación e inactivación*

El flujo de K^+ en los canales Kv está determinado por los límites de difusión del catión, y es impulsado únicamente por el potencial electroquímico. Hay una coordinación uniforme de los iones K^+ diseñada para superar las barreras mínimas de energía en el poro de manera de asegurar un flujo rápido. Otras partes del canal pueden participar en la determinación de si el canal está abierto o cerrado, y podrían hacerlo mediante cambios conformacionales en el camino de penetración del ión. En los canales Kv, cambios en el potencial de membrana pueden hacer que el canal pase rápidamente del estado cerrado al abierto (disparo). Por otro lado, si este estímulo persiste, el canal puede pasar al estado de inactivación, no pudiendo luego volver al estado abierto. Varias estructuras en los dominios están involucradas en esta regulación (Figura 1.16b; ⁶³).

Se ha visto que existe una conexión entre selectividad e inactivación. A través de estudios en varios Kv, se vio que frecuentemente los cambios en la selectividad causados por mutaciones específicas parecen estar correlacionados con la inactivación lenta. Más aún, se vio que

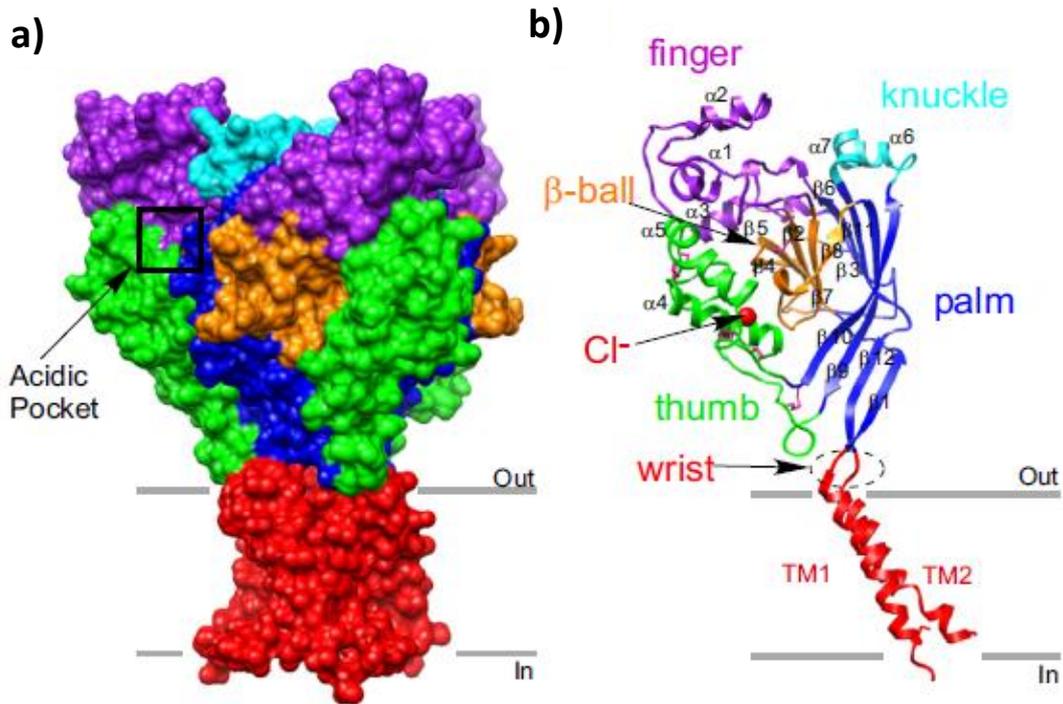


Figura 1.16. Esquema de la estructura cristalina del canal iónico sensible a ácido 1 (ASIC1)

a) Vista de la superficie del ASIC1 trimérico de pollo (cASIC1a). Los dominios están indicados con colores: dominios transmembrana 1 y 2 (TM1 y TM2, rojo); muñeca (rojo); palma (azul); nudillo (celeste); dedo (púrpura); pulgar (verde); y “pelota- β ” (naranja). Notar que los ASICs tienen forma de copa con un gran dominio extracelular. El bolsillo ácido, ubicado en la interfaz entre dos subunidades, se indica con el recuadro negro.

b) Representación de una subunidad de cASIC1 en formato de cinta. Los dominios específicos están indicados con colores. El dominio extracelular tiene 12 hebras β (1-12), 7 hélices α (1-7) y 7 enlaces disulfuro (en rosado; uno de los disulfuros no es visible). El dominio extracelular también contiene un sitio de unión para Cl^- (esfera roja) en el dominio pulgar.

Las imágenes se generaron a partir de la estructura cristalina del cASIC1 funcional (PDB ID: 3HGC). Tomado de Thomas W. Sherwood 2012

durante los procesos de inactivación ocurren cambios dinámicos en el filtro. De hecho, las perturbaciones en el poro que conducen a cambios en la selectividad, también modifican el proceso de inactivación lenta y viceversa. Esto sugiere que los dos fenómenos están acoplados y que se originan en la misma región del poro ⁷¹.

1.6.1.4. Toxinas bloqueadoras de canales Kv

Existen varias moléculas con actividad bloqueadora de canales Kv. Por un lado, como se comentó en la sección 1.5.2, una gran variedad de toxinas peptídicas provenientes de venenos animales, entre las que se destacan los integrantes de la familia Kunitz que son el centro de esta tesis. Por otro, numerosas moléculas orgánicas pequeñas que bloquean los canales en concentraciones en el orden de milimolar, provenientes de varias plantas y también de venenos animales. Las toxinas orgánicas son generalmente menos potentes y menos selectivas que las peptídicas ⁷².

1.6.2. Canales de sodio activados por cambios de pH (ASICs)

Las células utilizan moléculas específicas para medir y responder a cambios de pH, causados por diferentes agresiones patológicas y también como consecuencia de señales del propio organismo. En cordados existen canales de Na⁺ con sensibilidad a pH ácido, llamados ASICs (del inglés “acid-sensing ion channels”), que son las moléculas responsables de sensar el pH ácido. Los ASICs presentan homología en su secuencia de aminoácidos con los canales de la familia ENaC/DEG (ENaC: canal epitelial de Na⁺, del inglés “epithelial sodium channel”, también conocido como canal de sodio sensible a amilorida; DEG del inglés: “degenerin”; canal de Na⁺ mecanosensible). Los ASICs participan en varios procesos asociados con cambios de pH y se expresan en neuronas en todo el organismo. En el sistema nervioso central, ocurren fluctuaciones en el pH como resultado de un alto consumo energético debido a una elevada actividad neuronal, inflamación, hipercapnia e hipoxia. Se ha involucrado a los ASICs en la ansiedad, depresión, dolor, transducción sensorial, función de la retina, así como aprendizaje y memoria en el hipocampo, el cerebelo y la amígdala. También se han observado corrientes de ASICs en glía, células del músculo liso, osteoclastos y células del sistema inmune, indicando que los ASICs participan en la fisiología de células no neuronales ⁷³.

Existen cuatro genes de ASIC (ASIC1-4) en el genoma de mamíferos, que codifican para al menos seis subunidades de 500 a 560 aminoácidos, denominadas ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 y ASIC4. Las isoformas “a” y “b” de ASIC1 y ASIC2 difieren en el tercio N-terminal de la proteína y se originan por empalme alternativo. Todos los ASICs están conformados por tres subunidades, que se asocian para formar un canal activo, homomérico o heteromérico. La cinética de la corriente y de la activación depende de las subunidades que conforman el canal. Los ASICs son permeables a cationes monovalentes (Na⁺ > K⁺) y a protones. Algunos, sin embargo, como los canales homoméricos de la subunidad ASIC1a, los heteroméricos de ASIC1/2b y homoméricos humanos de ASIC1b, pueden ser permeables también a cationes divalentes como el Ca²⁺ ⁷³.

La activación de los ASICs ocurre en respuesta a incrementos rápidos en la concentración extracelular de protones (pH ácido). Luego de activarse, se inactivan rápidamente, de manera que se produce una corriente transitoria, aunque en algunos canales se puede observar cierto

nivel de corriente sostenida dependiente del ácido. Si se expone a los ASICs a un pH levemente ácido (no lo suficientemente bajo como para provocar su activación) o se baja lentamente el pH, se genera un estado estacionario de inactivación. En este estado, los ASICs no responden a un descenso adicional en el pH extracelular. Varios estudios sugieren que este estado previene la muerte neuronal mediada por acidosis.

La funcionalidad de algunas subunidades no es del todo conocida, y se ha visto que ASIC2b y ASIC4 no son sensibles al ácido. ASIC2b contribuye al sensado de protones mediante la formación de canales heteroméricos con otras subunidades. La función de ASIC4, sin embargo, es desconocida y las evidencias que existen indican que no estaría involucrada en el sensado de H⁺ ⁷³.

1.6.2.1. Arquitectura de los canales ASICs

Al igual que todos los canales de sodio DEG/ENaC, las subunidades de ASICs tienen características topológicas comunes con extremos carboxilo y amino terminales intracelulares, y dos dominios transmembrana separados por una gran región extracelular rica en cisteínas. La resolución de dos estructuras cristalográficas de ASIC1 de pollo, y la realización de estudios posteriores, contribuyó mucho a la comprensión de la estructura de los ASICs y algunos de los mecanismos involucrados en su funcionamiento. Aunque ambas estructuras son de canales cristalizados a bajo pH y, presumiblemente, corresponden a los canales inactivos, solo en una de ellas se utilizó una proteína que podía generar canales funcionales, activados por cambios de pH. Las estructuras son muy similares pero presentan diferencias significativas en el dominio transmembrana ⁷³.

Los ASICs tienen forma de copa, con un gran dominio extracelular que se proyecta marcadamente por encima de la membrana. Este dominio es grande y comprende más de dos tercios de la proteína. Se caracteriza por presentar motivos específicos y 14 enlaces disulfuro muy conservados. Las subunidades individuales se asocian en un triple eje dentro del canal trimérico. Dentro del dominio extracelular del canal trimérico, existen numerosos contactos intersubunidades y depresiones. La más notable de éstas es el bolsillo ácido, una región de contactos intrasubunidades que juegan un rol en la activación del canal dependiente del pH y en la unión de algunos moduladores. Existen cuatro vestíbulos principales para el solvente, dispuestos verticalmente dentro del core central de la proteína (superior, central, extracelular, intracelular). El dominio extracelular de cada subunidad se parece a una mano cerrada, y sus subregiones incluyen muñeca, palma, dedo, nudillo, pulgar y un dominio “pelota β” (pelota de hebras beta). Un ión de Cl⁻ está unido a cada subunidad dentro del dominio extracelular en la interfaz del pulgar, el dedo y la palma. La región transmembrana comprende seis hélices α, dos contribuidas por cada subunidad. Los extremos amino y carboxilo terminales intracelulares de los ASICs, que no están representados en la estructura, juegan un rol importante en el disparo del canal, la penetración del ión, contactos intracelulares proteína-proteína, y modulación por moléculas intracelulares ((Figura1.16; ⁷³).

1.6.2.2. La región del poro y el filtro de selectividad

El poro de los ASICs está formado por los dominios transmembrana 1 (TM1) y 2 (TM2). Las hélices α forman un ángulo de aproximadamente 50° respecto al plano de la membrana en el

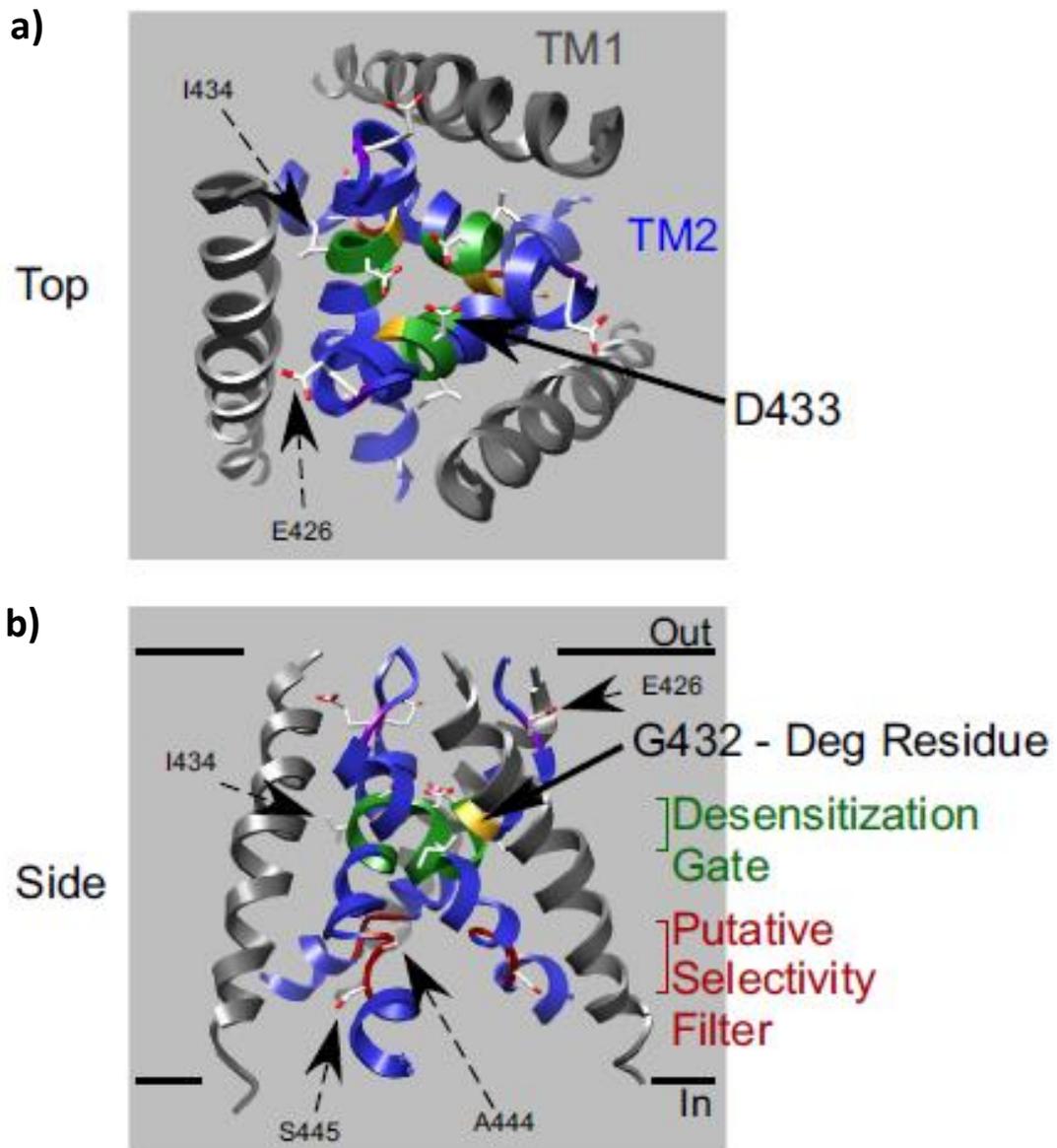


Figura 1.17. Estructura de la región del poro del ASIC1

Se muestra el poro del ASIC1 visto desde arriba **a)** y desde un costado **b)** (PDB ID: 3HGC). El dominio transmembrana 2 (TM2) está indicado en azul y el sitio (puerta) de desensibilización (D433-I434-G435-G436) en verde. Se cree que el residuo D433 es el responsable de la desensibilización; es el más extracelular y está localizado en la zona más estrecha del poro cuando el canal está desensibilizado. El residuo G432 de la degenerina (Deg) está indicado en amarillo; se sabe que mutaciones en este residuo alteran la activación por ácido del ASIC. El residuo E426, indicado en púrpura, es crítico para el bloqueo por Ca^{2+} . El presunto filtro de selectividad del ión está señalado en rojo (G443-A444-S445).

Tomado de Thomas W. Sherwood 2012

cristal. El TM2 limita el lumen del poro. El TM1 contacta con la bicapa lipídica y establece numerosas interacciones intrasubunidad con TM2, así como intersubunidad con TM1 y TM2 de la subunidad adyacente (Figura 1.17).

El dominio TM2 delinea predominantemente el poro y, en consecuencia, se asume que media la permeación del ion de Na^+ y forma el filtro de selectividad. La localización de la zona más estrecha del poro es diferente en el estado cerrado y en el estado abierto del canal. En el estado cerrado existe una constricción alrededor del D433. En el estado abierto, la constricción más pequeña está a medio camino del poro alrededor de G443-A444-S445. Estudios de mutagénesis de estos aminoácidos sugieren que son responsables del filtro de selectividad en los ASICs. El dominio TM2 es muy conservado entre las diferentes subunidades de ASICs.

1.6.2.3. La región extracelular y el sensado del protón

Los protones se unen al dominio extracelular y desencadenan tanto la activación del canal como el estado estacionario de desensibilización. En el cristal del ASIC desensibilizado se observa el “bolsillo ácido”, que contiene muchos residuos ácidos, localizado entre el dedo y el pulgar de una subunidad, y la palma de otra subunidad (Figura 1.16). Hay dos pares de cadenas laterales de residuos ácidos dentro del bolsillo ácido (Asp238-Asp350 y Glu239-Asp346) y un par dentro de la palma de una subunidad adyacente (Glu220-Asp408) que forman enlaces de hidrógeno carboxilatos-carboxilos. Debido a su elevado potencial electrostático negativo, estas cadenas laterales son candidatos excelentes para sensar protones. Además, los aminoácidos dentro del bolsillo ácido están posicionados perfectamente para soportar los cambios conformacionales que pueda sufrir el canal. Sin embargo, al eliminar los tres pares de residuos ácidos se genera un canal con una reducida afinidad aparente por el protón, pero que retiene la capacidad de abrirse en respuesta al ácido. Por tanto, es claro que otros residuos también juegan un rol en la apertura del canal inducida por pH ácido. Aminoácidos externos al bolsillo ácido también han sido implicados en el sensado de los protones ⁷³.

La actividad de los ASICs está regulada por el Ca^{2+} . De hecho, el gatillado de muchos ASICs se relaciona con la concentración extracelular de Ca^{2+} , de forma que a mayor concentración de Ca^{2+} hay menor probabilidad de apertura del canal. Además, la sensibilidad aparente por el protón de ASIC1 y ASIC3 se relaciona inversamente con la concentración extracelular de Ca^{2+} . Muchos estudios sugieren que el Ca^{2+} y los protones compiten por la unión al canal, y hay evidencias que sostienen un modelo donde el Ca^{2+} se une preferentemente al canal cerrado, mientras que el protón tiene preferencia por el canal abierto o desensibilizado. Trabajos con ASIC3 sugieren que un ión de Ca^{2+} bloquea el poro del canal y su remoción (inducida por la unión del protón al aminoácido de coordinación del Ca^{2+}) bastaría para abrir el canal, sin la necesidad de cambios conformacionales. Pero los protones potencian la apertura del canal en ausencia del Ca^{2+} , lo que indicaría que hay un mecanismo de disparo independiente del bloqueo por el Ca^{2+} . Estudios con ASIC1a revelan un comportamiento doble del Ca^{2+} : por un lado, el Ca^{2+} bloquea el poro del canal; y por otro lado, disminuye la sensibilidad del ASIC1a por el protón. Estos estudios sugieren que hay dos sitios de unión al Ca^{2+} en ASIC1a: uno que predominantemente determina el bloqueo del canal y otro que predominantemente media la regulación del Ca^{2+} en la inducción del gatillado por el protón ⁷³.

1.6.2.4. Inhibidores de canales ASICs

Muchos inhibidores afectan la actividad de los ASICs a través de la interacción con el dominio extracelular del canal. Por su naturaleza química, se distinguen tres clases: iones metálicos, moléculas pequeñas y toxinas ⁷³.

Al igual que Ca^{2+} , Mg^{2+} y otros iones metálicos, tanto divalentes como trivalentes, inhiben ASICs. Por ejemplo: los iones de zinc, cobre, plomo, níquel y cadmio inhiben ASICs1a. Por otro lado, hay moléculas pequeñas que presentan actividad bloqueadora de ASICs. Por ejemplo: el diurético amiloride bloquea el poro. El nafamostat, un compuesto sintético que inhibe peptidasas de serina de forma competitiva, también bloquea ASICs, al igual que drogas antiinflamatorias como diclofenac e ibuprofeno, y algunas diamidinas, que son activas contra protozoarios, como el diminaceno, la hidroxistilbamidina (HSB) y la pentamidina ⁷⁴.

Se han descrito muy pocas proteínas con actividad bloqueadora de ASICs. Si bien no presentan homología en sus secuencias, tienen en común que son pequeñas (entre 35 y 60 aminoácidos) y catiónicas, que están constituidas por dominios compactos, estabilizados por enlaces disulfuro, y que presentan anisotropía en su carga superficial. La psalmotoxina 1 (PcTx1) de la tarántula americana (*Psalmopoeus cambridgei*) y la APETx2 del veneno de una anémona (*Anthopleura elegantissima*) son las más estudiadas. La PcTx1 inhibe específicamente canales ASIC1a homoméricos, con un IC50 de aproximadamente 1 nM, y no presenta actividad sobre canales iónicos dependientes de voltaje. Por su parte, la APETx2 bloquea canales homoméricos de ASIC3 con un IC50 de 63 nM. Esta inhibición es rápida y completamente reversible en pocos minutos. También bloquea algunos canales heteroméricos (ASIC3 +ASIC1a, ASIC3 + ASIC1b) y canales de Na^+ activados por voltaje, pero con un IC50 mayor ^{75, 76, 77}.

Recientemente, se describieron otros péptidos bloqueadores de ASICs. Por un lado, se identificaron dos isopéptidos pertenecientes a la familia de toxinas “de tres dedos” (del inglés “three finger toxins”) en el veneno de la mamba negra (*Dendroaspis polylepis polylepis*). Se los denominó mambalgina 1 y mambalgina 2; poseen 57 aminoácidos y ocho residuos de cisteína. Son inhibidores potentes, rápidos y reversibles de homómeros de ASIC1a y heterómeros ASIC1a + ASIC2a y ASIC1a + ASIC2b, con IC50s similares (55, 246 y 62 nM, respectivamente). No afectan otros ASICs ni canales catiónicos dependientes de voltaje ⁷⁸. Por otro lado, se identificó un inhibidor de ASICs en el veneno de la anémona *Phymanthus crucifer* que se denominó PhcrTx1. La PhcrTx1 pertenece a la familia de inhibidores con “nudo de cistina” (ICK, del inglés “inhibitor cystine knot”); no bloquea canales de Na^+ dependientes de voltaje, pero sí K^+ , aunque esta actividad es mucho menor que la observada sobre los ASICs ⁷⁹.

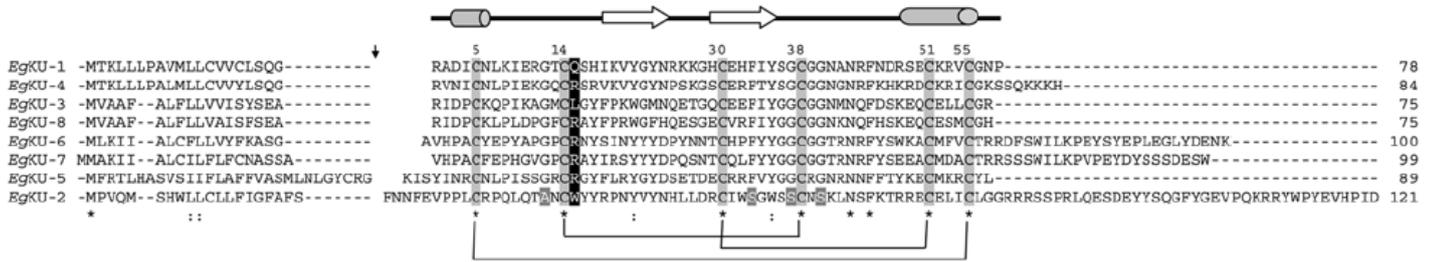
Finalmente, MiTx del veneno de una víbora coral (*Micrurus tener tener*), es un complejo heteromérico formado por MiTx- α (un inhibidor tipo Kunitz) y MiTx- β (una proteína tipo fosfolipasa A2), que actúa como un agonista potente, persistente y selectivo de ASICs. Este complejo es capaz de activar ASICs a pH 7.4. A ese pH, produce una corriente sostenida en canales de los subtipos 1a y 1b (EC50 9.4 ± 1.3 y 23 ± 3.6 nM, respectivamente). El efecto genera una pérdida de la desensibilización (mecanismo de inactivación del canal), y se revierte muy lentamente. Los ASIC1a bloqueados por PcTx1 no pueden ser activados por MiTx, y a la inversa si fueron activados por MiTx, no son inhibidos por PcTx1, lo que sugiere que estas moléculas actúan ocluyendo el canal, ya sea física o funcionalmente ⁸⁰.

1.7. Hipótesis del trabajo que guiaron el desarrollo de esta tesis

En los últimos años, nuestro grupo ha trabajado en la caracterización de una familia de proteínas tipo Kunitz de *E. granulosus*. Inicialmente, conocíamos 8 proteínas (que llamamos EgKU-1 a EgKU-8; Figura 1.18); sabíamos que la expresión de varias de ellas es especialmente alta en los gusanos larvarios y que algunas están presentes en sus secreciones, por lo que propusimos que podrían interferir con procesos fisiológicos del perro y contribuir al establecimiento de la infección⁵⁸. La caracterización del genoma del parásito^{81,82}, reveló luego la existencia de más integrantes en la familia. Como ya se comentó, desde el punto de vista funcional, las proteínas con un dominio Kunitz pueden presentar dos tipos de actividad. Habitualmente, son inhibidores competitivos de alta afinidad de peptidasas de serina, como por ejemplo el inhibidor de tripsina del páncreas bovino (BPTI). Alternativamente, pueden ser bloqueadores de canales catiónicos. Las dendrotoxinas (DTX), neurotoxinas de venenos de algunas víboras, son el ejemplo mejor estudiado.

Estudios realizados en el grupo con anterioridad a este trabajo habían permitido obtener evidencias de que, en la familia de *E. granulosus*, existirían inhibidores Kunitz con ambas funciones. En efecto, resultados obtenidos con EgKU-1 y EgKU-8 nativos (purificados a homogeneidad a partir de un extracto de protoescólex) habían mostrado que EgKU-8 inhibe tripsina con alta afinidad, en tanto EgKU-1 no inhibió ninguna de las peptidasas ensayadas. Por otro lado, estudios de modelado molecular revelaron una interesante similitud estructural entre EgKU-1 y la DTX- α , en particular, en la región del dominio Kunitz formada por el N-terminal y el “ β -turn” que se aproximan por el enlace disulfuro Cys5-Cys55 (Figura 1.12a), donde se ubican los residuos importantes en la interacción con el canal (Figura 1.19). En efecto, ambas moléculas comparten aminoácidos importantes para la actividad de la DTX- α : Leu7 y Lys27 en EgKU-1 son equivalentes con Leu9 y Lys29 en la DTX- α ⁸³. Leu7 y Lys27 están conservados en EgKU-4, el parálogo cercano de EgKU-1 (sus secuencias de aminoácidos poseen 71% de identidad), que es, por tanto, otro candidato a bloquear canales catiónicos⁵⁸.

a)



b)

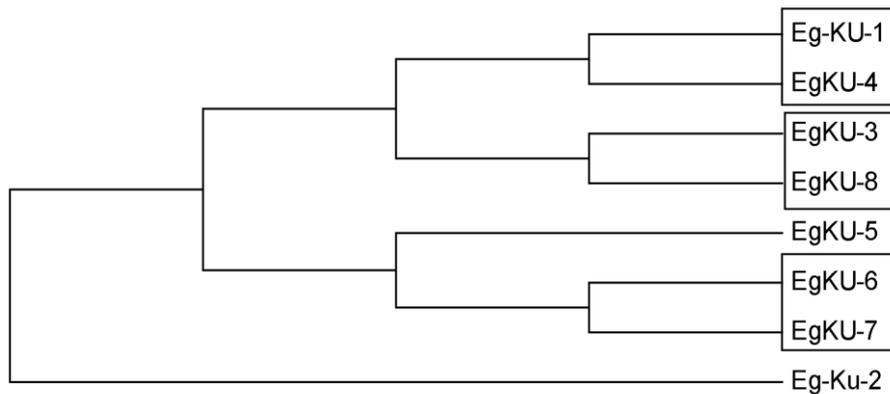
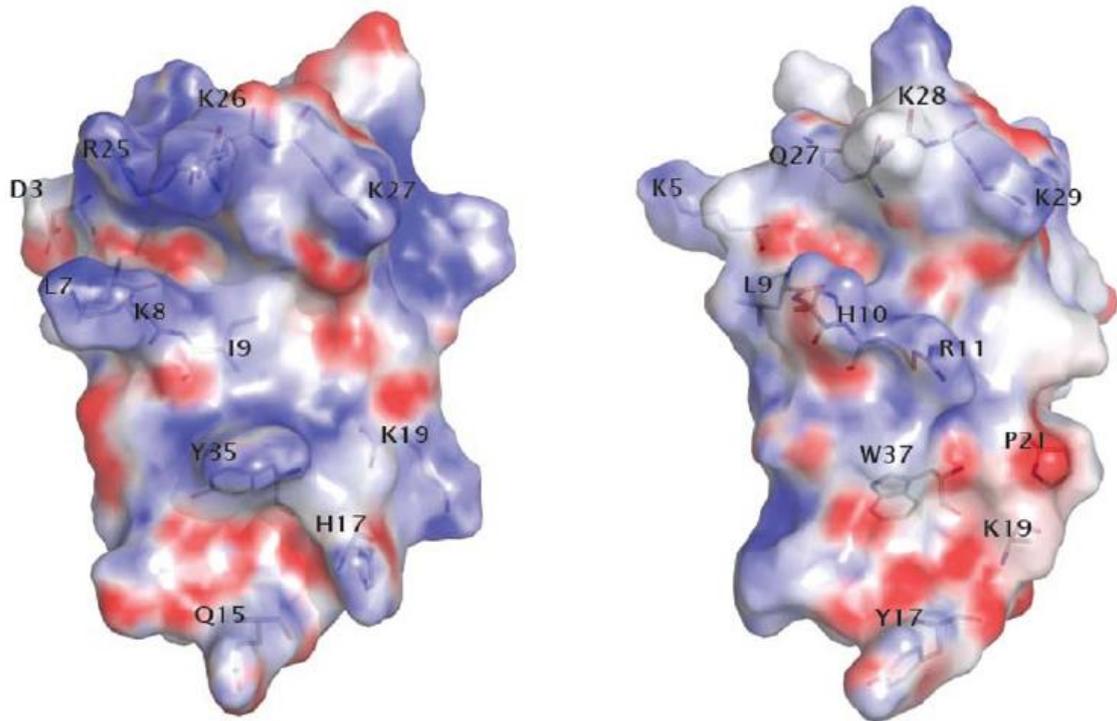


Figura 1.18 Alineamiento y análisis filogenético de EgKU-1 a EgKU-8

a) El alineamiento se realizó utilizando Clustal W2; se separó manualmente el péptido señal de la proteína madura (el sitio de escisión predicho está indicado con una flecha). Se resaltan en gris las Cys conservadas, conectadas de acuerdo a la topología canónica de los enlaces disulfuro del dominio Kunitz; la numeración corresponde a la del BPTI maduro (58 aminoácidos), al igual que los elementos de estructura secundaria indicados sobre el alineamiento, de manera de dar una visión global del plegamiento del dominio (los cilindros representan hélices α , y las flechas hebras β). Los residuos conservados están indicados con (*) y las sustituciones por residuos similares con (:). Con letras blancas sobre fondo negro, se señala el residuo de la posición 15 (que corresponde al sitio P1 de los inhibidores de peptidasas de serina); y con letras blancas sobre fondo gris, algunas sustituciones inusuales presentes en *EgKU-2* (tomado de González et al. 2009)⁵⁸

b) Árbol filogenético de las proteínas maduras predichas para *EgKU-1* – *EgKU-8* hecho por máxima parsimonia utilizando el programa MEGA 4 con parámetros por defecto; se recuadran los parálogos cercanos.

a)



b)

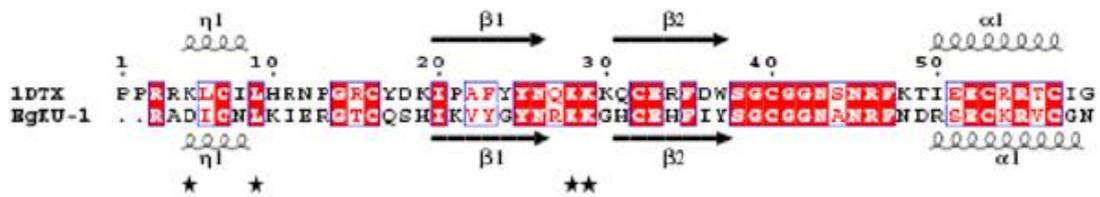


Figura 1.19 Comparación estructural entre *EgKU-1* y la dendrotoxina- α (α -DTX)

a) Representación de los potenciales electrostáticos superficiales de un modelo de *EgKU-1* (izquierda) y la estructura cristalina de la dendrotoxina- α . Se indican algunas posiciones equivalentes de ambas moléculas (ver alineamiento). Los colores van del azul (positivo, [+300 mV]) al rojo (negativo, [-300 mV]), pasando por el blanco (neutro). El modelo de *EgKU-1* fue construido utilizando las estructuras de 13 dominios Kunitz, incluyendo inhibidores de peptidasas y bloqueadores de canales.

b) Alineamiento ilustrando la similitud entre *EgKU-1* y la dendrotoxina- α (45% de identidad). Se indican en blanco sobre fondo rojo los residuos idénticos, y en rojo sobre fondo blanco los residuos similares. Se señalan con asteriscos, los aminoácidos que han sido asociados con la actividad de la α -DTX (K5, L9, K28, K29); notar los que se encuentran en posiciones equivalentes en *EgKU-1* (L7, K26, K27).

Tomada de González et al. 2009⁵⁸.

1.8. Objetivos

Con estos antecedentes, el objetivo central de este trabajo fue tratar de confirmar la existencia de diversidad funcional en las proteínas Kunitz de *E. granulosus*. Para ello, nos planteamos investigar la(s) función(es) de cinco integrantes de la familia: dos pares de parálogos cercanos, *EgKU-1/EgKU-4* y *EgKU-3/EgKU-8*, y *EgKU-7*.

En particular, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

- 1) Obtener las proteínas en un sistema de expresión heterólogo.
- 2) Caracterizar la actividad inhibidora de peptidasas de *EgKU-3*, *EgKU-7* y *EgKU-8*.
- 3) Analizar la capacidad bloqueadora de canales de *EgKU-1*.
- 4) Estudiar ambas actividades en *EgKU-4* ya que, por un lado, la secuencia de su bucle antipeptidasa indicaba que podía presentar actividad inhibidora de tripsina; y, por otro, poseería algunos residuos presuntamente involucrados en el bloqueo de canales.

2. Procedimientos experimentales generales y obtención de proteínas Kunitz

2.1. Reactivos generales

Las sales, las sustancias amortiguadoras y los productos que se detallan a continuación se obtuvieron de Sigma o de Merck: ditioneitol (DTT), 2-mercaptoetanol, iodoacetamida (IAM), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), monolaurato de polioxietilen-sobitan (Tween 20), t-octil fenoxipolietoxietanol (Tritón X-100), lauril sulfato de sodio (SDS), tricina, acrilamida, N,N'-metilen-bis-acrilamida, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (Temed), urea, glicina, azul de Coomassie R250, Coomassie G250, azul de bromofenol, glutaraldehído, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMFA), glicerol, seroalbúmina bovina (BSA), tris(hidroximetil) aminometano (Tris), 7-aminocumarin (AMC), Suc-AAPF-AMC, N-t-BOC-IEGR-AMC, Suc-AAA-AMC, elastasa porcina, colagenasa, taurocolato de sodio, azida de sodio, solución salina de Hanks, antibióticos: penicilina, ampicilina, kanamicina.

La tripsina (T1426) y la quimotripsina bovina (C-7762) se adquirieron en Sigma. La tripsina aniónica, la tripsina catiónica y la quimotripsina caninas estaban disponibles en el laboratorio. Habían sido obtenidas a partir de un páncreas canino en el contexto de mi tesis de grado, siguiendo el protocolo descrito por Waritani y cols.⁸⁴, que permite aislar las tres enzimas utilizando sucesivamente precipitación salina, gel filtración y cromatografía de afinidad.

Para procedimientos generales se utilizó metanol, etanol 96% (v/v), etanol absoluto, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético y éter de calidad ppa, obtenidos de droguerías de plaza.

En los procedimientos de biología molecular, se utilizaron reactivos de Gibco BRL (EUA), Promega (Madison, WI, EUA), Boehringer Mannheim (EUA) y New England Biolabs (Reino Unido).

2.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida

2.2.1. *SDS-PAGE convencional*

Se realizó siguiendo el protocolo convencional de Laemmli⁸⁵ utilizando un gel concentrador de acrilamida al 4% (p/v) y un gel separador de 10 o 12% de acrilamida, dependiendo de la muestra. Los geles, de 1.5 mm de espesor, se corrieron en el sistema Mini PROTEAN II (Bio-Rad, EUA) o en el sistema Mighty Small Vertical Units SE260 de Hoefer (Amersham Biosciences, Reino Unido). Las muestras para la corrida en el gel se prepararon agregándole a 30 µl de cada muestra 6 µl del buffer muestra 6x [Tris-HCl 0.375 M pH 6.8, glicerol 60% (v/v), SDS 12% (p/v), azul de bromofenol 0.006%]; a las muestras que fueron reducidas se les agregó DTT 1 M (concentración final 0.05 M). Todas las muestras fueron hervidas 5 min. La electroforesis se realizó a 35 mAmp, en un amortiguador Tris-glicina (Tris 0.3%, glicina 1.44%, SDS 0.1%).

2.2.2. *Tricina-SDS-PAGE*

Se realizó siguiendo el protocolo convencional de Schägger y cols⁸⁶, utilizando un gel concentrador de acrilamida al 4% (p/v), un gel espaciador de 10% y uno separador de 16.5% de acrilamida. Se utilizó un amortiguador anódico (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.9), y otro catódico [Tris-

HCl 0.1 M, Tricina 0.1 M pH 8.25, SDS 0.1% (p/v)]. Otros detalles experimentales fueron similares a los descritos para SDS-PAGE convencional.

El peso molecular de los componentes de las muestras se estimó por comparación con estándares (kit de bajo peso molecular de Pharmacia, LMW kit y kit de muy bajo peso molecular Pharmacia, MW Range 2.5-16.9) o con BPTI que tiene una masa de 6.5 kDa. Según la concentración de la muestra a analizar, se utilizó 5 μ l de marcador de peso molecular (para geles teñidos con Coomassie).

Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 por inmersión en una solución del colorante (0.1% en solución fijadora: 40% metanol, 10% ácido acético) durante 60 min y se destiñeron con 7.5% ácido acético y 5 % de metanol durante toda la noche.

2.3. Estimación de la concentración de proteínas

Para estimar la concentración de proteínas de las muestras, dependiendo de cada caso, se usó el reactivo BCA, reactivo de Bradford o absorbancia a 280 nm.

El ensayo del reactivo BCA (Pierce, IL, EUA) se basa en la reducción cuantitativa de Cu^{2+} a Cu^{1+} por las proteínas en medio alcalino, y la formación de un complejo coloreado de Cu^{1+} con ácido bicinchonínico (BCA, del inglés '*bicinchoninic acid*'), que se detecta a 560 nm. En cada ensayo, se realizó una curva de calibración con soluciones de concentración conocida de BSA. La concentración de las muestras problema se estimó interpolando los valores de las absorbancias correspondientes en la curva de calibración. Se realizaron todas las medidas por triplicado en una microplaca de poliestireno de 96 pocillos, utilizando 150 μ l de muestra (HCl 1mM en el caso de los blancos) y 150 μ l de la solución que contiene el reactivo BCA. La reacción se dejó transcurrir una hora a 37 $^{\circ}$ C, y luego se midió la Abs a 560 nm en un lector de microplacas (Multiskan MS, Labsystems, Suecia).

El método de Bradford se basa en la unión al colorante Coomasie Brilliant Blue G-250⁸⁷. El reactivo de Bradford se preparó en el laboratorio. En cada ensayo de cuantificación de proteínas se incluyó una curva de calibración preparada utilizando BSA. El ensayo se realizó en microplacas de poliestireno de 96 pocillos. En todos los casos, se usó 10 μ l de muestra y las medidas fueron realizadas por triplicado. La reacción se inició con el agregado de 200 μ l de reactivo de Bradford [Coomasie Brilliant Blue G-250 0.1 mg/ml, etanol 5%(v/v) y ácido fosfórico 8.5% (m/v)]. Luego de transcurrida la reacción durante 5 min a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de microplacas (Multiskan MS, Labsystems, Suecia).

Se determinó la concentración a partir de la absorbancia a 280 nM cuando la proteína que estudiábamos estaba en una alta pureza. Se midió 2 μ l por triplicado en el espectrofotómetro de gotas (NanoDrop 1000, Thermo Scientific), luego se determinó la concentración de proteína dividiendo el promedio de los triplicados por el ϵ teórico determinado a partir de la secuencia en el sitio ProtParam de expasy (<http://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

2.4. Producción y purificación de EgKUs

2.4.1. Preparación de los EgKU nativos

Los quistes hidáticos de origen bovino se obtuvieron a partir de órganos (generalmente pulmón y, ocasionalmente, hígado) de animales infectados, provistos generosamente por Urexport (Montevideo, Uruguay). El procesamiento de los quistes se realizó en forma aséptica. El contenido del quiste, líquido hidático y protoescolex, se extrajo con la ayuda de una pipeta pasteur luego de perforar el quiste. Los protoescolex se separaron del líquido hidático por decantación y se lavaron repetidas veces con amortiguador fosfato 10 mM, NaCl 0.15 mM, pH 7.4 (PBS).

El extracto de proteoscolex se preparó mediante homogeneizado con ultrasonido de una suspensión de parásitos en amortiguador 50 mM fosfato pH 7.0, en un instrumento Cole-Parmer 4710 (Vernon Hills, IL, EUA) a 4 °C. Luego se centrifugó a 10000 rpm, 20 min a 4 °C.

Se purificaron EgKU-1 y EgKU-8 siguiendo el protocolo puesto a punto por la Dra. Silvia González⁵⁸, que consiste en dos cromatografías sucesivas. El sobrenadante de protoescolex fue pasado a través de una columna de intercambio iónico Resource S (Pharmacia) de 1 ml, equilibrada en el mismo amortiguador. El procedimiento se realizó utilizando un equipo de FPLC (del inglés: *fast protein liquid chromatography*) (AKTA purifier). La elución se realizó aumentando la fuerza iónica de manera lineal, de 0 a 0.4 M de NaCl en el mismo amortiguador en 10 min a un flujo de 1ml/min. La elución se siguió midiendo absorbancia a 280 nm (A_{280}), por SDS-PAGE y actividad inhibidora de proteasas. Una de las fracciones eluida presentó actividad inhibidora de proteasas y un peso molecular entre 6 y 7 kDa aproximadamente. Esta fracción se aplicó a un Aquapor RP300 (100X21 mm, Perkin Elmer), columna de fase reversa para HPLC (rpHPLC). Las proteínas pegadas fueron eluidas con un gradiente lineal de acetonitrilo 0-40% en 60 minutos a un flujo de 0.4 ml/min en 0.07% de ácido trifluoroacético, la elución fue monitoreada a 220 nM. Se identificaron EgKU-1 y EgKU-8 y se verificó que estaban puras por análisis de espectrometría de masa. Por último, se liofilizaron las eluciones de ambas proteínas.

2.4.2. Preparación de EgKU recombinantes

EgKU-1, EgKU-3, EgKU-4, EgKU-7, EgKU-7 sin C-terminal (EgKU-7d) y EgKU-8 fueron expresados como proteínas recombinantes en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, usando el plásmido recombinante pET28a con el inserto de interés. Las construcciones para las proteínas recombinantes presentan fusionada a la secuencia correspondiente al EgKU una secuencia líder. Ésta codifica para una extensión N-terminal de 30 aminoácidos con un tándem de 6 histidinas que se utiliza luego para la purificación. En el laboratorio contábamos con construcciones para EgKU-1 (preparado por la Dra. Silvia González), EgKU-3 (preparado por la Mag. Mariana Margenat) y EgKU-7 (preparado por el Lic. Leonardo Pellizza). Se preparó el vector de expresión (pET28a(+)) con la secuencia del dominio Kunitz correspondiente a EgKU-4, EgKU-7d y EgKU-8, obtenidas de ADN copia (ADNc) de protoescolex tratados con pepsina. En la Figura 2.1 se muestra la secuencia de aminoácidos de cada una de las construcciones.

Primero se amplificó por PCR el ADNc utilizando la polimerasa *VENT*, que tiene capacidad de corregir errores. Para el diseño de los cebadores, se tuvo en cuenta, en el caso de EgKU-7 y

EgKU-1

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSRADICNLKIERGTCSHIKVYGYNRKKGHCHEFIYSGCGG
NANRFNDRSECKRVCGNP

PM 10143 Da, PI 9.58

EgKU-4

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSRVNICNLPKIEGQCRSRVKVYGYNPSKGS CERFTYSGCGG
NGNRFKHKRDCKRICGKSSQ KKKH

PM 10832 Da, PI 10.36

EgKU-3

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSRIDPCKQPIKAGMCLGYFPKWGMNQETGQCEEFYGGCGG
NMNQFDSKEQCELLCGR

PM 9949 Da, PI 7.69

EgKU-8

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSRIDPCKLPLDPGFCRAYFPRWGFHQESGECVRFYGGCGG
NKNQFHSKEQCESMCG H

PM 10063 Da, PI 8.64

EgKU-7

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFVHPACFEPHDVGPCCRAYIRSYYYDPQSNTCQLFYGGC
GGTRNRFYSEECMDACRRSSSWILKPVPEYDYSSDES

PM 12986 Da, PI 6.48

EgKU-7 cortado con trombina

GSHMASMTGGQQMGRGSEFVHPACFEPHDVGPCCRAYIRSYYYDPQSNTCQLFYGGCGGTRNRFYSEECMDAC
TRRSSSWILKPVPEYDYSSDES

PM 11110 Da, PI 5.47

EgKU-7 dominio

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFVHPACFEPHDVGPCCRAYIRSYYYDPQSNTCQLFYGGC
GGTRNRFYSEECMDACR

PM 10391 Da, PI 7.10

EgKU-7 dominio cortado con trombina

GSHMASMTGGQQMGRGSEFVHPACFEPHDVGPCCRAYIRSYYYDPQSNTCQLFYGGCGGTRNRFYSEECMDAC
TR

PM 8509 Da, PI 6.29

Figura 2.1 Secuencias de aminoácidos de los inhibidores Kunitz recombinantes utilizados. Se destaca en azul la extensión peptídica agregada por el plasmido pET 28a+ donde se marca en negro el tándem de histidinas y en naranja el sitio de corte para la trombina. Le sigue la secuencia correspondiente al inhibidor Kunitz donde en verde se marcan las cisteínas y en rojo el sitio P1.

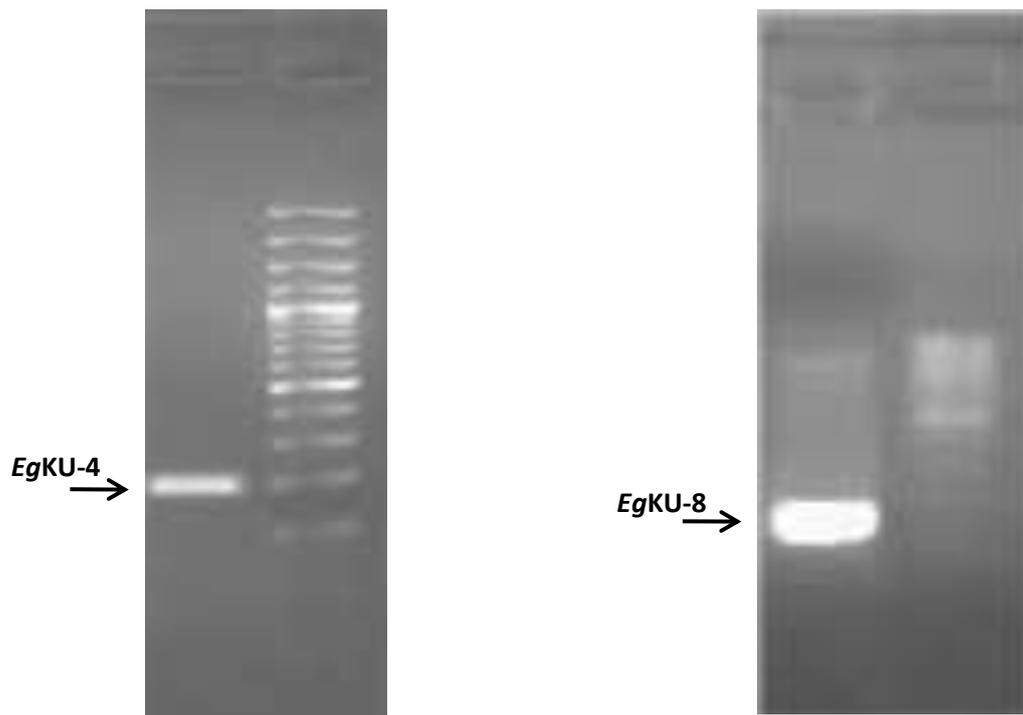


Figura 2.2 Amplificación de los dominios Kunitz de *EgKU-4* y *EgKU-8*. Electroforesis en geles de agarosa 1.5 %. Las flechas señalan los productos de PCR obtenidos con cebadores específicos para *EgKU-4* (a la izquierda) y *EgKU-8* (a la derecha) a partir de ADNc de protoescólex tratados con pepsina. La migración corresponde al tamaño esperado para *EgKU-4* (311 pb) y *EgKU-8* (290 pb), ya que las bandas se ubican próximas a la de 300 pb del marcador de peso molecular.

EgKU-8, la secuencia del gen ortólogo de *E. multilocularis*, ya que solo conocíamos para estos dos parte de la secuencia N-terminal de *E. granulosus*, y existe gran similitud entre los genes de ambos organismos, especialmente en sus regiones codificantes (ver, por ejemplo, ⁸⁸⁸⁹). Los cebadores se diseñaron de manera de obtener solo la región codificante para la proteína madura, flanqueada por sitios de corte para las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III para *EgKU-4* (*EgKU-4* forward: AGGATCCAGAGTGAATATCTGCAAT, y *EgKU-4* reverse: AAAGCTTACTTAATGCTTCTTCTTTTG) y *EgKU-8* (*EgKU-8* forward: AGGATCCCGCATTGACCCCTG, y *EgKU-8* reverse: AAAGCTTACTTAGTGACCGCAC), y *Eco*RI y *Hind*III para *EgKU-7* (*EgKU-7* forward: AGAATTCGTTTCATCCGGCTTGCTTT, y *EgKU-7* reverse: AAAGCTTACCTACCACGATTCATC) y *EgKU-7d* (*EgKU-7d* forward: AGAATTCGTTTCATCCGGCTTGCTTT, y *EgKU-7d* reverse: AAAGCTTACCTACCTGGTGCAGGC). En la Figura 2.2 se muestra la corrida de electroforesis para el producto de PCR obtenido para *EgKU-4* y *EgKU-8*. Los productos de la PCR se purificaron del gel, y se trataron con polimerasa *Taq* para adenilar sus extremos 5', a fin de poder ligarlo al vector *pGem-T Easy* (Promega), ya que la polimerasa *VENT* no posee actividad transferasa terminal y, por tanto, no agrega adeninas. Una vez ligada la secuencia de interés al vector *pGem-T Easy*, se amplificó el plásmido en *E. coli* XL1 y se lo purificó. Luego, se recuperó la secuencia codificante del plásmido utilizando las enzimas restricción correspondientes y se la ligó al vector de expresión (pET28a(+)) (Novagen) previamente tratado con las mismas enzimas de restricción. Finalmente, se amplificó el plásmido recombinante en *E. coli* XL1, se lo purificó, y se secuenció el fragmento de interés utilizando el cebador T7 que flanquea el sitio de clonado múltiple del vector. La secuencia se verificó con la obtenida a partir del análisis transcriptómico ⁹⁰. En el caso de *EgKU-8*, del cual se desconocía gran parte de la secuencia y no estaba disponible de la información transcriptómica, se confirmó que el ADNc clonado codifica para *EgKU-8* a partir del análisis por espectrometría de masa de fragmentos peptídicos obtenidos por hidrólisis con tripsina del inhibidor purificado a partir de un extracto de protoescoléx, reducido y alquilado con iodoacetamida ⁵⁸ (Figura 2.3).

Las proteínas de *EgKU* fusionadas al tándem de 6 histidinas fueron expresadas en *E. coli* transformadas con el pEt28a con el correspondiente inserto. Se crecieron las bacterias en medio líquido LB conteniendo kanamicina (30 µg/ml). En el caso de los dos pares de parálogos *EgKU-1/EgKU-4* y *EgKU-3/EgKU-8* se indujo la expresión con 100 µM de IPTG cuando el cultivo presentaba una absorbancia entre 0.4 y 0.6 a 600 nm durante cuatro horas, obteniéndose buenas cantidades de proteína soluble ⁹¹. Como *EgKU-7* tiende a precipitar en cuerpos de inclusión, la mayor proporción de *EgKU-7* y *EgKU-7d* soluble se obtuvieron cuando se indujo tempranamente a una absorbancia entre 0.2–0.3 a 600 nm, durante dos horas. Para purificar las proteínas, se utilizó un protocolo general diseñado para proteínas con extensión 6xHis. Se rompieron las bacterias por sonicado en un amortiguador con 20 a 30 mM de imidazol, a un pH al menos una unidad por debajo del punto isoeléctrico de la proteína recombinante. Luego se recuperó la proteína de la fase soluble por medio de una cromatografía de afinidad con matriz Ni-NTA-agarosa; la elución se realiza con 250 mM de imidazol. En la Figura 2.4, se muestra el análisis por SDS-PAGE del perfil de purificación de *EgKU-4* y *EgKU-8*. Se determinó la cantidad de proteína obtenida utilizando el reactivo BCA. Se recuperaron aproximadamente 5 mg de *EgKU-1*, *EgKU-3*, *EgKU-4* y *EgKU-8* y 300 µg de *EgKU-7* por litro de cultivo. Finalmente cambiamos el amortiguador de elución por el correspondiente de trabajo (50 mM Tris pH para

1	5	14	30	38	51	55
RIDPCKLPLDPGF C RAYFPRWGFHQESGECVRFIYGGCGGNK N QFHSKEQ C ESM C GH						
From-To	m/z (measured)	m/z (calculated)	Sequence			
1-15	1843.88	1843.92	RIDPCKLPLDPGF C R*			
2-15	1687.78	1687.82	IDPCKLPLDPGF C R			
7-15	1074.52	1074.53	LPLDPGF C R			
16-20	653.35	653.33	AYF P R*			
21-32	1491.61	1491.64	WGFHQESGEC V R			
33-42	1072.46	1072.48	FIYGGCGGN K			

*The sequence was confirmed by MS/MS analysis.

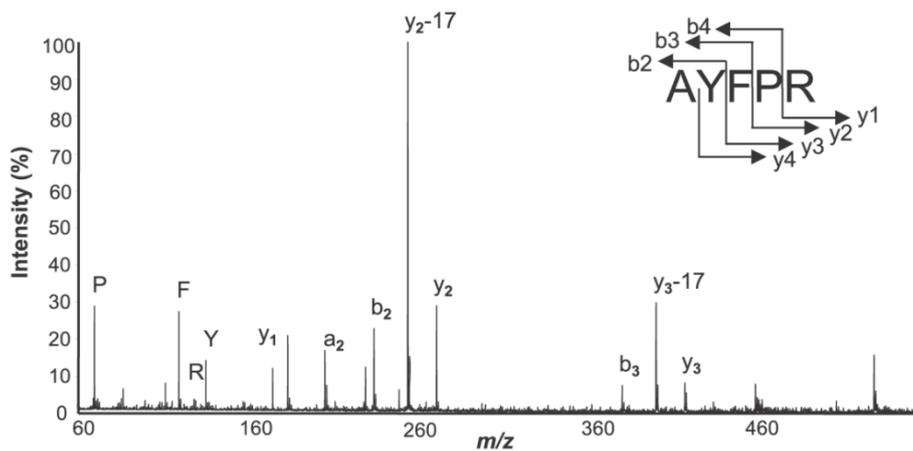


Figura 2.3 Confirmación de la secuencia de *Eg*KU-8 nativo. La fracción con *Eg*KU-8 nativo proveniente de proteoescólex fue resuelta por SDS-PAGE y teñida con coomassie. La banda de aproximadamente 7 kDa fue digerida con tripsina, después se redujeron los fragmentos y se alquilaron con iodacetamida. Se identificaron los fragmentos por MALDI-TOF MS teniendo un 73% de cobertura (42/57 aminoácidos) de la secuencia predicha para *Eg*KU-8 maduro. Los péptidos 1-15 y 16-20 fueron verificados por MS/MS. El panel inferior muestra los iones *b* e *y* correspondientes al péptido 16-20 (m/z 653.33). P, F, R e Y indican los iones imonio del correspondiente aminoácido.

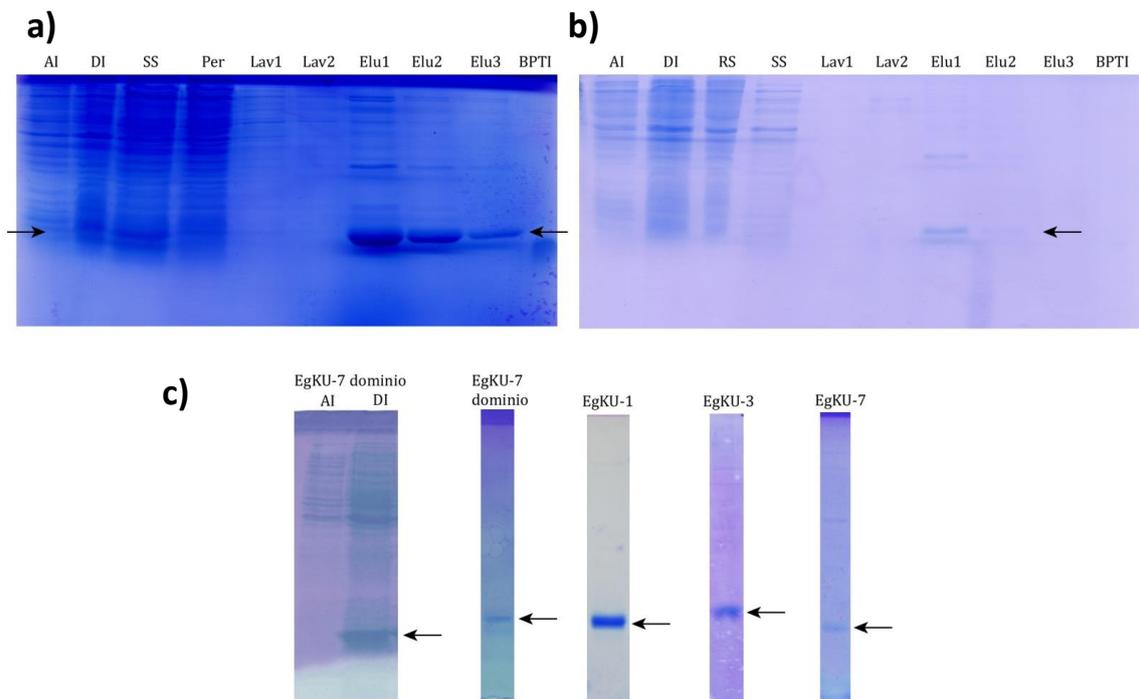


Figura 2.4 SDS-PAGE convencionales de las proteínas purificadas. Los geles de 15% fueron sembrados con 30 μ l de cada alícuota previamente mezclada con amortiguador de corrida en presencia de reductor DTT. Luego se visualizaron con Coomassie. **a)** *EgKU-4y* **b)** *EgKU-8*. AI, antes de inducir las bacterias con IPTG; DI, después de inducir; SS, la fracción soluble luego del sonicado; RS, la fracción no soluble luego del sonicado; Per, el percolado de la columna de Níquel, Lav son los lavados de la columna de Níquel; Elu, son las eluciones de la columna; BPTI, es el marcador de peso molecular (6.5 kDa). **c)** Muestras de distintos *EgKUs* luego de purificarlas con la columna de Níquel. Las flechas negras indican las bandas que se corresponden a los *EgKUs*.

los ensayos cinéticos y Hepes 20 mM pH 7.4 para los ensayos con canales) por gel filtración utilizando columnas de PD10, siguiendo las especificaciones del fabricante.

2.4.3. Hidrólisis de la porción N-terminal de EgKU-7 y EgKU-7d por trombina

EgKU-7 recombinante tiende a precipitar cuando se cambia el amortiguador con imidazol por el de trabajo sin imidazol luego de la purificación con la matriz de níquel. Mejoramos su solubilidad cortando con trombina la extensión N-terminal que presenta el tándem de 6 histidinas. Esto se puede hacer gracias a que la construcción está diseñada de manera que la extensión N-terminal tenga un sitio de corte específico para la trombina. Incubamos 5 unidades de trombina por mg de EgKU-7 (estimada por el ensayo de Bradford), en el amortiguador de elución con imidazol, durante 12 horas, detuvimos la reacción con 5 mM de PMSF. Purificamos EgKU-7 sin la extensión N-terminal por FPLC (AKTA) utilizando la columna de intercambio iónico Resource Q de 6 ml. Para esto previamente cambiamos el amortiguador con imidazol por un amortiguador Tris 20 mM, pH 8, con 10 mM de NaCl, por gel filtración en columna PD10, luego cargamos la columna Resource Q. Purificamos por gradiente de NaCl de 10 a 500 mM en 80 min, a un flujo de 1 mL/min. De esta forma se logró aumentar la solubilidad de la proteína. Obtuvimos aproximadamente 2 mg/ml, unas 10 veces más concentrada de lo que pudimos obtener cuando la proteína presentaba la extensión N-terminal con el tándem de histidinas (Figura 2.5 y 2.6).

2.4.4. Determinación de la masa molecular por MALDI-TOF-MS

Los análisis de espectrometría de masa con ionización por laser asistida por matriz y detección por tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés, *matrix assisted light desorption ionization-time of flight*) fueron realizados por Madelón Portela (Unidad de Bioquímica Analítica, Instituto Pasteur), utilizando un instrumento Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, MA, EUA), con un láser de nitrógeno ($\lambda = 337$ nm). Los espectros se obtuvieron mayoritariamente en modo lineal, con un voltaje de aceleración de 25 kV. La proteína purificada se incubó con una resina poros R2 20 μ m (Applied Biosystems) durante 10 min. Luego de centrifugar, se descartó el sobrenadante y se lavó la resina con TFA 0.2%. Finalmente, se resuspendió en una solución de matriz, preparada como solución saturada de ácido sinapínico (ácido 3-5-dimetoxi 4-hidroxicinámico) en acetonitrilo 60%-TFA 0.2%.

Para reducir y alquilar las muestras de EgKUs se disolvió 2 μ l del inhibidor, incubado o no con la tripsina, en una solución que contenía 5.5 M de cloruro de guanidinio, 1mM de EDTA, y se desnaturalizó a 85°C durante 15 minutos. Luego se redujo con 10 mM de dithiothreitol (DTT) durante 15 minutos a 85°C. Finalmente se trató la muestra con 25 mM de iodoacetamida durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Las muestras fueron concentradas y desaladas usando una microcolumna de fase reversa C18 (OMIX Pipette tips, Varian) y se eluyó con solución de matriz (ácido α -ciano hidroxicinámico y TFA 0.2% en acetonitrilo (50%)) directamente sobre la placa del MALDI.

2.5. Ensayos cinéticos

Las medidas de actividad enzimática tipo tripsina, quimotripsina y elastasa se hicieron mediante hidrólisis de sustratos fluorogénicos, en condiciones de velocidad inicial, a 37 °C. Los experimentos se llevaron a cabo a pH 8, que es el utilizado habitualmente para enzimas de

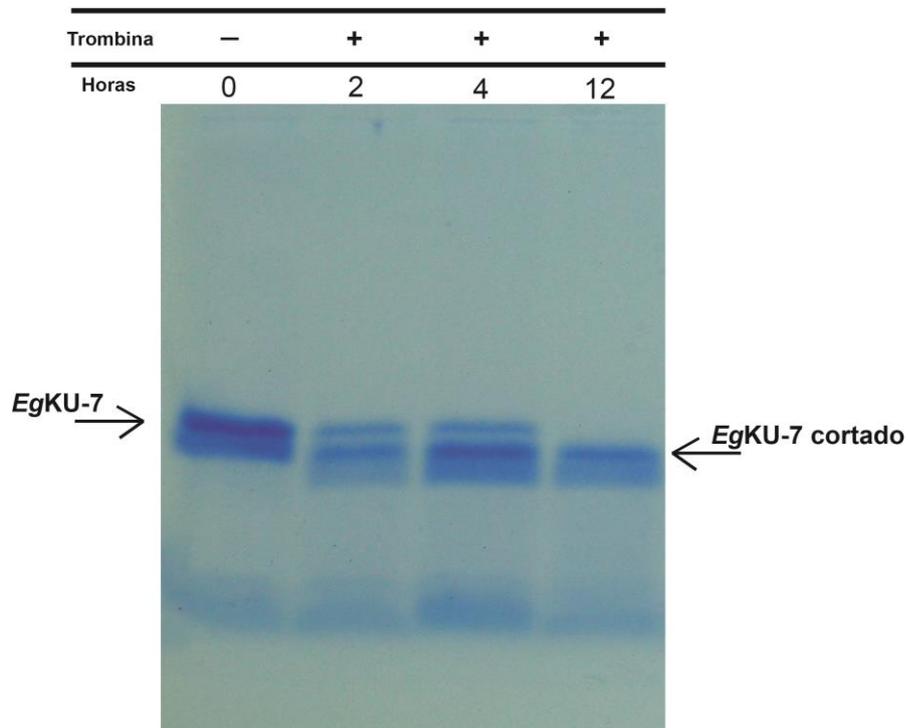


Figura 2.5 Tratamiento de *EgKU-7* con trombina. Se incubó aproximadamente 0.5 mg de *EgKU-7* con 2 unidades de trombina. Se tomaron alícuotas a las 2, 4 y 12 horas y se analizaron las muestras por SDS-PAGE convencional utilizando un gel de poliacrilamida 15% teñido con coomassie.

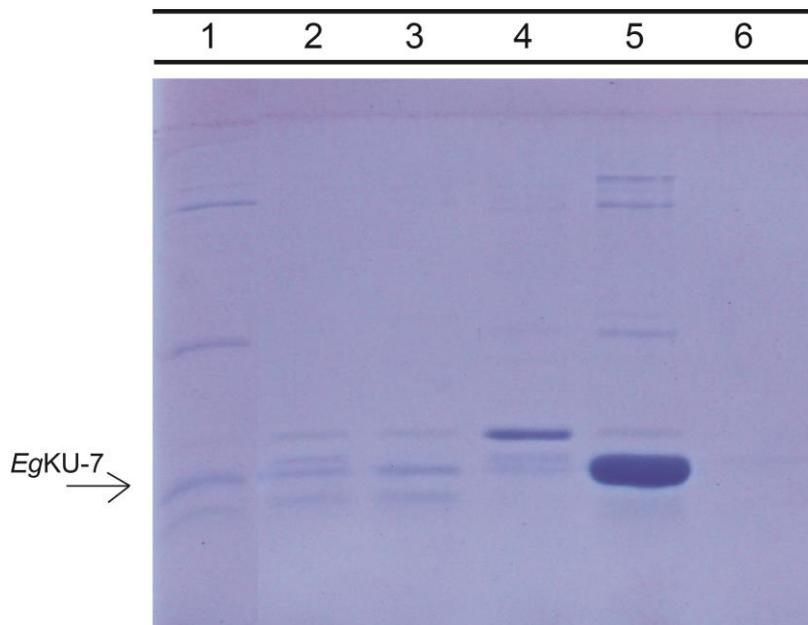


Figura 2.6 Purificación por intercambio iónico de *EgKU-7* cortado con trombina. Se utilizó una columna Resource Q equilibrada con Tris (20mM, pH 8.0, 10mM NaCl) y se eluyó con un gradiente de NaCl de 10 a 500 mM en 80 min, a un flujo de 1 mL/min. Se observa el perfil de purificación por SDS-PAGE convencional en gel de poliacrilamida 15%. El carril 1 corresponde a la elución de la matriz de níquel, antes de entrar en la columna. Los carriles 2 a 6 corresponden a sucesivas fracciones de elución.

este tipo. Las diluciones de las enzimas, los sustratos y los inhibidores fueron preparadas en Tris-HCl 50 mM, pH 8.0, 0.01% Tritón X100 (v/v). Se utilizaron sustratos artificiales cuyas propiedades de fluorescencia aumentan como resultado de la actividad enzimática (liberación del fluoróforo AMC). Los ensayos se realizaron en microplacas negras para fluorimetría de 96 pocillos (Costar, Corning Life Sciences, EUA), en un volumen final de 200 μ l. Los cambios de intensidad de fluorescencia, medidos en una longitud de onda de excitación de 390 nm y una de emisión de 460 nm, fueron registrados en un fluorímetro para microplacas (FLUOstar* OPTIMA, BMG Labtechnologies, Offenburg, Alemania). Para los ensayos con tripsina, se utilizó un sustrato artificial con la secuencia peptídica Nuc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC; para quimotripsina, uno con la secuencia Nuc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC; y para elastasa, Nuc-Ala-Ala-Ala-AMC. Los parámetros cinéticos de las tripsinas y quimotripsinas para estos sustratos fueron: $K_M = 25 \pm 3 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 38 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la tripsina aniónica canina; $K_M = 31 \pm 4 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 43 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la tripsina catiónica canina; $K_M = 85 \pm 9 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 50 \pm 6 \text{ s}^{-1}$ para la tripsina catiónica bovina; $K_M = 39 \pm 2 \mu\text{M}$ para la quimotripsina- β canina (no contamos con el valor de k_{cat}) y $K_M = 30 \pm 2 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}} = 19 \pm 2 \text{ s}^{-1}$ para la quimotripsina bovina. Estos valores fueron determinados previamente en el contexto de mi tesis de grado ⁹². No disponemos de valores para la elastasa porcina.

Las velocidades de hidrólisis de los sustratos se calcularon a partir de los gráficos de formación de AMC vs tiempo. Estos gráficos conforman una recta, cuya pendiente es el valor de velocidad inicial de la reacción de hidrólisis. La concentración de AMC formado se calculó a partir de una curva de calibración de fluorescencia en función de concentraciones crecientes de AMC. Las curvas de calibración se realizaron cada vez que se realizaba un experimento.

2.5.1. Titulación de las enzimas

La concentración molar de enzima activa, tanto de tripsinas como de quimotripsinas, se determinó por experimentos de titulación con inhibidores específicos que se unen fuertemente al sitio activo de las enzimas en una relación de uno a uno, formando complejos muy estables. Se utilizó el inhibidor competitivo de alta afinidad BPTI en el caso de las tripsinas y quimotripsina- α . Para la quimotripsina(s)- β canina(s) se utilizó *EgKU-3*, ya que no contábamos con otro inhibidor de alta afinidad. La elastasa no fue titulada por no contar con un inhibidor de alta afinidad para esta enzima. En cada ensayo, se varió la concentración de la enzima (0 a 8 nM), y se mantuvo fija la del inhibidor (entre 1.5 y 4 nM dependiendo del experimento). Se ensayaron también diferentes concentraciones de las enzimas en ausencia del inhibidor (0 a 3 nM). En todos los casos, se utilizó la misma concentración de sustrato (5 μ M). Se calcularon las velocidades iniciales para cada concentración de enzima (tanto en presencia como en ausencia del inhibidor) y se graficaron en función de la concentración de enzima. Las velocidades iniciales de las condiciones que poseen actividad detectable en presencia de inhibidor, forman una recta que tiene la misma pendiente que la correspondiente a la enzima sin inhibir. El corte de la recta en presencia de inhibidor con la abscisa x indica la concentración de enzima activa, que es igual a la concentración utilizada de inhibidor. De esta manera, se puede inferir cuánta enzima activa se recuperó en la purificación. En la Figura 2.7 se muestra como ejemplo la titulación de quimotripsina- β por *EgKU-3*.

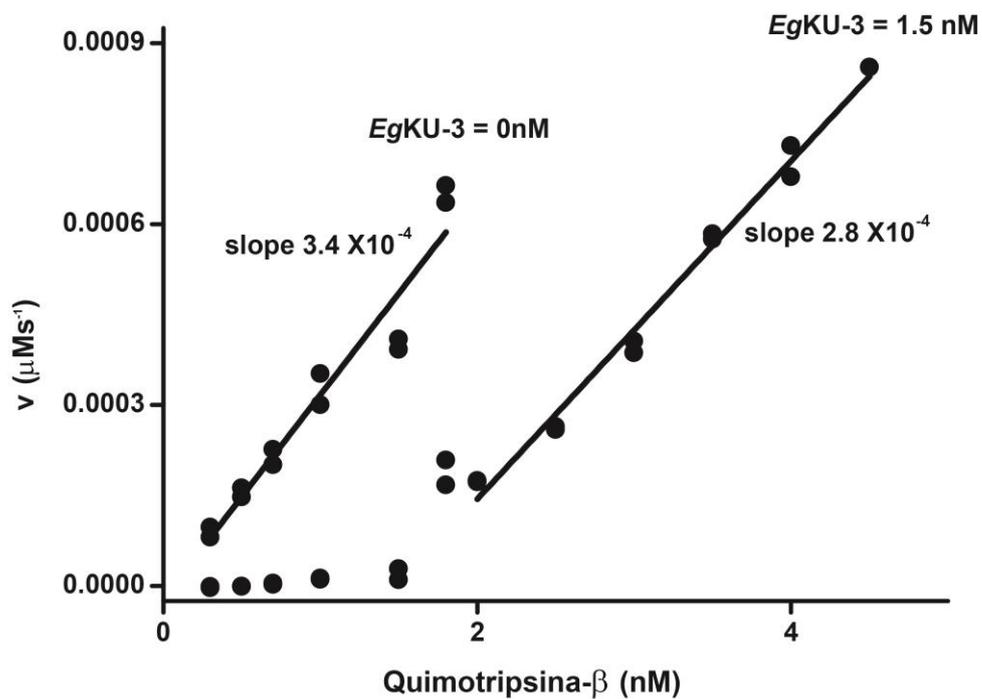


Figura 2.7 Titulación de quimotripsina- β canina por EgKU-3. Se preincubaron diferentes concentraciones de quimotripsina- β (0 a 4.5 nM) en ausencia o presencia de EgKU-3 (1.5 nM) durante 15 minutos. Se inició la reacción agregando 5 μM de sustrato. Se grafica la velocidad de formación de producto en función de la concentración de quimotripsina- β , en ausencia de inhibidor (izquierda) y en presencia de EgKU-3 (derecha). Se observa que las velocidades iniciales estimadas en las condiciones donde se detecta actividad conforman en presencia de inhibidor una recta de igual pendiente a la obtenida en ausencia de inhibidor. El corte de la recta con la abscisa indica la concentración de enzima activa, que corresponde a la del inhibidor (1.5 nM).

2.5.2. Estudios de inhibición de alta afinidad

Para determinar las constantes de inhibición globales (K_i^*) de los inhibidores sobre las distintas enzimas, se analizó la velocidad inicial de hidrólisis de sustrato en presencia de concentraciones crecientes del correspondiente inhibidor. Las medidas fueron realizadas luego de incubar el inhibidor con la enzima durante 15 minutos de forma de alcanzar el equilibrio. La constante de inhibición fue determinada a partir del ajuste de la ecuación no lineal de Morrison para inhibidores de alta afinidad^{93,94}. Esta ecuación tiene en cuenta que las concentraciones de enzima y de inhibidor son del mismo orden y que la concentración de inhibidor libre no es igual a la total:

$$\text{Ecuación 1} \quad v_i = \frac{v_o}{2[E]} \left\{ ([E] - [I] - K_{Iap}^*) + \sqrt{([I] + K_{Iap}^* - [E])^2 + 4K_{Iap}^* [E]} \right\}$$

donde K_{Iap}^* es la constante global de disociación aparente del complejo enzima-inhibidor, v_i es la velocidad en presencia de inhibidor una vez alcanzado el estado estacionario, v_o es la velocidad en ausencia de inhibidor, $[I]$ es la concentración total del correspondiente inhibidor y $[E]$ es la concentración total de enzima activa. La verdadera constante global de inhibición, K_i^* , se obtuvo a partir de la corrección de K_{Iap}^* de acuerdo a la ecuación 2 de inhibidores competitivos. No obstante, la concentración de sustrato era de 5 μM por lo tanto menor que el K_M por factores de 0.2 o menores, por lo cual ambos valores eran muy similares.

$$K_i^* = \frac{K_{Iapp}^*}{1 + \frac{[S]}{K_M}} \quad \text{Ecuación 2}$$

En el caso de la inhibición de tripsinas por *EgKU-7*, los datos de velocidad inicial de hidrólisis de sustrato en función de concentraciones crecientes de inhibidor no se ajustaban a la ecuación de Morrison. Para ajustarlos se utilizó un modelo que involucra, en lugar de un solo sitio de interacción del inhibidor con la enzima, dos sitios de unión independientes. Se utilizó el programa DynaFit que permite realizar ajustes no lineales por mínimos cuadrados de datos cinéticos a partir de las ecuaciones estequiométricas (www.biokin.com/dynafit/)⁹⁵. Del ajuste se obtienen dos valores de K_i , uno para cada sitio de unión (K_i^a y K_i^b).

2.5.3. Estudio de los cursos temporales de la inhibición

Se midió cómo decrecía la velocidad de formación de producto durante los primeros minutos de la reacción luego de agregar enzima a una mezcla de inhibidor y sustrato (5 μM). Estos estudios se realizaron a concentraciones crecientes de inhibidor. Se analizaron los progresos de las curvas utilizando la ecuación exponencial mas recta que describe el establecimiento del equilibrio entre la enzima y el inhibidor⁹⁶:

$$P = v_i t + \frac{(v_o - v_i)(1 - e^{-k_{obs}t})}{k_{obs}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde P es la concentración de AMC producido por la hidrólisis del sustrato, v_o es la velocidad inicial, v_i es la velocidad una vez alcanzado el estado estacionario y k_{obs} representa la constante exponencial aparente de pseudo primer orden.

En el caso de *EgKU-7* con las tripsinas caninas, que no ajustó bien a la ecuación 3, se estudió utilizando una ecuación doble exponencial:

$$P = A_1(1 - e^{-k_{obs1}t}) + A_2(1 - e^{-k_{obs2}t}) \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde A_1 y A_2 son las amplitudes del curso temporal y k_{obs1} y k_{obs2} son las constantes exponenciales aparentes de pseudoprimer orden.

Para aquellos inhibidores en los que la formación del complejo enzima inhibidor se da en un solo paso (esquema 1) el valor de k_{obs} está relacionado con las constantes cinéticas k_1 y k_{-1} y con la relación de $[S]/K_M$ por la ecuación 8⁹⁷:



$$k_{obs} = k_{-1} + \frac{k_1}{1 + \frac{[S]}{K_M}} [I] \quad \text{Ecuación 5}$$

La constante k_1 fue determinada a partir del ajuste de los gráficos de k_{obs} vs $[I]$ a la ecuación 5. Como la k_{-1} es muy pequeña no la pudimos determinar a partir de estos gráficos, pues no se distinguía significativamente de cero. Por este motivo calculamos k_{-1} a partir de la ecuación 6 cuando la relación v_i/v_o era mayor a 0.05⁹⁸:

$$k_{-1} = k_{obs} \frac{v_i}{v_o} \quad \text{Ecuación 6}$$

Los valores de k_{-1} y k_1 determinados permitieron corroborar el valor de la constante K_I^* a partir de la ecuación 7:

$$K_I^* = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad \text{Ecuación 7}$$

Si la inhibición se da en dos pasos con el primero rápido en relación al segundo (esquema 2), el valor de k_{obs} (k_{obs1} para EgKU-7 con las tripsinas caninas) está relacionado con las constantes cinéticas k_2 y k_{-2} y con el equilibrio de disociación del primer paso K_1 ($K_1 = k_{-1}/k_1$) por la ecuación hiperbólica:



$$k_{\text{obs}} = k_{-2} + \frac{k_2 [I]}{[I] + K_1 \left(1 + \frac{[S]}{K_M} \right)} \quad \text{Ecuación 8}$$

Las constantes k_2 y K_1 fueron determinadas a partir del ajuste de los gráficos hiperbólicos de k_{obs} vs $[I]$ a la ecuación 8. Como la k_{-2} es muy pequeña no la pudimos determinar de este ajuste, por este motivo lo calculamos a partir de la ecuación 9 cuando la relación v_i/v_o era mayor a 0.05 ⁹⁸:

$$k_{-2} = k_{\text{obs}} \frac{v_i}{v_o} \quad \text{Ecuación 9}$$

Los valores de k_{-2} , k_2 y K_1 determinados permitieron corroborar el valor de la constante global K_1^* a partir de la ecuación 10:

$$K_1^* = K_1 \frac{k_{-2}}{k_2 + k_{-2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

2.5.4. Estudios de estabilidad de los inhibidores frente a tripsina

Los estudios de estabilidad se realizaron siguiendo los cursos temporales de la inhibición durante 8 horas de reacción, luego de agregar enzima a una mezcla de inhibidor y sustrato (5 μM). Estos estudios se realizaron a concentraciones crecientes de inhibidor.

Alternativamente se incubó inhibidor con tripsina por períodos de tiempo crecientes (0 a 24 horas), se detuvo la reacción en los diferentes tiempos con 5 mM de PMSF. Luego se analizaron las muestras por SDS-PAGE en amortiguador de tricina. La concentración de inhibidor (entre 15 y 20 μM) y enzima (entre 1.5 y 2 μM) fue la necesaria para tener al menos 1 μg de inhibidor sembrado en el carril, teniendo la precaución de mantener la misma relación

de concentración entre la enzima y el inhibidor que en los experimentos de los cursos temporales de la inhibición que se describen más arriba. Se analizó cómo variaba la intensidad de las bandas a medida que transcurría el tiempo por densitometría utilizando el programa Win_Image Studio Lite_5.0.21.

2.6. Experimentos de *patch-clamp* con *EgKU-1* y *EgKU-4* sobre neuronas de ganglios de la raíz dorsal de rata

El efecto de *EgKU-1* y *EgKU-4* sobre las corrientes de Na⁺ y K⁺ activadas por voltaje y sobre las corrientes de Na⁺ dadas por los ASIC cuando se activan por un cambio rápido de pH, fueron estudiadas por la técnica “whole cell patch-clamp” en cultivos primarios de neuronas de ganglios de la raíz dorsal de rata (DRG). Estos experimentos fueron hechos en el Laboratorio de Neurofisiología Sensorial, del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla en el contexto de una pasantía. Los cuidados y procedimientos hechos sobre los animales estaban de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento del animal. El número de animales utilizados para este trabajo se mantuvo en el mínimo necesario para una interpretación significativa de los datos.

2.6.1. Cultivo celular

Las neuronas de las DRG fueron aisladas a partir de ratas Wistar posnatales sin distinción de sexo. Los cultivos se realizaron de acuerdo al procedimiento descrito por Salceda y colaboradores ⁹⁹. Las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas con una sobredosis de sevoflurano. Las neuronas fueron aisladas de la columna vertebral y se las incubó (30 minutos a 37°C) en medio Leibovitz L15 (Invitrogen, USA) conteniendo 1.25 mg/ml de tripsina y 1.25 mg/ml de colagenasa (ambos de Sigma-Aldrich). Después del tratamiento enzimático, los ganglios fueron lavados tres veces con L15 estéril. Las células fueron disociadas mecánicamente utilizando una pipeta Pasteur y plaqueadas sobre cubre objetos de vidrio de 12 mm X 10 mm (Corning, USA) pretratados con poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) e incubadas en cajitas redondas de cultivo de 35 mm (Corning). Las células aisladas se dejaron decantar y adherir al cubreobjeto durante 4 a 8 horas en una atmósfera húmeda (5% CO₂, a 37 °C) utilizando un incubador CO₂water-jacketed incubator (Nuaire, USA). Las placas donde se incubaron las células contenían L15 suplementado con 15.7 mM NaHCO₃ (Merck, México), 10 % de suero bovino fetal, 2.5 µg/ml de fungizona (ambos de Invitrogen), 100 U/mL de penicilina (Lakeside, Mexico), y 15.8 mM de HEPES (Sigma-Aldrich).

2.6.2. Experimentos de electrofisiología sobre las DRG

Los cubreobjetos con las células adheridas fueron transferidos a una cámara de perfusión de 500 µl montada sobre la base de un microscopio invertido (TMS, Nikon Co, Japon). Las soluciones utilizadas en los experimentos se indican en la tabla 2.1. Las células fueron bañadas (por perfusión) con la solución extracelular por medio de una bomba peristáltica (Masterflex, L/S Easy-Load II; Cole Parmer, USA). Los registros de corriente fueron tomados a temperatura ambiente (23-25°C) utilizando un amplificador Axopatch 1D (Molecular Devices, USA). Para garantizar la viabilidad de las células que se registraron se aseguró que se observara un adecuado campo de espacio, donde las células que se eligieron fueron refringentes bajo el contraste de fase del microscopio. Éstas además no estaban adheridas a otras células, no

contenían prolongaciones, y tenían un soma redondo y de aspecto regular. El pulso y muestreo de datos se generó con el programa informático pClamp 9.2 (Molecular Devices) utilizando el sistema de adquisición de datos de 16-bit (Digidata 1320, Molecular Devices). Las señales fueron filtradas a 5 kHz y digitalizadas a 20 kHz. Las pipetas fueron *puleadas* desde capilares de vidrio de borosilicato (TW120-3; WPI, USA) utilizando un Flaming-Brown electrode puller (80-PC; Sutter Instruments, USA). Las pipetas tenían una resistencia que variaba de 1 a 3 M Ω y se las llenó con solución intracelular (Tabla 2.1). La resistencia en serie se compensó eléctricamente hasta un 80%. El sello y la resistencia de las células fueron chequeados continuamente para garantizar que las condiciones de los registros fueran estables. Los registros donde la resistencia varió más de un 10% no fueron tenidos en cuenta. Los datos se guardaron en una computadora para luego realizar el correspondiente análisis final.

2.6.3. Análisis de los datos y protocolo de los experimentos

Se estudio del efecto de los *EgKUs* sobre las corrientes de Na⁺ y K⁺ que se activan por cambio de voltaje. La aplicación fue ejecutada mediante un microinyector de presión (Baby Bee, USA) desde una micropipeta ubicada en la vecindad de la célula que se estaba registrando. Las células registradas tenían un potencial de membrana entre -45 y -65 mV. Las corrientes transmembrana de K⁺ (y Na⁺) fueron provocadas por un simple paso de voltaje siguiendo el protocolo de pulso de despolarización que va de un potencial inicial (*holding potential*, V_H) de -100 mV a uno de 0 mV durante 1000 ms. Para los análisis de corriente en función del voltaje (I/V), el total de las corrientes de K⁺ fueron registrados a partir de pulsos de voltaje sobre el potencial de membrana, que iban aumentando consecutivamente de a 10 mV, cada pulso se aplicó durante 1000 ms y el intervalo entre ellos fue de 2 s. Las corrientes aisladas de K⁺ fueron registradas luego de realizar pulsos de 100 ms que aumentaban de a 10 mV durante 8 s, de -100 mV a 45 mV, utilizando solución donde se sustituyo el Na⁺ por colina (tabla 2.1). Se realizó un pre-pulso de -100 mV a 0 mV cuando se registró todas las corrientes aisladas de K⁺ dependientes de voltaje: las rápidas, transitorias de tipo-A (IKA), así como las corrientes no inactivantes de rectificación lenta (IKDR). En los registros donde se registró únicamente IKDR, se realizo, luego de realizar el pulso de -100 mV, un segundo pulso de -45 mV para inactivar las corrientes IKA. Las corrientes IKA fueron estimadas a partir de la substracción a los registros con todas las corrientes aisladas de K⁺ (incluyen IKA e IKDR) los registros IKDR. Los *EgKUs* fueron co-aplicados cuando se registraban las células, los análisis I/V fueron realizados luego que se estabilizaba el efecto.

Las corrientes ASIC fueron generadas por un cambio rápido (aproximadamente 100 ms) de pH de 7.4 a 6.1 durante 5 s, esto se logró al cambiar uno de los tres canales de salida de un perfusor de cambio rápido (SF-77B, Warner Inst, USA) mientras se mantenía la célula a un V_H de -60 mV. Se utilizaron para los registros únicamente las células que presentaban un pico de corrientes de Na⁺ distintivo (un pico inicial seguido de una corriente sostenida) como respuesta a la perfusión ácida. El tiempo entre los cambios de pH para una misma célula fue de 1 minuto, para asegurarse que las corrientes de los ASICs se recuperaran totalmente de la desensibilización. Se agregó a la solución extracelular de pH 6.1, capsazepina (Sigma-Aldrich), un antagonista del potencial receptor transitorio vanilloide 1 (TRPV1) para evitar la activación

	Extracelular (mM)	pH 6.1 Extracelular (mM)	Extracelular (mM) sin NaCl	Intracelular (mM)	Intracelular (mM) sin NaCl
NaCl	140	140	-	10	-
KCl	5.4	5.4	10	125	50
KF	-	-	-	-	40
CaCl ₂	1.8	1.8	1.8	0.1	0.1
MgCl ₂	1.2	1.2	1.2	-	-
Colina-Cl	-	-	130	-	60
CdCl ₂	-	-	0.3	-	-
HEPES	10	-	10	5	5
MES	-	10	-	-	-
EGTA	-	-	-	10	10
MgATP	-	-	-	2	2
NaGTP	-	-	-	1	1
	pH 7.4 ajustado con NaOH	pH 6.1 ajustado con NaOH	pH 7.4 ajustado con KOH	pH 7.2 ajustado con KOH	pH 7.2 ajustado con KOH

Tabla 2.1 Soluciones utilizadas por “whole-cell patch clamp” en los registros por clampeo de voltaje. Se utilizaron estas soluciones para registrar las corrientes dependientes de voltaje y la corriente de sodio activada por cambio rápido a pH ácido (ASIC).

del receptor TRPV1 que está presente en las células DRG. Las corrientes ASICs fueron caracterizadas por: a) la amplitud máxima del pico (I_{pico}), b) las constantes de tiempo de desensibilización (τ_{des} , determinada del ajuste con una ecuación exponencial simple de la fase de la corriente que disminuye). Los *EgKUs* fueron pre-aplicados durante 1 minuto y luego se coaplicaron junto con el amortiguador ácido de pH 6.1. Los pHs de las soluciones fueron chequeados para asegurarse que el pH no cambiara por la adición del inhibidor.

Para ambas corrientes se estudió la respuesta en función de la dosis de *EgKU-1*. Para las corrientes de potasio se estudió tanto *EgKU-1* nativo como recombinante (en los pulsos de -100 mV a uno de 0 mV durante 1000 ms) y para las corrientes de ASIC únicamente *EgKU-1* nativo. Se comparó el efecto sobre las corrientes a medida que se aumenta la concentración del *EgKU-1* con sus respectivos controles. Los datos fueron ajustados a la ecuación:

$$Y = \min + \frac{(\max - \min)}{\left[1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^H\right]} \quad \text{Ecuación 11}$$

dónde Y es el efecto del inhibidor, x es la concentración del inhibidor, max y min son los efectos máximos y mínimos, EC_{50} es la concentración en la que el efecto es el 50% y H es la constante de Hill.

3. Los parálogos *EgKU-3* y *EgKU-8* presentan la actividad inhibidora de peptidasas de serina típica de los inhibidores Kunitz

Como ya se comentó, estudios previos al trabajo de esta tesis realizados con *EgKU-8* nativo, purificado a partir de protoescólex, mostraron que esta proteína (que contiene Arg en el sitio P1) presenta actividad inhibidora de tripsina. Por otro lado, considerábamos que *EgKU-3*, el hermano parólogo con una Leu en el P1, era un buen candidato a inhibir quimotripsinas.

Por este motivo, estudiamos en profundidad la actividad inhibidora de *EgKU-8* nativo frente a tripsina bovina comercial y tripsinas caninas, purificadas a partir de páncreas. Además, clonamos y produjimos *EgKU-8* recombinante y verificamos que su actividad es comparable a la de la proteína nativa. Finalmente, estudiamos la actividad inhibidora de *EgKU-3* recombinante frente a quimotripsinas bovina comercial y canina, purificada a partir de páncreas.

3.1. *EgKU-8* y *EgKU-3* son inhibidores de alta afinidad de tripsinas y quimotripsinas respectivamente

En primer lugar, determinamos las constantes globales de inhibición (K_i^*) de *EgKU-3* recombinante y *EgKU-8* nativo frente a peptidasas de serina digestivas. Para *EgKU-8*, ensayamos tripsina catiónica y quimotripsina-A bovinas, así como tripsina catiónica, tripsina aniónica y quimotripsina-B caninas. Para *EgKU-3*, ensayamos quimotripsina-A bovina, quimotripsina-B canina y elastasa porcina.

Los valores de K_i^* se determinaron a partir de las medidas de velocidad de hidrólisis del sustrato por las enzimas en presencia de concentraciones crecientes de inhibidor, manteniendo fija la concentración de enzima activa. Las diferentes concentraciones de inhibidor se preincubaron con la enzima durante 15 minutos antes de iniciar la reacción con el sustrato. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Morrison (Ecuación 1), recomendada para inhibidores de alta afinidad^{93,94}, utilizando el programa Origin 8.1, como se ejemplifica en las Figuras 3.1 y 3.2. De los ajustes, se determinaron los valores de K_i^* aparente, que se corrigieron con la Ecuación 2, obteniéndose los valores de K_i^* que se muestran en la Tabla 3.1. Se confirmó que *EgKU-8* es un excelente inhibidor de tripsinas tanto caninas como bovinas (K_i^* del orden de 10^{-11} M), pero no es tan buen inhibidor de quimotripsina bovina (K_i^* del orden de 10^{-9} M) y no presenta actividad inhibidora de quimotripsina canina. Por otro lado, se observó que *EgKU-3* es un inhibidor de alta afinidad de quimotripsinas, tanto de la bovina como de la canina (K_i^* del orden de 10^{-11} M), y que no es un inhibidor tan potente de elastasa (K_i^* del orden de 10^{-9} M).

Además, realizamos experimentos de titulación de quimotripsina con *EgKU-3*. Para esto, determinamos las velocidades de hidrólisis de sustrato de diferentes concentraciones de quimotripsina en presencia y ausencia de una concentración fija de *EgKU-3*. El gráfico de velocidad en función de la concentración de quimotripsina muestra que *EgKU-3* presenta el comportamiento típico de inhibidores de alta afinidad: la recta resultante en presencia de inhibidor, que se inicia en una concentración determinada de quimotripsina, tiene la misma pendiente que la obtenida en ausencia de inhibidor, que se inicia en 0 nM de quimotripsina (Figura 2.7).

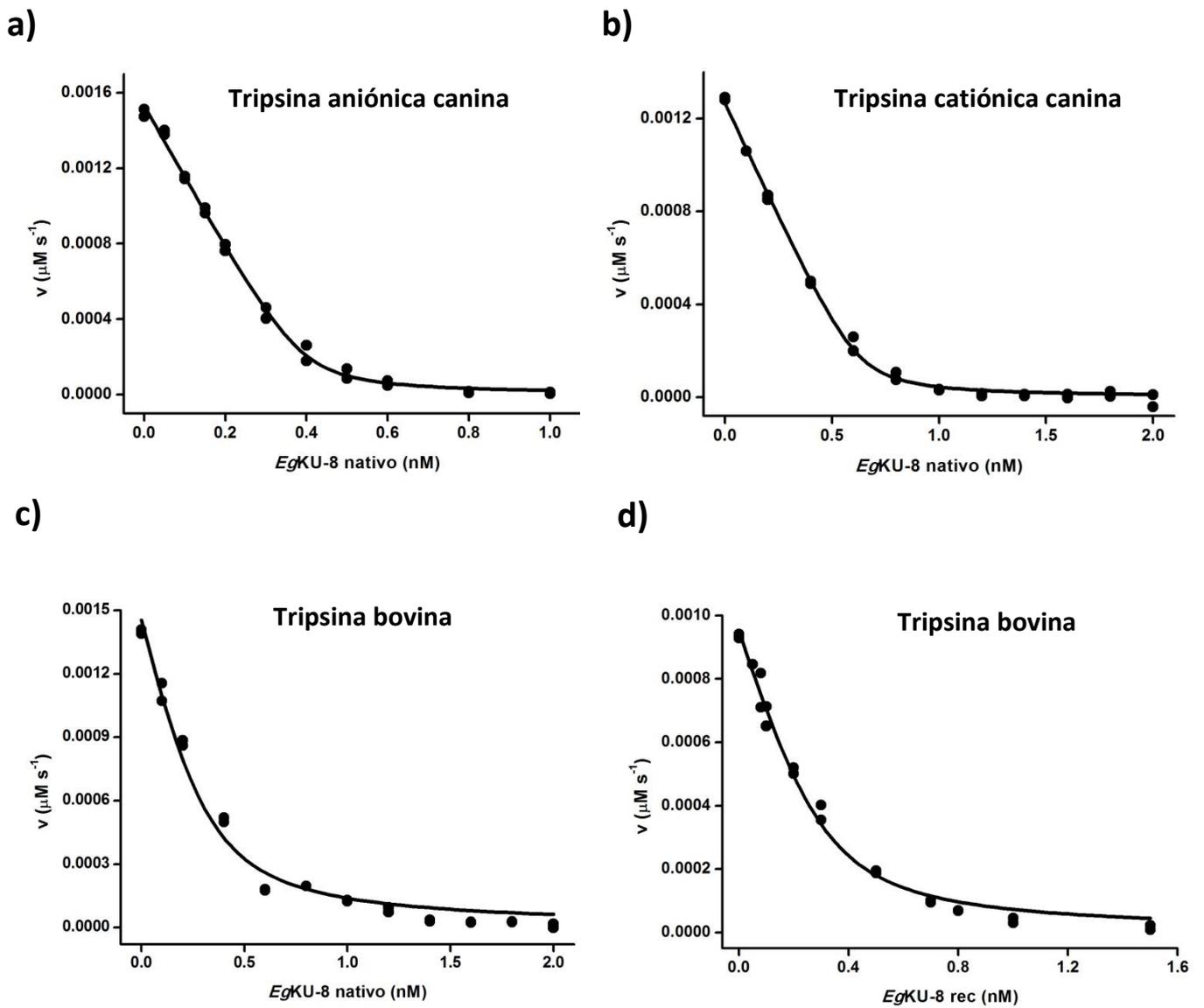


Figura 3.1 Inhibición de tripsina bovina y tripsinas caninas por *EgKU-8*. Se incubó la enzima (0.3 nM) con concentraciones crecientes del correspondiente *EgKU-8* (nativo o recombinante), en amortiguador Tris 50 mM, pH 8, 0.01% Tritón X-100, durante 15 minutos a 37°C, y se inició la reacción con el sustrato N-*t*-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC (5 μM). Se determinó la velocidad inicial de la reacción siguiendo la fluorescencia con longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión. La línea negra representa el mejor ajuste de la ecuación de Morrison (Ecuación 1). **a)** *EgKU-8* nativo con tripsina aniónica canina, **b)** *EgKU-8* nativo con tripsina catiónica canina, **c)** *EgKU-8* nativo con tripsina catiónica bovina y **d)** *EgKU-8* recombinante con tripsina catiónica bovina.

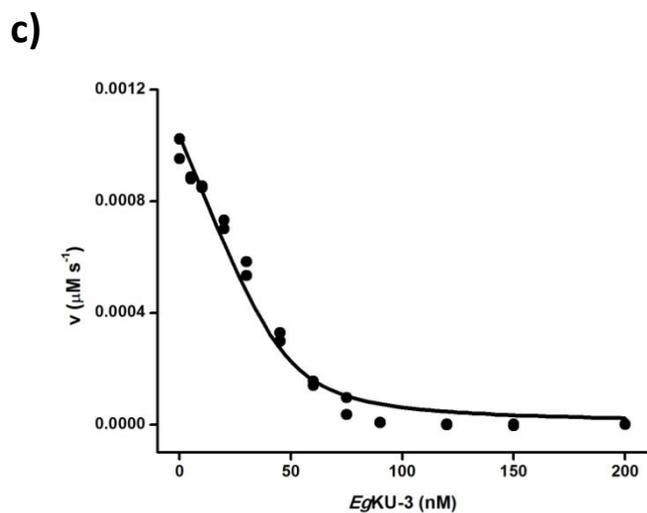
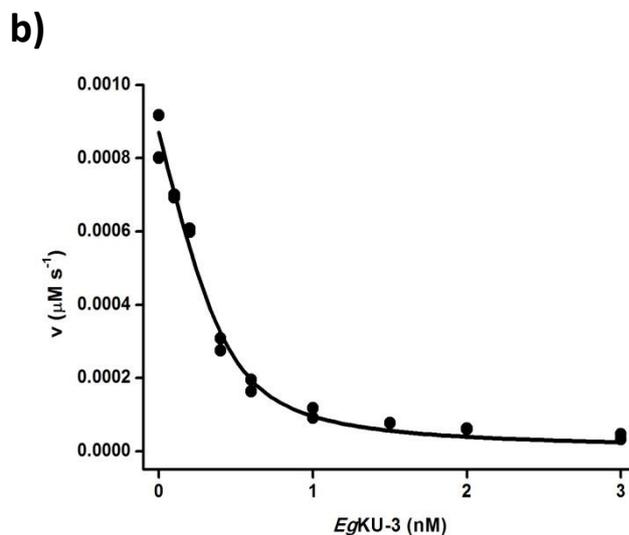
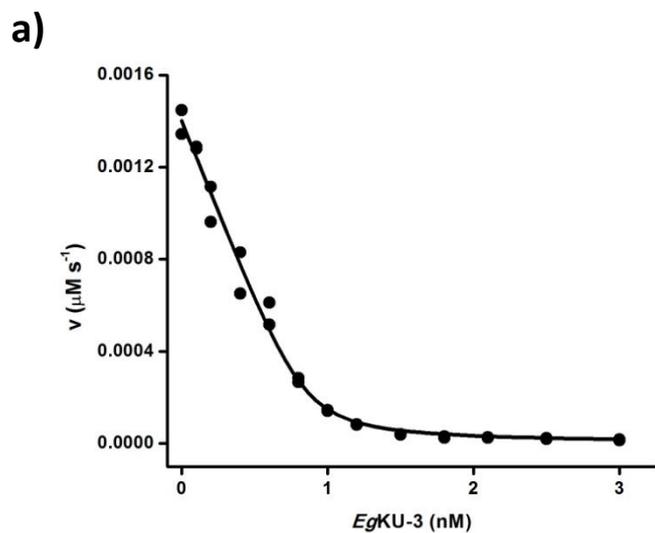


Figura 3.2 Inhibición de quimotripsinas bovina y canina, y elastasa porcina por EgKU-3. Se incubó la enzima (1 nM para las quimotripsinas y 24 nM para la elastasa) con concentraciones crecientes del EgKU-3, en amortiguador Tris 50 mM, pH 8, 0.01% Tritón X-100, durante 15 minutos a 37°C, y se inició la reacción con el sustrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC para las quimotripsinas y Suc-Ala-Ala-Ala-AMC para la elastasa; 5 μM). Se determinó la velocidad inicial de la reacción siguiendo la fluorescencia con longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión. La línea negra representa el mejor ajuste de los datos experimentales a la ecuación de Morrison (Ecuación 1). EgKU-3 recombinante con: **a)** quimotripsina bovina, **b)** quimotripsina canina y **c)** elastasa porcina.

Proteasa de serina	K_i^* (pM)		
	<i>EgKU-3</i> rec ^a	<i>EgKU-8</i> nat ^b	<i>EgKU-8</i> rec ^a
Tripsina catiónica bovina	N.D. ^c	60 ± 13	50 ± 10
Tripsina catiónica canina	N.D. ^c	22 ± 8	N.D. ^c
Tripsina aniónica canina	N.D. ^c	17 ± 4	N.D. ^c
Quimotripsina-A bovina	53 ± 19	2050 ± 170	N.D. ^c
Quimotripsina-B canina	84 ± 49	N.I. ^d	N.D. ^c
Elastasa porcina	5000 ± 2000	N.D. ^c	N.D. ^c

Tabla 3.1 Constantes de inhibición (K_i^*) de *EgKU-3* recombinante, *EgKU-8* nativo y recombinante frente a proteasas de serina digestivas. Las constantes fueron calculadas a partir del ajuste a la ecuación 1 en ensayos de inhibición (Figuras 3.1 y 3.2), y corrigiendo por la concentración de sustrato utilizando la ecuación 2. Los valores corresponden al promedio y desviación estándar de al menos tres experimentos.

a: rec, recombinante; b: nat, nativo; c: N.D., no determinado; y d: N.I., no se observó inhibición

Este resultado indica que *EgKU-3* tiene utilidad potencial para determinar la concentración de quimotripsinas.

3.2. *EgKU-3* y *EgKU-8* son inhibidores lentos con un mecanismo de inhibición en dos pasos

Una característica de los inhibidores de proteasas del tipo Kunitz es que la inhibición es lenta, y presenta un mecanismo cinético que involucra dos equilibrios ³⁵. Verificamos que *EgKU-3* y *EgKU-8* tienen este comportamiento típico. Por un lado, estudiamos a *EgKU-8* frente a las tripsinas bovina y caninas; por otro, estudiamos a *EgKU-3* frente a la quimotripsina bovina. Para esto, realizamos el análisis de los cursos temporales de formación de producto en presencia de concentraciones relativamente altas de inhibidor (próximas a pseudo primer orden), sin incubar previamente el inhibidor con la enzima. Los gráficos de los cursos temporales muestran cómo cambia la pendiente en el tiempo, hasta que se estabiliza una vez que se alcanza el equilibrio entre la enzima y el inhibidor. Este comportamiento en el tiempo muestra que *EgKU-3* y *EgKU-8* son inhibidores lentos, ya que les lleva algunos minutos inhibir a la enzima (Figura 3.3 y 3.5).

A partir de los ajustes de los cursos temporales con la ecuación 3 ⁹⁶, se determinaron las constantes exponenciales (k_{obs}) para diferentes concentraciones de inhibidor. Al graficar los valores de k_{obs} vs $[I]$ se obtuvo una hipérbola (Figuras 3.4 y 3.5). Este comportamiento corresponde al mecanismo de inhibición que involucra dos pasos reversibles consecutivos, con el primero relativamente rápido (Esquema 2).

Del ajuste de los datos de k_{obs} vs $[I]$ a la Ecuación 8 se determinaron las constantes K_1 (k_{-1}/k_1) y k_2 . Como los valores de k_2 son muy pequeños, no se pudieron determinar a partir de este ajuste. Para la mayoría de las peptidasas, se determinó k_2 utilizando la Ecuación 9, tomando valores de v_i que mantenían al menos 5% de actividad en relación al v_o , ya que a menor valor de v_i los errores eran muy grandes. Con las tres constantes calculadas se verificó el valor de K_1^* utilizando la Ecuación 10. Los valores calculados de K_1^* a través del análisis de los cursos temporales son comparables a los obtenidos por el ajuste de Morrison. Para *EgKU-8* (tanto nativo como recombinante) frente a la tripsina bovina no se calculó el k_2 con la Ecuación 9, ya que los datos obtenidos de v_i estaban por debajo de 5% de actividad. Por tanto, calculamos este valor de k_2 a partir de la Ecuación 10 utilizando el valor de K_1^* determinado a partir del ajuste de Morrison (Tablas 3.2 y 3.3)⁵⁸.

3.3. Discusión de los estudios funcionales con *EgKU-3* y *EgKU-8*

Nuestros resultados muestran que *EgKU-3* y *EgKU-8* presentan el comportamiento típico de los inhibidores Kunitz en la inhibición de peptidasas de serina. En efecto, son lentos, es decir les lleva cierto tiempo alcanzar el equilibrio de la inhibición. Además, presentan gran afinidad por la enzima que inhiben, siendo tan alta esta afinidad que, si bien la inhibición es reversible, tienden a comportarse como inhibidores irreversibles. En términos generales, el mecanismo de inhibición que presentan involucra dos pasos, el primero que implica una interacción relativamente rápida del inhibidor con la enzima y el segundo que estabiliza el complejo enzima-inhibidor.

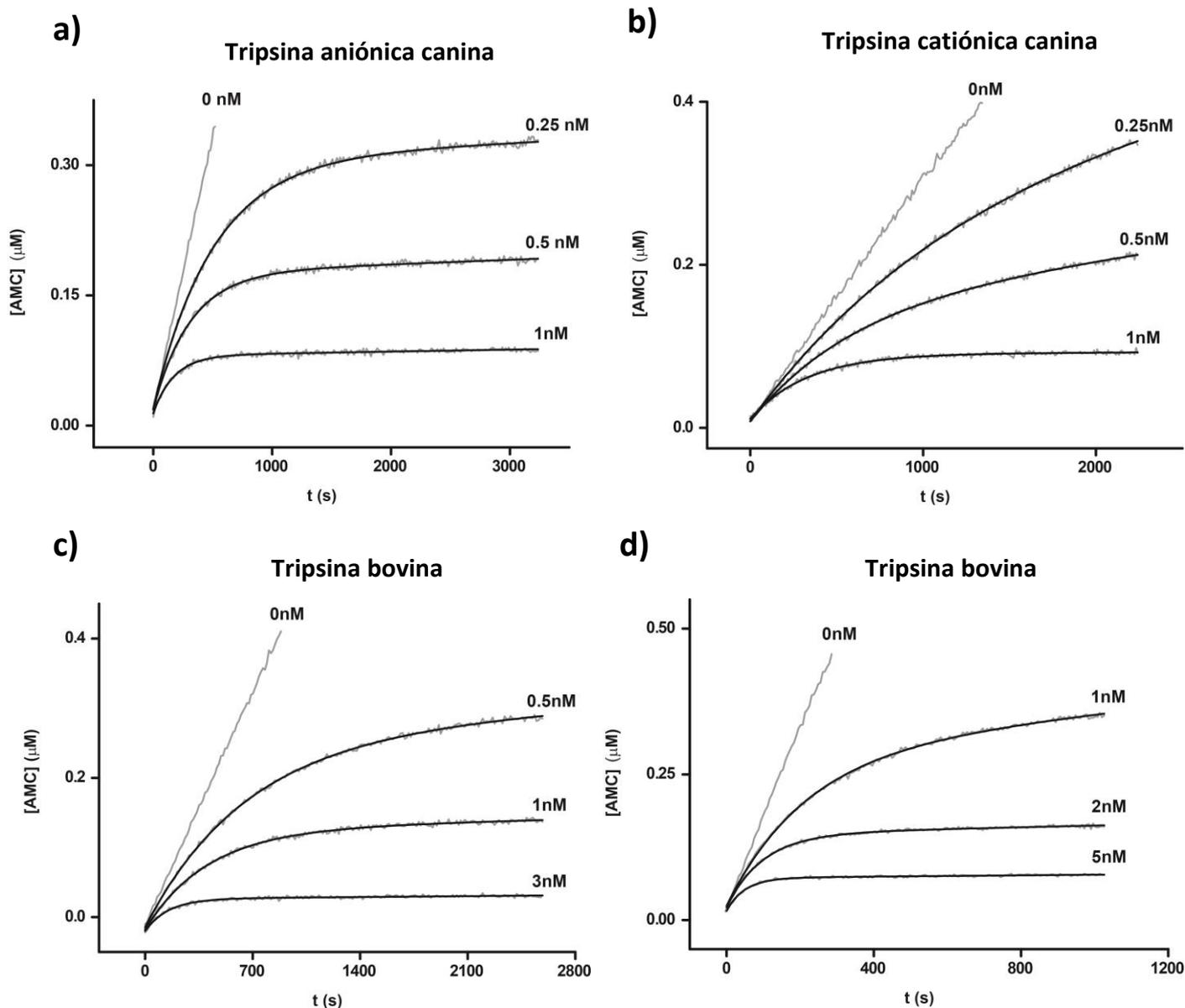


Figura 3.3 Cursos temporales de la inhibición de tripsinas por *EgKU-8*. Se registró la aparición de producto inmediatamente después del agregado de tripsina (0.05 nM) a la mezcla de sustrato (N-t-BOC-Ile-Gly-Arg-AMC, 5 μM) y concentraciones crecientes de *EgKU-8*, en Tris 50 mM, pH 8, 0.01 % Tritón X-100. Las líneas negras muestran los ajustes a la ecuación 3, y los números, las correspondientes concentraciones de *EgKU-8*. *EgKU-8* nativo con: **a)** tripsina aniónica canina, **b)** tripsina catiónica canina y **c)** tripsina catiónica bovina; **d)** *EgKU-8* recombinante con tripsina catiónica bovina.

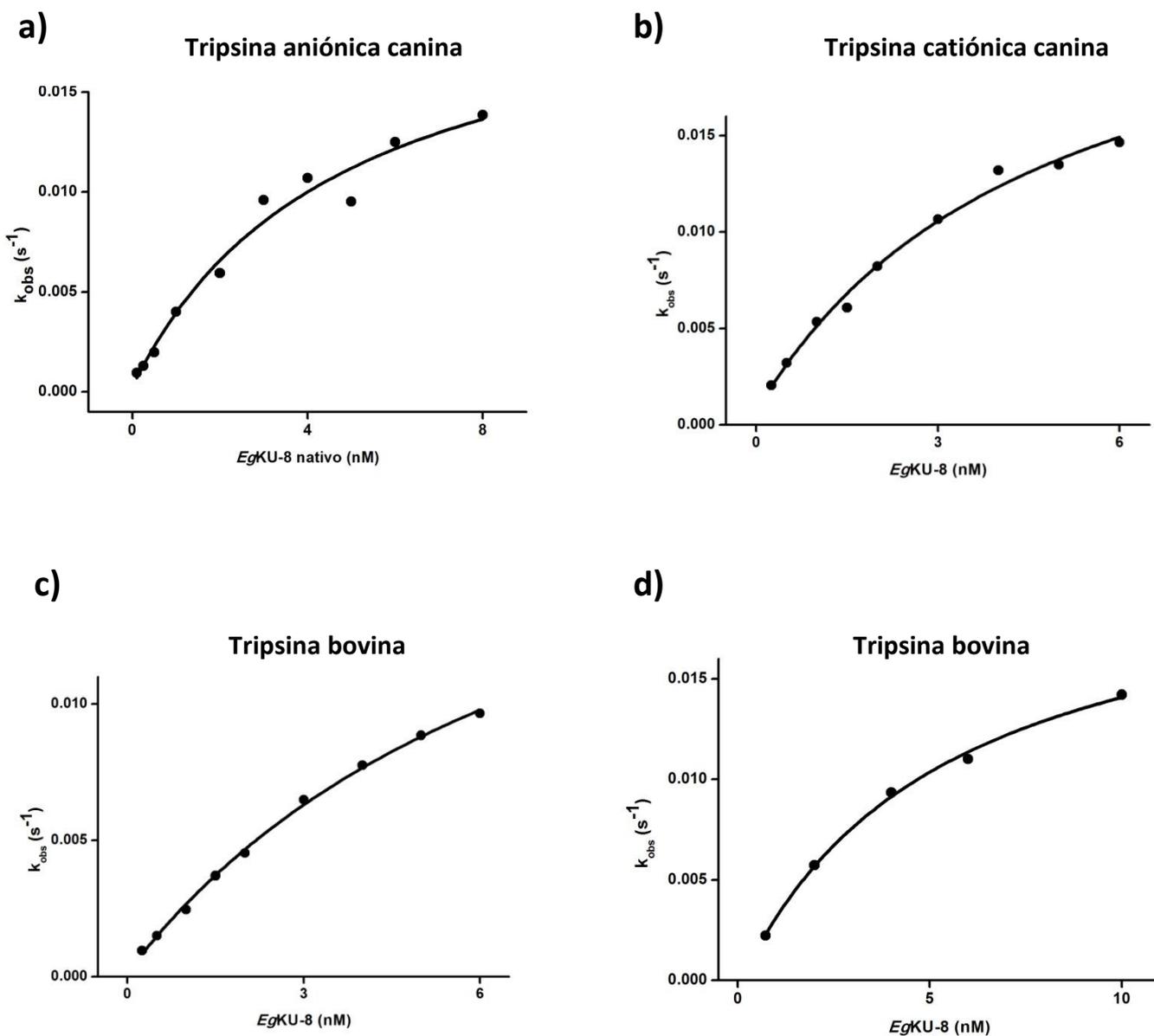


Figura 3.4 Efecto de la concentración de EgKU-8 sobre la constante exponencial. Se inició la reacción añadiendo la enzima correspondiente a la mezcla de sustrato (N-t-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC, 5 μ M) y EgKU-8, en amortiguador Tris 50 mM, pH 8, 0.01 % Tritón X-100, y se siguió la reacción a 37°C. Los valores de k_{obs} son el promedio de al menos dos medidas independientes, y se obtuvieron a partir del mejor ajuste de los cursos temporales a la ecuación 3. Con la línea negra se representa el mejor ajuste a la ecuación hiperbólica (Ecuación 8), que corresponde al mecanismo de inhibición del Esquema 2. Se muestra el efecto de EgKU-8 nativo sobre: **a)** tripsina aniónica canina, **b)** tripsina catiónica canina, y **c)** tripsina catiónica bovina; en los tres casos, la concentración de enzima fue de 0.05 nM para 0.1 a 1 nM de EgKU-8, 0.2 nM para 1 a 5 nM de EgKU-8 y 0.6 nM para 5 a 8 nM de EgKU-8. En **d)** se muestra el efecto de EgKU-8 recombinante sobre tripsina catiónica bovina; la concentración de enzima fue de 0.05 nM para 0.1 a 1 nM de EgKU-8, 0.2 nM para 1 a 4 nM de EgKU-8 y 0.6 para 4 a 10 nM de EgKU-8.

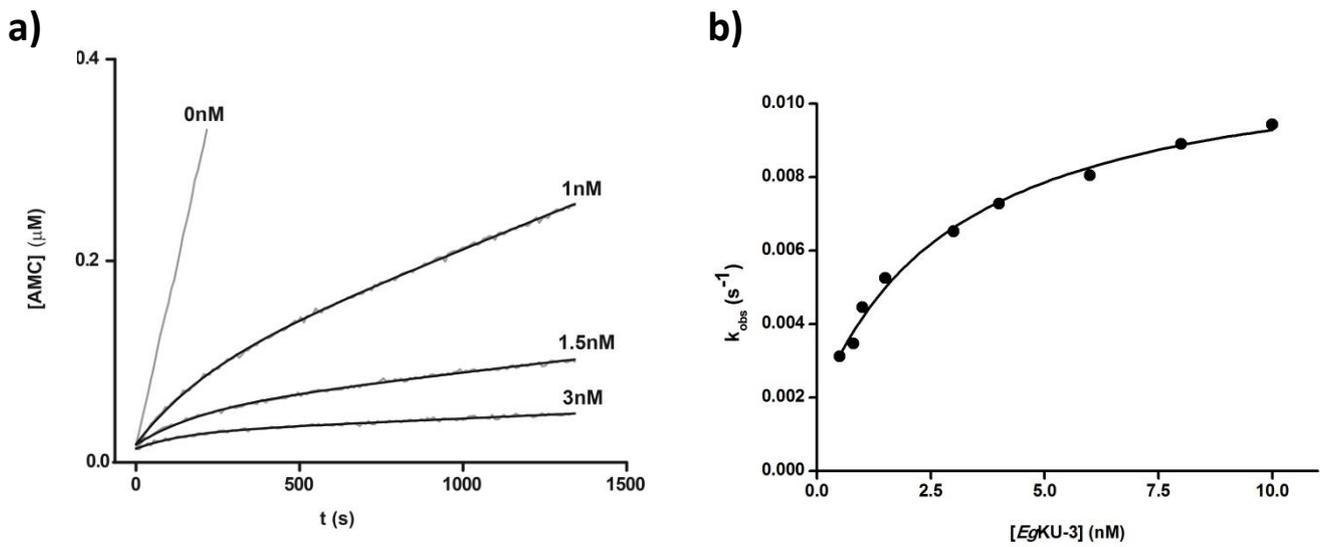


Figura 3.5 Cursos temporales de la inhibición de quimotripsina bovina por *EgKU-3* y efecto de la concentración de *EgKU-3* sobre la constante exponencial. **a)** Cursos temporales de la inhibición de quimotripsina bovina por *EgKU-3*. Se comenzó a registrar la aparición de producto inmediatamente después del agregado de quimotripsina (1 nM) a la mezcla de sustrato (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, 5 μM) y *EgKU-3* (0 a 3 nM), en Tris 50 mM, pH 8, 0.01 % Tritón X-100. Las líneas negras muestran los ajustes a la ecuación 3. **b)** Efecto de la concentración de inhibidor sobre la constante exponencial. La concentración de enzima fue de 0.05 nM para 0.1 a 1 nM de *EgKU-3*, 1 nM para 1 a 3 nM de *EgKU-3* y 2 nM para 3 a 10 nM de *EgKU-3*. Los valores de k_{obs} son el promedio de al menos dos medidas independientes, y se obtuvieron a partir del mejor ajuste de los cursos temporales a la ecuación 3. Con la línea negra se representa el mejor ajuste a la ecuación 8, que corresponde al mecanismo de inhibición del esquema 2.

Constantes cinéticas	Tripsinas		
	Tripsina catiónica bovina	Tripsina aniónica canina	Tripsina catiónica canina
EgKU-8 nativo			
$k_2 \times 10^{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(a)}$	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.6	1.5 ± 0.1
$K_i \text{ (nM)}^{(a)}$	10.2 ± 3.4	4.3 ± 0.5	2.9 ± 1.0
$k_2/K_i \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}^{(a)}$	2.7 ± 0.5	7.0 ± 1.2	6.0 ± 2.0
$k_{-2} \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(b)}$	2.3 ± 0.3 ^c	1.1 ± 0.7	1.1 ± 0.5
$K_i^* \text{ (pM)}^{(d)}$	N.D. ^e	16 ± 3	21 ± 6
EgKU-8 recombinante			
$k_2 \times 10^{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}^{(a)}$	2.8 ± 1.9	N.D. ^e	N.D. ^e
$K_i \text{ (nM)}^{(a)}$	19 ± 13	N.D. ^e	N.D. ^e
$k_2/K_i \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}^{(a)}$	3.8	N.D. ^e	N.D. ^e
$k_{-2} \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	0.73 ^c	N.D. ^e	N.D. ^e
$K_i^* \text{ (pM)}$	N.D. ^e	N.D. ^e	N.D. ^e

Tabla 3.2 Cinética de inhibición de tripsinas bovina y caninas por EgKU-8 nativo y recombinante

^a k_2 , K_i y k_2/K_i se determinaron a partir de los cursos temporales (Figuras 3.3 y 3.4). Los valores son el promedio de al menos dos experimentos independientes con el error estándar correspondiente.

^b k_{-2} se calculó mediante la ecuación 9 a partir de cursos temporales. Los valores corresponden al promedio de quince experimentos independientes con el respectivo desvío estándar.

^c k_{-2} se calculó a partir de la ecuación 10 utilizando el valor de K_i^* determinado en los experimentos de inhibición (Figura 3.1 y Tabla 3.1). El valor corresponde al promedio de dos experimentos independientes con su respectivo error estándar.

^d K_i^* se calculó a partir de la ecuación 10 utilizando los valores de k_2 , K_i y k_{-2} obtenidos de los cursos temporales. Los valores corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes con su respectivo error estándar.

^e N.D. no determinado.

<i>EgKU-3</i>	
Constantes cinéticas	Quimotripsina bovina
$k_2 \times 10^{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ^(a)	1.2 ± 0.2
$K_i \text{ (nM)}$ ^(a)	3.2 ± 1.2
$k_2/K_i \times 10^6 \text{ (M}^{-1} \text{s}^{-1}\text{)}$ ^(a)	3.8 ± 2.0
$k_{-2} \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ ^(b)	2.8 ± 2.3
$K_i^* \text{ (pM)}$ ^(c)	73.2 ± 29.6

Tabla 3.3 Cinética de inhibición de quimotripsina bovina por *EgKU-3* recombinante

^a k_2 , K_i y k_2/K_i se determinaron a partir de los cursos temporales (Figura 3.5). Los valores son el promedio de al menos dos experimentos independientes con el error estándar correspondiente.

^b k_{-2} se calculó mediante la ecuación 9 a partir de cursos temporales. Los valores corresponden al promedio de quince experimentos independientes con el respectivo desvío estándar.

^c K_i^* se calculó a partir de la ecuación 10 utilizando los valores de k_{-2} , K_i y k_2 obtenidos de los cursos

3.3.1. *EgKU-8* como inhibidor de tripsinas

Como ya se comentó, *EgKU-8* es un potente inhibidor de alta afinidad de tripsinas. No es un inhibidor tan potente de la quimotripsina-A bovina y no presentó actividad inhibitora de quimotripsina-B canina. Su patrón de inhibición es muy similar al descrito para el BPTI. Esta similitud es consistente con el parecido que presenta *EgKU-8* con el BPTI en el sitio P1 y los 8 a 10 residuos que lo rodean en el bucle canónico anti-peptidasa (a ambos lados de la Cys14, que junto con la Cys38 forma el enlace disulfuro que estabiliza el bucle). El bucle de *EgKU-8* también es muy similar al del TFPI-2 (el dominio 2 del inhibidor de la vía del factor tisular de la coagulación), otro potente inhibidor tipo Kunitz de tripsina (y de plasmina) (Figura 3.6; ⁵⁸). Estos residuos determinan la especificidad del inhibidor por las peptidasas de serina que inhibe; en particular, el P1 es responsable del 50% de la especificidad.

Inhibidor	NH ₂ -	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'	P5'	-COOH
<i>EgKU-8</i>	-	D	P	G	F	C	R	A	Y	F	P	R	-
BPTI	-	Y	T	G	P	C	K	A	R	I	I	R	-
TFPI-2_Domain 1	-	D	Y	G	P	C	R	A	L	L	L	R	-

Figura 3.6 Secuencia de aminoácidos del bucle anti-peptidasas de *EgKU-8*. Los residuos de las posiciones 10 a 20 de *EgKU-8* es comparada con los respectivos residuos de BPTI (sp P00974) y TFPI-2 Domain 1 (sp P48307).

Como se comentó más arriba, la inhibición de tripsinas por *EgKU-8* es lenta y de alta afinidad al igual que la de otros inhibidores del tipo Kunitz con sus blancos fisiológicos. De los gráficos de cursos temporales se puede apreciar que, como se esperaba, es también un inhibidor reversible, pues se observa actividad enzimática incluso a concentraciones mayores a la estequiométrica de inhibidor una vez alcanzado el equilibrio. Si fuera irreversible no habría actividad remanente cuando la concentración de inhibidor supera la de enzima. Por otro lado, la estabilidad del complejo enzima-inhibidor se refleja en el pequeño valor de la constante de disociación, siendo del orden de 10^{-4} s^{-1} . El valor de k_2/K_i , la constante aparente de segundo orden para la formación del complejo (k_{on}), es del orden de $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, similar al reportado para otros inhibidores del tipo Kunitz, aunque el valor de k_2 de 10^{-4} s^{-1} es varios ordenes más rápido que el del BPTI que es de 10^{-8} s^{-1} ¹⁰⁰. Esto se refleja en la estabilidad del BPTI con la tripsina bovina, cuyo complejo puede durar del orden de 30 años ¹⁰¹.

En los estudios de inhibición de las tripsinas caninas, se observa que el K_i^* de *EgKU-8* es tres veces más chico que con la tripsina bovina (Tabla 3.2). Este resultado podría sugerir que las tripsinas caninas sean su blanco fisiológico. No obstante, hay que tener en cuenta que los valores de K_M de las tripsinas caninas para el mismo sustrato también son tres veces menores que el obtenido con la tripsina bovina, indicando que la diferencia en el K_i^* seguramente se deba a una característica de las propias enzimas y no a la eficiencia que *EgKU-8* podría haber adquirido evolutivamente para actuar sobre las tripsinas caninas. Debido a estas observaciones, analizamos los aminoácidos que estarían involucrados en la interacción con el sustrato y los inhibidores en estas enzimas. El sitio de unión al sustrato de la tripsina está

formado por los residuos 189-195 (bucle 1) y 214-220 (bucle 2) (numeración de la quimotripsina; ¹⁰². Las tres tripsinas son idénticas en estos bucles excepto en el residuo de la posición 217, que es Ser en la tripsina bovina, Ala en la catiónica canina y Tyr en la aniónica. Es interesante que la tripsina aniónica del salmón del Atlántico también tiene una Tyr en la posición 217, y que la presencia de este residuo fue utilizada para explicar discrepancias similares a las nuestras en el comportamiento de la tripsina de salmón respecto a la bovina. En ese caso, las diferencias derivaron de variaciones en el entramado de puentes de hidrógeno en el bolsillo de unión al sustrato y el respectivo complejo enzima-sustrato/inhibidor: en el caso de la tripsina de salmón, se forman directamente enlaces de hidrógeno en los complejos del sustrato e inhibidor con la tripsina, que no se forman con la tripsina bovina (en su lugar, son mediados por agua debido a la Ser 217). Las diferencias observadas en nuestros datos podrían explicarse de manera similar ^{103,104,58}.

En suma, nuestros resultados nos permiten afirmar que *EgKU-8* es un inhibidor lento de alta afinidad de tripsinas, pudiendo ser estas enzimas su blanco fisiológico, aunque también podrían serlo otras peptidasas de serina con una actividad similar a la de la tripsina. En virtud de que *EgKU-8* está presente en secreciones de protoescólex ⁵⁸ y también en líquido hidático y secreciones de adultos (nuestros datos no publicados), podría interferir con la actividad de peptidasas de ese tipo presentes en el duodeno, y contribuir al establecimiento y persistencia de la infección en el hospedero definitivo. Asimismo, la presencia de *EgKU-8* en el líquido hidático indica que también podría participar en la interacción del parásito con el hospedero intermediario.

3.3.2. *EgKU-3* como inhibidor de quimotripsinas

Por su parte, *EgKU-3* se comportó como un potente inhibidor de alta afinidad de quimotripsina, observándose actividad tanto con la quimotripsina-A bovina como con la quimotripsina-B canina, con valores de K_i^* comparables, ambos del orden de 10^{-11} M. Estos valores son de los más pequeños registrados en la base de datos Merops (<http://merops.sanger.ac.uk/>), en la que existen datos de solo dos inhibidores con tan alta afinidad por la quimotripsina, ambos con quimotripsina-A bovina. Uno de ellos es un inhibidor Kunitz (BmCl) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y presenta un K_i^* del orden de 10^{-12} M ¹⁰⁵. El otro, AeTi de *Archidendron ellipticum*, anotado como perteneciente a la familia I3 de inhibidores Kunitz de peptidasas de serina presentes en leguminosas, cuyo prototipo es el inhibidor de tripsina de soja (STI, del inglés “soybean trypsin inhibitor”); presenta un K_i^* del orden de 10^{-11} M ¹⁰⁶. No obstante, solo se conoce su secuencia parcial (20 aminoácidos). Hasta el momento, no se han descrito inhibidores de quimotripsina-B de alta afinidad, probablemente debido a que existen muy pocos estudios con esta enzima. Es de destacar que la estabilidad del complejo enzima-inhibidor de *EgKU-3* con quimotripsina bovina presenta un comportamiento similar al de *EgKU-8* con tripsina, siendo el valor de k_2/K_i (k_{on}) también del orden de 10^6 M⁻¹ s⁻¹, y el de k_{-2} de 10^{-4} s⁻¹ (Tabla 3.3).

EgKU-3 inhibe quimotripsina-B, a diferencia de *EgKU-8* y el BPTI que no inhiben esta quimotripsina pero sí quimotripsina-A. La alta afinidad de *EgKU-3* por las quimotripsinas se explica por la Leu que presenta en el residuo P1, que contrasta con la Arg de *EgKU-8* (y la Lys del BPTI). Además, el bucle anti-peptidasa de *EgKU-3* posee otras diferencias con el de *EgKU-8*. Estas son: Lys en lugar de Asp en P6, Ala en lugar de Pro en P5, Met en lugar de Phe en P3, Gly

en lugar de Ala en P1' y Lys en lugar de Arg en P5' (los bucles anti-peptidasa de *EgKU-3* y *EgKU-8* difieren en un 50%, en tanto los correspondientes polipéptidos maduros -sin el péptido señal- difieren en 37%) (Figura 3.7). Como esta región complementa la especificidad por la enzima que determina el sitio P1¹⁰⁷, seguramente esas diferencias sean relevantes en el bloqueo de quimotripsina-B, especialmente las observadas en los residuos ubicados previo a la Cys.



Figura 3.7 Alineamiento de *EgKU-3* con otros inhibidores Kunitz que inhiben peptidasas de serina. Comparación de la secuencias de *EgKU-3* con *EgKU-8*, BPTI (sp P00974) y BmCI. El alineamiento fue construido con el programa Clustal W2. En letras rojas se marca el bucle anti-peptidasas y con una flecha negra el sitio P1.

El sitio de unión al sustrato de la quimotripsina está formado por los residuos 189-195, 214-220 y 225-228 que forman el bolsillo de unión al sustrato. Éstos se distribuyen en dos barriles β que constan de seis segmentos antiparalelos y dos bucles que van desde 184-195 y 216-223. La estructura del bolsillo está estabilizada por un enlace disulfuro entre las Cys 191 y Cys 220 y por una red de enlaces de hidrógeno entre los residuos del bolsillo¹⁰⁸. Según la base de datos Merops, el perro posee cuatro isoformas de quimotripsina, todas del tipo B. Nuestra fuente de quimotripsina canina fue una fracción purificada de páncreas, por lo cual suponemos que probablemente es una mezcla de distintas isoformas. La región involucrada en la interacción con el sustrato de la quimotripsina-B es muy similar a la de la quimotripsina-A. La única diferencia que presentan con ella todas las quimotripsinas caninas es en el aminoácido 218, que es Gly en lugar de Ser. Además, el sitio 226 es diferente en dos de las cuatro isoformas, que poseen Ala en lugar de Gly. Al asumir que utilizamos una mezcla de las cuatro isoformas, en principio, *EgKU-8* no inhibiría ninguna de ellas, lo que indica que el residuo 218 podría tener una relevancia importante en la interacción con el inhibidor.

Por otro lado, Péter Hudáky y col y observaron que las quimotripsinas-A bovina y B de rata difieren en su actividad frente a diferentes sustratos, y muestran susceptibilidad distinta frente a varios inhibidores. Para explicar este comportamiento, analizaron sus diferencias en el sitio activo; vieron que las quimotripsinas A/B poseen respectivamente en los residuos: 218, Ser/Gly; 219, Tyr/Val; y 226, Gly/Ala. Asimismo, mediante un análisis estructural de la quimotripsina-A, concluyeron que las diferencias en 218 y 219 no explicarían las diferencias de actividad, ya que estos residuos apuntan hacia el solvente y no interaccionan con el sustrato. En cambio, el residuo 226 sí interaccionaría con el sustrato. Más aún, al mutarlo por Gly en la quimotripsina B, observaron que la actividad de la enzima mutante era similar a la de la A, por lo que concluyeron que el residuo 226 explicaba las diferencias de actividad¹⁰⁹. En nuestro

caso, no observamos una diferencia en el K_M , para el sustrato que trabajamos, entre la quimotripsina A y la fracción que contiene las quimotripsinas B. Tal vez esto sea debido a la actividad de las isoformas que presentan Gly en el residuo 226. Asimismo, podría suceder que el residuo en la posición 218 estuviera involucrado en la interacción con el inhibidor y no fuera tan relevante en la interacción con el sustrato.

En suma, *EgKU-3* es un excelente inhibidor lento de alta afinidad de quimotripsinas. Presenta una muy potente actividad sobre la quimotripsina-B canina, siendo ésta una buena candidata como blanco fisiológico de esta molécula, aunque también podrían serlo otras peptidasas de serina con una actividad similar. Además, las propiedades de *EgKU-3* en la inhibición de quimotripsinas lo hacen un potencial reactivo para titular quimotripsinas, en particular la isoforma B para la que no se conocen inhibidores tan potentes. Al igual que *EgKU-8*, *EgKU-3* está presente en secreciones de protoescoléx⁵⁸, en líquido hidático y secreciones de adultos (nuestros datos no publicados), por lo que podría contribuir tanto al establecimiento y persistencia de la infección en el hospedero definitivo como participar en la interacción del parásito con el hospedero intermediario.

4. *EgKU-7* es un inhibidor de tripsinas con características particulares

Estudios previos a esta tesis, realizados en conjunto con el Lic. Leonardo Pellizza, habían mostrado que, al igual que *EgKU-8*, *EgKU-7* es un inhibidor de alta afinidad de tripsina (ambos poseen arginina en el sitio P1). No obstante, los estudios de los cursos temporales de la inhibición sobre tripsina bovina revelaron diferencias entre ellos. Efectivamente, los gráficos de k_{obs} vs [*EgKU-7*] presentaron un comportamiento lineal en lugar del hiperbólico típico. Esto indica que, a diferencia de los inhibidores Kunitz típicos, *EgKU-7* presentaría un mecanismo de inhibición de un único paso en lugar de dos pasos consecutivos, con el primero más rápido. Este comportamiento nos sedujo, y nos llevó a realizar estudios para confirmarlo e intentar explicarlo. Además, nos interesó estudiar si, actuando sobre tripsinas caninas (candidatas a blancos fisiológicos), *EgKU-7* presenta el mismo comportamiento que el observado sobre la tripsina bovina.

4.1. *EgKU-7* se perfila como un inhibidor lento con dos sitios de unión

Profundizamos los estudios de actividad inhibidora de *EgKU-7* sobre la tripsina bovina. En una primera instancia buscamos determinar el valor de K_i^* a partir de experimentos de velocidad de hidrólisis del sustrato artificial en función de la concentración de inhibidor. Llamativamente, a diferencia de lo que había ocurrido con *EgKU-3* y *EgKU-8*, los datos no se ajustaron bien a la ecuación de Morrison, cuando se intentó ajustarlos en el programa Origin 8.1 fijando la concentración de enzima activa utilizada en el experimento (Figura 4.1). Se descartó que el mal ajuste se debiera a una mala estimación de la concentración de *EgKU-7* y/o de la tripsina activa, verificando la concentración de *EgKU-7* por absorbancia a 280 nm y la de enzima activa mediante titulación con BPTI. También verificamos por absorbancia a 280 nm la concentración del BPTI utilizado en la titulación. Los resultados indicaron que no había error en la estimación de las concentraciones, de manera que se confirmó que la distribución de los datos de velocidad vs [*EgKU-7*] efectivamente no se ajusta bien a la ecuación de Morrison.

En el experimento de velocidad vs [*EgKU-7*], se observó que la velocidad disminuía más de lo esperado, es decir *EgKU-7* parecía inhibir más que un inhibidor de alta afinidad. Para explicar esto, nos planteamos si podría ocurrir que *EgKU-7* tuviese dos sitios de interacción en lugar de uno con la tripsina. Al analizar los datos con el programa Dynafit para un modelo con un sitio de unión, se repitió el mal ajuste observado por la ecuación de Morrison. En cambio, para un modelo con dos sitios de unión independientes, se obtuvo un muy buen ajuste. De este último ajuste se determinaron dos valores de K_i ($K_i^a = 14 \pm 5$ pM y $K_i^b = 248 \pm 118$ pM) (Figura 4.1 y Tabla 4.1).

Continuando con la caracterización del inhibidor, se realizaron estudios de los cursos temporales de la inhibición de tripsina bovina. Se verificó que *EgKU-7* es un inhibidor lento, que alcanza el equilibrio en tiempos del orden de varios minutos, como lo descrito para los inhibidores del tipo Kunitz, similar a lo observado con *EgKU-3* y *EgKU-8* (Figura 4.2a). Se verificó también que es un inhibidor reversible, pues se observó actividad remanente una vez alcanzado el equilibrio, incluso a concentraciones mayores de inhibidor que de enzima. Además, se confirmó que los gráficos de k_{obs} vs [*EgKU-7*] presentan un comportamiento lineal (Figura 4.2b). Esto indicaría que la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7*, a diferencia de

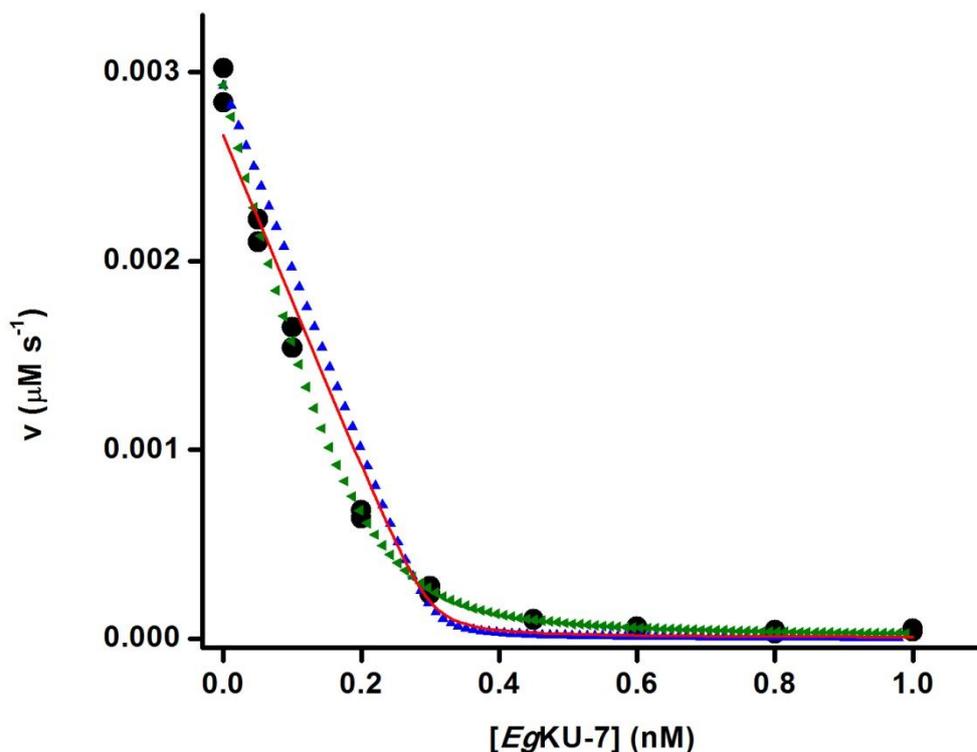


Figura 4.1 Inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7*. La tripsina bovina (0.3 nM) se preincubó con la correspondiente concentración de *EgKU-7* (de 0 a 1 nM) durante 15 minutos. Se inició la reacción agregando 5 μM de sustrato. Se grafica la velocidad de formación de producto en función de la concentración de *EgKU-7*: la línea roja muestra el ajuste a la ecuación de Morrison realizado con Origin 8.1; los triángulos azules, el ajuste al modelo de un sitio de unión realizado con Dynafit; los triángulos verdes, el ajuste con Dynafit al modelo de dos sitios de unión independientes.

Constantes de inhibición de tripsinas con <i>EgKU-7</i>			
<i>EgKU-7</i>	Tripsina bovina	Tripsina catiónica canina	Tripsina aniónica canina
K_i^a (pM) ^(a)	14 ± 5	12.6	2.7 ± 3.2
K_i^b (pM) ^(a)	248 ± 118	12.6	151 ± 64
<i>EgKU-7</i> Hid			
K_i^* (pM) ^(b)	700 ± 30	N.D. ^(c)	N.D. ^(c)
<i>EgKU-7</i> sin C-term			
K_i^* (pM) ^(b)	26 ± 6	N.D. ^(c)	N.D. ^(c)

Tabla 4.1 Constantes de inhibición de tripsinas con *EgKU-7*

^a K_i^a y K_i^b fueron determinadas a partir del ajuste de los datos de v vs $[\text{EgKU-7}]$ con el modelo de dos sitios de unión independientes utilizando el programa Dynafit (figuras 4.1 y 4.14)

^b K_i^* fue calculada mediante el ajuste de los datos v vs $[\text{EgKU-7}]$ a la ecuación de Morrison (ecuación 1) (figuras 4.13 y 4.22)

^c N.D. No determinadas

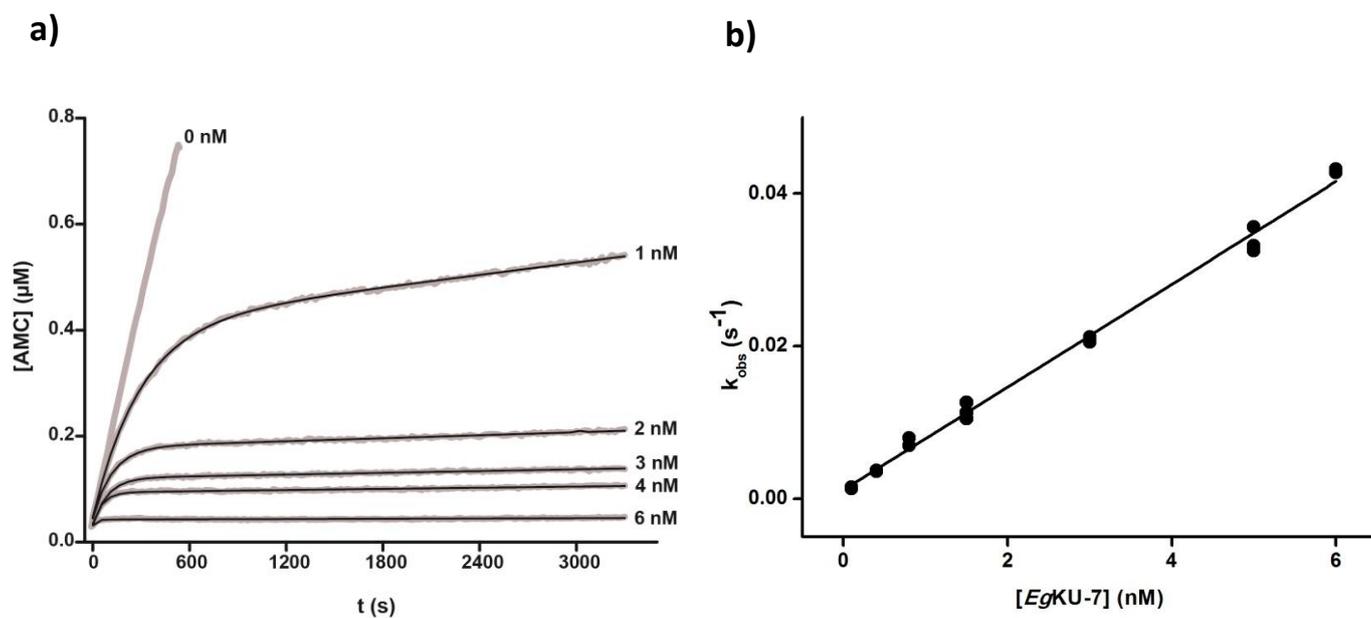


Figura 4.2 Inhibición en el tiempo de tripsina bovina por EgKU-7. **a)** Curso temporal de la inhibición de tripsina bovina por EgKU-7. Se incubó EgKU-7 (0-6 nM) con 5 μM de sustrato y se inició la reacción agregando 0.6 nM de tripsina. Con la línea negra se representa el ajuste a una función exponencial más recta (ecuación 3) utilizando el programa Origin 8.1. **b)** Constante exponencial k_{obs} , obtenida a partir del ajuste de los cursos temporales, en función de la concentración de EgKU-7 (de 0 a 6 nM). La concentración de enzima utilizada fue 0.05 nM entre 0.1-1.5 nM de EgKU-7, 0.3 nM entre 1.5-5 de EgKU-7 y de 0.6 nM entre 5-6 nM de EgKU-7. Se observa un comportamiento lineal compatible con un mecanismo de inhibición de un único paso de orden dos. La línea representa el mejor ajuste a la ecuación de la recta.

otros inhibidores del tipo Kunitz como *EgKU-8*, no presenta evidencia de alcanzarse en dos pasos sucesivos, con la primera unión rápida del ligando seguida de un paso lento, sino que puede explicarse a través de un único paso de orden dos. En este caso, la k_1 tendría un valor de $(5 \pm 2) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la k_{-1} $(2.1 \pm 0.2) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; de estas se puede calcular el valor de K_i^* (k_{-1}/k_1) que da $43 \pm 11 \text{ pM}$ (Tabla 4.2). Este valor de K_i^* es tres veces mayor que el más pequeño (K_i^*) calculado con el programa Dynafit para el modelo con dos sitios de interacción de *EgKU-7* con la tripsina.

4.2. *EgKU-7* es hidrolizado por la tripsina bovina

Cuando observamos en detalle los cursos temporales de la inhibición, notamos que la pendiente luego de aproximadamente 1200 s aumenta significativamente. Es decir, la tripsina parecía recuperar actividad. En la Figura 4.3 se muestra un experimento representativo en el que se ve claramente este efecto. Para estudiarlo, realizamos cursos temporales de larga duración, de aproximadamente 8 horas, mediante los que verificamos que efectivamente la pendiente aumentaba desde valores de $1.2 \times 10^{-5} \mu\text{M s}^{-1}$ (de 1000 a 2000 s) hasta valores de $3.4 \times 10^{-5} \mu\text{M s}^{-1}$ (de 30000 a 35000 s), manteniéndose estable luego de dos horas (Figura 4.4). Vale aclarar que, si bien la pendiente aumentó, se mantuvo dos órdenes de magnitud por debajo de la pendiente obtenida en ausencia de inhibidor ($1.5 \times 10^{-3} \mu\text{M s}^{-1}$); es decir, la hidrólisis del sustrato artificial se mantenía fuertemente inhibida. Estos resultados sugieren que *EgKU-7* se modifica cuando se incuba con la tripsina bovina por períodos prolongados. Para comparar, realizamos en paralelo experimentos de cursos temporales de larga duración de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-8*; observamos que *EgKU-8* parece mantener la mayor parte de la inhibición durante las 8 horas que duró el experimento.

Una posible interpretación para este fenómeno de cambio en el patrón de inhibición es la modificación de *EgKU-7*, posiblemente debido a que es hidrolizado por la tripsina. Como mantiene gran parte de su actividad inhibidora, pensamos inicialmente que *EgKU-7* se hidrolizaba en el sitio P1 manteniéndose la estructura gracias a los enlaces disulfuro y, en consecuencia, parte de su actividad. Para verificar esto, realizamos geles de SDS-PAGE en amortiguador de tripsina de *EgKU-7* incubado con tripsina a 37°C durante períodos de tiempo crecientes. Para estos experimentos, utilizamos concentraciones de 2 y 20 μM de tripsina y *EgKU-7*, respectivamente, que mantienen las relaciones de concentración utilizadas en los cursos temporales; a su vez, corrimos las mismas muestras en presencia y ausencia del reductor DTT (Figura 4.5).

En los geles se verifica que *EgKU-7* se va hidrolizando a medida que transcurre el tiempo. En presencia del reductor DTT, se observa que la banda correspondiente a *EgKU-7* pierde intensidad en el transcurso de la incubación con tripsina bovina. En consecuencia, aparece otra banda de menor tamaño, que se observa desde que se mezcla *EgKU-7* con la tripsina y aumenta su intensidad a medida que transcurren las primeras horas de incubación. Además, aparece otra banda, de menor tamaño aún, luego de pasadas las cuatro horas de incubación, observándose bien definida a las 24 horas. Por tanto, a las 24 horas de incubación, además de la banda correspondiente a la tripsina se observan tres bandas: una muy tenue correspondiente a *EgKU-7* sin hidrolizar y otras dos, de menor tamaño, que corresponderían a productos de la hidrólisis de *EgKU-7*. Por el perfil de migración de las bandas observadas y por

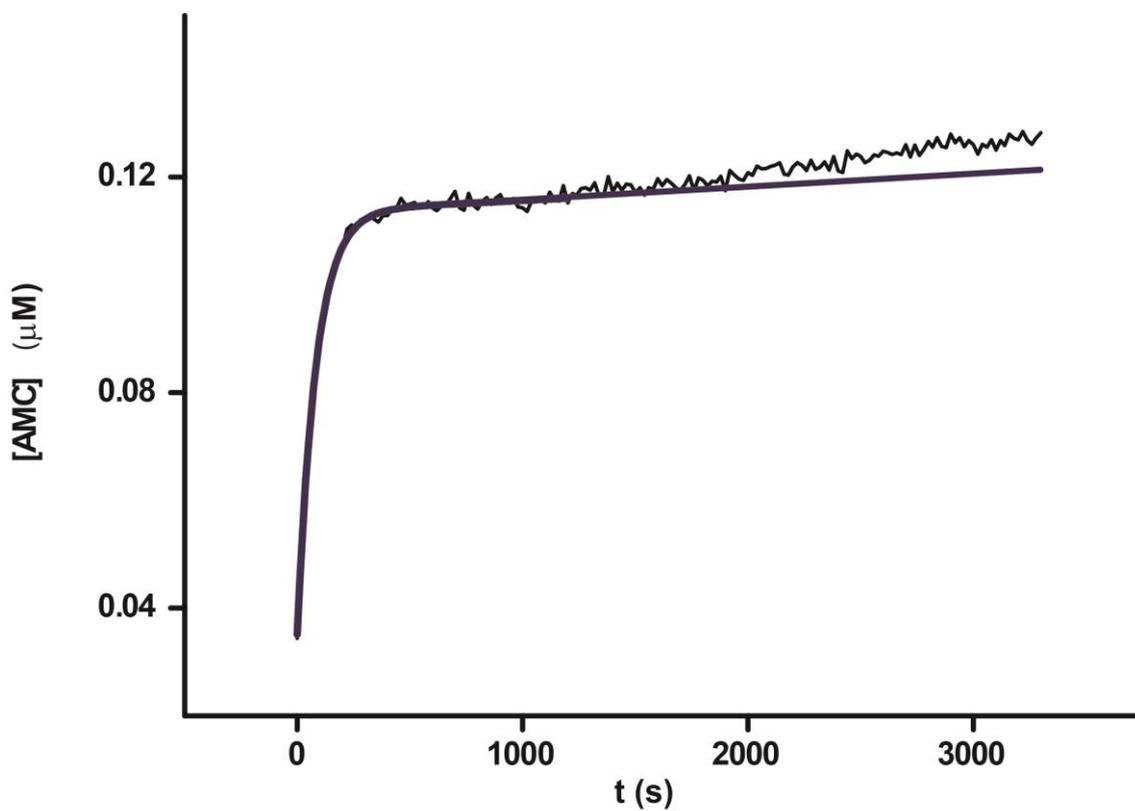


Figura 4.3 Detalle del curso temporal de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7*. Se incubó *EgKU-7* 3 nM con 5 μM de sustrato. Se inició la reacción agregando 0.6 nM de tripsina. Se graficó la formación de producto en función del tiempo. En azul, se muestra el ajuste a la ecuación exponencial más recta (ecuación 3) hasta los 1200 segundos; se extendió la fase lineal para ilustrar que se recupera actividad.

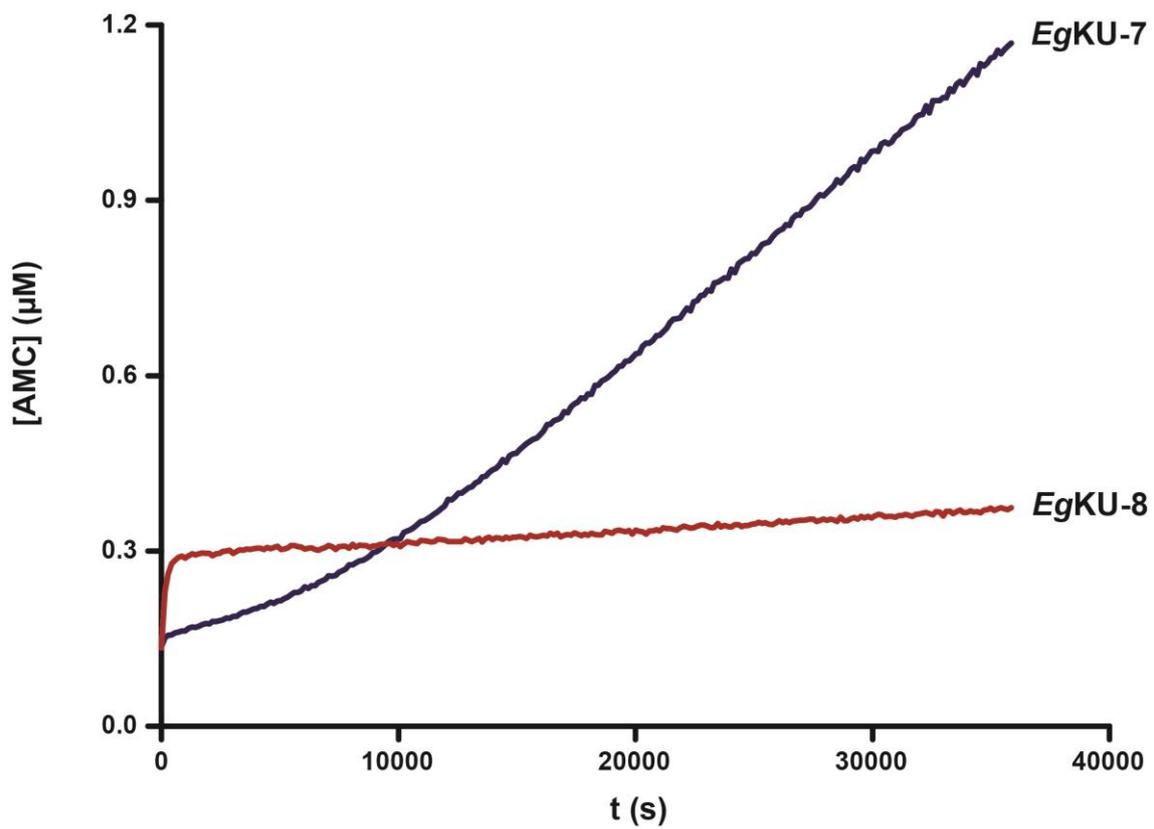


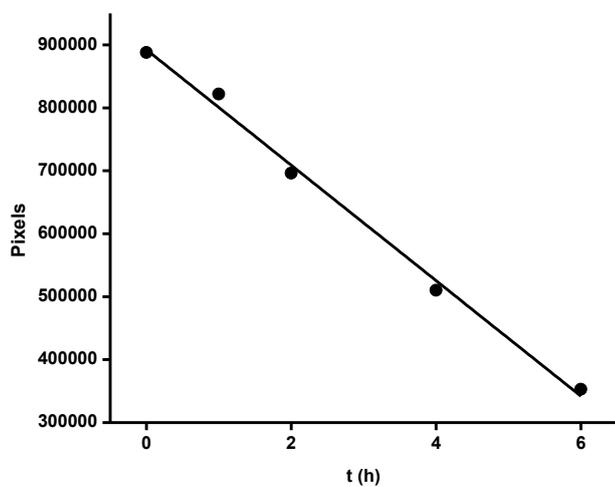
Figura 4.4 Curso temporal de la estabilidad de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* y *EgKU-8*. Se incubó 3 nM de *EgKU-7* o de *EgKU-8* con 5 µM de sustrato y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. Se graficó la formación de producto en función del tiempo. En azul, se muestra el curso temporal de la inhibición por *EgKU-7* y en rojo, por *EgKU-8*.

las evidencias de los sitios de hidrólisis obtenidos en los análisis por espectrometrías de masa (ver más adelante), la banda inmediatamente más pequeña a la de *EgKU-7* correspondería al fragmento C-terminal luego de la hidrólisis en el sitio P1, teniendo una masa de 7526.1 Da. La que le sigue en tamaño correspondería al mismo fragmento pero hidrolizado a nivel de la extensión C-terminal del dominio, teniendo una masa de 5077.5 Da (Figura 4.5c). El fragmento N-terminal derivado del corte en P1 tiene un PM de 3600.0 Da, y es muy pequeño para poder visualizarse en el gel; además, se podría hidrolizar en el medio. Las extensiones N- y C-terminal del dominio Kunitz, que también presentan pesos moleculares muy pequeños, 1535.7 y 2462.6 Da respectivamente, tampoco se visualizan.

En el gel en ausencia de reductor, se observa también la aparición de dos bandas de menor tamaño a la correspondiente a *EgKU-7*, a medida que transcurre el tiempo de la incubación con tripsina bovina. Primero aparece, ni bien se mezcla con la tripsina, una banda más pequeña que *EgKU-7*. Esta podría corresponder a *EgKU-7* hidrolizado en el sitio P1; esta hidrólisis le podría permitir migrar más que cuando no está hidrolizado aunque conserve los enlaces disulfuro. Adicionalmente, es posible, que este fragmento haya perdido la porción N-terminal, lo cual contribuiría a explicar su mayor migración. Al igual que en el gel con reductor, aproximadamente a las cuatro horas de incubación aparece otra banda de menor tamaño aún, que se observa claramente a las 24 horas, y correspondería a *EgKU-7* hidrolizado en las extensiones C y N-terminales del dominio y en el sitio P1. A diferencia del gel con DTT, no se observa a las 24 horas la banda muy tenue que corresponde a *EgKU-7* sin hidrolizar; seguramente, esto sea consecuencia de cómo se resolvió este gel, ya que se sembraron las mismas muestras que en el gel con reductor.

Digitalizamos y cuantificamos las bandas del gel con reductor por densitometría utilizando el programa Image Studio Lite 5.0, para observar gráficamente el perfil de desaparición de *EgKU-7* y de aparición de las nuevas bandas. Por un lado, estudiamos cómo disminuye la intensidad de la banda correspondiente a *EgKU-7* en el tiempo (Figura 4.6a) y, a partir de esos datos, estimamos la constante de hidrólisis de *EgKU-7* para la tripsina bovina (k_{Hid}). Considerando que la enzima está saturada con *EgKU-7* y que se está en presencia de una cinética de orden cero, se espera que la concentración de *EgKU-7* disminuya linealmente con el tiempo. Sabemos que el valor de la intensidad de la banda de *EgKU-7* a tiempo cero corresponde a 6.3 μg de proteína (5.7×10^{-10} moles, PM = 11104.2 Da) que, a su vez, corresponden a 20 μM de *EgKU-7*. Teniendo en cuenta este dato, estimamos la velocidad de hidrólisis a partir de la pendiente; obtuvimos un valor de $2.0 \times 10^6 \text{ M h}^{-1}$. Como estamos en condiciones de V_{Max} , dividiendo la velocidad por la concentración de tripsina utilizada en el experimento obtuvimos un valor aproximado de k_{Hid} de $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ($t_{1/2} = 44$ minutos). Dividiendo k_{Hid} por el valor de K_i de *EgKU-7* (utilizamos el K_i^a obtenido del ajuste por Dynafit), obtuvimos el valor de la constante de orden dos: $1.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es mayor que el presentado por el sustrato artificial N-t-BOC-IEGR-AMC $k_{cat}/K_M = 50 \text{ s}^{-1}/85 \times 10^{-6} \text{ M} = 5.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, indicando una mayor eficiencia de la tripsina bovina en la hidrólisis de *EgKU-7* que en la de este sustrato (k_{cat} y K_M fueron determinados en el laboratorio durante mi tesis de grado). El valor de k_{Hid} de $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ es comparable al de k_{-1} obtenido a partir de los cursos temporales de inhibición, $2.1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, lo que sugiere que la hidrólisis del *EgKU-7* podría estar limitando el proceso.

a)



b)

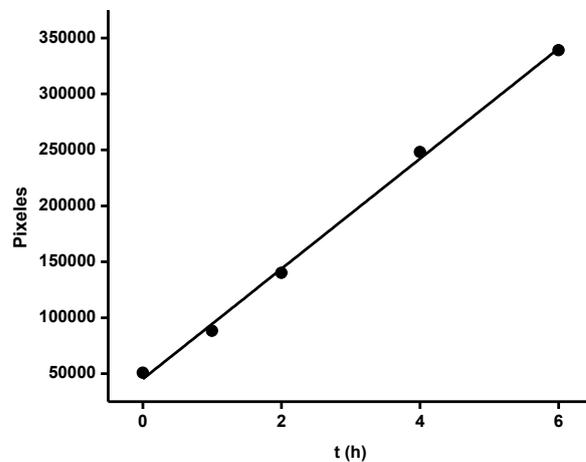


Figura 4.6 Densitometría del gel correspondiente al análisis por SDS-PAGE de *EgKU-7* incubado con tripsina (muestras tratadas con DTT). Se analizó por densitometría el gel de la Figura 4.5a, utilizando el programa Studio Lite 5.0. Se muestra en **a)** la desaparición de la banda correspondiente a *EgKU-7* y en **b)** la aparición de la banda correspondiente al primer producto de la hidrólisis de *EgKU-7*.

Por otro lado, estimamos también el valor de la velocidad de hidrólisis a partir del primer producto de la hidrólisis de *EgKU-7* en las primeras 6 horas (Figura 4.6b), que suponemos corresponde a la porción C-terminal de *EgKU-7* luego de ser hidrolizado en el sitio P1. Para los cálculos consideramos que la intensidad de la banda es proporcional a la masa y que los moles se conservan. A su vez, asumimos que el peso molecular de este primer producto de la hidrólisis es 7526.1 Da (Figura 4.5c). Obtuvimos un valor de velocidad de $1.6 \times 10^6 \text{ M h}^{-1}$, muy similar al determinado a partir de la hidrólisis de *EgKU-7* ($2.0 \times 10^6 \text{ M h}^{-1}$). La pequeña diferencia que se observa se podría deber a la hidrólisis del segundo sitio de corte, la cual aumentaría el valor de la pendiente de hidrólisis de *EgKU-7* y disminuiría la de aparición del primer producto, ya que ambos presentarían dicho sitio de corte. De manera que estos datos parecen ser coherentes con que el primer sitio de hidrólisis de *EgKU-7* por la tripsina bovina es el sitio P1.

Es de destacar que la banda correspondiente a la tripsina no disminuye su intensidad durante el tiempo que dura el experimento. Además de servir como control de carga, esto muestra que, a pesar de que es hidrolizado, *EgKU-7* mantiene inhibida la autohidrólisis de la tripsina. En efecto, hemos corroborado en otras oportunidades que, en ausencia de inhibidores y sustratos, la tripsina se hidroliza en su totalidad luego de estar dos horas en estas condiciones.

Es de destacar además que no se observa una banda en la cual la tripsina tenga aumentado su peso molecular. En otras palabras, no se observa una banda que corresponda a la enzima acilada con *EgKU-7*, indicando que hay una rápida resolución de esa etapa de la reacción de hidrólisis.

Para confirmar la baja resistencia a la hidrólisis que tiene *EgKU-7* cuando se lo incuba con la tripsina bovina en relación a otros inhibidores de tripsina del tipo Kunitz, realizamos también electroforesis en geles de poliacrilamida corridos en amortiguador de tricina, para *EgKU-8*, el cual según los experimentos de cursos temporales no se hidroliza, y para BPTI incubados con tripsina bovina a 37°C durante 5 horas. Observamos que estos inhibidores no son hidrolizados por la tripsina bovina en condiciones en las que sí se hidroliza *EgKU-7* (ver Figura 4.7 y 4.19).

4.3. *EgKU-7* es hidrolizado por la tripsina bovina en el sitio P1 y en las extensiones N y C-terminales del dominio Kunitz

A raíz de los estudios de electroforesis en conjunto con los de la cinética de inhibición, es nuestra hipótesis que *EgKU-7* es hidrolizado en el sitio P1, y que el complejo enzima-inhibidor se mantiene debido a que el dominio Kunitz está estabilizado por los enlaces disulfuro y, posiblemente, a que *EgKU-7* interacciona con la tripsina en algún lugar más por fuera del dominio Kunitz. A fin de corroborar esto y de identificar los sitios de hidrólisis, se realizaron análisis de espectrometría de masa (MALDI-TOF/TOF) de alícuotas de *EgKU-7* incubadas con tripsina bovina durante períodos de tiempo crecientes. Por un lado, se realizaron registros en ausencia de reductor, de manera de observar el dominio Kunitz estabilizado por los enlaces disulfuro y los posibles productos de hidrólisis de las extensiones que sobresalen del dominio. Por otro lado, con las muestras reducidas y alquiladas, de manera de evidenciar si el dominio está hidrolizado en el sitio P1. Además, se analizaron como controles *EgKU-7* en ausencia de tripsina bovina y tripsina bovina en ausencia de *EgKU-7* (Figuras 4.8 y 4.9).

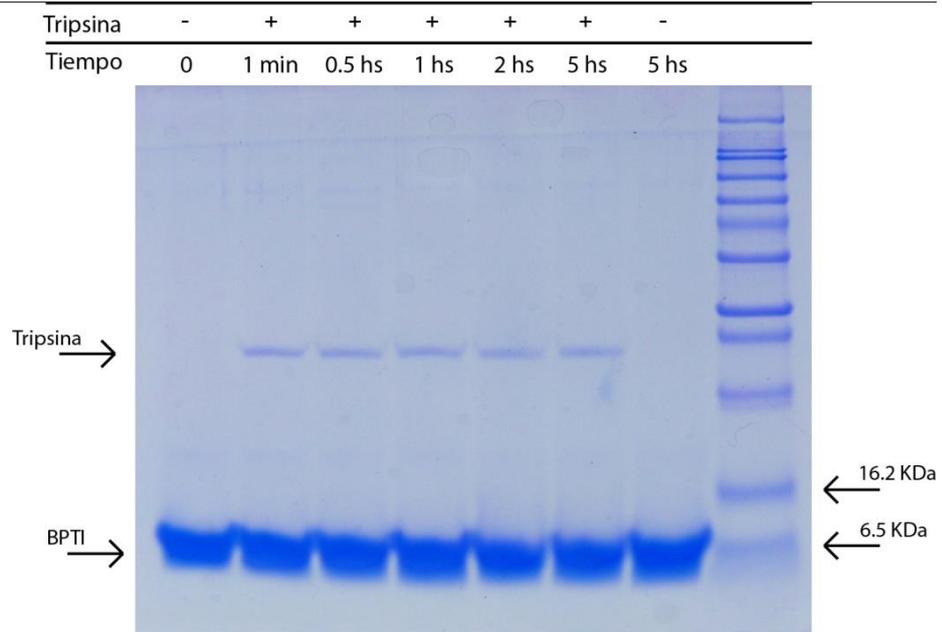
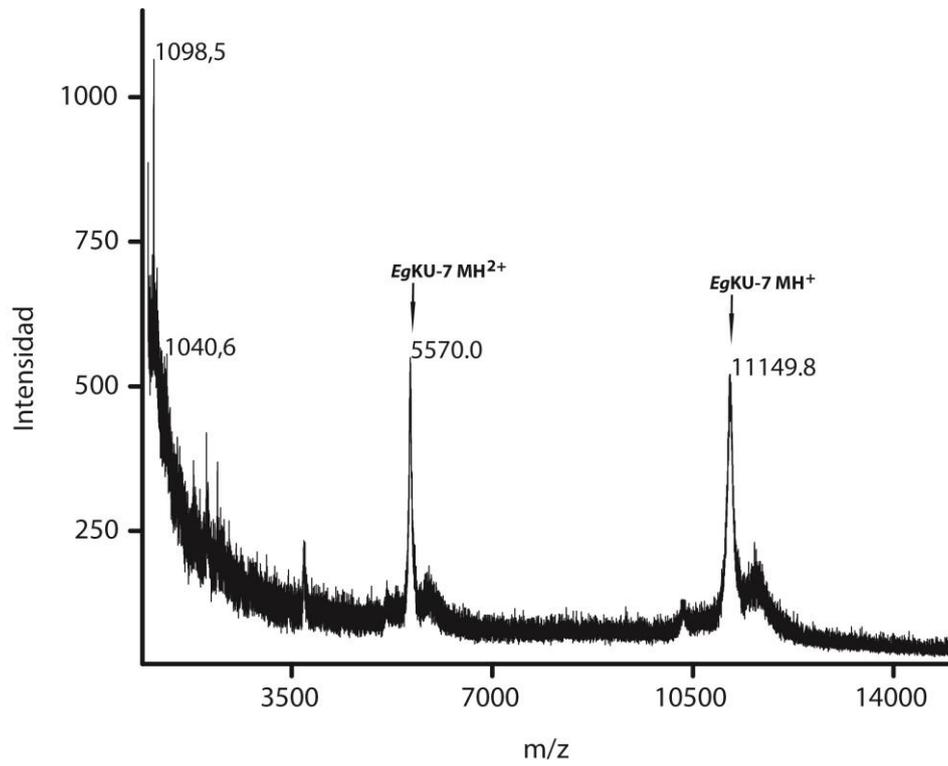
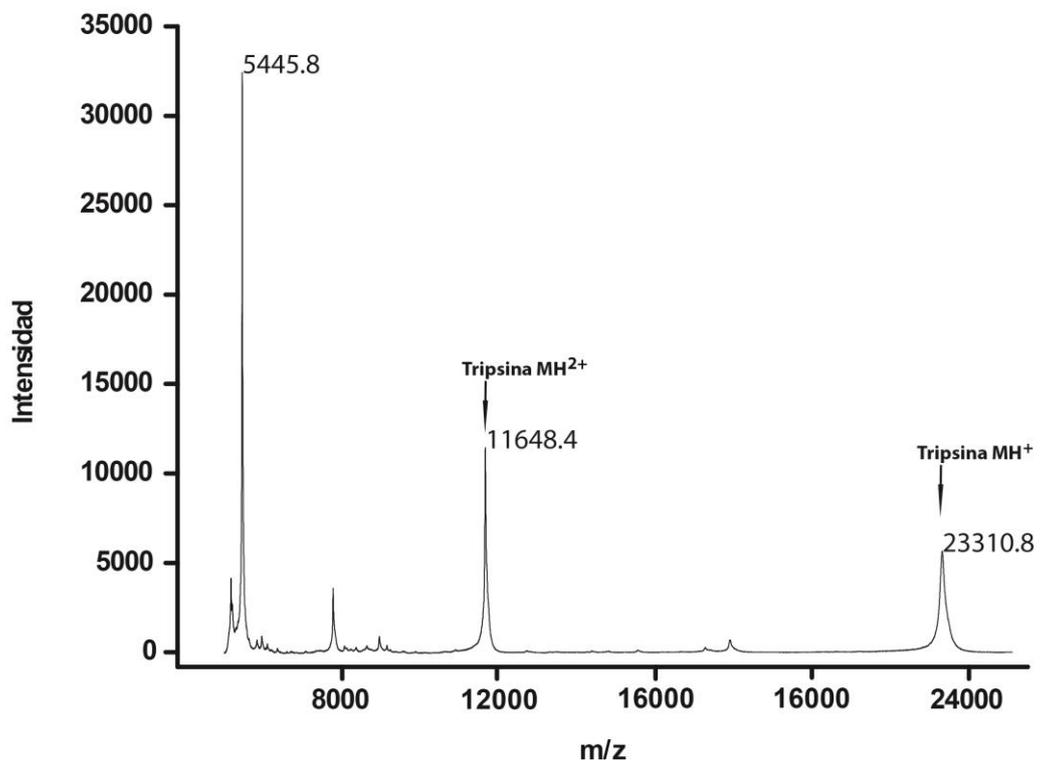


Figura 4.7 Análisis por SDS-PAGE en amortiguador de tricina de muestras de BPTI incubado con tripsina durante períodos de tiempo crecientes. Se incubó 15 μM de BPTI con 1.5 μM de tripsina en amortiguador Tris 50 mM pH 8 a 37°C. A tiempos crecientes, se tomaron alícuotas de 60 μl y se frenó la reacción agregando 5 μl de PMSF 50 mM. En el gel, se sembraron 30 μl de cada alícuota tratada con el reductor DTT.

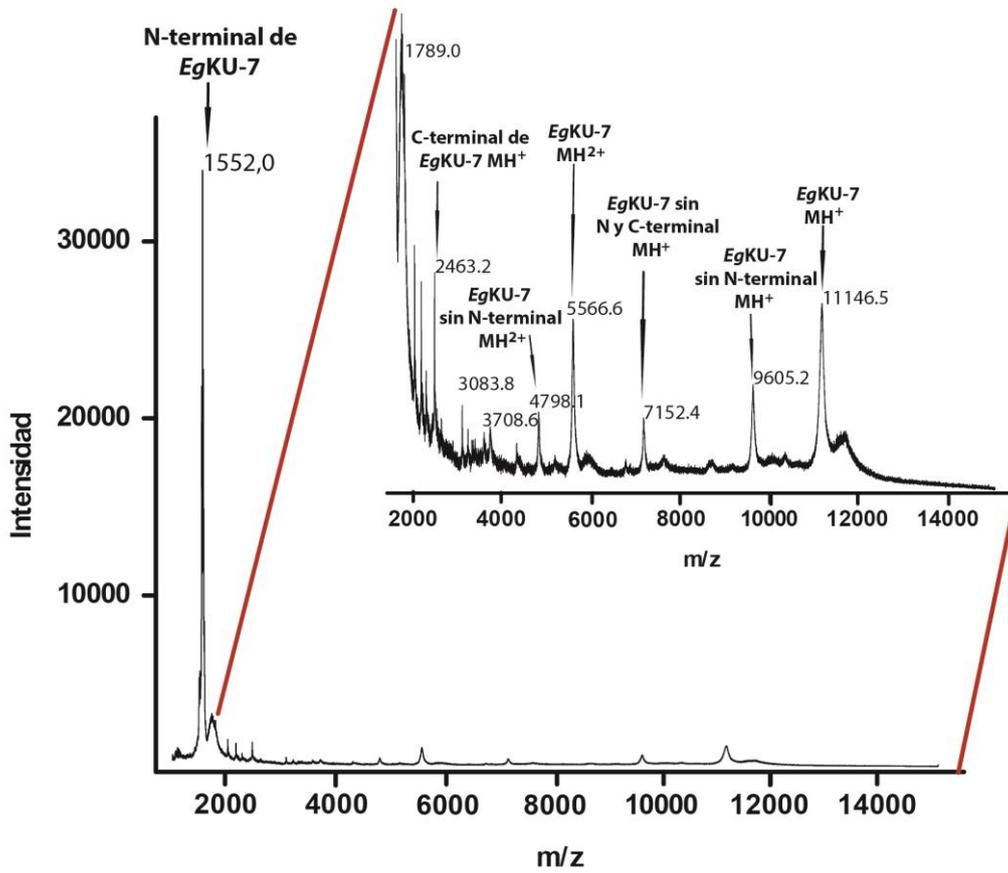
a)



b)



c)



d)

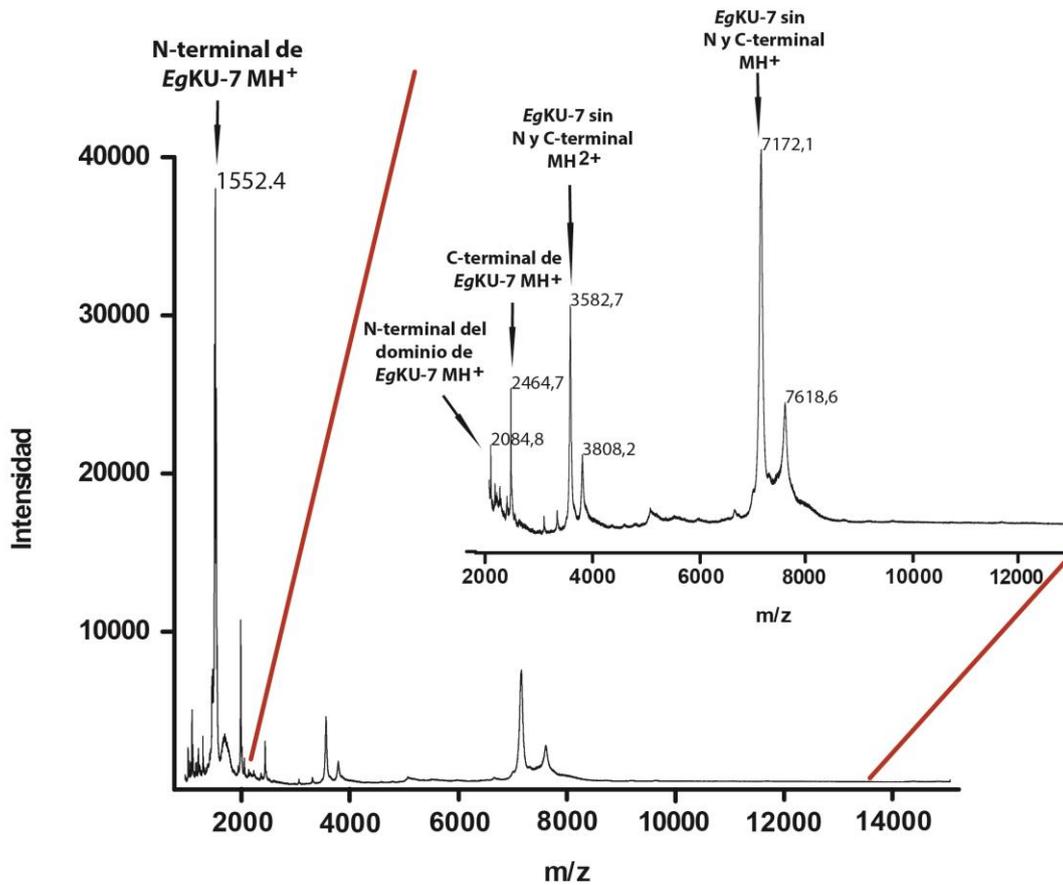
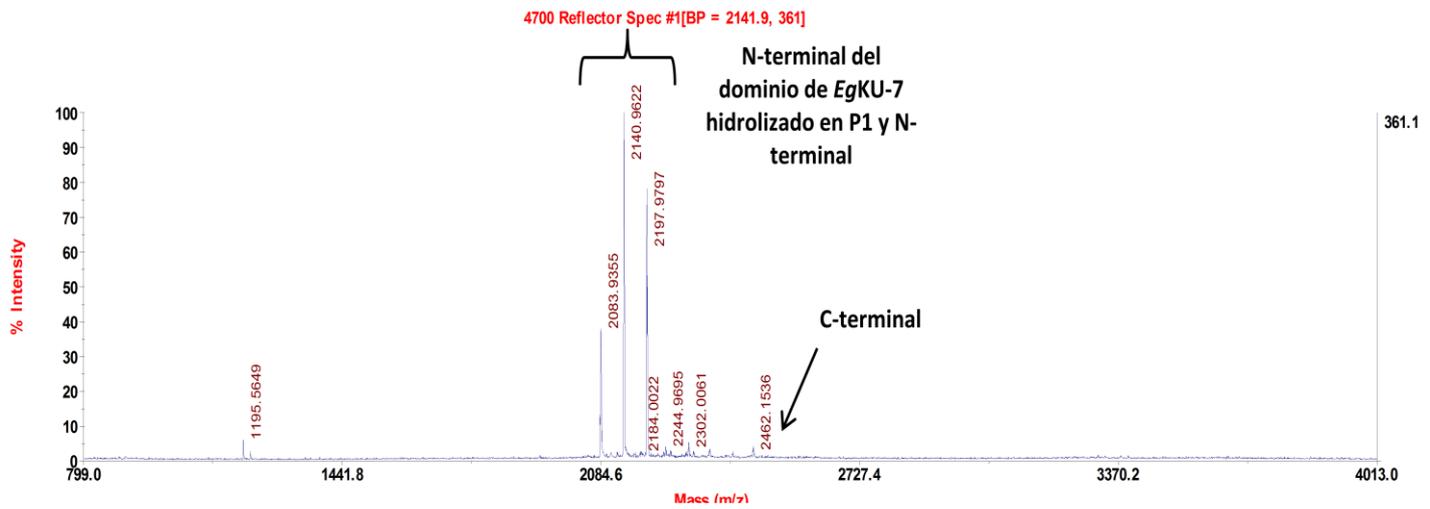


Figura 4.8 Análisis por espectrometría de masa de *EgKU-7* incubado con tripsina. Se muestran los espectros obtenidos por MALDI TOF/TOF en modo lineal de: a) *EgKU-7*, b) tripsina, c) y d) *EgKU-7* incubado con tripsina en amortiguador Tris pH 8 a 37°C durante 30 minutos y 24 horas, respectivamente. Las muestras no fueron reducidas ni alquiladas.

a)



b)

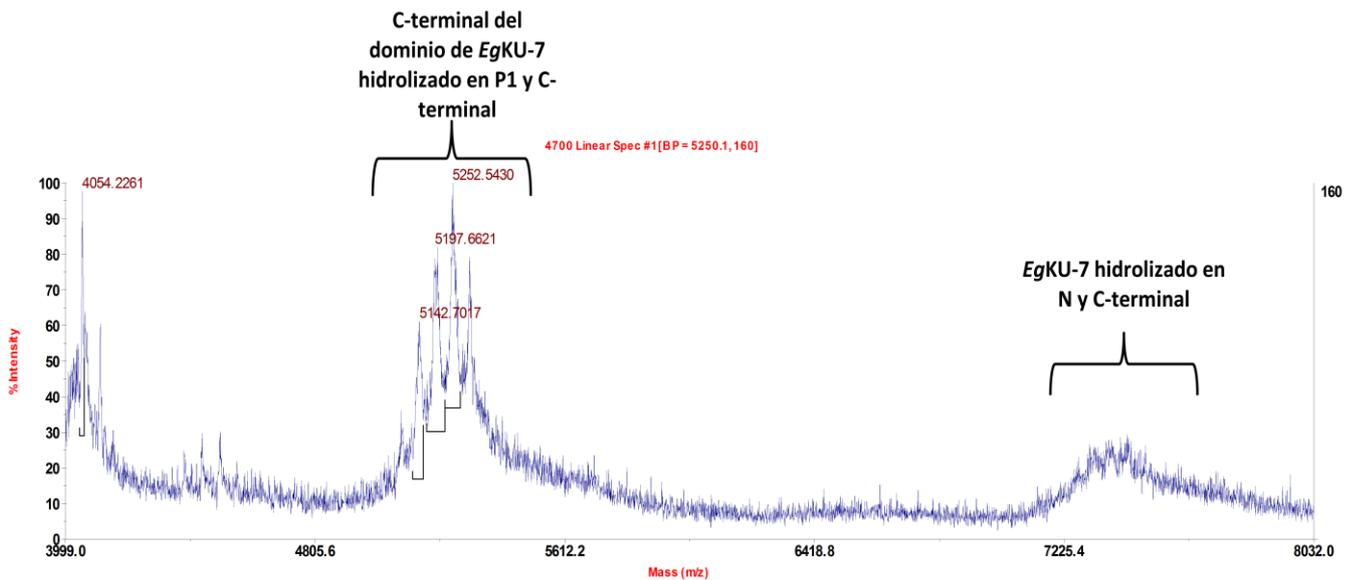


Figura 4.9 Análisis por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF) de *EgKU-7* luego de 24 horas de incubación con tripsina; la muestra fue reducida con DTT y alquilada con iodoacetamida previo al análisis. La incubación se realizó en amortiguador Tris pH 8 a 37°C. a) Se midió en modo reflector en un rango de masa de 800 a 4000 Da; se observan picos de la porción N-terminal del dominio Kunitz, con masas correspondientes a la incorporación de ninguno (PM teórico 2084.3) a dos grupos carboxiamidometilo; y la extensión C-terminal por fuera del dominio Kunitz. **b)** Se midió en modo lineal en un rango de masa de 4000 a 8000 Da; se observan picos de la porción C-terminal del dominio Kunitz, con masas correspondientes a la incorporación de ninguno (PM teórico 5081.5) a cuatro grupos carboxiamidometilo; y el dominio hidrolizado en las extensiones N y C-terminales pero sin hidrolizar en P1. Cada modificación introducida por la incorporación de iodoacetamida suma 57 Da (ver figura 10b).



b)

Pesos moleculares (Da) de los diferentes fragmentos peptídicos reducidos y alquilados de *Eg*KU-7 luego de tratar con tripsina bovina

	Péptido (tioles)	Péptido (disulfuros)	Péptido + 1 CAM	Péptido + 2 CAM	Péptido + 3 CAM	Péptido + 4 CAM	Péptido + 5 CAM	Péptido + 6 CAM
1	11110.2	11104.2	11167.5	11224.5	11281.5	11338.5	11395.5	11452.5
2	1535.7	-	-	-	-	-	-	-
3	9592.5	9586.5	9649.8	9706.8	9763.8	9820.8	9877.8	9934.8
4	3602.0	3600.0	3659.2	3716.2	-	-	-	-
5	2084.3	2082.3	2141.4	2198.4	-	-	-	-
6	7526.2	7524.1	7583.4	7640.4	7697.4	7754.4	-	-
7	2462.6	-	-	-	-	-	-	-
8	8665.6	8659.6	8722.9	8779.9	8836.9	8893.9	8950.9	9007.9
9	7147.9	7141.9	7205.2	7262.6	7319.2	7376.2	7433.2	7490.2
10	5081.8	5075.8	5138.8	5195.8	5252.8	5309.8	-	-

Figura 4.10 Productos de la hidrólisis de *Eg*KU-7 por tripsina. a) Se muestran las secuencias de los péptidos que se pueden obtener luego de la hidrólisis de la proteína recombinante (cuya secuencia se indica en 1). Con flechas azules, se señalan los sitios dónde se verificó que ocurre hidrólisis. Con flechas de colores, los péptidos observados en las muestras reducidas y alquiladas: flecha negra, extensiones N y C-terminal del dominio Kunitz; flecha verde, porción N-terminal del dominio; flecha roja, porción C-terminal del dominio; flecha gris, dominio sin extensiones. b) Tabla con los correspondientes pesos moleculares, mostrando los pesos moleculares teóricos con y sin oxidación de cisteínas a disulfuros y con alquilación incompleta con iodoacetamida (CAM: carboxiamidometilación).

En los espectros de masa de las muestras sin reducir y alquilar (Figura 4.8), en primer lugar, se ve que las proteínas - *EgKU-7* (PM teórico, 11104.2 Da; obtenido, 11148.8 Da) y tripsina (PM teórico, 23290 Da; obtenido, 23310.8 Da) - se encontraban bastante puras previo a la incubación. En los espectros de masa de *EgKU-7* incubado con tripsina bovina durante tiempos crecientes aparecen nuevos picos. Para facilitar la descripción de los resultados obtenidos, mostramos solamente el espectro al inicio de la incubación de *EgKU-7* con tripsina (30 minutos) y el del final de la incubación (24 horas). Contamos también con datos a 1 y 15 minutos y a 1, 2 y 5 horas.

A los 30 minutos de la incubación, observamos el péptido correspondientes al extremo N-terminal aportado por el vector de expresión (PM teórico, 1535.7 Da; obtenido, 1552.0 Da); vale aclarar que este pico se ve muy bien desde el primer minuto de incubación. Además, a partir de la media hora, identificamos a *EgKU-7* sin el péptido N-terminal (PM teórico, 9586.4 Da; obtenido, 9605.2 Da); y a la extensión C-terminal (PM teórico, 2462.6; obtenido, 2463.2 Da) del dominio Kunitz, cortada en la arginina 58. No observamos el pico correspondiente a *EgKU-7* sin el C-terminal, pero sí a *EgKU-7* sin las dos extensiones, es decir al dominio (PM teórico, 7141.8 Da; obtenido, 7152.4 Da).

A las 24 horas, se observan los picos que corresponden a las extensiones C y N-terminales del dominio y el pico correspondiente al dominio Kunitz sin las extensiones (PM teórico, 7141.8 Da; obtenido, 7172.1 Da). No se observa el pico correspondiente a *EgKU-7* hidrolizado únicamente en la extensión N-terminal. Además, al final de la incubación, se observa un pico que puede corresponder a la porción N-terminal del dominio de *EgKU-7* (PM teórico, 2084.3 Da; obtenido, 2084.8 Da), indicando ruptura de los enlaces disulfuro del dominio (Figura 4.8). Por tanto, nuestros resultados indican que la tripsina hidroliza las extensiones N- y C-terminales del dominio Kunitz de *EgKU-7*. El corte en la extensión C-terminal ocurre preferentemente en la arginina que está ubicada en la posición 58 y no en la anterior ni en la Lys más próxima al C-terminal.

Además, verificamos que la tripsina bovina hidroliza a *EgKU-7* en el sitio P1, estudiando por espectrometría de masa muestras reducidas y alquiladas de *EgKU-7* luego de 24 horas de incubación con tripsina. Se observaron picos correspondientes a los fragmentos peptídicos esperados de la hidrólisis de *EgKU-7* por la tripsina en la arginina del fragmento aportado por el vector de expresión, en el sitio P1 y en la arginina 58 de la extensión C-terminal (Figura 4.9). Los fragmentos N y C-terminales del dominio se observaron como picos con masas correspondientes a la incorporación de ninguno a dos grupos carboxiamidometilo en el N-terminal, y de ninguno a cuatro en el C-terminal (ver Figura 4.10). Esto es consistente con la modificación incompleta de los fragmentos para dar productos parcialmente carboxiamidometilados. Además, se observaron posibles picos que podrían corresponder al dominio de *EgKU-7*, es decir que parte de *EgKU-7* no sería hidrolizado en el sitio P1.

En suma, cuando *EgKU-7* se incuba con tripsina bovina, se hidroliza en la extensión N-terminal aportada por el vector de expresión, en la arginina 58 de la extensión C-terminal y en gran parte (pero no todo) en el sitio P1. Si bien estos resultados no permiten establecer la cinética del proceso ni determinar qué sitio se hidroliza primero, sí son perfectamente consistentes con la hipótesis que nos planteamos a partir de los resultados obtenidos por SDS-PAGE.

4.4. Si *EgKU-8* se trata con trombina, adquiere una cinética similar a la de *EgKU-7* en la inhibición de tripsina bovina

Obtuvimos un resultado inesperado e interesante, en el marco de ensayos tendientes a mejorar la solubilidad de *EgKU-8* recombinante. Al igual que para *EgKU-7*, tratamos la proteína con trombina a fin de escindir la extensión N-terminal que contiene el tándem de histidinas aportado por el vector de expresión (ver materiales y métodos). Luego de la digestión con trombina y purificación de la recombinante por intercambio iónico, verificamos su actividad inhibidora de peptidasas analizando los cursos temporales de la inhibición. En estos estudios, observamos que si bien el transcurso de la inhibición de *EgKU-8* tratado con trombina presentaba el comportamiento de inhibidor lento que esperábamos (Figura 4.11), el gráfico de k_{obs} en función de la concentración de *EgKU-8* tratado con trombina indicaba un comportamiento similar al de *EgKU-7* y no al de *EgKU-8* sin tratar con trombina (Figura 4.12a).

La secuencia de *EgKU-8* recombinante, además del sitio de corte para trombina dado por el vector pET 28a en el N-terminal de la proteína, presenta otro sitio de corte a nivel del dominio Kunitz, en el bucle anti-peptidasa. Este sitio está dado por la prolina 19 (P4') y la arginina 20 (P5') (Figura 4.12b). De manera que el bucle anti-peptidasa podría quedar abierto, cambiando la conformación a nivel del sitio P1, luego del tratamiento con trombina. Esto podría ayudar a entender el comportamiento atípico de *EgKU-7* frente a la tripsina bovina. Una posible explicación del comportamiento lineal de k_{obs} en función de la concentración de *EgKU-7* frente a la tripsina bovina sería que el bucle presenta una conformación que permite la formación de un complejo "apretado" en un único paso pero se hidroliza en el sitio P1. En cambio, en el caso de *EgKU-8*, se da el pasaje lento a una forma que resiste la hidrólisis pero, cuando se trata *EgKU-8* con trombina y se abre el bucle anti-peptidasa, no se pasa a la forma que resiste la hidrólisis. Por tanto, el comportamiento lineal de *EgKU-8* tratado con trombina apoya la hipótesis de que el comportamiento lineal de k_{obs} vs [I] refleja que el sitio P1 del bucle anti-peptidasa de *EgKU-7* no es capaz de resistir la hidrólisis.

4.5. El K_i^* de *EgKU-7* cortado con tripsina bovina es mayor que el del inhibidor intacto

Como los estudios de los cursos temporales mostraban que la tripsina recuperaba actividad, pero se mantenía fuertemente inhibida por *EgKU-7*, quisimos estudiar la actividad de *EgKU-7* luego de haber sido incubado 24 horas con tripsina. Para esto, tratamos a *EgKU-7* con tripsina bovina y lo purificamos por intercambio iónico. El rendimiento fue muy bajo, ya que la solubilidad disminuyó notoriamente luego de la incubación. De todas maneras, pudimos separar de la tripsina una pequeña fracción del total de *EgKU-7* hidrolizado. Con esta fracción de *EgKU-7* hidrolizado, ensayamos la velocidad de hidrólisis del sustrato artificial por tripsina bovina en función de la concentración de inhibidor para determinar el valor de K_i^* . Los ajustes por la ecuación de Morrison fueron buenos y pudimos calcular un valor de $K_i^* = 0.7 \pm 0.3$ nM para *EgKU-7* hidrolizado. Este valor es unas 50 veces mayor que el K_i^a y 3 veces mayor que el K_i^b determinados para *EgKU-7* antes del tratamiento con tripsina (Figura 4.13). Es decir, como esperábamos a raíz de los resultados de cursos temporales, observamos que *EgKU-7* hidrolizado disminuye notoriamente su actividad inhibidora, pero sigue siendo un potente inhibidor, ya que el K_i^* es del orden de 10^{-10} M. Este valor indica que sigue comportándose como un inhibidor de alta afinidad.

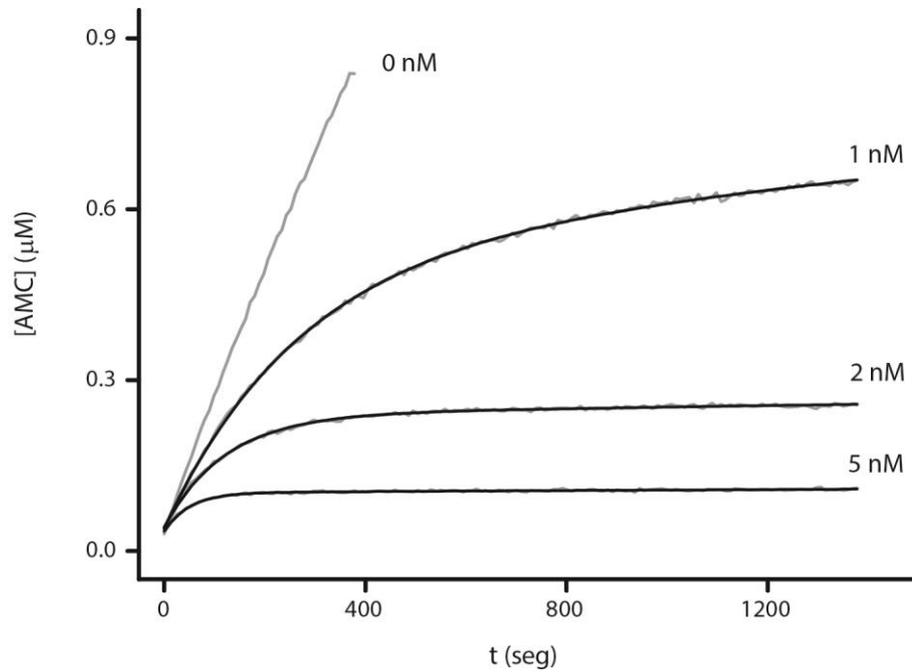
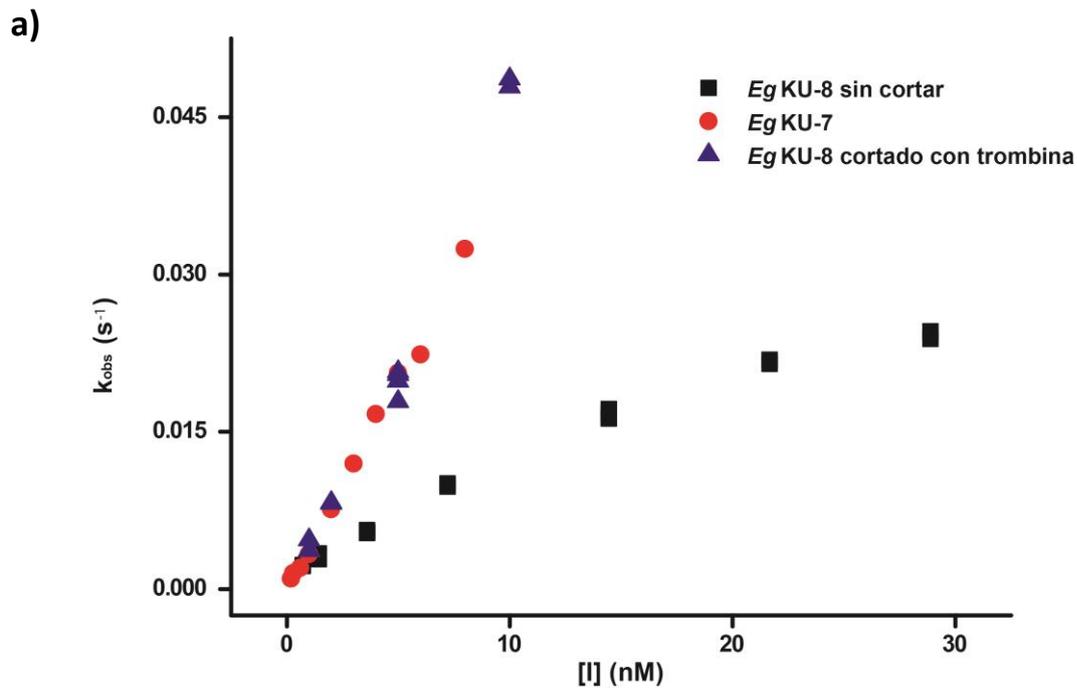


Figura 4.11 Curso temporal de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-8* tratado con trombina. Se incubó *EgKU-8* tratado con trombina (0 a 5 nM) con el sustrato (5 μM) y se inició la reacción agregando 0.6 nM de tripsina. La línea negra representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta (ecuación 3) utilizando el programa Origin 8.1.



b)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGS

RIDPCKLPLDPGFCRAYFPRWGFHQESGECVRFIYGGCGGNKNQFHSKEQCESMCGH

Figura 4.12 Constante exponencial k_{obs} en función de la concentración de *EgKU-7*, *EgKU-8* y *EgKU-8* tratado con trombina, en la inhibición de tripsina bovina. **a)** Los valores de k_{obs} se obtuvieron a partir de los cursos temporales de inhibición en experimentos similares al mostrado en la figura 4.11. La concentración de enzima utilizada fue de 0.6 nM. En negro, se muestra a *EgKU-8*; en azul, a *EgKU-8* tratado con trombina; y en rojo, a *EgKU-7*. **b)** Secuencia de *EgKU-8* recombinante: arriba, extensión aportada por el vector pET28a con el tándem de histidinas en el extremo N-terminal; abajo, *EgKU-8* (proteína madura, sin el péptido señal). En rojo, se indican los sitios de corte para trombina presentes en la extensión con el tándem de histidinas y en el bucle anti-peptidasas, que se resalta en gris.

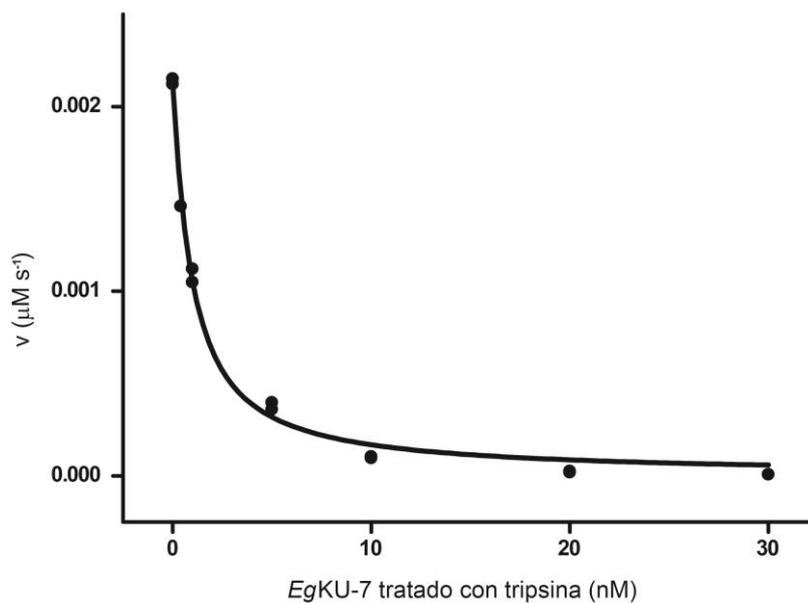


Figura 4.13 Inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* hidrolizado por tripsina bovina. Previo al experimento, se incubó *EgKU-7* durante 24 horas con tripsina bovina y se lo purificó por intercambio iónico. La tripsina (0.3 nM) se incubó con la correspondiente concentración de inhibidor durante 15 minutos. Se inició la reacción agregando 5 μM de sustrato. Se graficó la velocidad inicial de formación de producto en función de la concentración de *EgKU-7* tratado con tripsina (0 a 30 nM). La línea negra muestra el ajuste a la ecuación de Morrison utilizando el programa Origin 8.1.

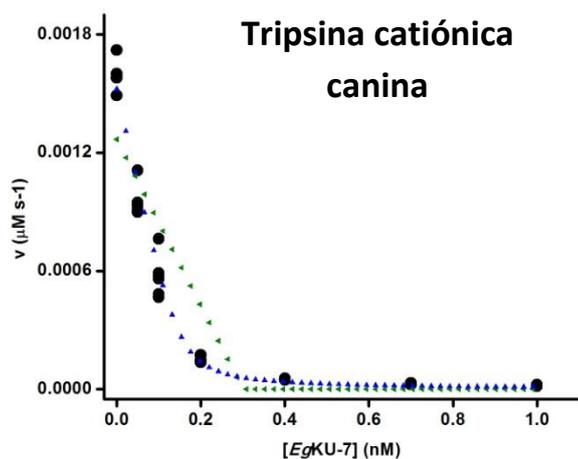
4.6. La actividad inhibidora de *EgKU-7* sobre las tripsinas caninas es diferente a la observada sobre la tripsina bovina

Hasta el momento, habíamos observado que *EgKU-7* inhibe peptidasas de serina, en particular del tipo tripsina. La tripsina utilizada en los ensayos es la enzima bovina, de origen comercial, es decir que no es la tripsina que está presente en el sitio dónde se instala el protoescólex en el intestino del perro. De manera que, al igual que se hizo para *EgKU-8* y *EgKU-3*, estudiamos la actividad inhibidora de *EgKU-7* sobre algunas de las peptidasas de serina caninas que están presentes en el sitio dónde el parásito secretaría al inhibidor. Por un lado, se hicieron estudios preliminares de la actividad inhibidora de triptasa y quimasa de mastocitos. Para esto, nos contactamos con el Prof George Caughey (Universidad de San Francisco) que ha trabajado extensamente con este tipo de proteasas purificadas de mastocitoma canino. En su laboratorio, se ensayó la actividad de *EgKU-7*, y también las de *EgKU-3* y *EgKU-8*, sobre quimasa y triptasa caninas (estos estudios fueron realizados por Wilfred Raymond). Los resultados mostraron que ninguno de los tres *EgKUs* presentaba actividad inhibidora de estas enzimas. Por otro lado, estudiamos la capacidad de *EgKU-7* de inhibir tripsinas caninas; como era de esperar, *EgKU-7* se comportó como un potente inhibidor. Sin embargo, como se describe a continuación, el patrón de inhibición de las tripsinas caninas mostró diferencias con el observado con la tripsina bovina.

Al intentar determinar los valores de K_i^* para las tripsinas caninas, de manera similar a lo ocurrido con la tripsina bovina, no pudimos ajustar los datos a la ecuación de Morrison, cuando fijamos la concentración de enzima usada en el experimento (cuya concentración, a su vez, había sido determinada por titulación con BPTI). Por tanto, analizamos los datos con el programa Dynafit, para un modelo de un sitio de unión y para el modelo de dos sitios de unión independientes (Figura 4.14). En el caso de la inhibición de tripsina catiónica canina por *EgKU-7*, el ajuste al modelo con dos sitios independientes convergió, aunque con mucho error, a dos valores iguales muy pequeños de K_i^a y K_i^b (12.6 pM), indicando una fuerte interacción de los dos sitios de unión de *EgKU-7* con esta enzima. En el caso de la tripsina aniónica canina, se obtuvieron dos valores de K_i : $K_i^a = 2.7 \pm 3.2$ pM y $K_i^b = 151 \pm 64$ pM; siendo notable que el menor valor de K_i^a es un orden de magnitud menor que el observado con *EgKU-7* actuando sobre la tripsina bovina.

Continuando con la caracterización, realizamos estudios de los cursos temporales de la inhibición de ambas tripsinas caninas por *EgKU-7*. Al igual que con la tripsina bovina, *EgKU-7* se comportó como un inhibidor lento con estas enzimas. Sin embargo, los datos no se ajustaron muy bien a la exponencial más recta (ecuación 3). Como el curso temporal parece tener dos fases, lo ajustamos a una ecuación exponencial doble (Figuras 4.15 y 4.16). Obtuvimos muy buenos ajustes con dos valores de k_{obs} en cada caso, de aproximadamente un orden de diferencia entre ellos. Los valores de k_{obs2} (los menores) no mostraron dependencia con la concentración de *EgKU-7*; fueron de $(18 \pm 2) \times 10^{-3}$ y $(13 \pm 4) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ para las tripsinas catiónica y aniónica caninas, respectivamente. Por otro lado, los valores de k_{obs1} (los mayores) fueron iguales a los que se obtienen si se ajustan los datos a tiempos menores a la ecuación de la exponencial más recta (primera fase). Cuando estos valores de k_{obs1} se graficaron en función de la concentración de inhibidor, se obtuvieron gráficos de distribución hiperbólica, lo que indica que el mecanismo de inhibición es el típico de dos pasos, diferente al observado para

a)



b)

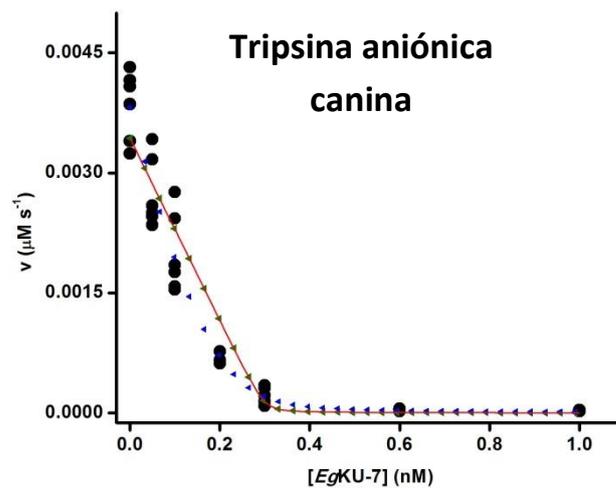


Figura 4.14 Inhibición de tripsinas caninas por *EgKU-7*. Cada enzima (0.3 nM) se preincubó con la correspondiente concentración de inhibidor durante 15 minutos. Se inició la reacción agregando 5 μM de sustrato. Se graficó la velocidad inicial de formación de producto en función de la concentración de *EgKU-7* (0 - 1 nM). La línea roja muestra el ajuste a la ecuación de Morrison (ecuación 1) realizado con Origin 8.1. Los triángulos azules, el ajuste al modelo de un sitio de unión; y los triángulos verdes, al modelo de dos sitios de unión independientes, ambos realizados con Dynafit. **a)** *EgKU-7* con tripsina catiónica canina (no se logró la convergencia a la ecuación de Morrison utilizando el programa Origin 8.1). **b)** *EgKU-7* con tripsina aniónica canina.

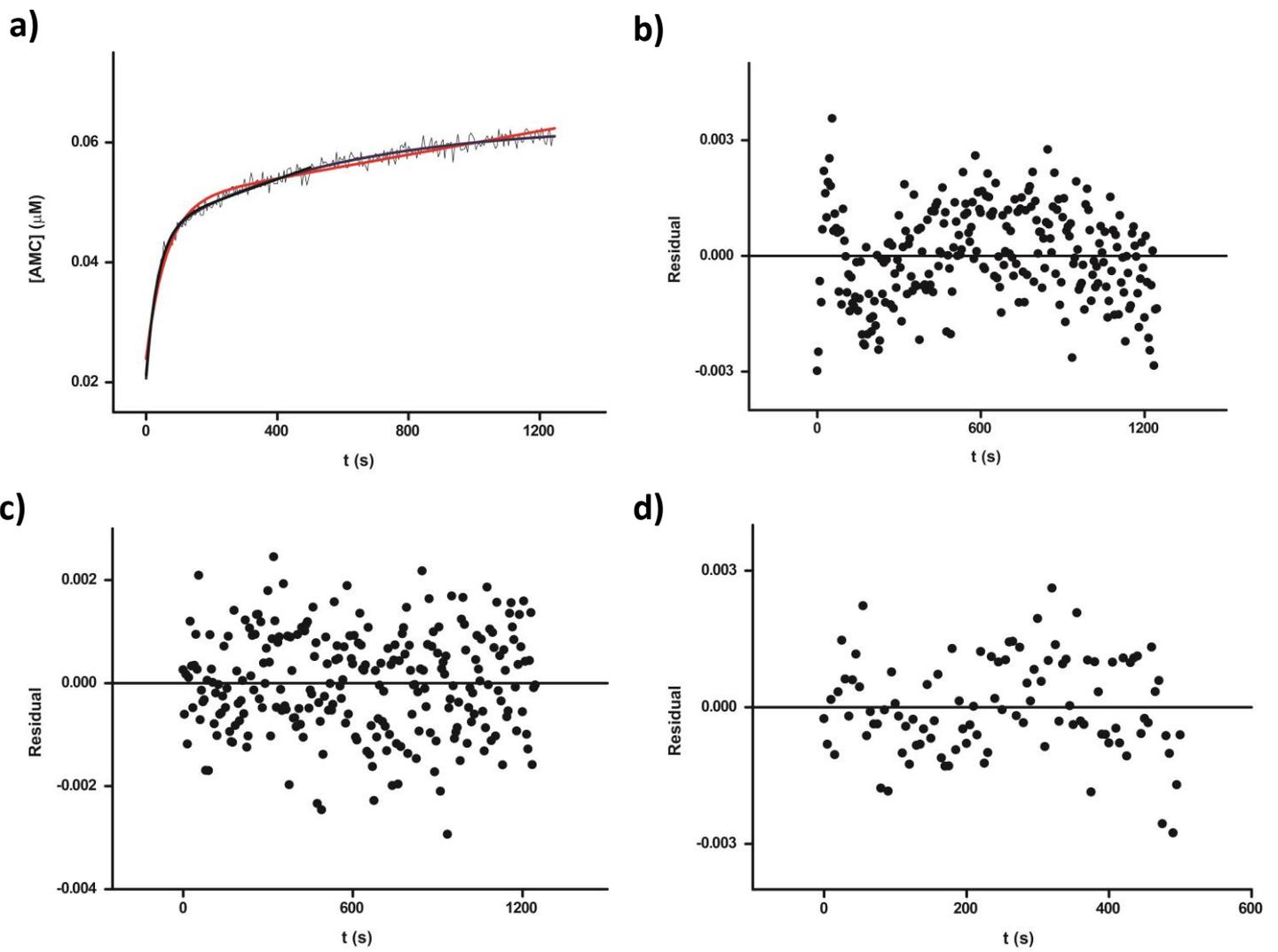


Figura 4.15 Curso temporal de la inhibición de tripsina catiónica canina por *EgKU-7*. **a)** Se incubó *EgKU-7* (3 nM) con el sustrato (5 μM) y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. La línea roja representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta; la azul, a la ecuación exponencial doble; y la negra, a la exponencial más recta hasta los 500 segundos del experimento. **b)** Residual en función del tiempo al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta; **c)** residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial doble y **d)** residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta hasta los 500 segundos.

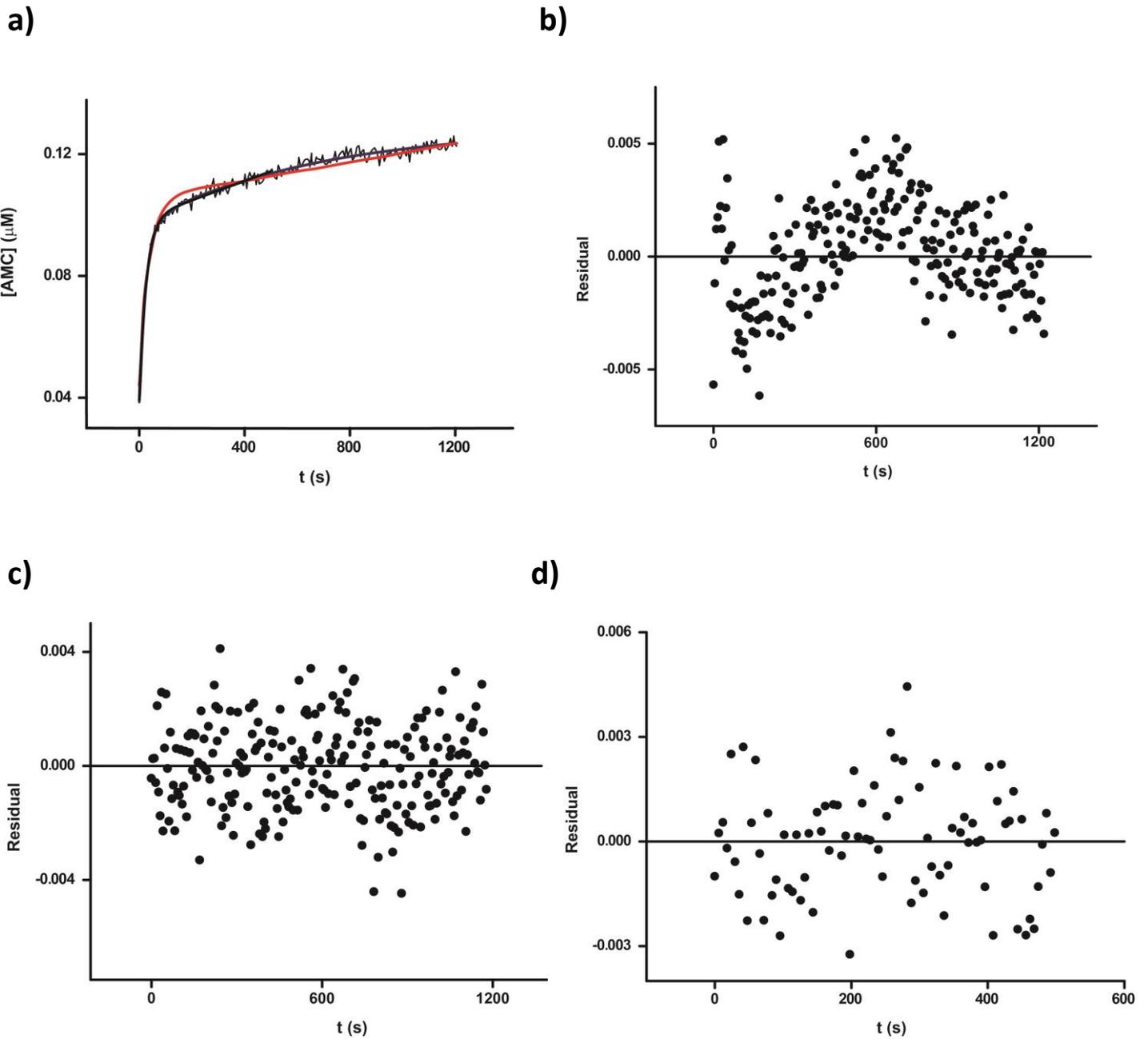


Figura 4.16 Curso temporal de la inhibición de tripsina aniónica canina por *EgKU-7*. **a)** Se incubó *EgKU-7* (3 nM) con el sustrato (5 μM) y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. La línea roja representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta; la azul, a la ecuación exponencial doble; y la negra, a la exponencial más recta hasta los 500 segundos del experimento. **b)** Residual en función del tiempo al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta, **c)** residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial doble y **d)** residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta hasta los 500 segundos.

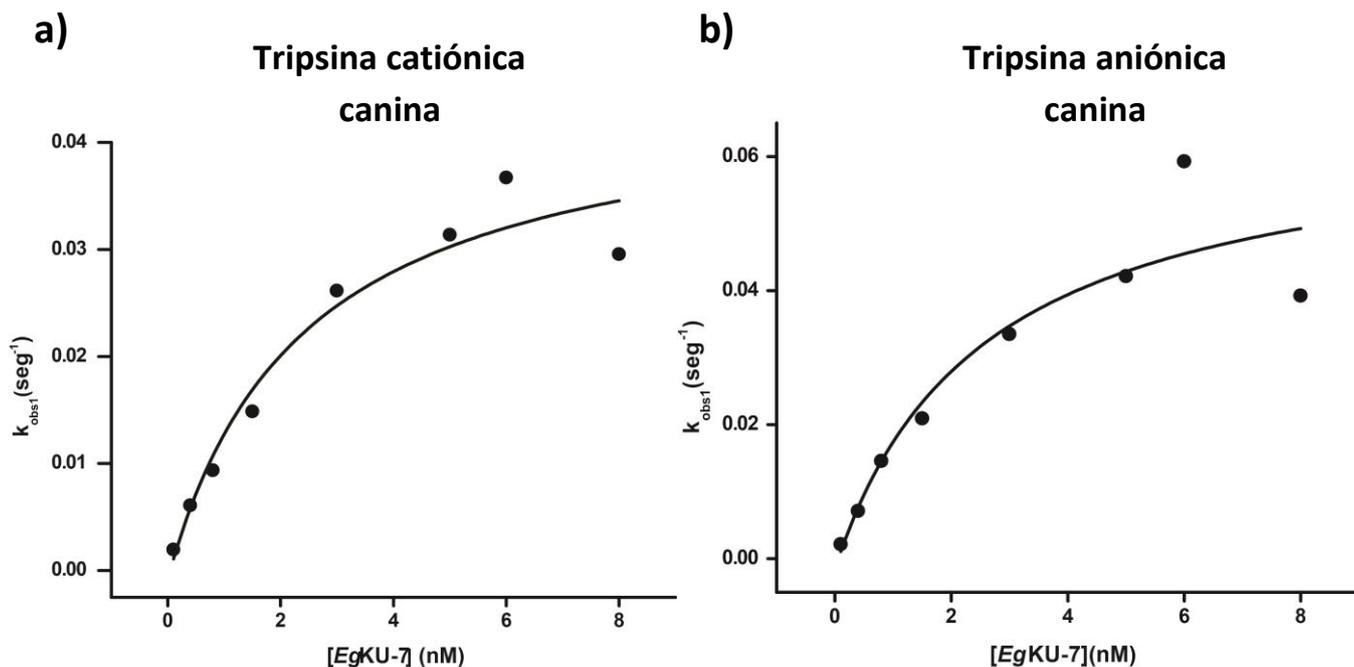


Figura 4.17 Gráficos de la constante de tiempo k_{obs1} en función de la concentración de EgKU-7 para la inhibición de tripsinas caninas. Los valores de k_{obs} fueron determinados en experimentos similares a los de las figuras 4.15 y 4.16. La concentración de enzima utilizada fue de 0.05 nM entre 0 y 2 nM de EgKU-7, 0.3 nM entre 2 y 5 nM de EgKU-7, y 0.6 nM entre 5 y 8 nM de EgKU-7. Se observa el comportamiento hiperbólico de EgKU-7 frente a las tripsinas caninas. En **a)** el efecto sobre la tripsina aniónica y en **b)** sobre la catiónica. La línea negra muestra el mejor ajuste a la hipérbola utilizando el programa Origin 8.1.

Constantes cinéticas		
EgKU-7	Tripsina bovina	
$k_1 \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	4.8 ± 2.0	
$k_{-1} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	2.1 ± 0.2	
$K_i^* \text{ (pM)}$ (d)	43 ± 11	
$k_{\text{Hid}} \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (e)	2.6	
$k_{\text{Hid}}/K_i^a \times 10^7 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$ (f)	1.9	
EgKU-7 sin C-term	Tripsina bovina	
$k_1 \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	5.4 ± 0.2	
$k_{-1} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	1.6 ± 0.4	
$K_i^* \text{ (pM)}$ (d)	30 ± 2.0	
EgKU-7	Tripsina catiónica canina	Tripsinas aniónica canina
$k_2 \times 10^{-2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	7.0 ± 2.0	6.0 ± 0.5
$K_i \text{ (nM)}$ (a)	5.0 ± 3.0	2.8 ± 0.8
$k_2/K_i \times 10^7 \text{ (M}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)}$ (a)	1.3 ± 0.9	2.4 ± 0.8
$k_{-2} \times 10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (b)	2.5 ± 1.5	10 ± 5
$K_i^* \text{ (pM)}$ (c)	19 ± 26	39 ± 31
$K_{\text{obs}2} \times 10^{-3} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ (a)	18 ± 2	13 ± 4

Tabla 4.2 Cinética de inhibición de tripsinas bovina y caninas por EgKU-7 recombinante

^a k_2 , k_{-1} , k_{-1} , K_i , k_2/K_i y $k_{\text{obs}2}$ fueron determinados a partir de los cursos temporales (figuras 4.2, 4.15, 4.16 y 4.18). Los valores son el promedio de al menos dos experimentos independientes con el error estándar correspondiente.

^b k_{-2} y k_{-1} fueron calculados mediante las ecuaciones 6 y 9 a partir de cursos temporales. Los valores corresponden al promedio de quince experimentos independientes con el respectivo desvío estándar.

^c K_i^* con las tripsinas caninas fueron calculados a partir de la ecuación 10 utilizando los valores de k_2 , K_i y k_{-2} obtenidos de los cursos temporales. Los valores corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes con su respectivo error estándar.

^d K_i^* con la tripsina bovina fue determinado a partir de la ecuación 7.

^e k_{Hid} fue calculada a partir de los estudios por densitometría de los geles de EgKU-7 incubado con tripsina (Figuras 4.5 y 4.6)

^f K_i^a fue determinada por el modelo de dos sitios de unión independientes utilizando el programa Dynafit (Figura 4.1 y Tabla 4.1)

EgKU-7 con la tripsina bovina (Figura 4.17). De los datos, como se detalla en materiales y métodos, determinamos las constantes k_2 , k_{-2} y K_i y de éstas calculamos K_i^* . Su valor para la tripsina catiónica canina ($K_i^* = 19 \pm 26$ pM) fue muy comparable al valor de K_i^a . Sin embargo, para la tripsina aniónica, el valor de K_i^* ($K_i^* = 39 \pm 31$) fue 14 veces mayor al calculado para K_i^a (Tabla 4.2); más adelante discutiremos esta diferencia.

Estudiamos también la estabilidad de *EgKU-7* frente a las tripsinas caninas, como lo hicimos con la tripsina bovina, mediante cursos temporales de larga duración (8 horas) y análisis por SDS-PAGE en amortiguador de tripsina. En los cursos temporales observamos que, cuando se incubaba *EgKU-7* con las tripsinas caninas, la tripsina catiónica canina recupera un poco de actividad luego de alcanzada la inhibición (Figura 4.18); esto se visualiza en la velocidad de hidrólisis del sustrato artificial en los intervalos de 1000 a 2000 s y de 25000 a 28000 s que va de $2.2 \times 10^{-6} \mu\text{M s}^{-1}$ a $3.4 \times 10^{-6} \mu\text{M s}^{-1}$, respectivamente. En el caso de la tripsina aniónica canina, no se observa que recupere actividad luego de alcanzada la inhibición (Figura 4.18). Además, estudiamos por SDS-PAGE la estabilidad de *EgKU-7* incubado durante 5 horas a 37°C con las tripsinas caninas. Los resultados obtenidos son diferentes a los observados con la tripsina bovina. Con tripsina catiónica canina, se ve que *EgKU-7* queda totalmente hidrolizado a las 5 horas, pero la banda que aparece como producto de la hidrólisis presenta un tamaño diferente a la observada con la tripsina bovina, indicando que se hidroliza en otro lugar, al menos inicialmente (Figura 4.19). Con tripsina aniónica canina, *EgKU-7* prácticamente no se hidroliza en 5 horas de incubación (Figura 4.20).

Los resultados descritos en los párrafos anteriores parecen indicar que el comportamiento hiperbólico de k_{obs} vs concentración de inhibidor no solo sugiere un mecanismo de inhibición de dos pasos, a los que se suma la fase lenta observada en los cursos temporales, sino que también muestra la gran estabilidad del bucle anti-peptidasa. Si esto es correcto, la hidrólisis de *EgKU-7* por la tripsina catiónica canina se daría fuera del bucle anti-peptidasa. Este dato, sumado a la diferencia de tamaño de la banda correspondiente al primer producto de la hidrólisis cuando se incubaba *EgKU-7* con la tripsina bovina, y la evidencia de dos sitios de unión obtenida en el ajuste por Dynafit, indican que la tripsina bovina y la catiónica canina difieren en sus preferencias de corte. Como sabemos que la tripsina bovina corta en las extensiones del dominio además del sitio P1, presumimos que la hidrólisis podría ser en el N y/o C-terminal. En particular, nos inclinamos por la extensión C-terminal, ya que la tripsina canina hidroliza a *EgKU-7* en un sitio específico y esta región es parte de la proteína nativa. Además, la existencia de dos sitios unión nos lleva a pensar que la extensión C-terminal es un sitio de unión específico para la tripsina, que sería hidrolizado rápidamente por la tripsina catiónica canina, más lentamente por la tripsina bovina y, en caso de hidrolizarse por la tripsina aniónica canina, lo sería mucho más lentamente.

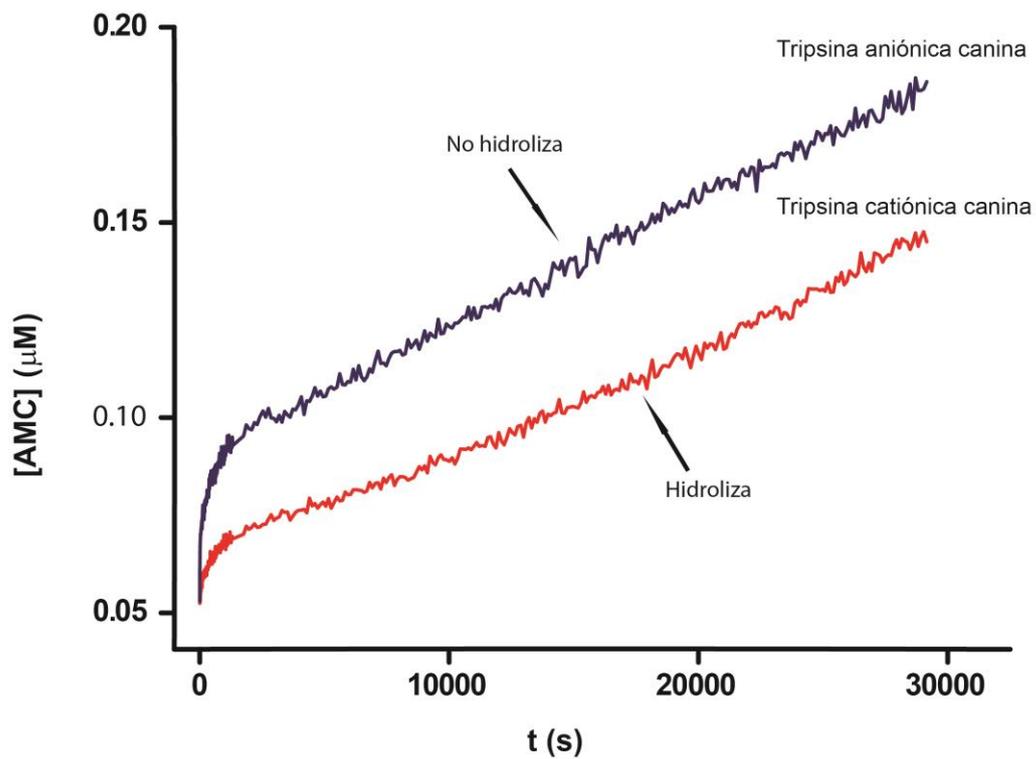


Figura 4.18 Curso temporal de larga duración de la inhibición de tripsinas caninas por *EgKU-7*. Se incubó 3 nM de *EgKU-7* con 5 μM de sustrato y se inició la reacción agregando 0.3 nM de la correspondiente tripsina. Se graficó la formación de producto en función del tiempo. En azul, se muestra el curso temporal de la inhibición de tripsina aniónica; y en rojo, el de la tripsina catiónica canina. “No hidroliza” e “hidroliza”, hacen referencia al efecto sobre *EgKU-7* de las tripsinas aniónica y catiónica, respectivamente, como se muestra en las figuras 4.20 y 4.19.

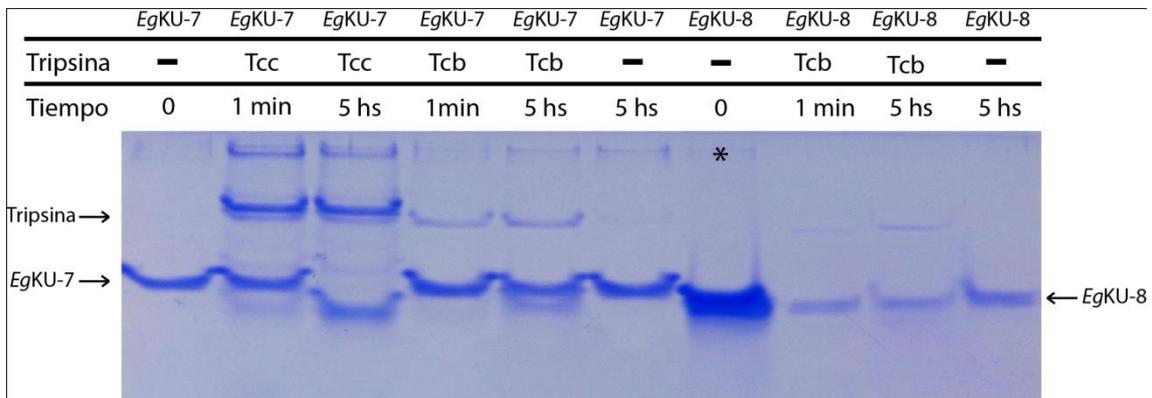


Figura 4.19 Análisis por SDS-PAGE en amortiguador de tripsina de *EgKU-7* incubado con tripsina catiónica canina (Tcc) y con tripsina bovina (Tcb), y de *EgKU-8* incubado con tripsina bovina. Se incubó 15 μM de inhibidor con 1.5 μM de tripsina en amortiguador 50 mM Tris pH 8 a 37°C. Al cabo de 1 min y de 5 hs, se tomaron alícuotas de 60 μl y se frenó la reacción agregando 5 μl de PMSF 50 mM. Se sembraron 30 μl de cada alícuota previamente tratada con el reductor DTT. En el carril marcado con *, se muestra *EgKU-8* como control de peso molecular

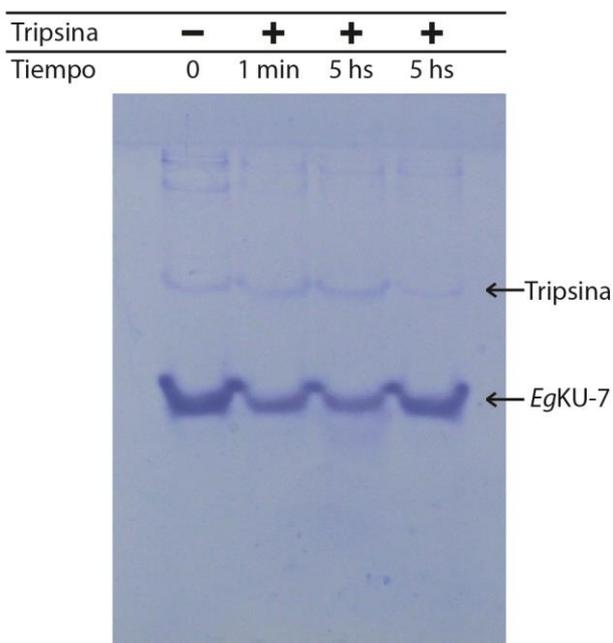


Figura 4.20 Análisis por SDS-PAGE en amortiguador de tripsina de *EgKU-7* incubado con tripsina aniónica canina. Se incubó 15 μM de *EgKU-7* con 1.5 μM de tripsina en amortiguador 50 mM Tris pH 8 a 37°C. Al cabo de 1 min y a las 5 horas, se tomaron alícuotas de 60 μl y se frenó la reacción agregando 5 μl de PMSF 50 mM. Se sembraron 30 μl de cada alícuota previamente tratada con el reductor DTT.

4.7. Estudio de la actividad inhibidora de tripsinas de una forma truncada de *EgKU-7* (sin la extensión C-terminal)

Los resultados obtenidos con el inhibidor *EgKU-7* muestran, por un lado, una inhibición de tripsina mayor a la correspondiente a una relación de uno a uno, pues los datos se ajustan a un modelo con dos sitios de unión independientes. Consistente con la existencia de dos sitios de unión, los cursos temporales de la inhibición de tripsinas presentan un comportamiento bifásico. Además, la tripsina catiónica canina no parece hidrolizar el sitio P1, pero sí otra región de *EgKU-7*, con una cinética muy rápida, lo que muestra una fuerte afinidad por ese sitio de corte. Esto es coherente con los dos valores de K_i muy pequeños determinados para la inhibición de esta tripsina por el modelo de dos sitios de unión independientes. Esta hidrólisis se refleja, además, en el pequeño aumento de actividad de la enzima en los temporales a tiempos prolongados. Como hemos mencionado, el segundo sitio de unión podría estar ubicado en la extensión C-terminal del dominio Kunitz de *EgKU-7*, ya que esta extensión está presente en el inhibidor nativo y es hidrolizada específicamente por la tripsina bovina en la arginina 58, y no en otros residuos básicos de su secuencia. Por tanto, presumimos que la extensión C-terminal podría estar vinculada con el hipotético segundo sitio de unión de *EgKU-7*, y que participaría en la inhibición de las tripsinas, de hecho, actuando como sustrato. Para confirmar la presencia de un sitio de unión a nivel del C-terminal, preparamos una forma recombinante de *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. La construcción correspondiente se realizó incluyendo solo la arginina 57, que es el residuo C-terminal de la forma truncada ("*EgKU-7* dominio"). Analizamos la cinética de la inhibición de esta forma de *EgKU-7* y la comparamos con la cinética de inhibición de *EgKU-7* entero.

4.7.1. La inhibición de tripsina por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal es algo menor que la del inhibidor entero

Primero caracterizamos la inhibición de la tripsina bovina; al igual que para *EgKU-7* entero, realizamos los experimentos para determinar el K_i^* . Como se muestra en la Figura 4.21, los datos obtenidos con la forma truncada de *EgKU-7* se ajustan muy bien a la ecuación de Morrison utilizando el programa Origin 8.1, cuando fijamos la concentración de tripsina activa utilizada en el experimento. También se ajustaron al modelo de un sitio con Dynafit. Vale aclarar que la enzima utilizada en estos experimentos era del mismo lote que la utilizada en los experimentos con *EgKU-7* entero. El valor de K_i^* obtenido fue de 26 ± 6 pM, del orden del K_i^a de *EgKU-7* entero.

También estudiamos los cursos temporales de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal (Figura 4.22). Se observó el mismo comportamiento que para *EgKU-7* entero. De los datos, se estimaron las constantes k_1 y k_{-1} y de éstas se calculó la constante $K_i^* = 30 \pm 1$ pM. Es interesante notar que las constantes de inhibición K_i^* determinadas por ambos métodos son muy parecidas, a diferencia de lo que ocurre con *EgKU-7* entero, para el cual la obtenida de los experimentos de curso temporal triplica a la K_i^a obtenida por el modelo de dos sitios independientes. Además los valores de K_i^* de *EgKU-7* truncado son comparables al valor de K_i^* calculado a partir de los cursos temporales para *EgKU-7* entero (43 ± 11 pM), lo que indica que el K_i^* determinado por los cursos temporales refleja el K_i^* que involucra al sitio P1.

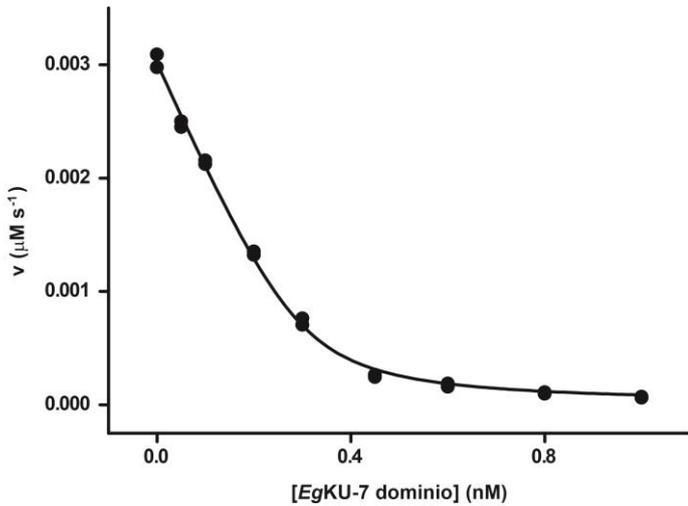


Figura 4.21 Inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. La tripsina (0.3 nM) se incubó con la correspondiente concentración de inhibidor (0-1 nM) durante 15 minutos. Se inició la reacción agregando 5 μM de sustrato. Se grafica la velocidad de formación de producto en función de la concentración de *EgKU-7*. La línea negra muestra el ajuste a la ecuación de Morrison con el programa Origin 8.1.

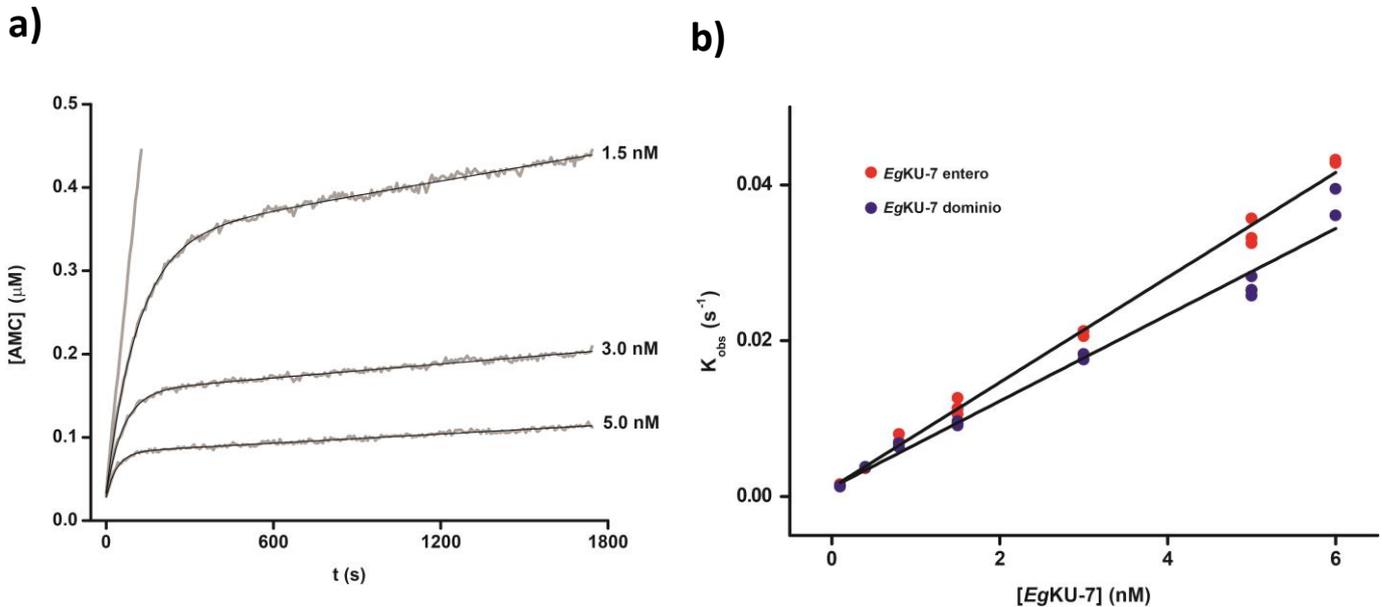


Figura 4.22 Curso temporal de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. **a)** Se incubó *EgKU-7* truncado (1.5, 3.0 y 5.0 nM) con 5 μM de sustrato y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. La línea negra representa el ajuste a una función exponencial más recta (ecuación 3) utilizando el programa Origin 8.1. **b)** Constante exponencial k_{obs} , obtenida a partir del ajuste de los cursos temporales, en función de la concentración de *EgKU-7* entero (rojo) y truncado (azul) (0-6 nM). La concentración de enzima utilizada fue de 0.05 nM para 0.1-1.5 nM de inhibidor; 0.3 nM para 1.5-5 nM; y 0.6 nM para 5-6 nM. Se observa un comportamiento lineal, que indica que la inhibición ocurre a través de un mecanismo de un único paso. La línea negra representa el mejor ajuste a la ecuación de la recta.

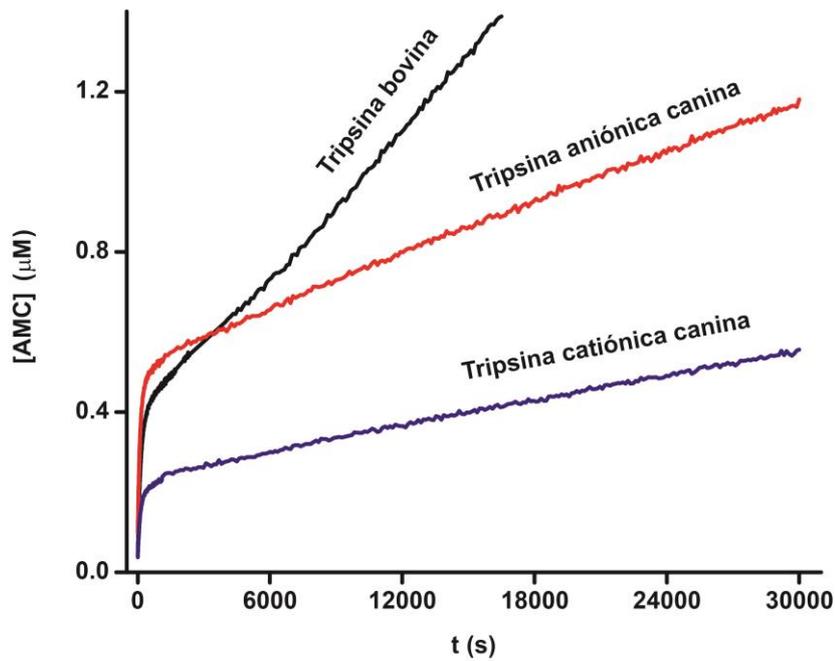


Figura 4.23 Cursos temporales de larga duración de la inhibición de tripsinas bovina y caninas por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. Se incubó 1 nM de *EgKU-7* con 5 μM de sustrato y se inició la reacción agregando 0.3 nM de la respectiva tripsina. Se graficó la formación de producto en función del tiempo. En negro, se muestra el curso temporal de la inhibición de tripsina bovina; en rojo, el de la tripsina aniónica canina; y en azul, el de la tripsina catiónica canina.

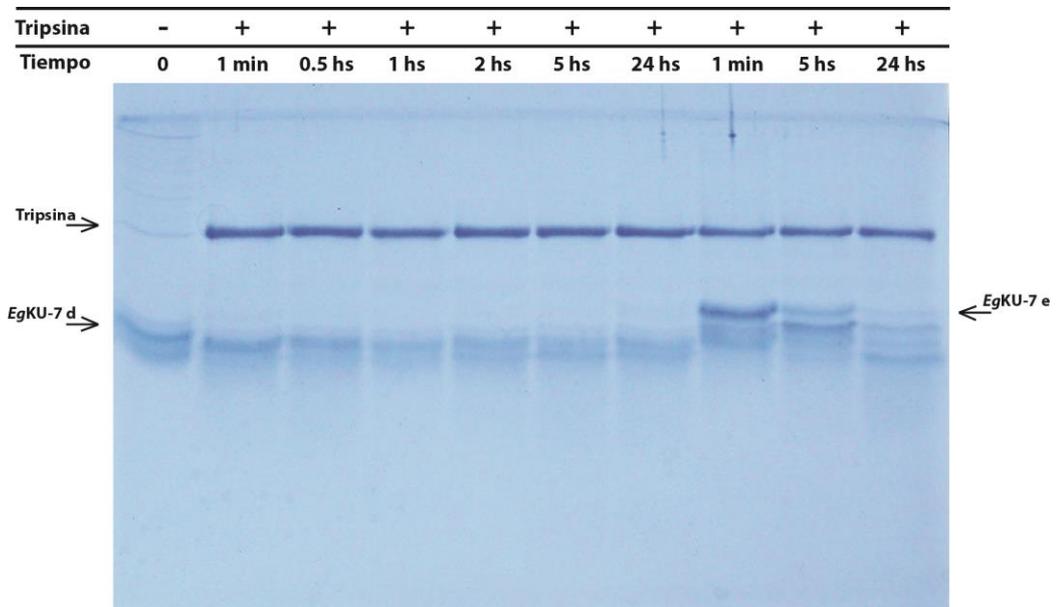


Figura 4.24 Análisis por SDS-PAGE en amortiguador de tricina de *EgKU-7* entero y truncado incubados con tripsina bovina durante períodos de tiempo crecientes. Se incubó 15 μM de la forma correspondiente de *EgKU-7* con 1.5 μM de tripsina en amortiguador Tris 50 mM pH 8 a 37°C; se tomaron alícuotas de 60 μl , a los distintos tiempos, y se frenó la reacción con 5 μl de PMSF 50 mM. En el gel, se sembraron 30 μl de cada alícuota, previamente tratada con el reductor DTT.

En suma, los dos métodos utilizados para determinar el valor de K_i^* de *EgKU-7* sin la extensión C-terminal sobre la tripsina bovina dieron resultados muy similares. Esto, junto a los buenos ajustes a la ecuación de Morrison de esta forma de *EgKU-7*, son indicios de que el extremo C-terminal estaría efectivamente involucrado en la interacción con la enzima.

4.7.2. *EgKU-7* sin la extensión C-terminal también es hidrolizado por la tripsina bovina

También estudiamos la estabilidad que presenta *EgKU-7* sin la extensión C-terminal al ser incubado con tripsina bovina; obtuvimos resultados similares a los de *EgKU-7* entero. Por un lado, realizamos estudios de cursos temporales de 8 horas de duración de la inhibición de tripsina por *EgKU-7* truncado (Figura 4.23). Se observó que, al igual que *EgKU-7* entero, el inhibidor truncado se modifica cuando es incubado con tripsina bovina, lo que se refleja en el aumento de la pendiente luego que se alcanza la inhibición, de un valor de $4.2 \times 10^{-5} \mu\text{M s}^{-1}$ a $6.8 \times 10^{-5} \mu\text{M s}^{-1}$ para los períodos de 1000 a 2000 s y de 14000 a 17000 s, respectivamente. Asimismo, se mantiene fuertemente inhibida la hidrólisis del sustrato artificial durante todo el curso temporal, ya que la pendiente es siempre dos órdenes de magnitud inferior al valor en ausencia de inhibidor ($1.8 \times 10^{-3} \mu\text{M s}^{-1}$).

Por otro lado, estudiamos por SDS-PAGE en amortiguador de tricina muestras de *EgKU-7* truncado incubado con tripsina a diferentes tiempos. En este experimento, verificamos que esta forma de *EgKU-7* tampoco resiste la hidrólisis. En el gel, se observa que, previo a la incubación con tripsina, migra como una banda de menor tamaño que *EgKU-7* entero. Se observa también cómo en el transcurso de la incubación aparece otra banda, que correspondería a la porción C-terminal del dominio Kunitz luego de la hidrólisis en el sitio P1. Esta banda migra a la misma altura que la banda más pequeña de la hidrólisis de *EgKU-7* entero. Se ve claramente que, a las 24 horas de incubación de *EgKU-7* entero, esta banda correspondería a *EgKU-7* entero cortado en la extensión C-terminal y en el sitio P1 (Figura 4.24). Por otro lado, se ve que al cabo de 24 horas, la forma truncada de *EgKU-7* no se hidroliza más de lo observado a las 5 horas; tal vez se alcance un equilibrio entre la hidrólisis y la resíntesis del sitio P1 que lleva a concentraciones relativamente similares de la proteína original y la hidrolizada.

Además, analizamos por espectrometría de masa de muestras reducidas y alquiladas los productos obtenidos luego de 24 horas de incubación con tripsina de la forma truncada de *EgKU-7*. Observamos picos correspondientes a los fragmentos peptídicos esperados de la hidrólisis de esta forma de *EgKU-7* en el sitio P1. Los fragmentos N y C-terminales del dominio se observaron como picos con masas correspondientes a la incorporación de ninguno a dos grupos carboxiamidometilo para el N-terminal, y de ninguno a cuatro para el C-terminal (Figura 4.25). Esto nuevamente es consistente con la modificación incompleta de los fragmentos para dar productos parcialmente carboxiamidometilados (Figura 4.26). Además, se observan picos que podrían corresponder al dominio de *EgKU-7*, es decir parte de *EgKU-7* truncado no estaría hidrolizado en el sitio P1. De manera, al igual que *EgKU-7* entero, *EgKU-7* sin la extensión C-terminal se hidroliza en el sitio P1 y a las 24 horas se mantiene parte del mismo sin hidrolizar en el sitio P1.

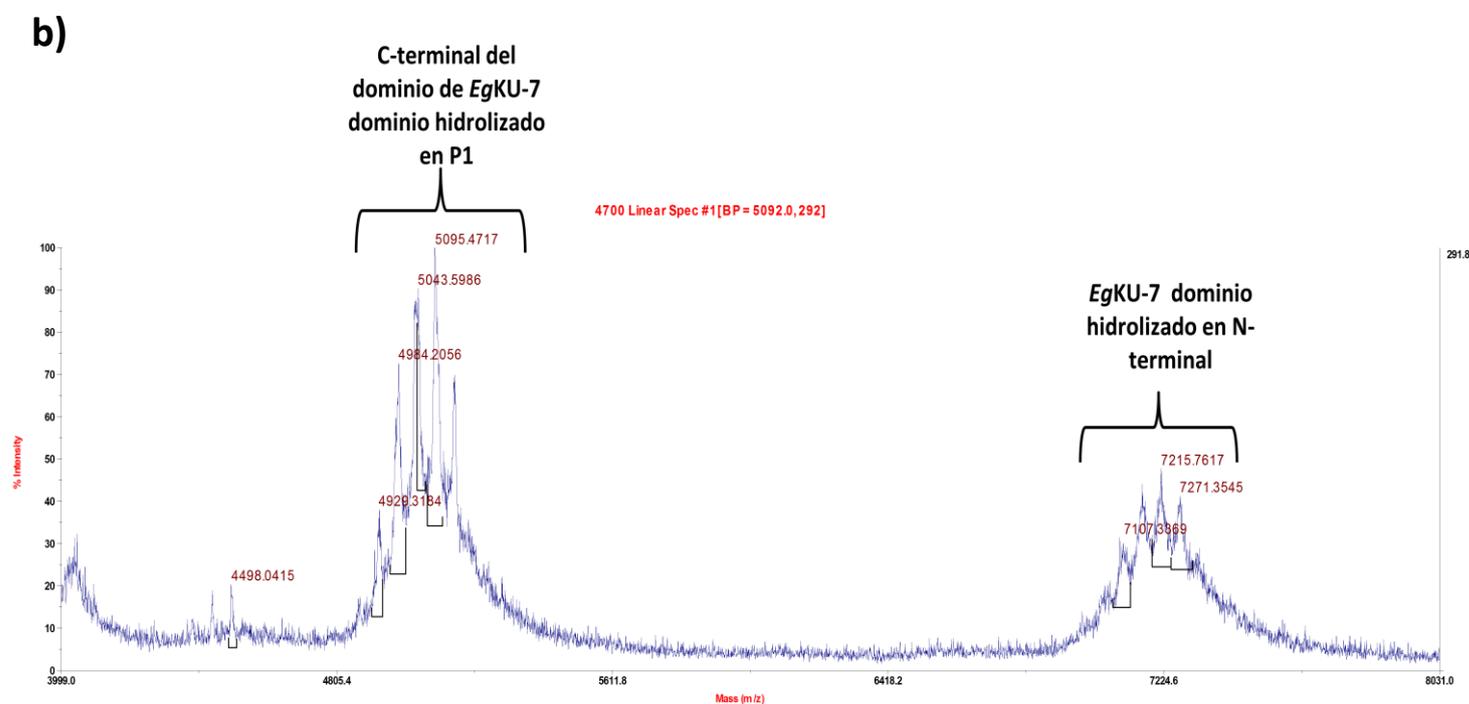
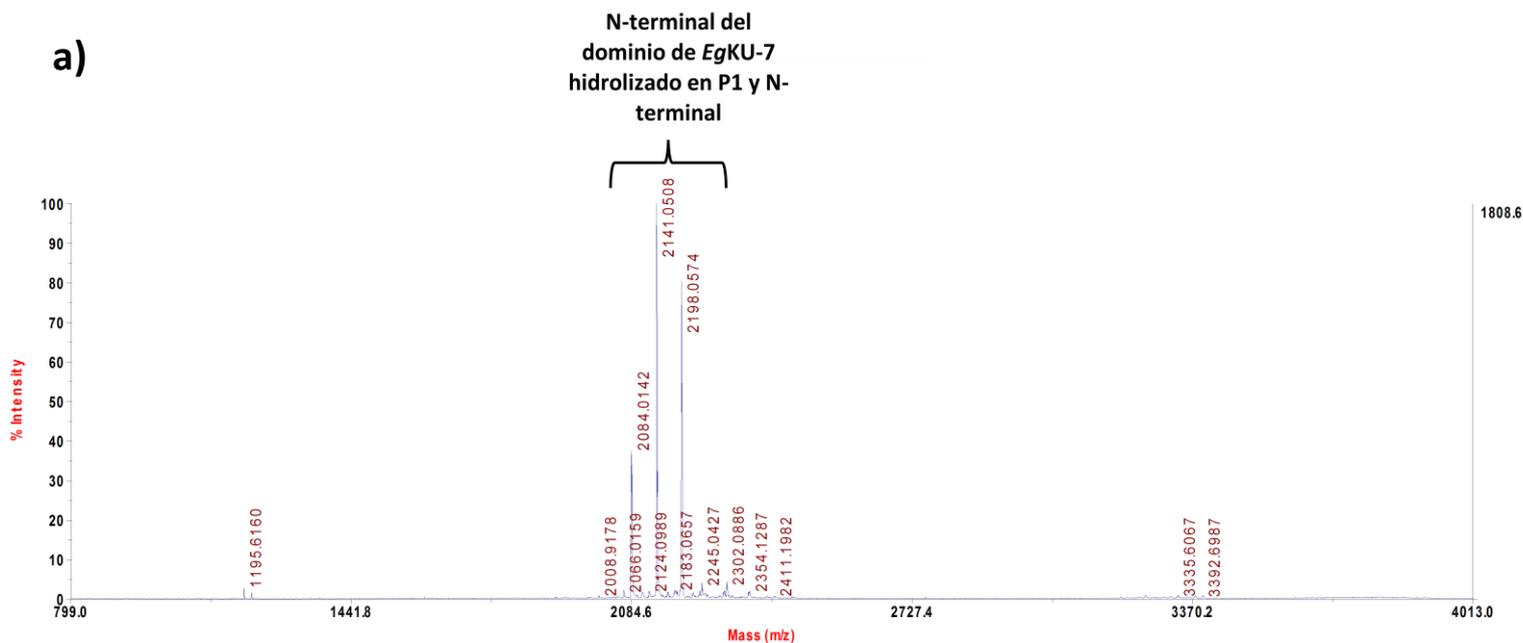
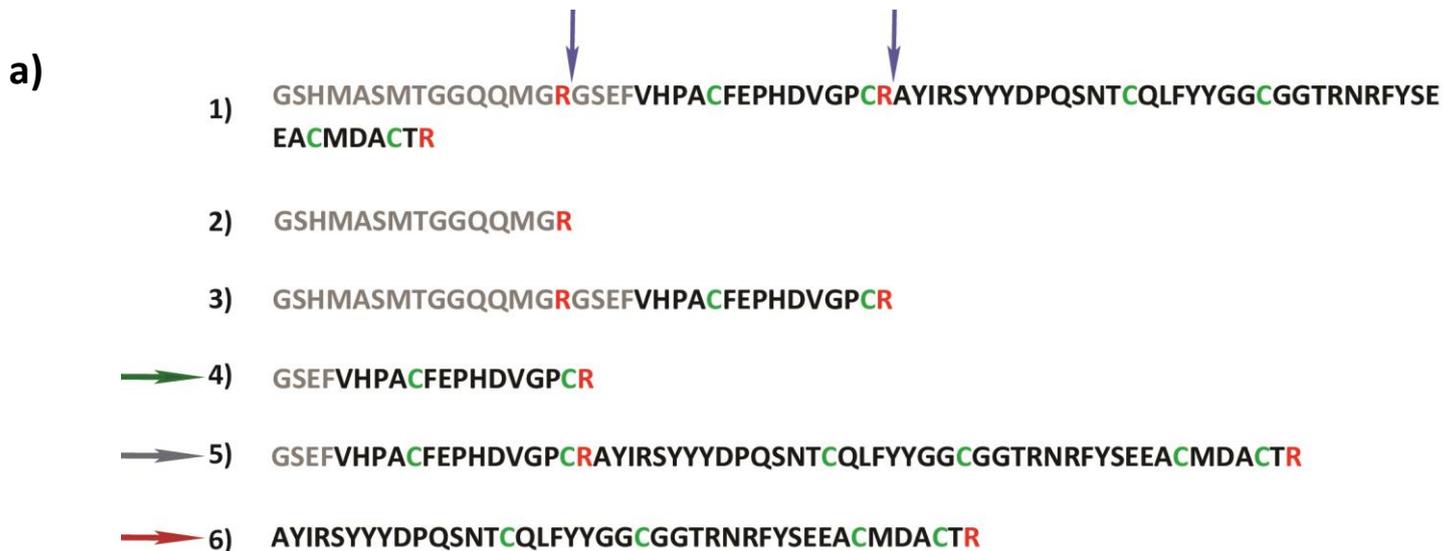


Figura 4.25 Análisis por espectrometría de masa (MALDI TOF/TOF) de EgKU-7 sin la extensión C-terminal luego de 24 horas de incubación con tripsina; la muestra fue reducida con DTT y alquilada con iodoacetamida previo al análisis. La incubación se realizó en amortiguador Tris pH 8 a 37°C. **a) Rango de masa de 800 a 4000 Da en modo lineal; se observa picos de la porción N-terminal del dominio Kunitz, con masas correspondientes a la incorporación de ninguno (PM teórico 2084.3) a dos grupos carboxiamidometilo. **b)** Rango de masa de 4000 a 8000 Da en modo reflector; se observan picos de la porción C-terminal del dominio Kunitz, con masas correspondientes a la incorporación de ninguno (PM teórico 5081.5) a cuatro grupos carboxiamidometilo; y el dominio hidrolizado en las extensiones N y C-terminales pero sin hidrolizar en P1. Cada modificación introducida por la incorporación de iodoacetamida suma 57 Da (Figura 4.26).**



b)

Pesos moleculares (Da) de los diferentes fragmentos peptídicos reducidos y alquilados de *Eg*KU-7 dominio luego de tratar con tripsina bovina

	Péptido (tioles)	Péptido (disulfuros)	Péptido + 1 CAM	Péptido + 2 CAM	Péptido + 3 CAM	Péptido + 4 CAM	Péptido + 5 CAM	Péptido + 6 CAM
1	8509.4	8503.4	8566.7	8623.7	8680.7	8737.7	8794.7	8851.7
2	1535.7	-	-	-	-	-	-	-
3	3602.0	3600.0	3659.2	3716.2	-	-	-	-
→ 4	2084.3	2082.3	2141.4	2198.4	-	-	-	-
→ 5	6991.7	6985.7	7049.0	7106.0	7163.0	7220.0	7277.0	7334.0
→ 6	4925.4	4921.4	4982.6	5039.6	5096.6	5153.6	-	-

Figura 4.26 Productos de la hidrólisis de *Eg*KU-7 sin la extensión C-terminal por tripsina bovina. a) Se muestran las secuencias de los péptidos que se pueden obtener luego de la hidrólisis de la proteína recombinante (cuya secuencia se indica en 1). Con flechas azules, se señalan los sitios dónde se verificó que ocurre hidrólisis. Con flechas de colores, los péptidos observados en las muestras reducidas con DTT y alquiladas con iodoacetamida: flecha verde, porción N-terminal del dominio Kunitz; flecha roja, porción C-terminal del dominio; flecha gris, dominio sin extensiones. b) Tabla con los correspondientes pesos moleculares, mostrando los pesos moleculares teóricos con y sin oxidación de cisteínas a disulfuros y con alquilación incompleta con iodoacetamida (CAM: carboxiamidometilación).

4.7.3. EgKU-7 sin la extensión C-terminal presenta un comportamiento monofásico en el curso temporal de la inhibición de tripsinas caninas

Estudiamos los cursos temporales de la inhibición de las tripsinas caninas por *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. Los ajustes con las ecuaciones de exponencial más recta y la ecuación con dos exponenciales se superponen muy bien, siendo el valor de k_{obs} obtenido de la ecuación de exponencial más recta muy comparable al de k_{obs1} de la ecuación de doble exponencial (Figuras 4.27 y 4.28). Estos resultados parecen indicar que la extensión C-terminal del dominio Kunitz estaría involucrada en el comportamiento bifásico del curso temporal de la inhibición de las tripsinas caninas. En conjunto con los experimentos de determinación de K_i^* con la tripsina bovina, indican que la extensión C-terminal estaría vinculada en la interacción con la enzima. Además, como los métodos de cuantificación de la concentración de *EgKU-7* sin la extensión C-terminal y título de la enzima activa son los mismos a los utilizados con *EgKU-7* entero, las diferencias en el comportamiento del inhibidor entero y el truncado no pueden asignarse a problemas en la determinación de las concentraciones.

Estudiamos además, la estabilidad de *EgKU-7* sin la extensión C-terminal frente a las tripsinas caninas mediante cursos temporales de inhibición de larga duración (Figura 4.23). Se observa que la inhibición de las tripsinas caninas por esta forma truncada *EgKU-7* se mantiene durante todo el experimento, aún en el caso de la tripsina catiónica, para la que se había observado un leve aumento de la actividad de la enzima en el caso de *EgKU-7* entero.

4.8. Discusión de los estudios funcionales de *EgKU-7*

Estudiamos la inhibición de tripsinas por *EgKU-7*, en particular, utilizando tripsina catiónica bovina (comercial) y tripsinas catiónica y aniónica caninas (purificadas de páncreas). Como era esperable para este tipo de inhibidores, en los tres casos *EgKU-7* se comportó como un inhibidor lento de alta afinidad. No obstante, estudios finos de la cinética de la inhibición mostraron comportamientos atípicos en la actividad de *EgKU-7*. Más aún, se observaron características particulares en la actividad inhibidora de cada una de las tripsinas estudiadas. Es decir, nuestros resultados demuestran que *EgKU-7* es un inhibidor muy particular de tripsinas, que presenta comportamientos distintivos en la interacción con diferentes tripsinas.

4.8.1. *EgKU-7* posee dos sitios de interacción con la enzima

Los resultados del estudio de la velocidad de hidrólisis del sustrato de diferentes tripsinas a medida que se aumenta la concentración de *EgKU-7* indicaron que es un inhibidor de alta afinidad de tripsinas, tal como se esperaba por la presencia de una arginina en su sitio P1. No obstante, nos fue difícil analizar los datos, ya que no logramos ajustarlos a la ecuación de Morrison. El mal ajuste parecía ser consecuencia de que presenta una inhibición mayor que la relación estequiométrica uno a uno, es decir una molécula de inhibidor parecía inhibir más de una molécula de enzima (Figura 4.1). Esto resultaba muy improbable para un inhibidor monodominio canónico. Una posible explicación era que *EgKU-7* presentara más de un sitio de unión con la tripsina. En base a su secuencia, supusimos que podía estar ubicado en la extensión C-terminal. Utilizando una forma de *EgKU-7* sin esa extensión, observamos excelentes ajustes de los datos a la ecuación de Morrison, lo que apoya la existencia de un segundo sitio de unión en la extensión C-terminal. Además, mediante el programa Dynafit, pudimos ajustar los datos de *EgKU-7* entero a un modelo con dos sitios de unión

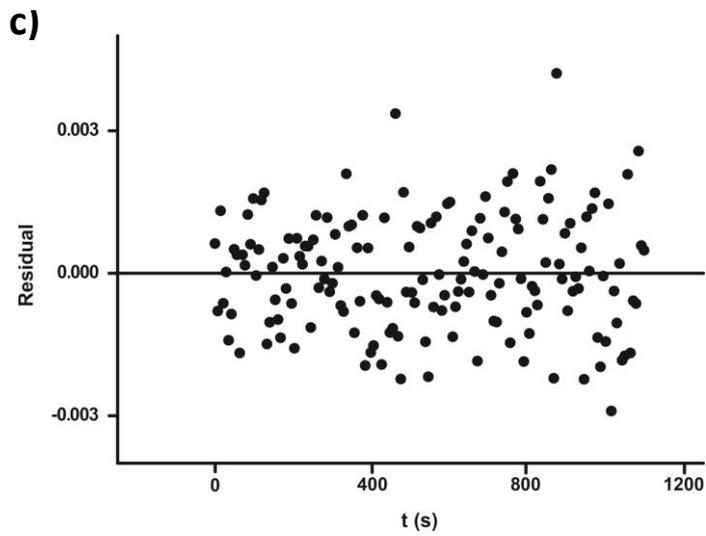
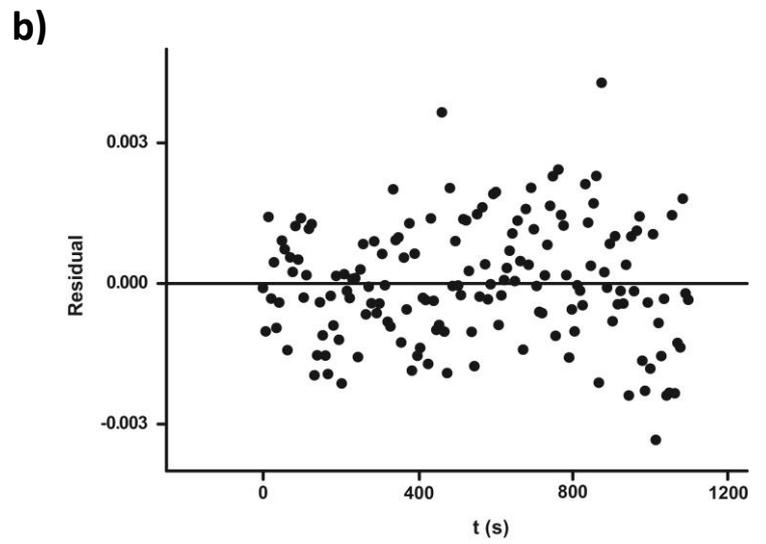
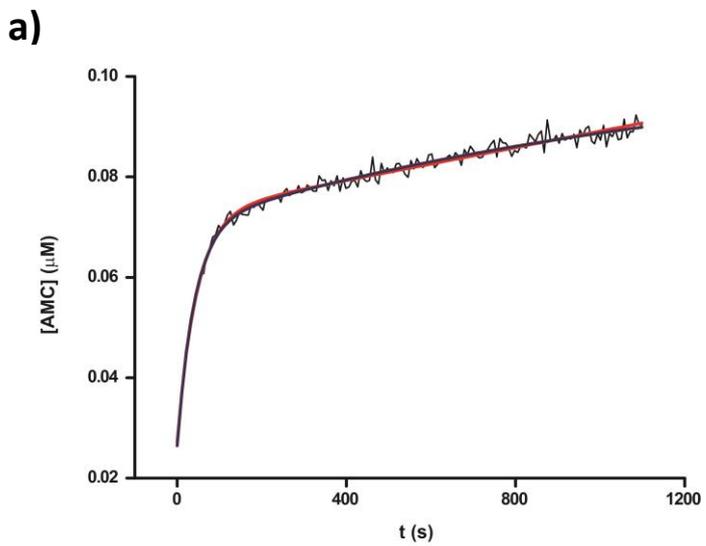


Figura 4.27 Curso temporal de la inhibición de tripsina catiónica canina por *EgKU-7*. **a)** Se incubó *EgKU-7* (3nM) con el sustrato (5 μM) y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. La línea roja representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta, la azul a la ecuación exponencial doble. **b)** Residual en función del tiempo al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta. **c)** Residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial doble.

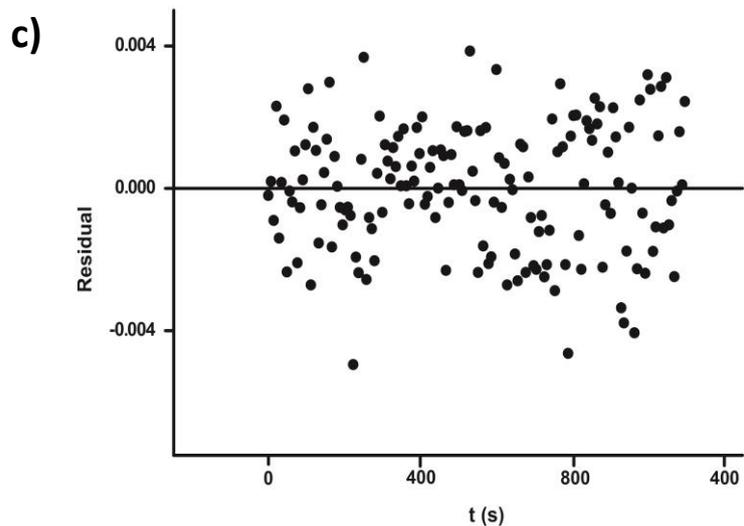
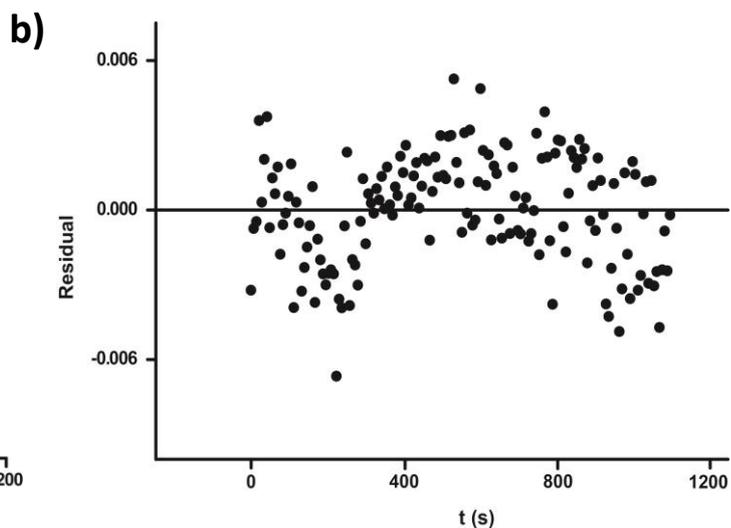
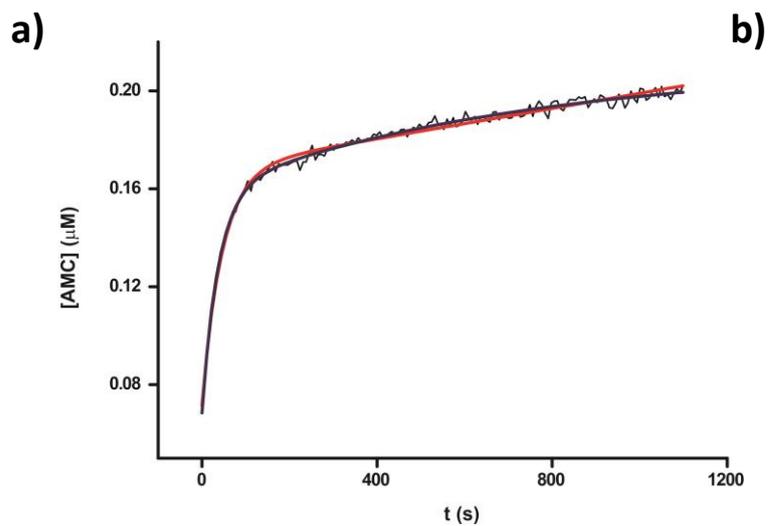


Figura 4.28 Curso temporal de la inhibición de tripsina aniónica canina por *EgKU-7*. **a)** Se incubó *EgKU-7* (0.3 nM) con el sustrato (5 μM) y se inició la reacción agregando 0.3 nM de tripsina. La línea roja representa el ajuste a la ecuación exponencial más recta, la azul a la ecuación exponencial doble. **b)** Residual en función del tiempo al ajustar los datos a la ecuación exponencial más recta. **c)** Residual al ajustar los datos a la ecuación exponencial doble.

independientes, y determinar valores de K_i^* para ambos sitios de unión. El valor de K_i^a fue similar para las tripsinas catiónicas bovina y canina (de orden 10^{-11} M) y un orden menor para la aniónica (de orden 10^{-12} M). Los valores de K_i^b fueron similares entre la tripsina bovina y la aniónica canina (de orden 10^{-10} M) pero un orden menor para la catiónica canina (de orden 10^{-11} M) (Tabla 4.1). Las diferencias de un orden en K_i^b de la tripsina catiónica canina y en K_i^a de la tripsina aniónica canina, indican que estos sitios tienen diferencias relevantes en la interacción con estas enzimas, siendo esto un indicio de que podrían ser el blanco fisiológico de cada uno de los sitios de interacción de EgKU-7.

4.8.2. Los cursos temporales de la inhibición de tripsinas por EgKU-7 muestran diferencias entre las tripsinas caninas y la bovina

EgKU-7 se comportó como un inhibidor lento de las tres tripsinas estudiadas, llevándole algunos minutos alcanzar una situación de equilibrio. El curso temporal frente a la tripsina bovina mostró durante los primeros minutos un comportamiento típico, ajustándose muy bien los datos a la ecuación de exponencial más recta. Sin embargo, en el final del curso temporal, se pudo observar, en algunos casos, un leve aumento de la actividad de la enzima (Figura 4.3). Esto nos dio indicios de que tal vez EgKU-7 no resistía la hidrólisis por la tripsina (ver sección siguiente). Por otro lado, los cursos temporales de la inhibición de tripsinas caninas por EgKU-7 mostraron un muy leve aumento de la actividad enzimática al final del curso temporal para la tripsina catiónica y nulo para la aniónica (Figura 4.18). Además, para ambas tripsinas caninas, se observó un comportamiento bifásico, es decir la inhibición parece ocurrir en dos fases, seguramente debido al segundo sitio de interacción. Logramos un buen ajuste cuando utilizamos una ecuación de dos exponenciales, y obtuvimos dos valores de k_{obs} (k_{obs1} y k_{obs2}) por ajuste; suponemos que cada k_{obs} corresponde a un sitio de unión. Este comportamiento es distinto al que habíamos observado para EgKU-3 y EgKU-8 frente a las peptidasas con que los estudiamos; en ese caso, los ensayos ajustaron muy bien a una ecuación de una exponencial más recta.

A fin de determinar el mecanismo de inhibición, estudiamos la relación de k_{obs} (para las tripsinas caninas utilizamos el k_{obs1}) en función de la concentración de inhibidor. En el caso de la tripsina bovina, los gráficos presentaron un comportamiento lineal, atípico para los inhibidores Kunitz, compatible con un mecanismo de inhibición de un único paso (Figura 4,2b). En cambio, para las tripsinas caninas obtuvimos un comportamiento hiperbólico, es decir que el mecanismo de inhibición de las tripsinas caninas es el típico de dos pasos (Figura 4.17). Como la tripsina bovina no estaría presente en el sitio dónde se establece el protoescólex en el intestino de perro, el comportamiento lineal podría indicar que la interacción es con una tripsina que no es su blanco fisiológico. Si bien el comportamiento hiperbólico de k_{obs1} vs [EgKU-7] frente a las tripsinas pancreáticas caninas tampoco quiere decir que estas enzimas sean su blanco fisiológico, este resultado también indica que EgKU-7 podría tener especificidad por las tripsinas caninas.

A partir de los gráficos de k_{obs} vs [EgKU-7] calculamos las constantes cinéticas y de éstas las constantes K_i^* . Comparando este valor con los valores de K_i^a determinados con Dynafit, pensamos que el K_i^a corresponde a la primera fase de los cursos temporales, que es de donde salen los datos para calcular K_i^* . El K_i^* para la tripsina bovina fue el triple que el valor calculado de K_i^a , para la tripsina catiónica canina fue solo un poco mayor, pero para la aniónica fue un

orden de magnitud mayor que el respectivo K_i^a . En cambio, cuando trabajamos con *EgKU-7* sin la extensión C-terminal frente a tripsina bovina, el K_i^* de los experimentos de *v* en función del tiempo fue muy comparable al valor obtenido a partir de los cursos temporales. Además, estos valores de K_i^* son también muy comparables al valor de K_i^* obtenido de los cursos temporales de la inhibición de tripsina bovina por *EgKU-7* entero (Tablas 4.1 y 4.2). Esto parece indicar que el valor de K_i^* obtenido por los cursos temporales refleja exclusivamente la inhibición que involucra el sitio P1 en el bucle anti-peptidasa. Por otro lado, los menores valores de K_i^a en relación al K_i^* determinados por los cursos temporales para *EgKU-7* entero, quizás estén indicando que el segundo sitio contribuye a estabilizar la interacción del bucle anti-peptidasa con la tripsina. Esto no sería apreciado en los cursos temporales, pero sí en los gráficos de velocidad vs [*EgKU-7*]. Es decir, quizás los dos sitios de unión no sean del todo independientes.

4.8.3. La estabilidad de *EgKU-7* frente a la hidrólisis difiere entre las distintas tripsinas

Al observar que aumentaba un poco la actividad de la enzima en los cursos temporales de *EgKU-7* con tripsina bovina, realizamos estudios a tiempos más largos. Propusimos que *EgKU-7* se modificaría al interactuar con la tripsina bovina, ya que al cabo de aproximadamente una hora de estar en contacto con el inhibidor, la velocidad de la hidrólisis del sustrato (v_i) aumenta unas tres veces con respecto al valor que presenta a los minutos, manteniéndose ese nivel de actividad estable por al menos 8 horas. No observamos este efecto con las tripsinas caninas (si bien la tripsina catiónica parece aumentar levemente su actividad, este aumento es mucho menor al observado con la tripsina bovina). Estos experimentos indican diferencias en el patrón de inhibición de las tripsinas caninas por *EgKU-7* respecto a la inhibición de tripsina bovina; *EgKU-7* parecería ser modificado por la tripsina bovina y no tanto por las caninas.

Desde los estudios de Laskowski en la década de los 50, se sabe que los inhibidores canónicos se comportan como sustratos. Se unen fuertemente al sitio activo de la peptidasa, pero las enzimas hidrolizan muy lentamente el enlace P1-P1' en comparación con los sustratos típicos. Existen numerosas evidencias de que esta hidrólisis es muy lenta, aportadas por inhibidores cuyas vidas medias varían de días a años. Un ejemplo de cinética muy lenta lo da el BPTI cuando interacciona con la tripsina bovina: es extremadamente estable, con una vida media de varios años^{37,110}. La velocidad de la hidrólisis depende estrictamente de cómo interacciona el bucle anti-peptidasa del inhibidor con el sitio activo de la enzima. En efecto, existen casos en los que la interacción lleva a una hidrólisis muy rápida. Por ejemplo, la mesotripsina es capaz de hidrolizar muy rápidamente a varios inhibidores canónicos; en particular, hidroliza al BPTI en pocas horas³⁶.

Los resultados de los cursos temporales de larga duración con tripsina bovina nos llevaron a pensar que esta enzima podría hidrolizar a *EgKU-7* en el sitio P1 de manera relativamente rápida, y que el inhibidor se mantendría estabilizado por los enlaces disulfuro, conservando parte de su capacidad inhibidora. Estudios de electroforesis y espectrometría de masa de muestras tomadas al cabo de diferentes tiempos de incubación de *EgKU-7* con tripsina bovina mostraron que, efectivamente, *EgKU-7* se hidroliza en P1 y, además, en las extensiones N y C-terminales del dominio Kunitz (Figuras 4.5, 4.8, 4.9 y 4.10). La hidrólisis en el C-terminal – que es propio de la proteína nativa, a diferencia del N-terminal que es aportado por el vector de expresión - ocurre específicamente en la arginina de la posición 58, lo que indica que este sitio sería preferencial. Por otro lado, cuando estudiamos la estabilidad de *EgKU-7* sin la extensión

C-terminal frente a tripsina bovina, observamos que la hidrólisis a nivel de P1 no es total sino que parece alcanzarse un equilibrio entre el inhibidor hidrolizado y sin hidrolizar, donde las proporciones entre ambas especies son similares. Como esta forma de *EgKU-7* no posee el sitio de corte en el C-terminal, la hidrólisis en el sitio P1 se visualiza bien en el análisis por electroforesis. Este comportamiento viene de la mano con lo observado para otros inhibidores canónicos, que presentan un equilibrio entre la hidrólisis y resíntesis del enlace P1-P1' ^{110 37}. A su vez, es de destacar que nunca observamos a la enzima acilada con el inhibidor; esto indicaría que el intermediario acil-enzima tiene una corta vida media y presenta una rápida resolución tanto para la resíntesis del bucle como para completar el proceso de hidrólisis formando una molécula de *EgKU-7* con el bucle anti-peptidasa hidrolizado. Una vez hidrolizado, *EgKU-7* se mantiene unido a la enzima, si bien con una menor afinidad, pues los experimentos realizados con el inhibidor previamente incubado 24 horas con tripsina mostraron un K_i^* un orden mayor que el del inhibidor no tratado.

El estudio de la estabilidad de *EgKU-7* frente a las tripsinas caninas también mostró un resultado no esperado. Sesgados por el resultado de los cursos temporales de larga duración, esperábamos que *EgKU-7* no fuera hidrolizado por las tripsinas caninas. Ese fue el caso para la tripsina aniónica. En cambio, la tripsina catiónica hidrolizó a *EgKU-7*, si bien la hidrólisis pareció ser diferente de la observada con la enzima bovina. En efecto, sería más rápida y en otro sitio, ya que el producto obtenido migra más en la electroforesis que el primer producto que se obtiene cuando se incuba *EgKU-7* con tripsina bovina. El producto de la hidrólisis de *EgKU-7* con la tripsina catiónica canina migra de forma similar a *EgKU-7* recombinante sin la extensión C-terminal. Si bien nos faltó confirmarlo por espectrometría de masa, presumimos que el corte sería fuera del dominio Kunitz.

Por otro lado, los resultados de los estudios cinéticos indican que la tripsina bovina es capaz de hidrolizar rápidamente el sitio P1 de *EgKU-7* y que las caninas no son capaces de hacerlo. Esto no solo se refleja en los cursos temporales de larga duración, en los que la tripsina bovina recupera mucha actividad y las caninas no, sino también en el comportamiento lineal de los gráficos de k_{obs} vs [*EgKU-7*], el cual parece ser consecuencia de que el bucle esté abierto. En este sentido, observamos que *EgKU-8*, que presenta un sitio de corte para trombina en el bucle anti-peptidasa próximo al P1, pasa de tener un comportamiento hiperbólico en los gráficos de k_{obs} vs [*EgKU-8*] a uno lineal cuando se lo trata con trombina (Figura 4.12). Seguramente, este tratamiento afecte la estabilidad del sitio P1 de *EgKU-8*. Asimismo, el resultado sugiere que el comportamiento lineal de *EgKU-7* es consecuencia de que el bucle anti-peptidasa se abre, producto de la inestabilidad que presenta frente a la tripsina bovina. De manera que el comportamiento lineal refleja la inestabilidad del bucle que, al abrirse, impediría la transición hacia un complejo "apretado" resistente a la hidrólisis. En otras palabras, sería indicativo de que, más que como un buen inhibidor, *EgKU-7* se comporta como un buen sustrato frente a la tripsina bovina. Por otro lado, con la tripsina catiónica canina, *EgKU-7* presenta un comportamiento hiperbólico. Es hidrolizado, pero el tamaño de la banda que se obtiene es similar a la construcción de *EgKU-7* sin la extensión C-terminal. Esto nos lleva a proponer que la tripsina catiónica canina hidroliza la extensión C-terminal de *EgKU-7* pero no el bucle anti-peptidasa.

Es interesante que, si bien el K_i^* de *EgKU-7* con la tripsina bovina es similar al que presenta con las tripsinas caninas, el bucle anti-peptidasa es mucho menos resistente a la hidrólisis por parte de la tripsina bovina. Esto parece una prueba clara de que la fuerte afinidad no necesariamente está relacionada con la estabilidad del bucle y constituye un dato más en el sentido que la resistencia a la hidrólisis de los inhibidores canónicos se acompaña de algo más que la fuerte unión que impide el ataque nucleofílico. Este resultado estaría apoyando la teoría del mecanismo estándar o de Laskowski, la más aceptada para explicar la resistencia a la hidrólisis de los inhibidores canónicos (ver 1.4.4 y 1.4.5 en Introducción), que plantea que la resistencia se debe a que el bucle anti-peptidasa es resintetizado luego de ser hidrolizado ¹¹⁰. Es difícil, con los datos que tenemos, determinar cuál o cuáles son los motivos que explican el porqué de la diferencia en la resistencia a la hidrólisis de *EgKU-7* por las diferentes tripsinas. Las tres enzimas con las que trabajamos difieren muy poco en las regiones involucradas en la catálisis; como se comentó en la sección 3.3.1 solo en el residuo 217. Tal vez, estudios de cristalografía ayuden a entender esta diferencia de estabilidad. Del lado del inhibidor, también es difícil saber cuál es la base molecular de esta diferencia; posiblemente se deba tanto al bucle como a la conformación del dominio Kunitz, ya que ambos son muy importantes para la correcta inhibición. Suponemos que, por algún motivo, el bucle anti-peptidasa de *EgKU-7* hidrolizado por la tripsina bovina no quedaría en una orientación que favorezca la resíntesis en el sitio activo de la enzima como sucedería en las tripsinas caninas.

Por otro lado, observamos diferencias en el corte de la extensión C-terminal del dominio por parte de las diferentes tripsinas; tampoco sabemos explicar el porqué de esta diferencia. En suma, nuestros resultados muestran que *EgKU-7* resiste la hidrólisis de la tripsina aniónica canina y no la de las otras. Por otro lado, las tripsinas catiónicas bovina y canina tienen diferente especificidad de corte. La bovina corta el enlace P1-P1' del bucle anti-peptidasas y las extensiones del dominio de *EgKU-7* recombinante. La canina hidroliza más rápidamente a *EgKU-7*, pensamos que en la extensión C-terminal del dominio de *EgKU-7*. Por tanto, en función de estos resultados, es interesante especular que el blanco fisiológico de inhibición de *EgKU-7* sería la tripsina aniónica, yendo esto de la mano con el menor valor de K_i^a que *EgKU-7* presenta con esta peptidasa. Asimismo, la rápida hidrólisis de *EgKU-7* por la tripsina catiónica canina, junto con el pequeño valor de K_i^b , indican que ésta sería el blanco del segundo sitio de unión de *EgKU-7* a la tripsina. La fuerte interacción y rápida hidrólisis de la porción C-terminal de *EgKU-7* por esta peptidasa sugieren que, efectivamente, la extensión C-terminal de *EgKU-7* actúa como sustrato de tripsina catiónica canina y abre interrogantes acerca del rol biológico de este fenómeno. Es posible que esta hidrólisis genere un péptido bioactivo o que el corte modifique la actividad de *EgKU-7*. En suma, *EgKU-7* parece tener preferencia en el sitio de unión del bucle anti-peptidasa por la tripsina aniónica y en el segundo sitio por la tripsina catiónica canina.

4.8.4. La extensión C-terminal participa en la inhibición de tripsinas

Como ya comentamos, cada molécula de *EgKU-7* parece inhibir más una molécula de tripsina. El buen ajuste a un modelo de dos sitios de interacción independientes de los datos de v vs $[EgKU-7]$, el comportamiento bifásico en los cursos temporales de la inhibición de las enzimas caninas por *EgKU-7* y el hecho que la extensión C-terminal sea hidrolizada en un sitio específico por las tripsinas catiónicas (verificado por espectrometría de masa solo para la

bovina), nos llevó a pensar que *EgKU-7* posee otro sitio de unión a la enzima involucrado en la inhibición, y que éste seguramente está ubicado en el C-terminal. Verificamos que esto es efectivamente así en ensayos cinéticos de tripsina bovina con una forma truncada *EgKU-7* (sin el extremo C-terminal). Obtuvimos ajustes perfectos a la ecuación de Morrison (Figura 4.21), y los valores de K_i^* calculados a partir de este ajuste y de los cursos temporales resultaron totalmente comparables. Más aún, estos valores de K_i^* fueron muy similares a los obtenidos por los cursos temporales con *EgKU-7* entero (Tablas 4.1 y 4.2). Esto parece indicar que el valor de K_i^* determinado por los cursos temporales refleja únicamente la interacción del bucle anti-peptidasa con la enzima.

Por otro lado, como los cursos temporales de la inhibición de tripsinas caninas no mostraron un comportamiento bifásico (Figuras 4.27 y 4.28), concluimos que el mecanismo de inhibición de *EgKU-7* es diferente al de los inhibidores canónicos típicos, e involucra a la extensión C-terminal. No conocemos de qué manera se une el C-terminal, y no hemos encontrado en la bibliografía inhibidores del tipo Kunitz que presenten un comportamiento de este tipo. En este contexto, es interesante comentar el mecanismo de inhibición de la anofelina de *Anopheles albimanus* (el prototipo de la familia I77 en la clasificación de MEROPS), que define una familia de inhibidores de trombina presentes en la saliva de mosquitos. Posee 60 aminoácidos y es una molécula flexible que carece de cisteínas que estabilicen un dominio. Inhibe trombina con un mecanismo muy particular: se extiende sobre la peptidasa orientándose en sentido inverso de como lo haría un sustrato. Interactúa con la trombina en dos regiones, una de ellas mediante el C-terminal que se ubica directamente en el sitio activo de la trombina; esta región presenta dos argininas contiguas que estarían directamente vinculadas a la inhibición¹¹¹. La extensión C-terminal de *EgKU-7* posee dos argininas consecutivas, contiguas al dominio, en una de las cuales es cortada por la tripsina bovina. Pensando en un comportamiento análogo al de la anofelina, esta extensión podría ubicarse en el sentido correcto (como un sustrato productivo) en el sitio activo de las tripsinas catiónicas (hidrolizándose) y de manera inversa en la tripsina aniónica (resistiendo la hidrólisis). Es claro que necesitamos realizar estudios estructurales para determinar cómo es la interacción de *EgKU-7* con las diferentes tripsinas.

En suma, nuestros resultados muestran que *EgKU-7* presenta dos sitios de unión con las tripsinas, uno ubicado en el bucle anti-peptidasa y el otro en la extensión C-terminal. Ambos son hidrolizados por la tripsina bovina. El sitio del bucle anti-peptidasa no sería hidrolizado por las tripsinas caninas; en cambio, el de la extensión C-terminal sería hidrolizado muy rápidamente por la enzima catiónica. Además, el sitio del bucle anti-peptidasa presenta una mayor afinidad por la tripsina aniónica, y el de la extensión C-terminal por la catiónica, lo que lleva a una rápida hidrólisis. El conjunto de los resultados indica que *EgKU-7* se comporta de manera distinta sobre cada una de ellas y permite especular que las tripsinas caninas serían su blanco fisiológico. *EgKU-7* inhibe totalmente a ambas peptidasas, pero se modifica cuando interactúa con la enzima catiónica, escindiéndose la extensión C-terminal. No sabemos si este fenómeno tiene relevancia biológica, pero quizás modifique la estructura del inhibidor o el péptido que se libera tenga algún tipo de actividad biológica.

Estos resultados nos dejan varias preguntas que no podemos responder aún: ¿Por qué la tripsina bovina hidroliza el sitio P1 y las caninas no? ¿Qué diferencia estructural entre *EgKU-7* y *EgKU-8* determina la diferencia en su comportamiento frente a la hidrólisis? ¿Cómo actúa la

extensión C-terminal en la inhibición? ¿Por qué se hidroliza tan rápido con la tripsina catiónica canina? ¿Cuál sería la relevancia biológica de la presencia de una extensión que refuerce la inhibición, si la ejercida por el dominio Kunitz es tan potente? ¿Tiene alguna actividad biológica una vez liberada?

5. Los parálogos *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquean canales iónicos

Como se comentó en la Introducción (sección 1.7), estudios previos al trabajo de esta tesis habían mostrado que *EgKU-1* purificado a partir de un extracto de protoescólex (proteína nativa) no presenta actividad inhibitora de peptidasas. Además, estudios de modelado por homología indicaron que podría presentar actividad bloqueadora de canales catiónicos. *EgKU-4* también la podría tener, ya que presenta una identidad de secuencia de aproximadamente 71% con su parólogo *EgKU-1* y comparte algunos residuos considerados importantes para esa actividad en proteínas relacionadas. Por otro lado, la secuencia del bucle anti-peptidasa de *EgKU-4* indica que, en caso de inhibir peptidasas de serina, actuaría como un inhibidor de tripsinas. En función de estos antecedentes, nos planteamos: 1) estudiar la actividad inhibitora de peptidasas de *EgKU-4*; y 2) estudiar si *EgKU-1* y *EgKU-4* efectivamente bloquean canales catiónicos. En este capítulo, describimos los resultados de estos estudios. Para realizar los trabajamos con *EgKU-1* nativo y recombinante y con *EgKU-4* recombinante.

5.1. Las peptidasas de serina no son el blanco fisiológico de los parálogos *EgKU1* y *EgKU-4*

Estudiamos la actividad inhibitora de peptidasas de *EgKU-4* y, en paralelo, la de *EgKU-1* recombinante a fin de analizar si esta proteína reproducía el comportamiento del inhibidor nativo. Como era de esperar, *EgKU-1* recombinante no inhibió ninguna de las peptidasas ensayadas (bovinas y caninas). Por su parte, *EgKU-4* presentó una baja actividad inhibitora de tripsina y quimotripsina, siendo mayor la actividad sobre la tripsina, lo que se explica por la presencia de una Arg en el sitio P1 (Figura 1.18).

Luego, analizamos la velocidad de formación de producto en función de la concentración de enzima, en presencia y ausencia de una concentración fija de inhibidor. Estudiamos el comportamiento de *EgKU-1* recombinante frente a quimotripsina (en virtud de la Gln que posee en P1) en paralelo con el de *EgKU-4* frente a tripsina. En el caso de *EgKU-1*, los datos experimentales en ausencia y presencia de inhibidor se ajustan a dos rectas paralelas, casi superpuestas, lo que indica que, al igual que la proteína nativa, no inhibe quimotripsina (Figura 5.1a). En cambio, *EgKU-4* presenta el comportamiento típico de inhibidores reversibles clásicos. Se observan dos rectas de diferente pendiente, la de mayor pendiente corresponde a la curva en ausencia de inhibidor y la de menor pendiente en presencia de inhibidor (Figura 5.1b). Finalmente, determinamos la constante global de inhibición de tripsina bovina (K_i^*) de *EgKU-4* mediante experimentos de velocidad de formación de producto en función de la concentración de inhibidor (Figura 5.1c). El valor de K_i^* obtenido (47 ± 2 nM) es tres órdenes de magnitud mayor que los calculados para *EgKU-3*, *EgKU-7* y *EgKU-8*. Estos resultados indican que *EgKU-1* y *EgKU-4* no son inhibidores tipo Kunitz típicos, y que *EgKU-4* presenta una actividad inhibitora de tripsina marginal.

5.2. *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquean canales de potasio dependientes de voltaje

Utilizando “*whole cell patch clamp*”, estudiamos el efecto de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) sobre corrientes de sodio y de potasio dependientes de voltaje (derivadas de canales tipo Nav y Kv, respectivamente). Los registros fueron hechos sobre neuronas provenientes de ganglios de la raíz dorsal (DRG) de ratas de entre 5 y 10 días de

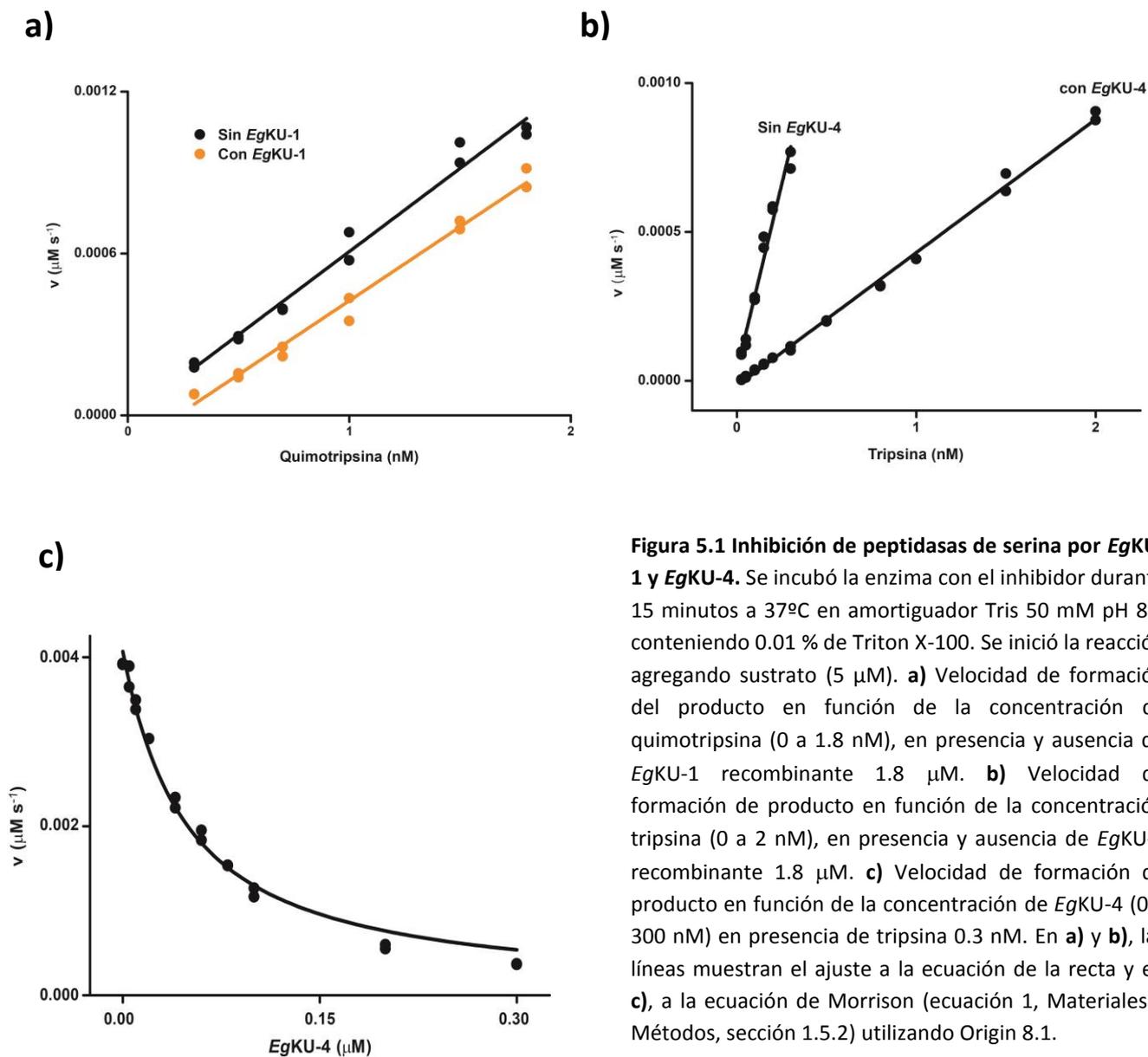


Figura 5.1 Inhibición de peptidasas de serina por *EgKU-1* y *EgKU-4*. Se incubó la enzima con el inhibidor durante 15 minutos a 37°C en amortiguador Tris 50 mM pH 8.0 conteniendo 0.01 % de Triton X-100. Se inició la reacción agregando sustrato (5 μM). **a)** Velocidad de formación del producto en función de la concentración de quimotripsina (0 a 1.8 nM), en presencia y ausencia de *EgKU-1* recombinante 1.8 μM . **b)** Velocidad de formación de producto en función de la concentración tripsina (0 a 2 nM), en presencia y ausencia de *EgKU-4* recombinante 1.8 μM . **c)** Velocidad de formación de producto en función de la concentración de *EgKU-4* (0 a 300 nM) en presencia de tripsina 0.3 nM. En **a)** y **b)**, las líneas muestran el ajuste a la ecuación de la recta y en **c)**, a la ecuación de Morrison (ecuación 1, Materiales y Métodos, sección 1.5.2) utilizando Origin 8.1.

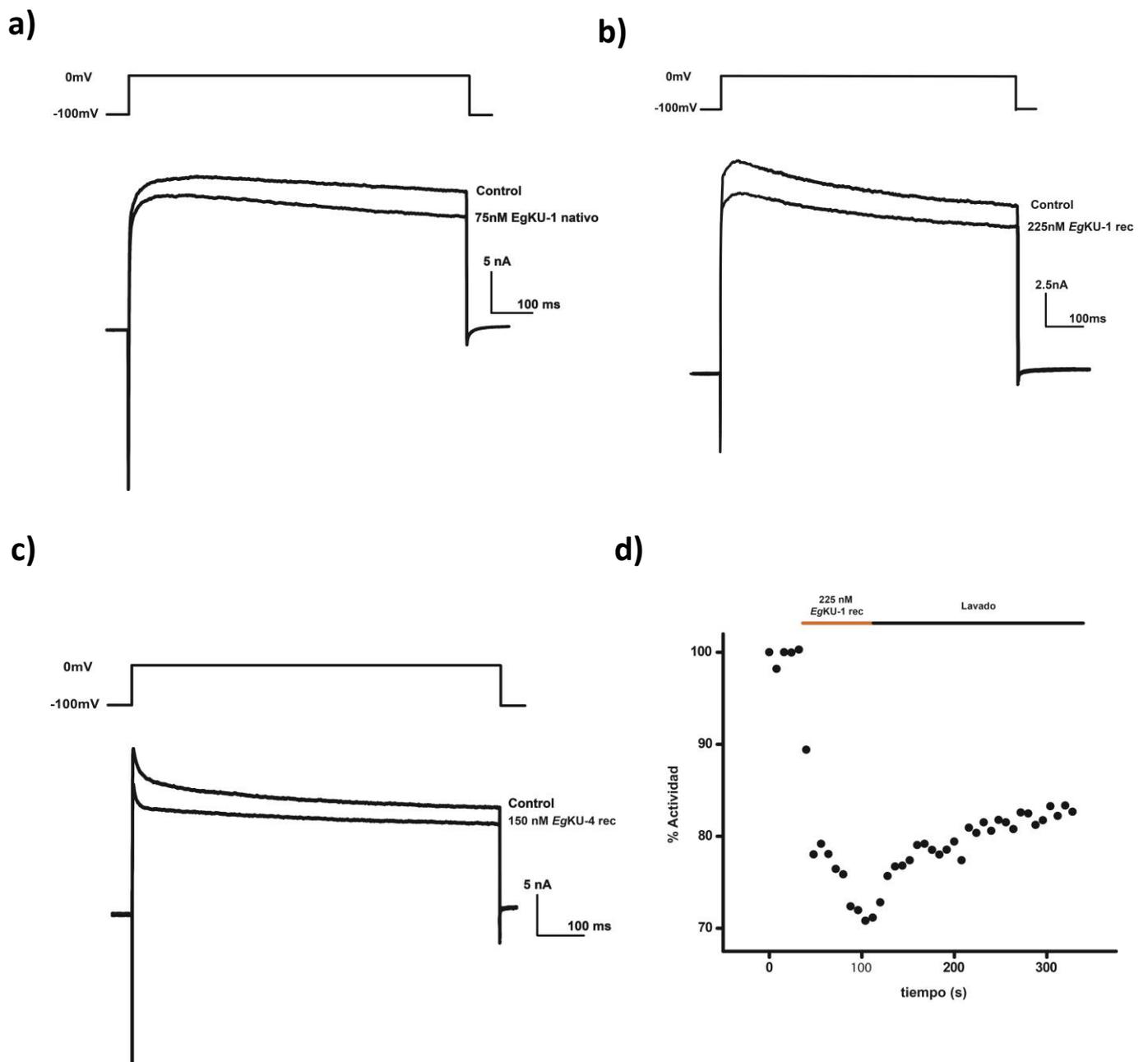
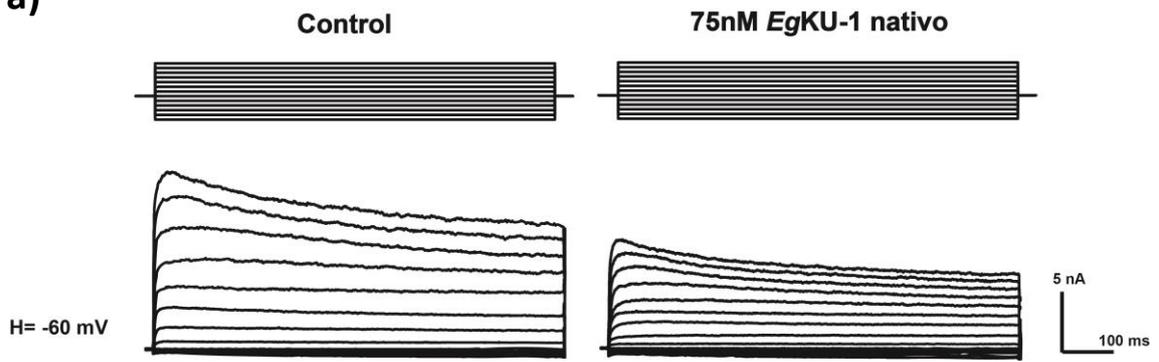
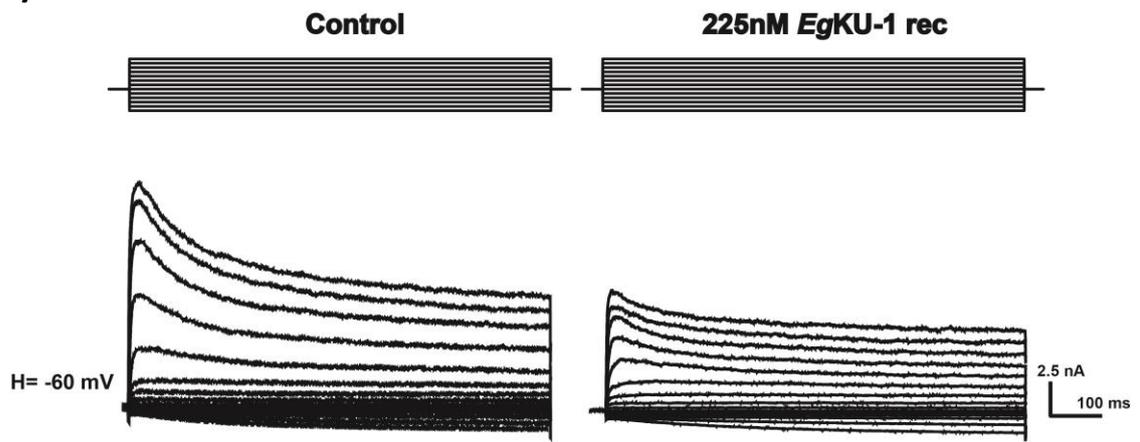


Figura 5.2 Bloqueo de canales de potasio dependientes de voltaje por parte de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) en DRG. En **a) - c)** se muestran experimentos representativos con *EgKU-1* nativo (75 nM, **a)**) y recombinante (225 nM, **b)**), y *EgKU-4* recombinante (150 nM, **c)**) que ilustran su capacidad de bloquear las corrientes de potasio activadas por un pulso de voltaje de -100 mV a 0 mV (representado sobre el gráfico de corriente). En **d)** se muestra que el efecto no es reversible, ya que parte del bloqueo persiste luego del lavado. Se grafica la corriente de potasio dependiente del voltaje remanente (% de actividad) en función del tiempo durante la aplicación del inhibidor y el lavado de la neurona.

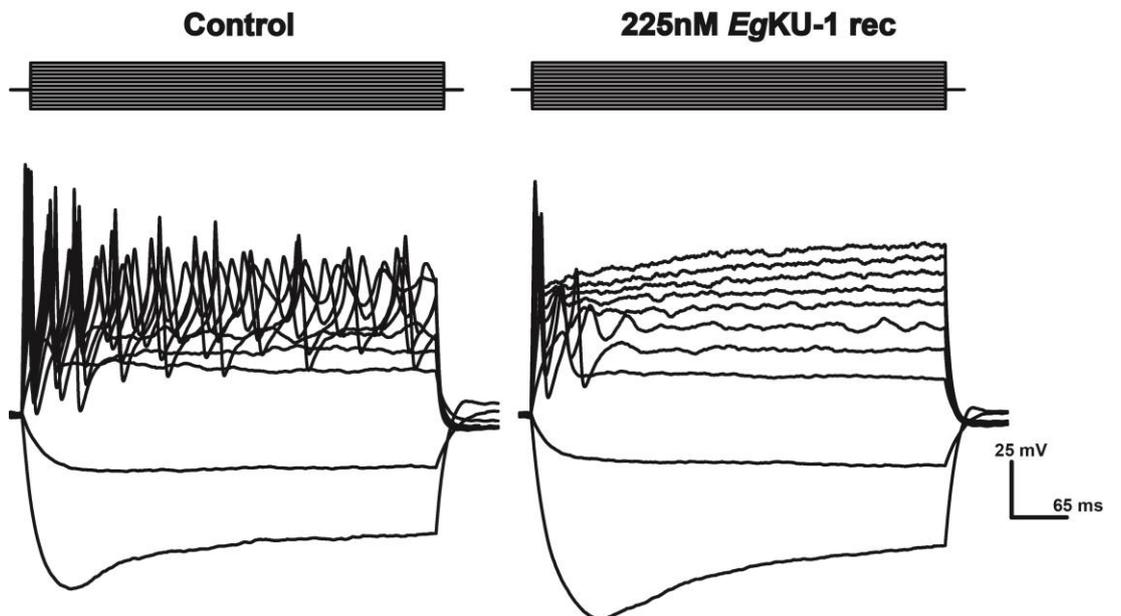
a)



b)



c)



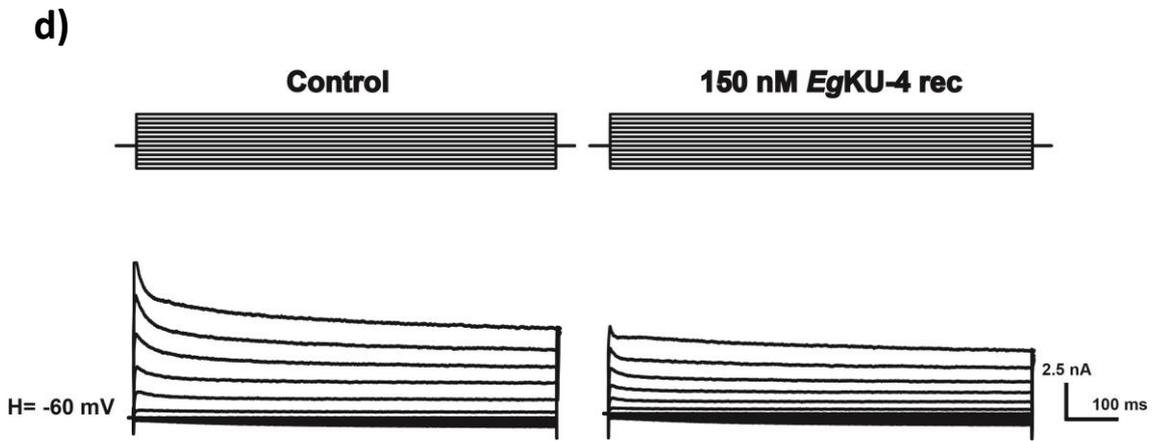
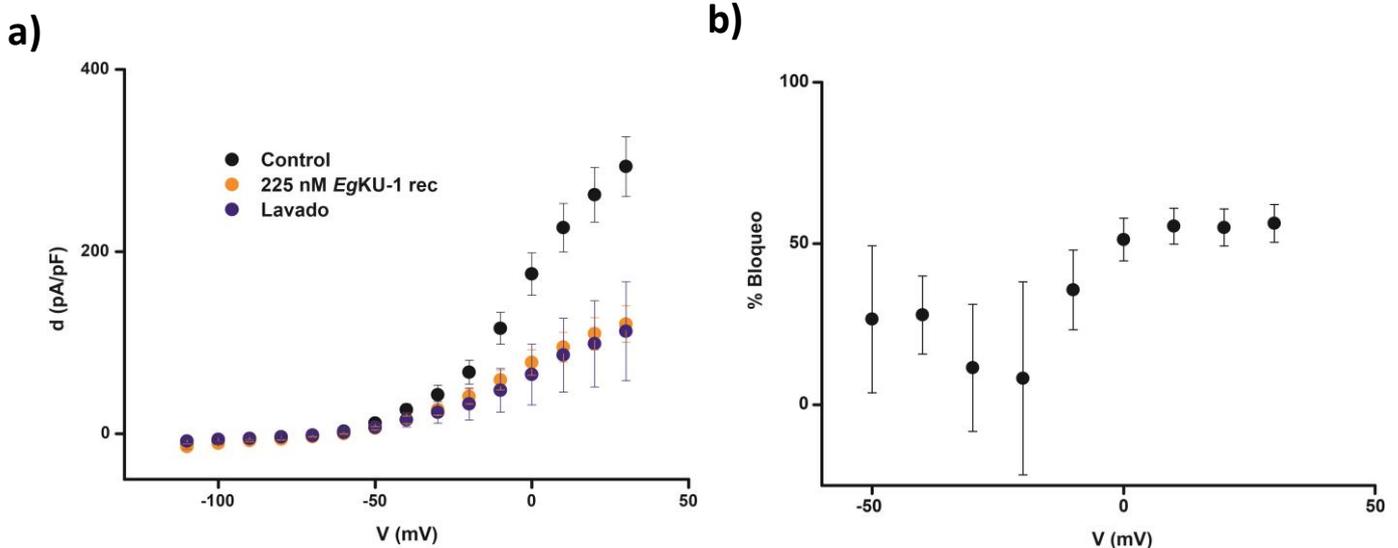


Figura 5.3 Efecto de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) sobre corrientes de potasio activadas por cambios de voltaje en DRG. Se registraron por clampeo de voltaje las corrientes de potasio activadas a diferentes voltajes, hasta observar que el registro fuera estable. Luego se aplicó el inhibidor, simultáneamente con pulsos de -100 mV a 0 mV, hasta que se estabilizara el efecto, y se registraron las corrientes de potasio a los diferentes voltajes. En **a)**, **b)** y **d)**, se muestran registros obtenidos por clampeo de voltaje antes y después de incubar con *EgKU-1* nativo (75 nM), *EgKU-1* recombinante (225 nM) y *EgKU-4* recombinante (150 nM), respectivamente. Las células estaban en un potencial de mantenimiento de -60 mV y se las registró a pulsos que fueron de -120 a +40 mV. En **c)**, se muestran registros obtenidos por clampeo de corriente antes y después de incubar con *EgKU-1* recombinante (225 nM). Se partió de -200 pA y se aplicaron pulsos crecientes hasta 1300 pA.



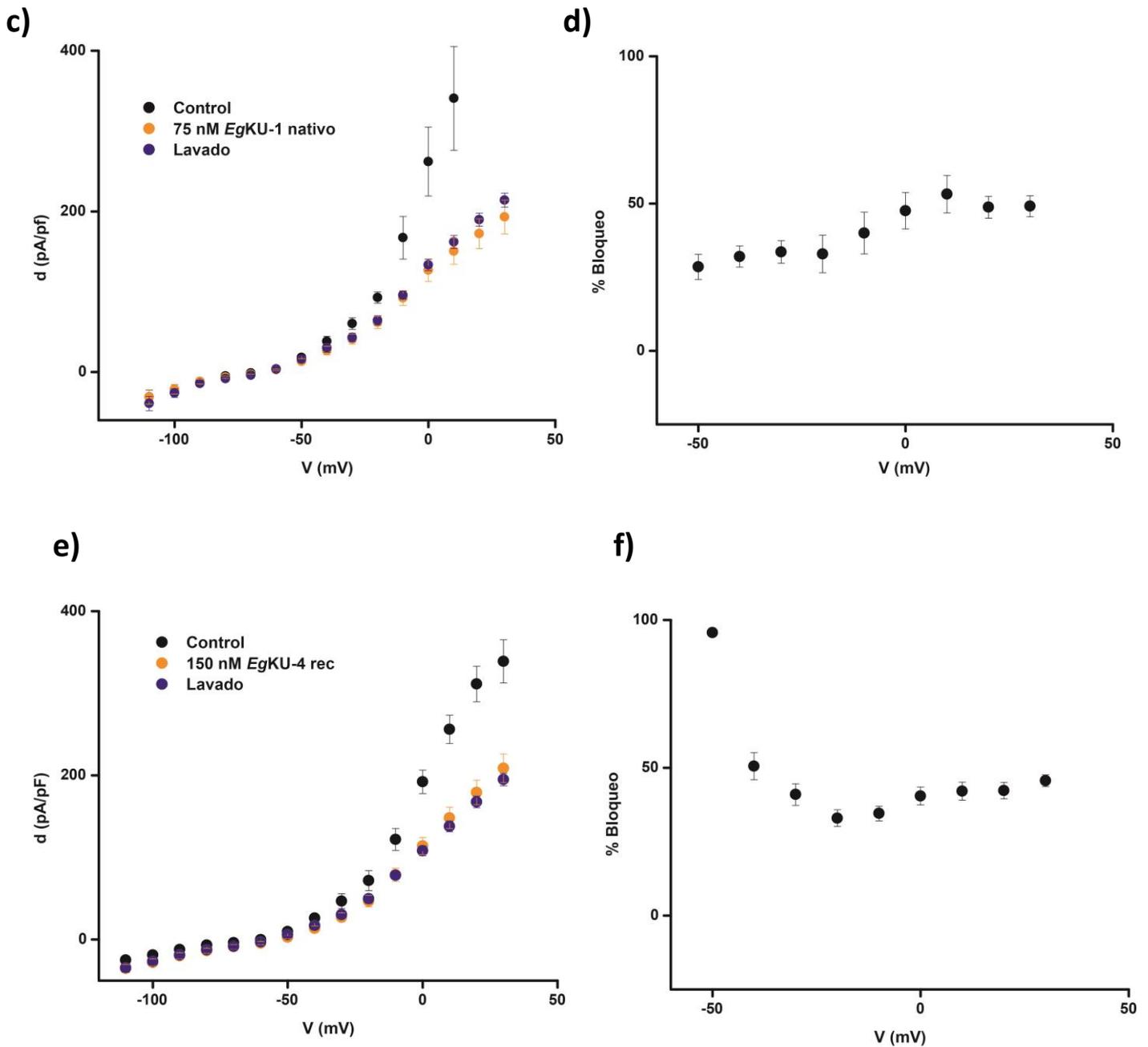


Figura 5.4. Curvas IV del bloqueo de corrientes de potasio activadas por cambios crecientes de voltaje por parte de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante). Se graficó la corriente al final del pulso (normalizada por la capacitancia) en función del voltaje (test IV) en presencia y ausencia de inhibidor y luego de lavar 5 minutos. También se graficó el porcentaje de bloqueo en función del voltaje. Los datos fueron tomados de registros realizados en soluciones normales (figura 5.3), de células que estaban en un potencial de mantenimiento de -120 mV a las que se aplicaron pulsos de -120 a +40 mV. **a)** y **b)** muestran los gráficos correspondientes a *EgKU-1* recombinante (225 nM), **c)** y **d)** a *EgKU-1* nativo (75 nM), y **e)** y **f)** a *EgKU-4* recombinante (150 nM). Los puntos de cada figura representan el promedio de 5 medidas, tomadas de experimentos independientes, y las barras sus respectivos errores.

edad. Una vez clampeada la neurona y previo a la aplicación de los inhibidores, se realizaron varios registros por clampeo de voltaje hasta verificar que el comportamiento de la célula era estable. Luego, se aplicó cada inhibidor simultáneamente con pulsos de -100 a 0 mV, que se mantuvieron hasta que se estabilizara el efecto, lo cual llevó de uno a tres minutos. Antes de ensayar nuestros inhibidores, se verificó el sistema experimental aplicando DTX (bloqueador de Kv) como control positivo.

EgKU-1 y *EgKU-4* no bloquearon las corrientes de Nav, pero sí las de Kv. En la Figura 5.2 se muestran registros representativos del efecto de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante). Se observa que *EgKU-1* recombinante a una concentración 225 nM bloqueó 20 ± 14 % al comienzo del estímulo y 25 ± 11 % al final (n=7), en tanto *EgKU-1* nativo 75 nM bloqueó 9.9 ± 2.5 % al comienzo y 19 ± 1 % al final (n=4) y *EgKU-4* 150 nM 23 ± 7 % al comienzo y 27 ± 12 % al final (n=6). Es decir que estas proteínas poseen un efecto mayor sobre las corrientes de Kv del final del pulso, que corresponden a las corrientes no inactivantes (IKDR, del inglés “delayed-rectifier K⁺ currents”). Las del comienzo del pulso, menos afectadas por los *EgKUs*, corresponden a las corrientes rápidas (IKA, del inglés “A-type K⁺ currents”). Este efecto no sería reversible, ya que luego de lavar persiste gran parte del bloqueo (Figura 5.2d).

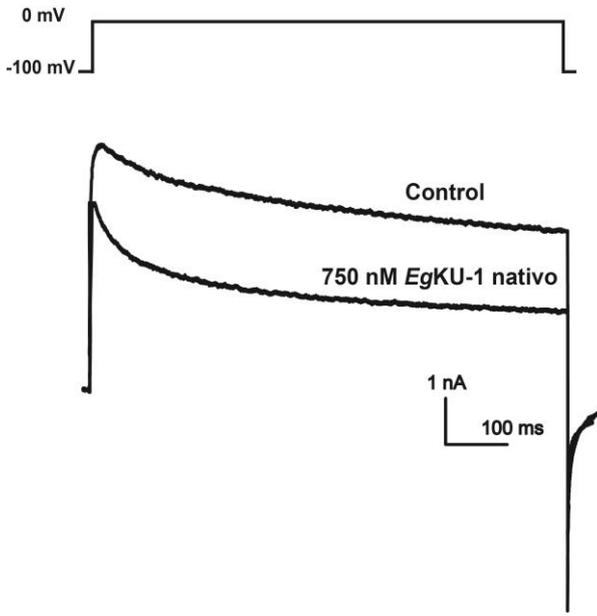
A continuación, analizamos la actividad de estas proteínas sobre las corrientes de Kv activadas a diferentes voltajes. Para esto, realizamos registros sobre células con un potencial de mantenimiento de -60 mV, a las que aplicamos pulsos de -110 a 40 mV, aumentando 10 mV en cada pulso. Registramos las corrientes previo a la aplicación del inhibidor, luego de aplicarlo y después de lavar durante aproximadamente 5 minutos. Analizamos los datos mediante las curvas de corriente en función del voltaje (test IV) y graficamos el porcentaje de bloqueo en función del voltaje (Figuras 5.3 y 5.4). Los resultados de estos experimentos mostraron que *EgKU-1* y *EgKU-4* afectan las corrientes de Kv, y que su efecto no se revierte con el lavado. *EgKU-1*, tanto nativo como recombinante, posee mayor actividad a voltajes superiores a -20 mV. Por su parte, la actividad de *EgKU-4* parece tener un máximo a -50 mV, luego baja y vuelve a subir a partir de -20 mV de manera similar a como lo hace *EgKU-1*. Si bien en estos experimentos trabajamos con concentraciones diferentes de cada proteína, son informativos para ver el perfil de inhibición de cada una de ellas, y muestran que el comportamiento de *EgKU-1* nativo y recombinante es similar.

5.2.1. El efecto de *EgKU-1* es mayor sobre las corrientes IKDR que sobre las IKA

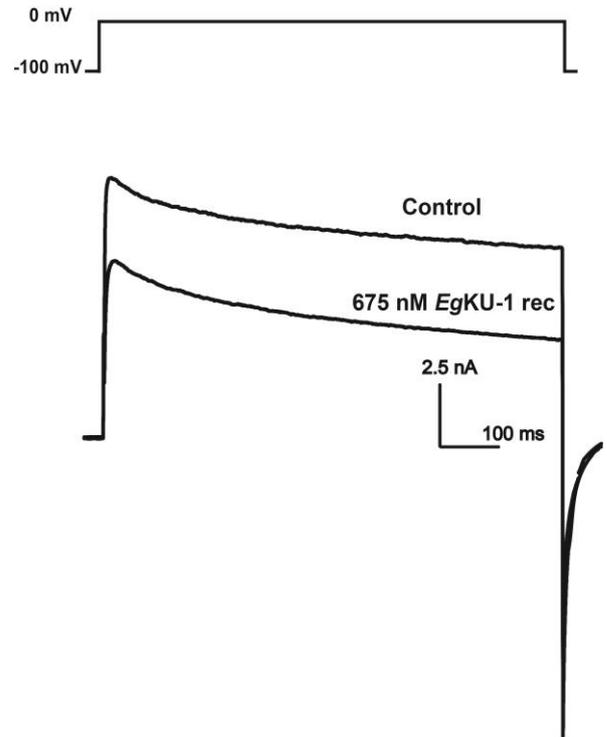
Como habíamos observado que *EgKU-1* y *EgKU-4* bloqueaban las corrientes de Kv y no las de Nav, estudiamos las corrientes de Kv aisladas de todas las corrientes de sodio. Para esto, realizamos registros de DRG en soluciones sin sodio, sustituyéndolo por colina de manera de mantener la osmolaridad. Al igual que en los registros anteriores, se realizaron registros control para verificar la estabilidad de las células. Luego se aplicó el inhibidor junto con un pulso fijo de -100 a 0 mV hasta que el efecto fuese estable (Figura 5.5).

Para *EgKU-1* (nativo y recombinante), estudiamos también el efecto sobre las corrientes activadas a diferentes pulsos de voltaje. Realizamos dos tipos de registros para poder estudiar por separado las corrientes IKA e IKDR. En uno, aplicamos un pulso previo (“prepulso”) de -100 mV que activa todas las corrientes de potasio dependientes de voltaje, tanto las IKA como las IKDR. En el otro, aplicamos un prepulso de -45 mV que inactiva las corrientes rápidas IKA pero

a)



b)



c)

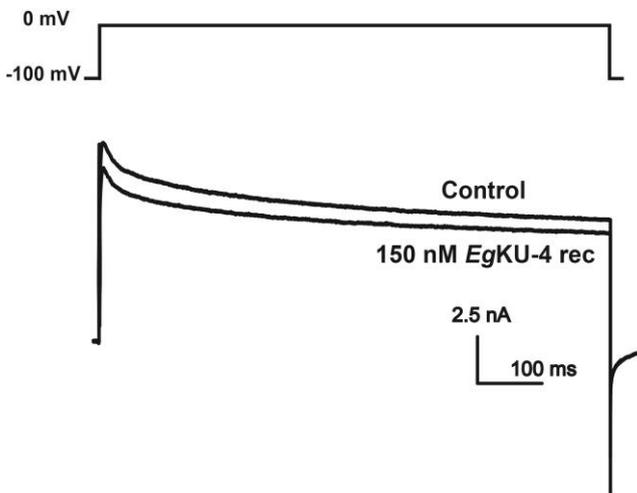
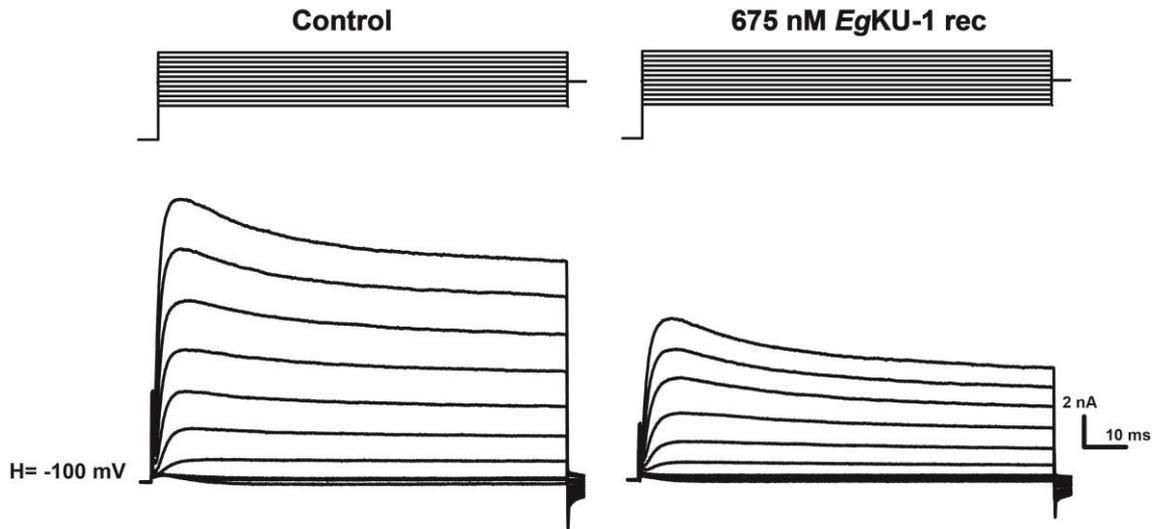


Figura 5.5 Bloqueo de corrientes aisladas de potasio dependientes de voltaje por *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) en DRG. Se registraron las corrientes aislada de potasio en DRG utilizando soluciones sin sodio, al aplicar un pulso de voltaje de -100mV a 0mV, hasta observar que el registro fuera estable. Luego, se aplicó cada inhibidor hasta que se estabilizara el efecto. Se graficó la corriente control y luego de aplicar el correspondiente *EgKU*. **a)** 750 nM de *EgKU-1* nativo, **b)** 675 nM de *EgKU-1* recombinante y **c)** 150 nM de *EgKU-4* recombinante.

IKA + IKDR

a)



b)

IKDR

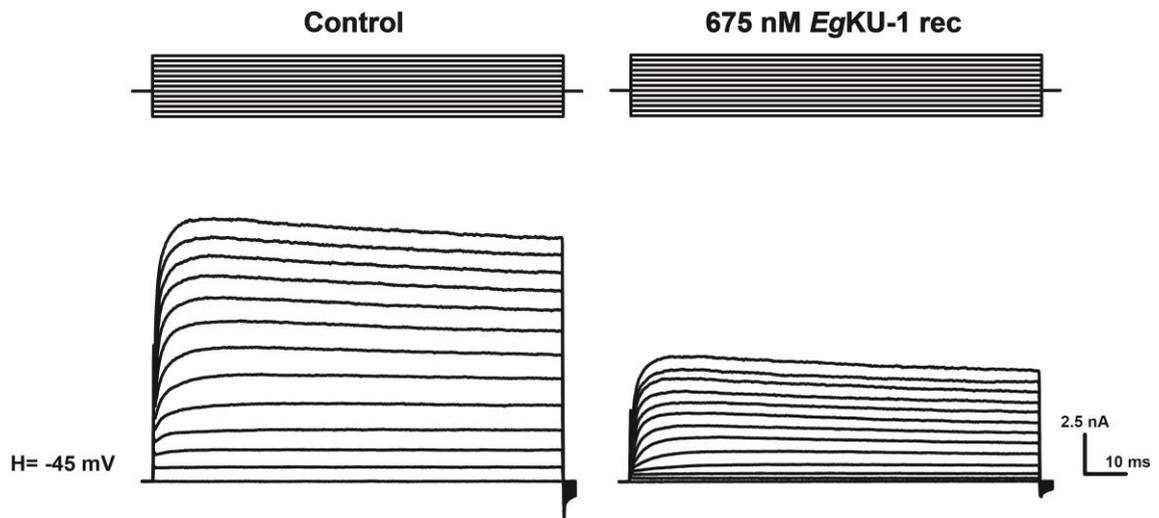
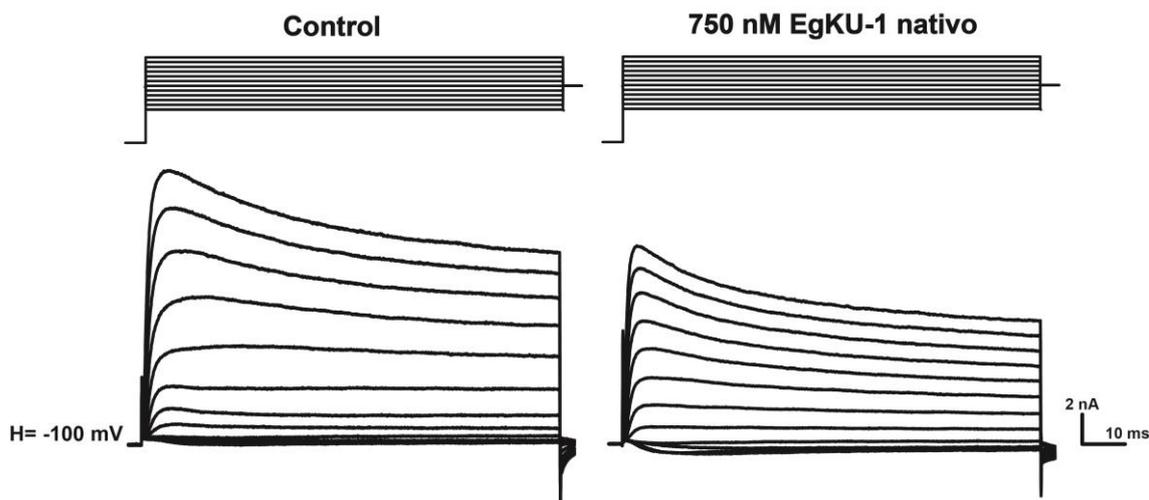


Figura 5.6 Efecto de *EgKU-1* recombinante sobre las corrientes aisladas de potasio activadas por cambios crecientes de voltaje en DRG. Se registraron las corrientes de potasio activadas por pulsos de voltaje que fueron de -65 a +45 mV aumentando 10 mV cada 8 segundos, hasta observar que el registro fuera estable. Luego, se aplicó *EgKU-1* recombinante, simultáneamente con pulsos de -100 mV a 0 mV hasta que se estabilizó el efecto, y se registraron nuevamente las corrientes a los diferentes voltajes. Los experimentos fueron realizados utilizando soluciones que contenían colina en lugar de sodio. Se realizaron dos tipos de registros: **a)** aplicando un prepulso de -100 mV, para activar todas las corrientes de potasio (IKA e IKDR) y **b)** aplicando un prepulso de -45 mV, para inactivar las corrientes rápidas (IKA) y aislar así las corrientes de activación lenta (IKDR).

IKA + IKDR



IKDR

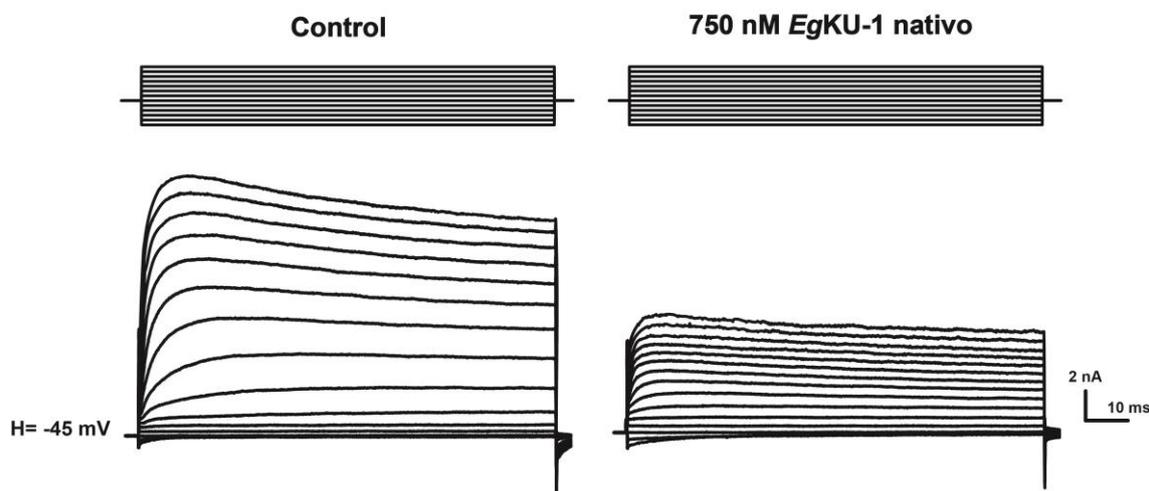
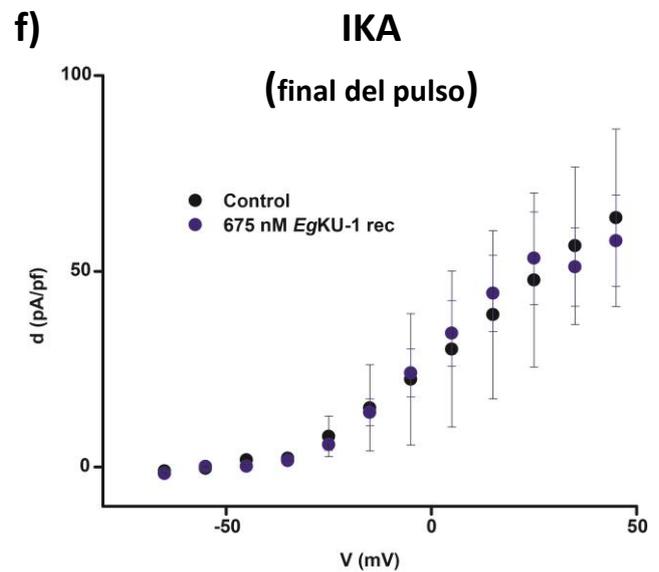
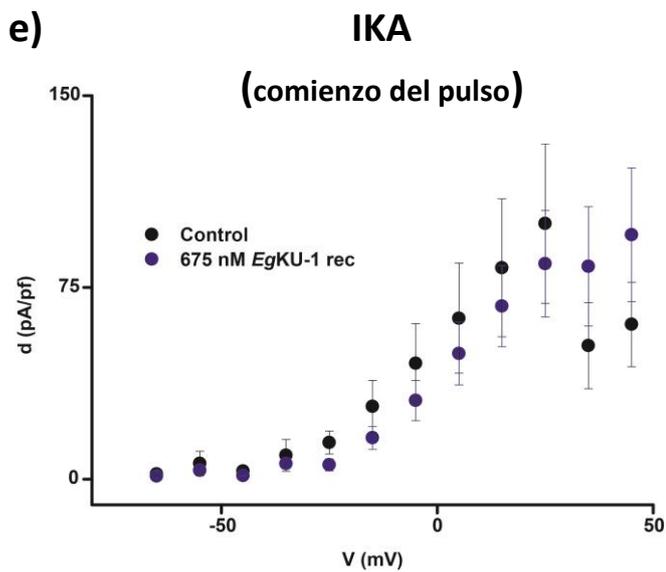
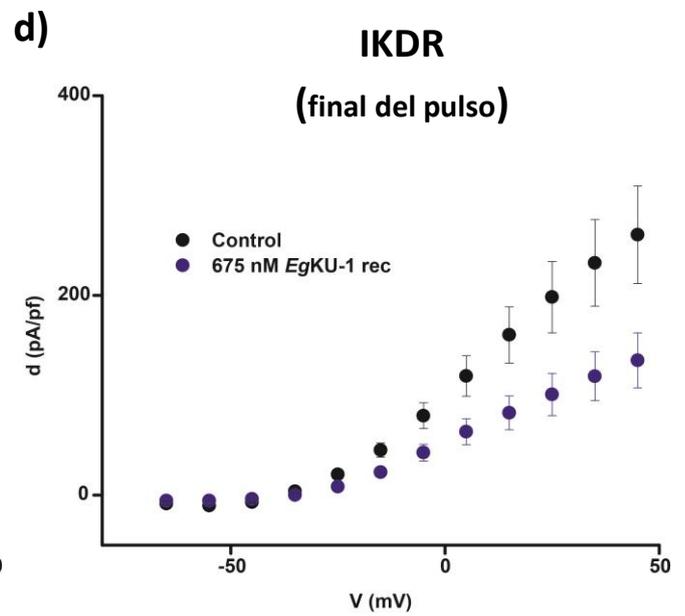
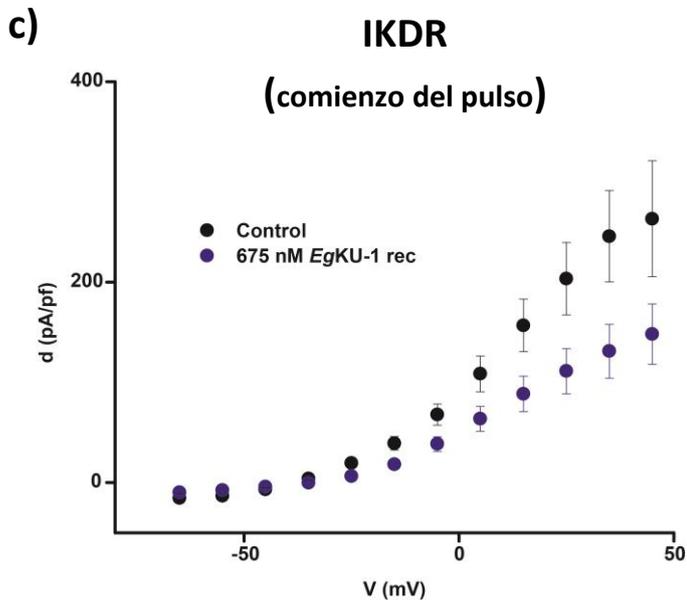
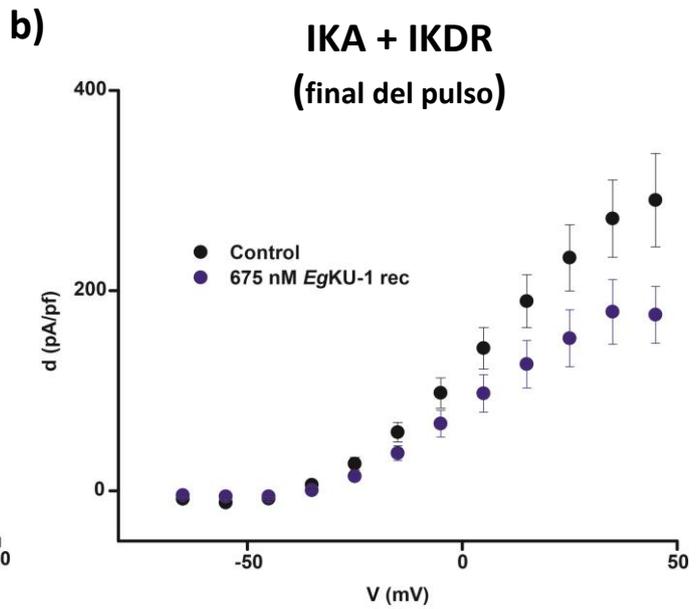
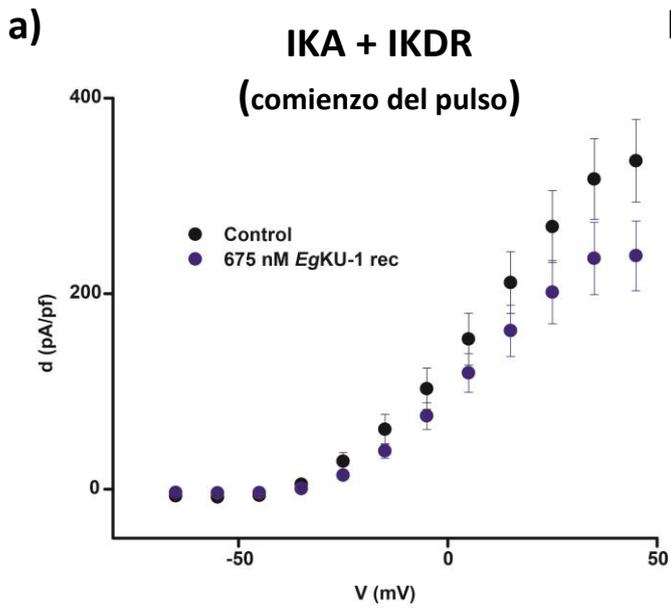
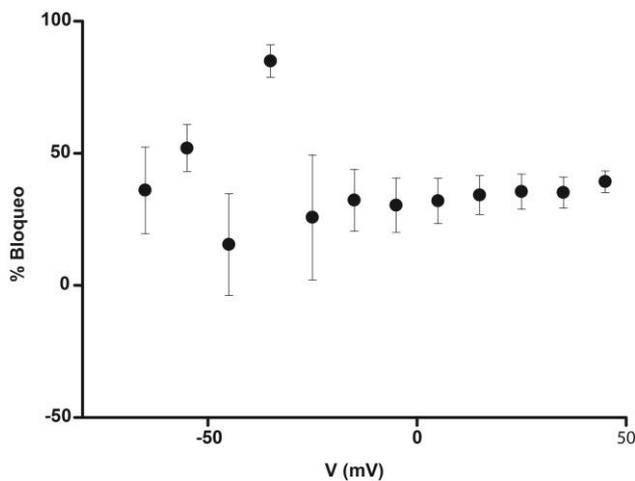


Figura 5.7 Efecto de *EgKU-1* nativo sobre las corrientes aisladas de potasio activadas por cambios crecientes de voltaje en DRG. Se registraron las corrientes de potasio activadas por pulsos de voltaje que fueron de -65 a +45 mV aumentando 10 mV cada 8 segundos, hasta observar que el registro fuera estable. Luego, se aplicó *EgKU-1* nativo, simultáneamente con pulsos de -100 mV a 0 mV hasta que se estabilizó el efecto, y se registraron nuevamente las corrientes de potasio a los diferentes voltajes. Los experimentos fueron realizados utilizando soluciones que contenían colina en lugar de sodio. Se realizaron dos tipos de registros: **a)** aplicando un prepulso de -100 mV, para activar todas las corrientes de potasio (IKA e IKDR) y **b)** aplicando un prepulso de -45 mV, para inactivar las corrientes rápidas (IKA) y aislar así las corrientes de activación lenta (IKDR).



**g) IKA + IKDR
(final del pulso)**



**h) IKDR
(final del pulso)**

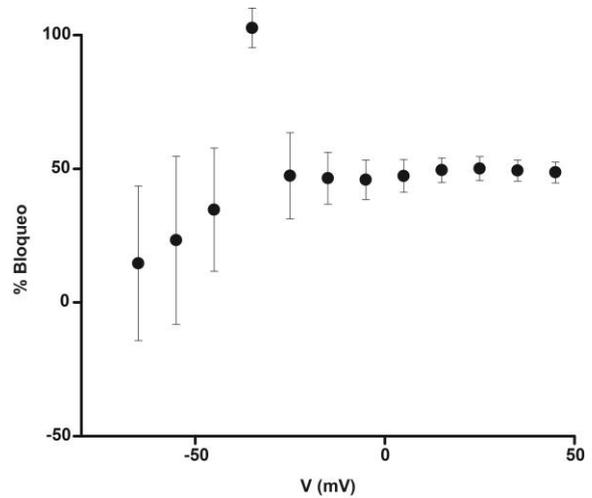
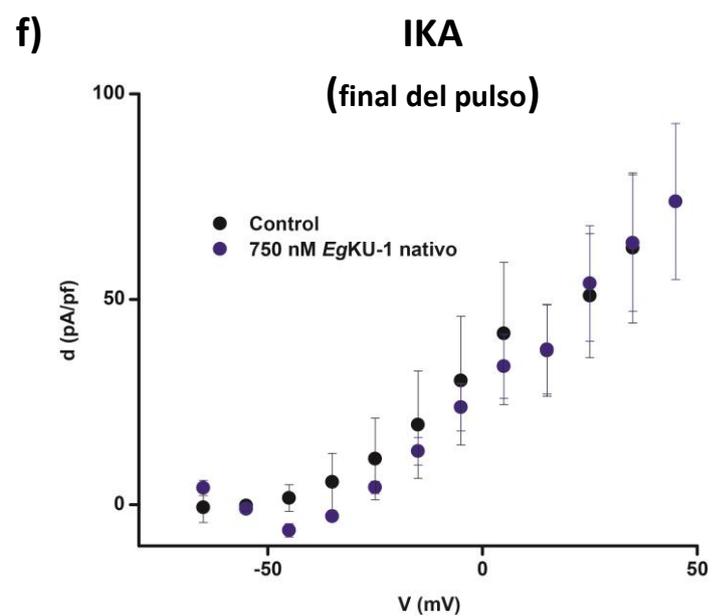
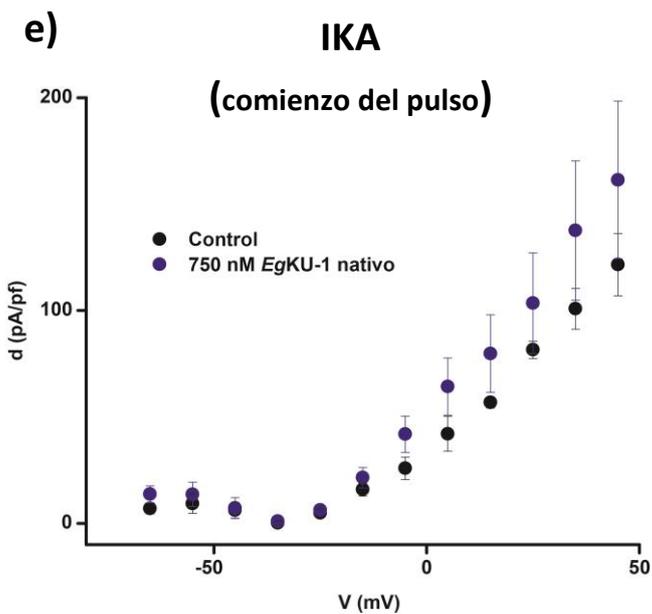
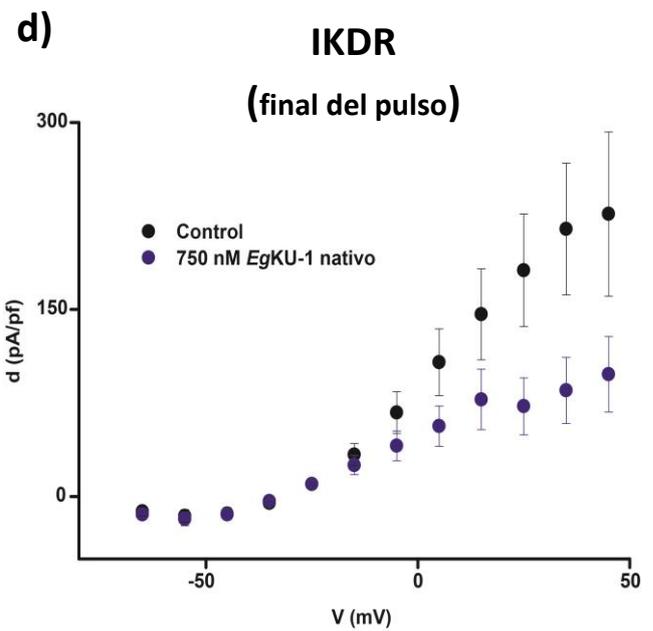
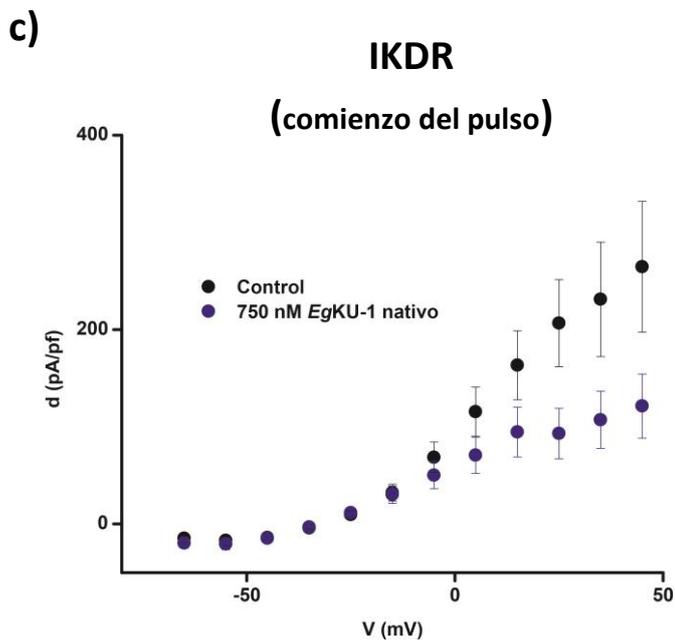
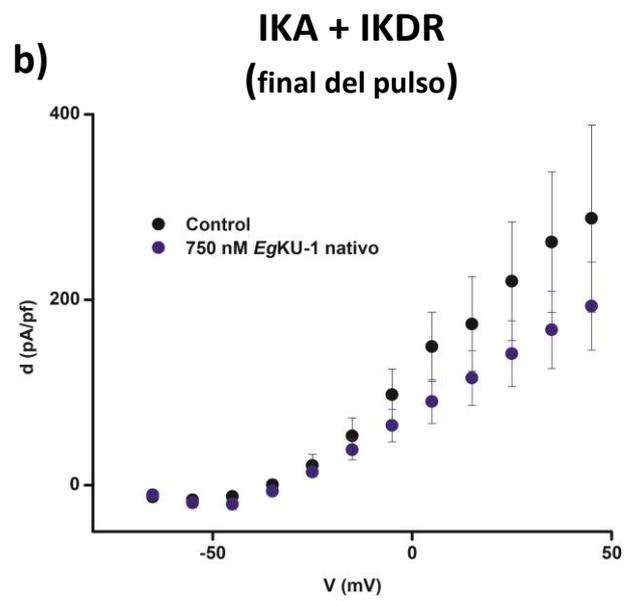
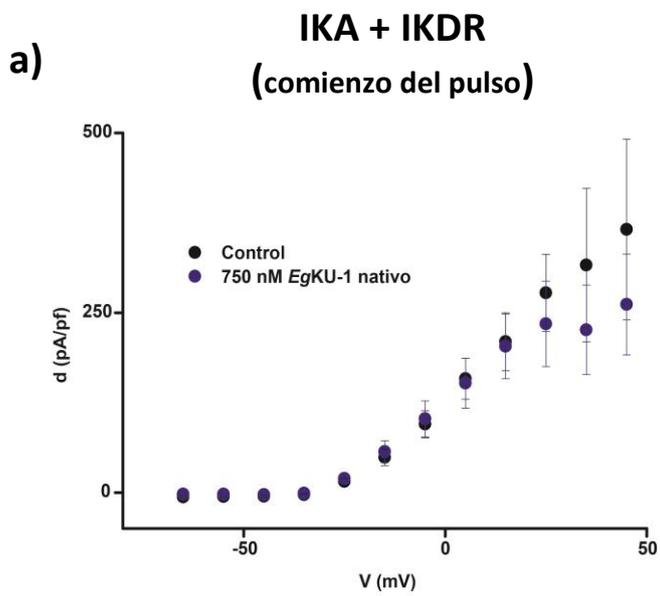


Figura 5.8 Curvas IV del efecto de *EgKU-1* recombinante sobre las corrientes aisladas de potasio activadas por cambios crecientes de voltaje. Se registraron las corrientes de potasio activadas por pulsos de voltaje que fueron de -65 a +45 mV aumentando 10 mV cada 8 segundos, hasta observar que el registro fuera estable. Luego, se aplicó *EgKU-1* recombinante, simultáneamente con pulsos de -100 mV a 0 mV hasta que se estabilizó el efecto, y se registraron nuevamente las corrientes de potasio a los diferentes voltajes. Los experimentos fueron ejecutados utilizando soluciones que contenían colina en lugar de sodio. Se realizaron dos tipos de registros: aplicando un prepulso de -100 mV, para activar todas las corrientes de potasio (IKA e IKDR); y aplicando un prepulso de -45 mV, para inactivar las corrientes rápidas (IKA) y así aislar las corrientes de activación lenta (IKDR). Se graficó la corriente al comienzo y final del pulso (normalizada por la capacitancia) en función del voltaje (test IV) para IKA, IKDR e IKA + IKDR, en presencia y ausencia de inhibidor. Se muestran los gráficos IV al comienzo y al final del pulso para: IKA + IKDR (**a**) y (**b**), respectivamente); IKDR (**c**) y (**d**), respectivamente); e IKA (**e**) y (**f**), respectivamente). Se graficó también el porcentaje de bloqueo al final del pulso en función del voltaje para los registros de IKA + IKDR (**g**) e IKDR (**h**). Los puntos de cada figura representan el promedio de 5 medidas, tomadas de experimentos independientes, y las barras sus respectivos errores.



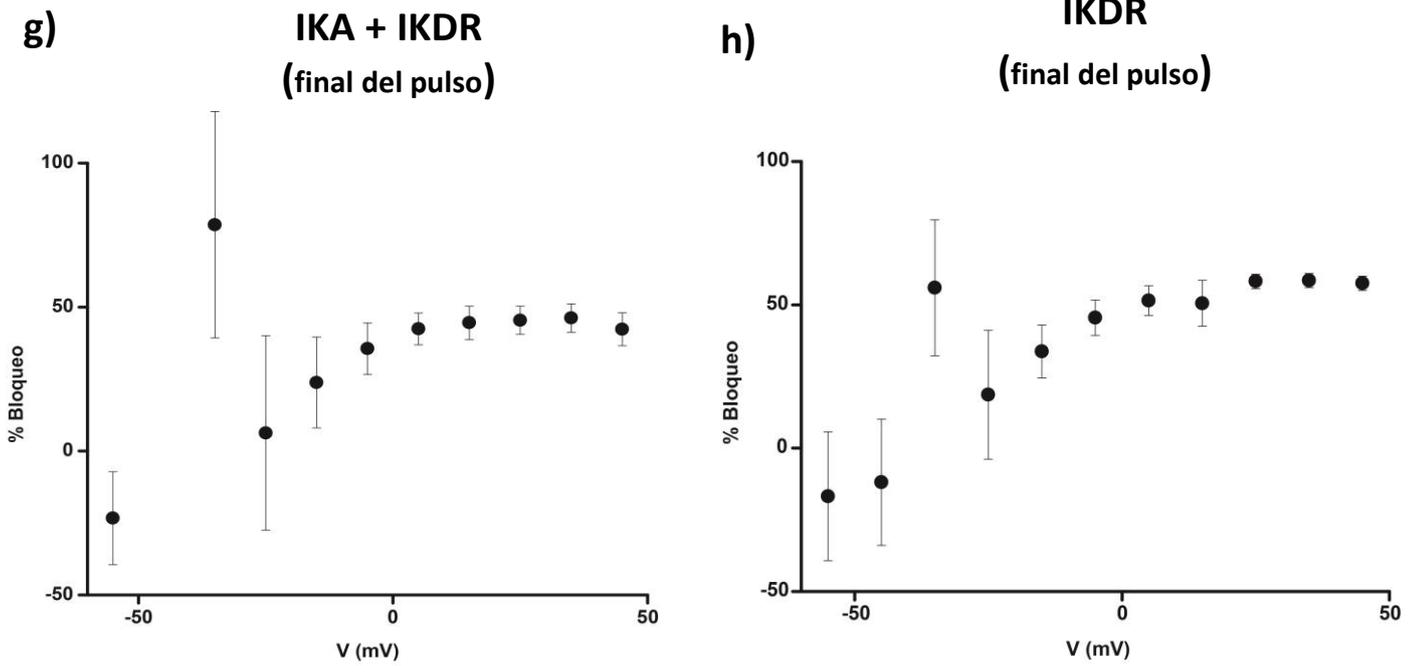


Figura 5.9 Curvas IV del efecto de *EgKU-1* nativo sobre las corrientes aisladas de potasio activadas por cambios crecientes de voltaje. Se registraron las corrientes de potasio activadas por pulsos de voltaje que fueron de -65 a +45 mV aumentando 10 mV cada 8 segundos, hasta observar que el registro fuera estable. Luego se aplicó *EgKU-1* nativo, simultáneamente con pulsos de -100 mV a 0 mV, hasta que se estabilizara el efecto y se registraron nuevamente las corrientes de potasio a los diferentes voltajes. Los experimentos fueron ejecutados utilizando soluciones que contenían colina en lugar de sodio. Se realizaron dos tipos de registros: aplicando un prepulso de -100 mV, para activar todas las corrientes de potasio (IKA e IKDR); y aplicando un prepulso de -45 mV, para inactivar las corrientes rápidas (IKA) y así aislar las corrientes de activación lenta (IKDR). Se graficó la corriente al comienzo y final del pulso (normalizada por la capacitancia) en función del voltaje (test IV) para IKA, IKDR e IKA + IKDR, en presencia y ausencia de inhibidor. Se graficó la corriente al comienzo y final del pulso (normalizada por la capacitancia) en función del voltaje (test IV) para IKA, IKDR e IKA + IKDR, en presencia y ausencia de inhibidor. Se muestran los gráficos IV al comienzo y al final del pulso para: IKA + IKDR (a) y b), respectivamente); IKDR (c) y d), respectivamente); e IKA (e) y f), respectivamente). Se graficó también el porcentaje de bloqueo al final del pulso en función del voltaje para los registros de IKA + IKDR (g) e IKDR (h)). Los puntos de cada figura representan el promedio de 5 medidas, tomadas de experimentos independientes, y las barras sus respectivos errores.

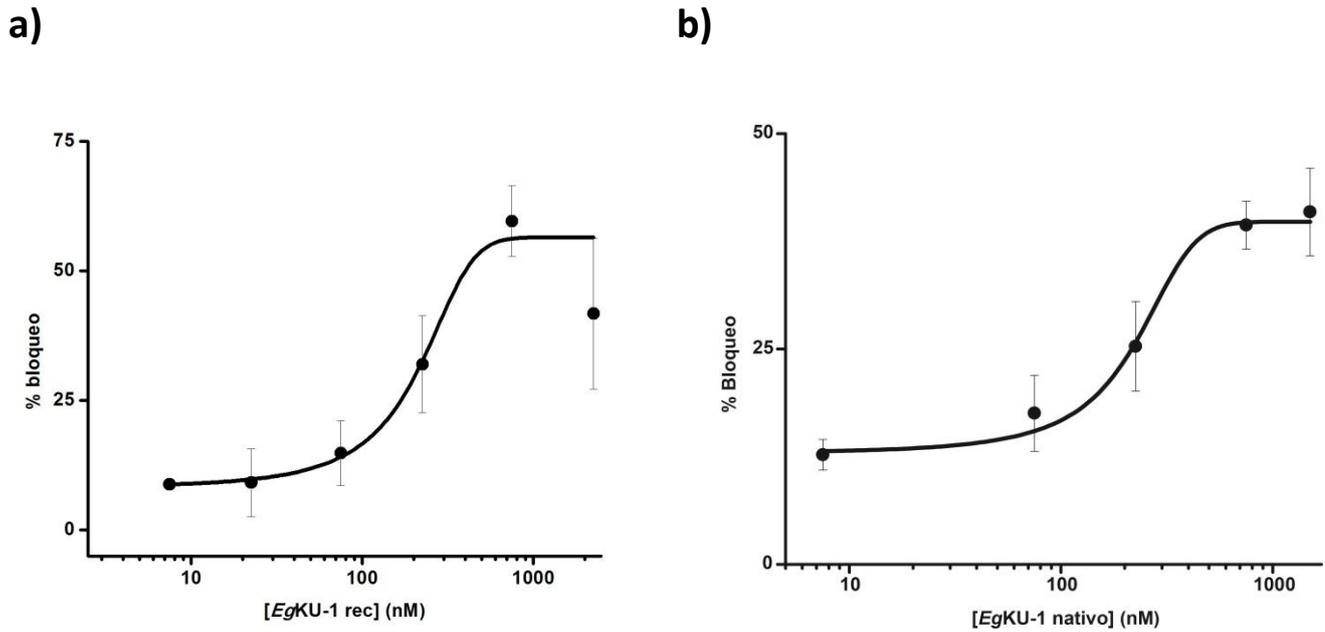


Figura 5.10 Estudio dosis-respuesta del efecto de *EgKU-1* (nativo y recombinante) sobre las corrientes aisladas IKDR. Los registros se realizaron en soluciones sin sodio (utilizando colina para mantener la osmolaridad), a un pulso fijo de -100mV a 0mv de 8 segundos de duración. Se registró antes y después de aplicar la concentración correspondiente de inhibidor. Se muestran los gráficos del % de bloqueo en función de la concentración de *EgKU-1* nativo (**a**) y recombinante (**b**). Cada punto es el promedio de al menos cinco medidas independientes con su respectivo error, representado con barras. La línea negra representa el mejor ajuste a la ecuación de dosis-respuesta (Ecuación 11, Materiales y métodos, sección 1.6.3).

no las IKDR (Figuras 5.6 y 5.7). Dedujimos las corrientes IKA restando los registros con las corrientes IKDR a los registros con ambas corrientes IKA e IKDR. De esta manera, pudimos estudiar por separado el efecto sobre las corrientes IKA y las IKDR. Los resultados obtenidos verificaron lo que indicaban los registros con todas las corrientes. Como se observa en las curvas de corriente en función de voltaje (test IV), el efecto es mayor sobre las corrientes no inactivantes IKDR; más aún, el bloqueo de las corrientes IKA es casi nulo. En los registros de ambos tipos, observamos que el bloqueo al final del pulso depende del voltaje. Es interesante que el mayor bloqueo se observó a un pulso de -35 mV; tal vez ese sea el umbral del canal que más bloquea *EgKU-1* y, en las condiciones del ensayo, la mayoría de las corrientes de potasio dependan de ese canal (Figuras 5.8 y 5.9).

También estudiamos el efecto en función de la concentración (dosis-respuesta) de *EgKU-1* sobre las corrientes aisladas de potasio dependientes de voltaje. Se aplicaron concentraciones crecientes de *EgKU-1* nativo y recombinante sobre distintas DRG, mientras se las registraba con un pulso de -100 mV a 0 mV hasta que el efecto fuera estable. En la Figura 5.10 se muestra el resultado de estos estudios con *EgKU-1* nativo y recombinante. A partir del ajuste de los datos experimentales a la ecuación para dosis-respuesta (Ecuación 11), se determinó el IC50 para *EgKU-1* recombinante (198 ± 90 nM) y para el nativo (218 ± 26 nM). Estos valores indican que la proteína recombinante reproduce muy bien el comportamiento de la nativa.

En el caso de *EgKU-4*, no estudiamos en profundidad su efecto sobre las corrientes de potasio aisladas; verificamos que las bloquea en un ensayo utilizando una única concentración (150 nM). Este resultado, junto con los de los registros con sodio, indica que podría tener un comportamiento similar al observado para *EgKU-1*.

5.3. *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquean canales de sodio dependientes de pH

Una de las líneas de investigación del laboratorio dónde se realizaron los estudios de electrofisiología (Laboratorio de Neurofisiología Sensorial, del Instituto de Fisiología de la Universidad Autónoma de Puebla) es el estudio de canales de sodio dependientes de pH (ASICs). Como hemos mencionado, los polipéptidos que inhiben ASICs son pequeños (entre 35 y 60 aminoácidos), y están constituidos por dominios compactos, estabilizados por enlaces disulfuro, son catiónicos y presentan anisotropía en su carga superficial (ver sección 1.6.2.4, Introducción). Debido a que *EgKU-1* y *EgKU-4* presentan estas características (en particular, son muy cargados: +6 y +14, respectivamente) decidimos estudiar si bloquean ASICs, además de Kv. Para ello, utilizando DRG, ensayamos la actividad de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) sobre los ASICs.

Primero, registramos las corrientes de sodio dependientes de pH más de una vez de manera de verificar la reproducibilidad y estabilidad de los registros. Luego, aplicamos cada inhibidor durante un minuto y volvimos a registrar. Observamos un notorio bloqueo de dichas corrientes, con una preferencia aparente por las corrientes rápidas. El efecto es sobre la amplitud de las corrientes y no sobre el curso temporal de la desensibilización (τ); y reversible, ya que desapareció totalmente luego de lavar durante un minuto (Figura 5.11). Es interesante mencionar que el efecto mostró una cierta resiliencia: en todos los casos, cuando aplicamos el inhibidor por segunda vez, el bloqueo fue menor y totalmente reversible luego del lavado (dato no mostrado). Por otro lado, observamos que *EgKU-1* podría además activar canales de

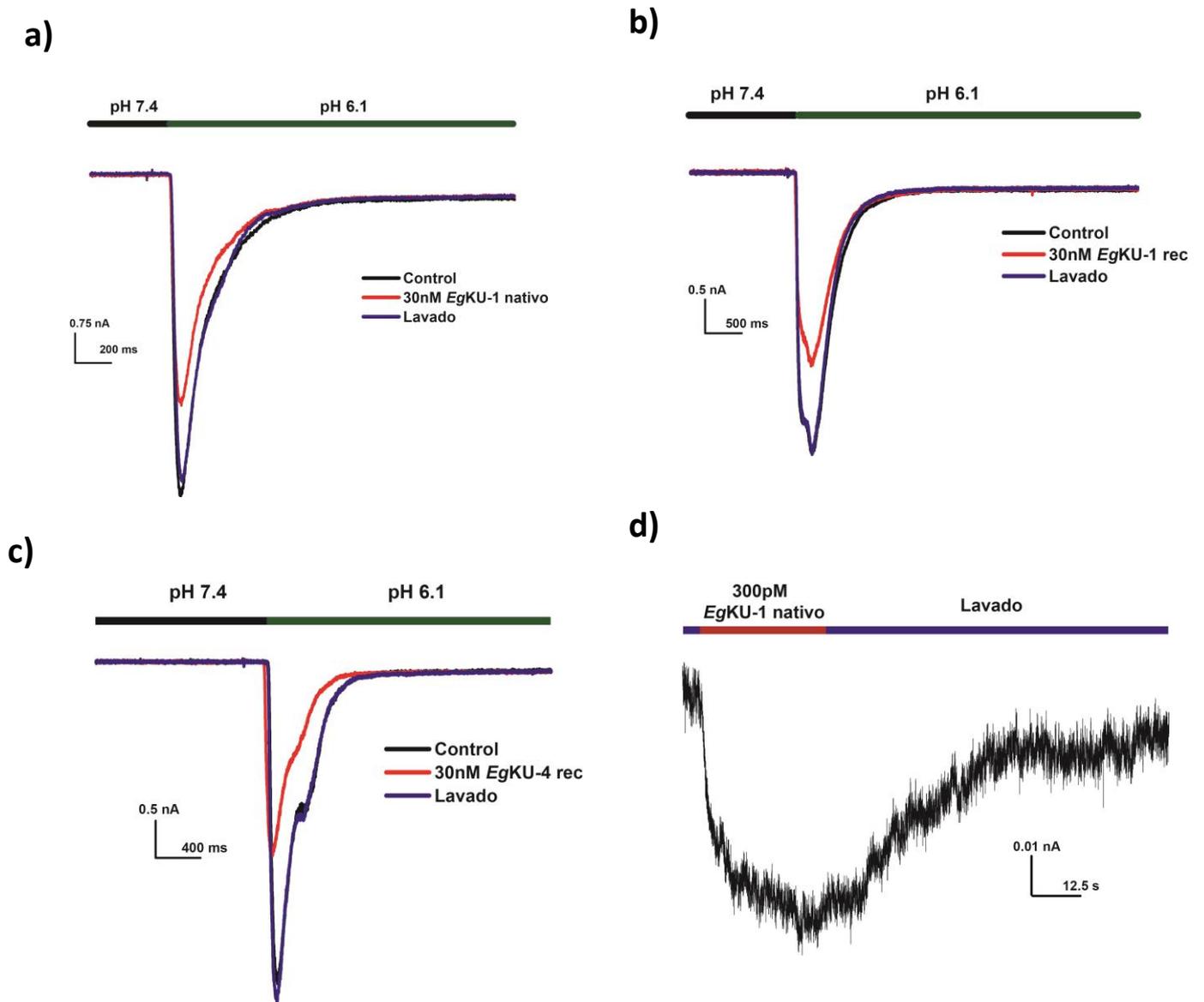


Figura 5.11 Actividad de *EgKU-1* (nativo y recombinante) y *EgKU-4* (recombinante) sobre los canales de sodio activados por pH ácido en DRG. Los registros se realizaron cambiando rápidamente la solución de pH 7.4 a pH 6.1, de manera de activar la entrada de sodio mediante los canales ASICs. Los inhibidores (30 nM) se aplicaron durante un minuto. En negro, se muestra el registro control; en rojo, luego de aplicar el inhibidor; y en azul; después de lavar. Se observa claramente el efecto de los *EgKUs* sobre la amplitud de la corriente de sodio y su desaparición después de lavar un minuto: **a)** *EgKU-1* nativo; **b)** *EgKU-1* recombinante; y **c)** *EgKU-4* recombinante. En **d)**, se muestra que *EgKU-1* nativo también activa la entrada de sodio (el registro fue hecho sin estímulo, luego de aplicar 300 pM de *EgKU-1* nativo).

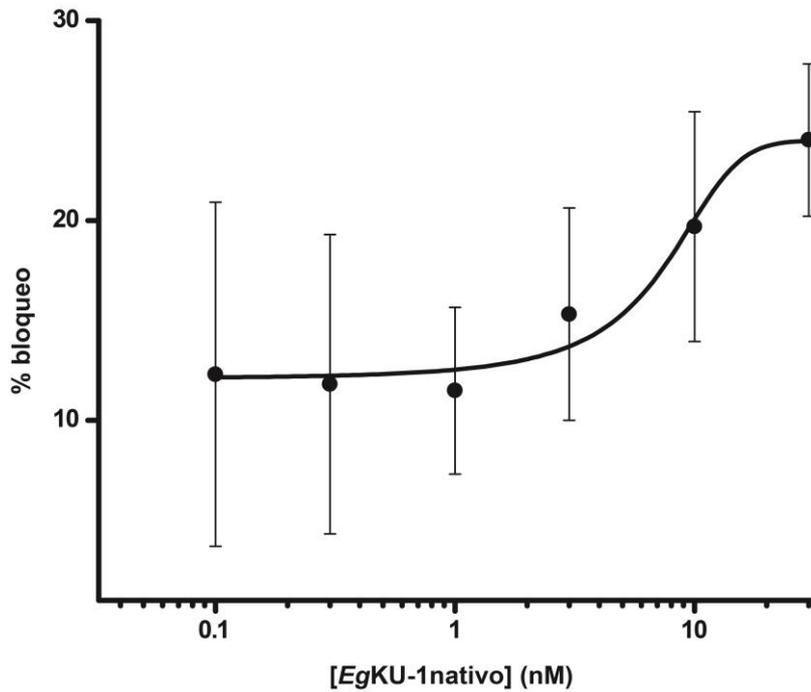


Figura 5.12 Estudio dosis-respuesta del efecto de *EgKU-1* nativo sobre las corrientes de sodio activadas por pH ácido. Se registraron las corrientes de sodio activadas por el cambio rápido de pH de 7.4 a 6.1 a concentraciones crecientes de *EgKU-1*. Se muestra el porcentaje de bloqueo en función de la concentración. Cada punto es el promedio de al menos 5 medidas independientes con su respectivo error, representado con barras. La línea negra representa el mejor ajuste a la ecuación de dosis-respuesta (Ecuación 11, Materiales y métodos, sección 1.6.3).

sodio; en efecto, al aplicar *EgKU-1* nativo sin cambiar el pH, se registró una corriente entrante, posiblemente de sodio, que se revirtió cuando se dejó de aplicar el inhibidor. Es posible que estos canales también sean ASIC; de ser así, *EgKU-1* podría tener un efecto activador sobre algunos ASICs y bloqueador sobre otros.

Finalmente, realizamos un estudio de dosis-respuesta con *EgKU-1* nativo (Figura 5.12). Si bien se observa que el efecto depende de la concentración de *EgKU-1*, la magnitud del bloqueo para cada dosis de inhibidor resultó muy variable, debido principalmente a la diversidad de respuestas que presentaron los diferentes tipos de neuronas presentes en los cultivos de DRG. Es muy probable que las distintas neuronas presentes en el cultivo primario posean diferentes tipos de ASICs. En tal caso, nuestros resultados indican que *EgKU-1* no bloquearía por igual a los distintos tipos, por lo que la diversidad de comportamientos observados derivaría de la combinación de ASICs presentes en cada neurona. De todas maneras, se estimó un IC50 para el bloqueo de los ASIC presentes en DRG. El valor, 7 ± 1.2 nM, es dos órdenes de magnitud menor que el determinado para el bloqueo de Kv.

5.4. Discusión de los estudios funcionales de *EgKU-1* y *EgKU-4*

En la búsqueda de la función biológica de *EgKU-1* y *EgKU-4*, estudiamos su capacidad de inhibir peptidasas y de bloquear canales catiónicos. Nuestros resultados muestran que *EgKU-1* y *EgKU-4* no son inhibidores canónicos de peptidasas de serina: *EgKU-1* no inhibió ninguna de las peptidasas ensayadas, y *EgKU-4* presenta una actividad inhibidora de tripsinas que calificamos como marginal, dado que no es de alta afinidad como la de los inhibidores del tipo Kunitz típicos. Además, *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquean canales catiónicos. En particular, observamos dicha actividad sobre canales de potasio activados por voltaje y sobre canales de sodio activados por pH ácido, con IC50 en el orden 10^{-7} M y 10^{-9} M, respectivamente en el caso de *EgKU-1*. Estos resultados indican que la función biológica de *EgKU-1* y *EgKU-4* es el bloqueo de canales catiónicos.

5.4.1. Acerca del bloqueo de canales de K^+ activados por voltaje

Tanto *EgKU-1* como *EgKU-4* presentaron una notoria actividad bloqueadora de las corrientes de Kv que, de manera similar a lo descrito para las DTXs, no fue reversible. Además, se observó que el efecto depende del voltaje. Al estudiar en profundidad el comportamiento de *EgKU-1* sobre corrientes aisladas de K^+ , observamos que su actividad fue marcadamente mayor sobre las corrientes de inactivación lenta (IKDR) que sobre las de inactivación rápida (IKA). Este comportamiento es un poco distinto al descrito para la α -DTX (la molécula sobre la que modelamos la estructura de *EgKU-1*), que posee mayor actividad sobre las corrientes IKA en las DRG de rata. Sin embargo, otros bloqueadores de canales del tipo Kunitz tienen un comportamiento similar al de *EgKU-1*. Por ejemplo, la δ -DTX que también bloquea principalmente las corrientes IKDR en DRG de rata¹¹². Se ha descrito que, al igual que la α -DTX, la δ -DTX bloquea los canales Kv1.1 y Kv1.6. Probablemente bloquee, además, canales de Kv relacionados con las corrientes IKDR, que podrían ser los que también bloquea *EgKU-1*. Por otro lado, en el caso de los dos *EgKUs*, el bloqueo pareció ser mayor en las soluciones con sodio que en las soluciones que no contienen sodio. Esto podría deberse a que se vean afectadas también corrientes de potasio activadas por sodio, que se sabe existen en las ASICs

de rata, en particular corrientes de potasio que son activadas por sodio y cloruro intracelular
113114.

Es pertinente mencionar que el valor de IC50 (aproximadamente 200 nM) determinado para *EgKU-1* sobre las corrientes aisladas de Kv es dos órdenes de magnitud más alto que los reportados para las DTXs en experimentos con DRG de rata (del orden de 10^{-9} M)¹¹². Esto podría deberse a que, si bien *EgKU-1* comparte con las DTXs varios residuos que estarían involucrados en la interacción con el canal, carece de la Lys5 que sería un determinante crítico para la actividad (Figura 1.19; ⁴⁴). Por otro lado, se observa que la curva de dosis-respuesta no parte de cero; tal vez esto sea consecuencia de que la actividad de *EgKU-1* sea mucho mayor sobre algún tipo de canal Kv, que estaría muy bloqueado a concentraciones bajas de *EgKU-1*.

5.4.2. ¿Podemos decir algo sobre la especificidad de inhibición de Kv por parte de *EgKU-1* y *EgKU-4*?

Como nuestros estudios fueron realizados sobre las corrientes totales de Kv en cultivos primarios, permitieron únicamente determinar la existencia de actividad bloqueadora de canales Kv por parte de *EgKU-1* y *EgKU-4*. Por lo tanto, se puede comparar la potencia del bloqueo sobre todos los Kv presentes en las DRG, pero no sobre un Kv específico. Más aún, puede ocurrir que el/los canal/es que estos inhibidores bloquea/n con mayor afinidad no esté/n presente/s en los preparados de DRG o esté/n muy poco representado/s. Este podría ser el caso de *EgKU-1* y *EgKU-4*, si efectivamente actuaran al ser secretados al intestino del perro, un medio muy distinto al de las DRGs.

Sin perjuicio de lo anterior, algunos resultados indican que algún Kv podría ser bloqueado con más potencia. Por un lado, como se comentó en la sección 5.4.1, los estudios de dosis-respuesta con *EgKU-1* sugieren que algún Kv sería bloqueado a muy baja concentración. Además, los estudios de la dependencia del bloqueo con el voltaje muestran que el mayor efecto de *EgKU-1* sobre las corrientes aisladas de K⁺ (en soluciones sin sodio) se observó a un potencial de -35mV (Figura 5.9). Por otro lado, para *EgKU-4* observamos el mayor efecto sobre las corrientes de K⁺ (en soluciones con sodio) a un potencial de -50 mV (Figura 5.4f). Es decir que para cada proteína hay un voltaje en el que el bloqueo sería mayor. Esto tal vez refleje la especificidad por el canal que cada inhibidor bloquea. Sería informativo estudiar el efecto de *EgKU-4* sobre corrientes aisladas de K⁺ para determinar si también bloquea más de las corrientes IKDR o si, en cambio, bloquea también las IKA. Los experimentos con *EgKU-4* parecen indicar que el mayor bloqueo es en las IKDR (Figura 5.2) pero no podemos asegurar que no sean también bloqueadas las IKA.

En suma, observamos que, de acuerdo a lo que había anticipado el modelo estructural de *EgKU-1*, el par de parálogos *EgKU-1/EgKU-4* bloquea canales de potasio dependientes de voltaje. Vimos que *EgKU-1* presenta mayor actividad sobre las corrientes IKDR que sobre las IKA, y que *EgKU-1* y *EgKU-4* bloquearían canales diferentes. La actividad de estos *EgKUs* sobre las DRG es menos potente que la observada con las DTXs. Esto podría deberse a que son bloqueadores menos potentes de canales Kv o a que su/s canal/es blanco/s no estén tan bien representados en las DRGs como lo están los de las DTXs.

5.4.3. Acerca del bloqueo de canales de Na⁺ activados por cambios de pH

Además de bloquear canales Kv, *EgKU-1* y *EgKU-4* presentaron una potente actividad bloqueadora (dosis dependiente) de ASICs en DRGs, que revirtió totalmente luego de lavar un minuto. Este tipo de actividad no había sido descrita para inhibidores del tipo Kunitz cuando realizamos estos experimentos. Como se comentó en la introducción, la única actividad descrita para inhibidores del tipo Kunitz sobre ASICs, era la de un complejo heteromérico aislado del veneno de una víbora coral formado por una proteína Kunitz (MitTx- α) y una fosfolipasa tipo A2 (MitTx- β) que actúa como un agonista potente, persistente y selectivo de ASICs pero no como un bloqueador ⁸⁰. Recientemente, en un estudio realizado en el laboratorio del Prof Enrique Soto a partir de los resultados que obtuvimos con *EgKU-1* y *EgKU-4*, se demostró que la α -DTX también bloquea las corrientes ASICs en DRGs (IC50 en el orden 10^{-7} M), aunque su actividad es considerablemente menor que sobre Kv (IC50 en el orden 10^{-9} M) ¹¹⁵.

Nuestros resultados parecen indicar una preferencia de *EgKU-1* y *EgKU-4* por las corrientes rápidas sobre las lentas. Las corrientes rápidas derivan de ASICs formados por las subunidades ASIC1a, ASIC1b y ASIC3. Las corrientes lentas, por su parte, se relacionan con las subunidades ASIC2a, que son las menos representadas en las DRG ¹¹⁶⁷⁵. Es muy difícil predecir qué canales son más bloqueados a partir de experimentos realizados con DRGs, ya que, como mencionamos varias veces, son cultivos heterogéneos y, por tanto, no se sabe a qué subtipo/s de ASICs corresponde el bloqueo observado. La dispersión de los resultados que obtuvimos en el estudio de dosis-respuesta con *EgKU-1* nativo (que se refleja en el error de la curva) indica que el bloqueo entre célula y célula fue variable. Este comportamiento junto con la aparente preferencia de *EgKU-1* y *EgKU-4* por las corrientes rápidas, indicarían que algunos canales ASICs son más bloqueados que otros por estos *EgKUs*. Esto reproduciría lo reportado para todos los bloqueadores proteicos de ASICs, que son muy específicos por determinada subunidad (ver sección 1.6.2.4). Un estudio de la actividad de *EgKU-1* y *EgKU-4* sobre células transfectadas con subunidades particulares de ASICs permitiría determinar si realmente son selectivos y caracterizar el bloqueo en cada caso.

Por otro lado, observamos que, en ausencia de estímulo, se activaba lentamente una corriente de sodio al aplicar una baja concentración de *EgKU-1*. Pensamos que este efecto es consecuencia de que *EgKU-1* tiene la capacidad de abrir canales ASICs. Se ha descrito que la PcTx1 abre el canal ASIC1a sin el estímulo de pH, generando una leve corriente de sodio. Se cree que esto ocurre porque hace que aumente la afinidad del canal por el H⁺, llevándolo del estado cerrado al estado de desensibilización ¹¹⁷. Tal vez *EgKU-1* tenga un mecanismo de bloqueo similar, y esto explique la corriente de sodio observada.

5.4.3.1. El comportamiento de EgKU-1 y EgKU-4 sobre los ASICs es similar al de la APETx2

Es interesante comentar los resultados de estudios de bloqueo de ASICs en DRG realizados con APETx2 y PcTx1. En el caso de la APETx2, de manera similar a lo que observamos con *EgKU-1* y *EgKU-4*, se registró un efecto variable entre las diferentes neuronas. Esto se explica porque la APETx2 bloquea homómeros de ASIC3 con mayor afinidad que heterómeros que contienen ASIC3. Además, la afinidad con que bloquea a cada heterómero también varía, dependiendo de las otras subunidades de ASICs que conformen al canal ¹¹⁶. En el caso de la PcTx1, el

comportamiento fue distinto. La PcTx1 es muy específica por la subunidad ASIC1a y bloquea solo los homómeros. En los estudios con DRG, se observó actividad únicamente sobre las corriente de tiempo intermedio, que se presume derivan de homómeros de ASIC1a ¹¹⁸. Por tanto, de manera similar a lo que ocurre con APETx2 y ASIC3, *EgKU-1* y *EgKU-4* podrían actuar específicamente sobre alguna subunidad de ASICs bloqueando tanto los homómeros como los heterómeros; la actividad resultante sobre cada canal dependería de su composición de subunidades.

5.4.3.2. EgKU-1 y EgKU-4 poseen características estructurales comunes con otros bloqueadores de ASICs

Chagot y colaboradores compararon la estructura de PcTx1 y APETx2 (dos bloqueadores de ASICs que poseen plegamientos diferentes) con la de APETx1, que posee similitud estructural con APETx2 y no bloquea ASICs, pero sí otros canales catiónicos. Observaron que, pese a que tienen estructuras diferentes, los dos bloqueadores de ASICs poseen características comunes; en particular, dos parches (“clusters”) de aminoácidos localizados en lados opuestos de las moléculas: uno básico/aromático, que está presente en bloqueadores de varios canales y sería importante para la actividad, denominado díada básica-aromática; el otro parche es básico/hidroxílico. Además, APETx2 y PcTx1 poseen un residuo ácido equidistante de los dos parches ¹¹⁹. En el caso de PcTx1, la resolución de la estructura del complejo con ASIC1a confirmó la relevancia de la díada básica/aromática en la interacción con el canal ¹²⁰. Es interesante notar que este tipo de elementos también están presentes en la α -DTX (Figura 5.13) ¹¹⁵, y que *EgKU-1* y *EgKU-4* poseen ambos parches con un residuo de Glu en las posición 10. Estas características estructurales podrían explicarían la actividad de los tres inhibidores Kunitz sobre los ASICs.

*5.4.4. ¿Son los ASICs o los Kvs blancos fisiológicos de *EgKU-1* y *EgKU-4*?*

EgKU-1 y *EgKU-4* son activos sobre canales muy diferentes. Esta falta de selectividad contrasta con la alta especificidad que poseen las proteínas Kunitz que inhiben peptidasas. Existen varios ejemplos de proteínas que bloquean distintos tipos de canales. Como hemos mencionado, recientemente contribuimos a demostrar que la α -DTX también bloquea ASIC además de Kv ¹¹⁵; asimismo, la δ -DTX bloquea Kir1.1, un canal de entrada de K⁺ ATP-dependiente, además de Kv ¹²¹. Otro ejemplo es la APETx2 que, además de bloquear ASIC3, bloquea canales de sodio activados por voltaje, en particular Nav1.2, Nav1.6 and Nav1.8 ^{77,76}. Es decir que estas proteínas tienen una cierta promiscuidad con respecto a los canales que bloquean, posiblemente producto del mecanismo por el cual bloquean al/a los canales. Más aún, los estudios de relación estructura-actividad generalmente han identificado regiones de la superficie de las moléculas involucradas con la actividad, pero no una región específica y definida responsable del bloqueo, como lo es el bucle anti-peptidasa ^{45,60,122,83}. De manera que determinadas características que sirven para bloquear una clase de canal pueden servir para bloquear otra clase diferente. En este contexto, es especialmente difícil predecir qué clase de canal es el blanco fisiológico de un bloqueador; es necesario también conocer el entorno fisiológico dónde actúa.

Nuestros resultados nos llevan a preguntarnos cuál es el mejor candidato a blanco fisiológico de *EgKU-1* y *EgKU-4*: ¿son los canales ASICs o los Kv? Los experimentos de dosis-respuesta con

EgKU-1 mostraron que el bloqueo depende de la dosis y permitieron estimar los valores de IC50. Como el valor sobre ASICs resultó dos órdenes de magnitud menor que sobre Kv, se podría pensar que los ASICs serían candidatos a blanco fisiológico de *EgKU-1*; sin embargo, no podemos descartar que exista algún Kv que sea muy bloqueado por *EgKU-1* (y/o *EgKU-4*). De hecho, como ya se comentó, tenemos alguna evidencia que indica que podría ser así. Por tanto, nuestros resultados sólo nos permiten afirmar que alguno o varios tipos de ASICs son fuertemente bloqueados por *EgKU-1* (y *EgKU-4*), pero no podemos afirmar que bloquee/n determinado ASIC con más potencia que determinado canal Kv.

Nuestros resultados nos dejan varias preguntas que no podemos responder aún: ¿Qué clase/s de canal es/son el blanco fisiológico de *EgKU-1* y *EgKU-4*? ¿Sobre qué tipo de Kv presentan mayor actividad? ¿Sobre qué tipo de ASICs presentan mayor actividad? ¿Cuál es el efecto biológico asociado al bloqueo de canales por parte de *EgKU-1* y *EgKU-4*?

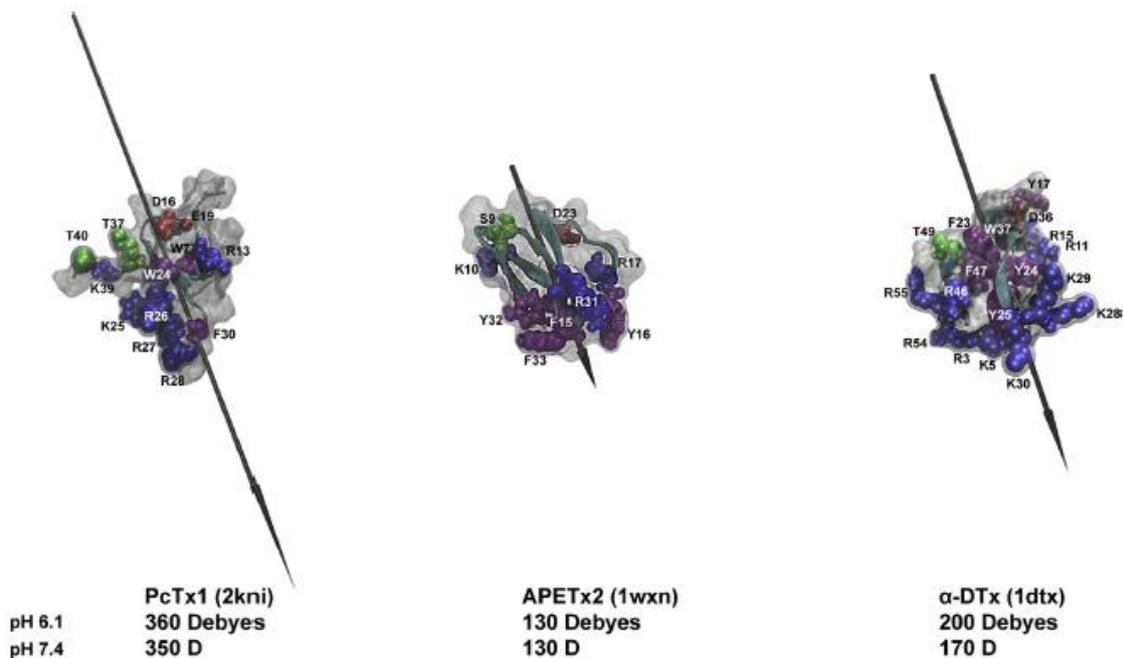


Figura 5.13 Comparación estructural y electrostática de la α -DTX con otros bloqueadores de ASICs. Se muestran los residuos expuestos que forman los parches básico/aromático y básico/hidrofóbico en PcTx1 y APETx2 (propuestos por Chagot y cols) y en la α -DTX. Los momentos dipolares de las moléculas están dibujados a escala según su magnitud; y los residuos coloreados según el siguiente código: en verde, los polares no cargados; en azul, los positivos, en rojo, los negativos; y en púrpura, los aromáticos. Debajo de cada modelo entre paréntesis se indica el código de acceso en PDB de cada proteína y la magnitud del dipolo a pH 6.1 y 7.4. Tomado de Báez y cols ¹¹⁵

6. Discusión

A partir de la caracterización de la actividad de cinco miembros de la familia de inhibidores del tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus*, demostramos que esta familia es funcionalmente diversa. En efecto, tres integrantes (*EgKU-3*, *EgKU-7* y *EgKU-8*) son potentes inhibidores de peptidasas de serina, con especificidades que difieren en función de los residuos que presentan en el sitio anti-peptidasa; así, *EgKU-3* (Leu en P1) inhibe quimotripsinas y *EgKU-7* y *EgKU-8* (Arg en P1) inhiben tripsinas. Es decir, se trata de parálogos que inhiben blancos parálogos. Además, observamos que *EgKU-7* presenta un comportamiento de inhibición atípico e inusual para inhibidores tipo Kunitz, con características particulares en la interacción con las diferentes tripsinas ensayadas. Los otros dos integrantes estudiados (*EgKU-1* y *EgKU-4*) bloquean canales catiónicos. Teniendo en cuenta que los inhibidores Kunitz de *E. granulosus* serían secretados por el parásito a la interfase con el hospedero definitivo, estos resultados indican que en las secreciones parasitarias existen familias de inhibidores Kunitz con un perfil evolutivo similar al observado en los venenos de animales. Verificar esta divergencia funcional, que entendemos refleja una similitud en el perfil de evolución entre los componentes de las secreciones parasitarias y los venenos, fue el principal objetivo de esta tesis. Además de su relevancia evolutiva, estos resultados pueden aportar a la comprensión de los mecanismos que utilizan *E. granulosus* y organismos relacionados para el establecimiento de una infección exitosa. Por sus funciones, estas moléculas podrían participar, entre otros, en la modulación de la respuesta inmune, la evasión de la degradación proteica, etc ¹²³.

6.1. La familia de inhibidores Kunitz de *Echinococcus granulosus*

Hace unos años, nuestro grupo identificó ocho proteínas Kunitz monodominio (*EgKU-1* a *EgKU-8*) en un relevamiento del transcriptoma de protoescoléx. La disponibilidad del genoma de *Echinococcus* spp. ^{81,82} nos permitió identificar genes para otros 8 integrantes de la familia (que denominamos *EgKU-9* a *EgKU-16*; Figura 6.1). Desde el punto de vista molecular, la familia se caracteriza por su diversidad y por la existencia de varios pares de parálogos cercanos. Estas dos características son consistentes con una evolución acelerada de la familia, y cabe esperar que sus blancos de inhibición (como contrapartes) reproduzcan un patrón similar de diversidad. También de acuerdo con un proceso de evolución acelerada, se observa que varios genes están ubicados muy próximos entre sí en el genoma, indicando que hubo varios eventos de duplicación; y que existe una mayor similitud en el péptido señal que en el resto de la proteína en cuatro de los siete pares de parálogos (*EgKU-1/EgKU-4*, *EgKU-3/EgKU-8*, *EgKU-13/EgKU-14* y *EgKU-15/EgKU-16*).

En el árbol filogenético (Figura 6.1), se observan dos clados principales y, por fuera de ellos, a *EgKU-2* y *EgKU-12* que a su vez son distantes entre sí. Uno de los clados está formado por cuatro pares de parálogos cercanos, con similitudes en el dominio Kunitz mayores al 60% (*EgKU-5/EgKU-11*, 62%; *EgKU-6/EgKU-7*, 78 %; *EgKU-3/EgKU-8*, 76%; y *EgKU-9/EgKU-10*, 92%). Este clado reúne a las proteínas con actividad inhibitora de peptidasas que caracterizamos en esta tesis (*EgKU-3*, *EgKU-7* y *EgKU-8*) y otras (*EgKU-5* y *EgKU-6*) para las que, en estudios preliminares, verificamos que inhiben tripsina. Con respecto a otros integrantes del clado, por su proximidad filogenética con *EgKU-5*, *EgKU-11* sería otro inhibidor de peptidasas (con actividad tipo tripsina, ya que tiene una Arg en P1). Sin embargo, presenta una Gly en lugar de

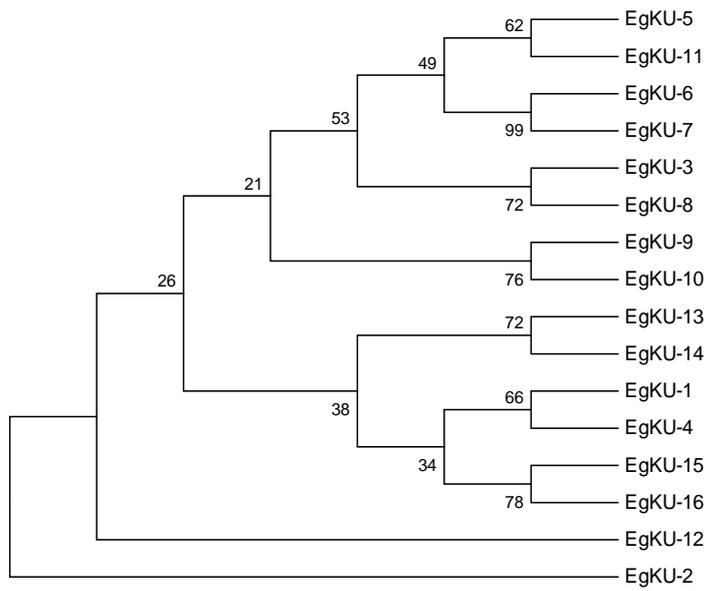


Figura 6.1 Análisis filogenético de los 16 miembros de la familia de inhibidores del tipo Kunitz de *E. granulosus*. Las secuencias predichas para los dominios Kunitz fueron analizadas mediante el método de *Neighbor-Joining* utilizando el programa Mega 4 con los parámetros por defecto ¹⁴⁵.

la Cys14; si no se tratara de un error de secuenciación, esto podría reflejar alguna variación en su función, dado que esta Cys, contigua al sitio P1, es una de las que forma el enlace disulfuro que fija el bucle antipeptidasa. Finalmente, el par de parálogos *EgKU-9/EgKU-10*, es el más distante del clado. Es difícil predecir la función de estas proteínas a partir de sus secuencias; por un lado, al igual que *EgKU-1* y *EgKU-4*, ambas presentan la Leu7; además, *EgKU-9* (pero no *EgKU-10*) presenta una Arg en el “ β -turn”. Por otro lado, su bucle anti-peptidasa tiene similitudes con el de *EgKU-8*. Como se agrupan con los inhibidores de peptidasas, podrían inhibir peptidasas (tipo quimotripsina en el caso de *EgKU-9* - Leu en P1; y tripsina en el de *EgKU-10* - Arg en P1). Sin embargo, no puede descartarse que *EgKU-9* también bloquee canales en virtud de que la Leu7 y uno o más residuos cargados positivamente en el “ β -turn” han sido identificados como elementos importantes para el bloqueo de Kv (Figura 1.19).

El otro clado está formado por tres pares de parálogos con similitudes en sus dominios mayores al 65% (*EgKU-1/EgKU-4*, 76 %; *EgKU-13/EgKU-14*, 66 %; y *EgKU-15/EgKU-16*, 78 %). En este clado, se encuentran *EgKU-1* y *EgKU-4* que bloquean canales pero no disponemos de datos de actividad para las demás proteínas. Si bien, como hemos mencionado, es difícil predecir su función a partir de las secuencias, *EgKU-15* y *EgKU-16*, que forman el par más próximo a *EgKU-1/EgKU-4*, comparten con ellos la Leu7 y un “ β -turn” cargado positivamente. Por tanto, son candidatos a bloqueadores de canales. Por su parte, en el par *EgKU-13/EgKU-14*, *EgKU-13* tiene la Leu7 y una Arg en el “ β -turn”; en tanto *EgKU-14* no posee ninguna de las características presentes en *EgKU-1* y *EgKU-4*. Su bucle antipeptidasa tampoco posee similitud con los inhibidores de peptidasas de la familia. Por tanto, no tenemos elementos para predecir su función; si actuaran como inhibidores de peptidasas, inhibirían enzimas tipo elastasa (Ser y Gly en P1, para *EgKU-13* y *EgKU-14*, respectivamente). En este análisis muy preliminar, hemos considerado solamente los elementos de estructura que han sido relacionados con el bloqueo de Kv en los estudios de relación estructura-actividad de las DTX, que son el ejemplo mejor estudiado de inhibidores Kunitz que bloquean canales catiónicos. Como comentamos previamente, recientemente contribuimos a demostrar que la α -DTX también bloquea ASICs y verificamos que posee elementos estructurales que han sido relacionados con el bloqueo de ASICs en otros inhibidores ¹¹⁵. En este contexto, no resultó inesperado observar que varios de ellos están presentes también en *EgKU-1* y *EgKU-4* (Figura 5.13), en particular, la anisotropía de carga superficial y un “cluster” de aminoácidos básico/aromático (díada básica-aromática). Estudios preliminares de este tipo con los restantes *EgKUs* presentes en el genoma, en particular con los más expresados (ver más adelante), nos permitirán seleccionar los que serían más interesantes para la realización de ensayos funcionales.

En cuanto a *EgKU-2* y *EgKU-12* que aparecen muy distantes, tenemos evidencia experimental preliminar de que *EgKU-2* (Trp en P1) es un potente inhibidor de quimotripsina. En cuanto a *EgKU-12*, su bucle anti-peptidasas tiene similitudes con el de *EgKU-7* y presenta una Arg en P1, lo que nos lleva a plantear que podría inhibir tripsina.

Por su parte, los datos de RNASeq generados en el marco de los proyectos genoma ⁸¹⁸² muestran que en todos los estadios analizados se expresan algunos integrantes de la familia. Es interesante que la mayoría de los *EgKUs* se expresan en el adulto y que, para varios de ellos, el nivel de expresión es mucho mayor que en los otros estadios. Es el caso de *EgKU-3*, *EgKU-7*, *EgKU-8* así como de *EgKU-11* y *EgKU-16* ⁸¹⁸². Además, se ha verificado la presencia de *EgKU-3* y

EgKU-8 en secreciones de protoescólex y protoescólex activados con pepsina, en líquido hidático de quistes obtenidos de varias especies (humano, ovino y bovino) y en secreciones de adultos (⁵⁸; ¹²⁴; y resultados de nuestro grupo aún no publicados). Además, *EgKU-1* y *EgKU-4* se encuentran entre los genes más expresados por los adultos grávidos ⁸¹ y *EgKU-9* es uno de los transcritos más abundantes de la oncosfera ⁸².

Tomados en conjunto, estos datos indican que la secreción de inhibidores del tipo Kunitz es una estrategia que *E. granulosus* ha desarrollado para instalarse y permanecer en el hospedero definitivo bloqueando, mediante interacciones de alta afinidad, la función de proteínas del hospedero, como peptidasas de serina y canales catiónicos. Asimismo, la alta expresión de algunos *EgKUs* en los estadios asociados con el desarrollo del metacestodo indica que también participarían en la interacción con los hospederos intermediarios.

6.2. Existen familias de inhibidores del tipo Kunitz en otros cestodos

En el estudio que publicamos hace unos años, incluimos resultados de una búsqueda exhaustiva de inhibidores Kunitz monodominio en las bases de datos de ESTs de platelmintos disponibles hasta entonces ⁵⁸. Nuestros resultados mostraron que, entre los parásitos, la expresión de familias de estas proteínas sería una característica distintiva de los cestodos. En efecto, identificamos ortólogos de los *EgKUs* en *E. multilocularis* y *Taenia solium*. Sin embargo, no encontramos sino algunos transcritos correspondientes a proteínas con una arquitectura molecular similar, es decir un péptido señal seguido de un único dominio Kunitz, en una extensa colección de ESTs de trematodos, representativa de todos los estadios del ciclo de vida de *Shistosoma mansoni* ¹²⁵ y varios de *S. japonicum* ¹²⁶. También identificamos genes codificantes para proteínas Kunitz monodominio en el genoma de la planaria (platelminto de vida libre) *Schmidtea mediterránea* (SmedGD) ¹²⁷; este organismo tendría un set de al menos 20 proteínas de este tipo, para 14 de las cuales existe evidencia de transcripción. En términos generales, los datos genómicos y transcriptómicos de estos organismos (y otros relacionados) disponibles actualmente (accesibles en WormBase ParaSite: <http://parasite.wormbase.org/>) confirman estas evidencias iniciales. En este contexto, el hecho que familias de proteínas Kunitz monodominio estén presentes en planarias y cestodos pero virtualmente ausentes de trematodos refleja que su evolución es característica de un linaje de platelmintos, y reviste un interés especial si, como sugerimos, estaría relacionado con la forma de vida parasitaria de los cestodos.

Asimismo, analizamos exhaustivamente las ESTs de nematodos, el otro filum de helmintos (en el que también existen organismos parásitos y de vida libre), disponibles en ese momento, realizando una búsqueda en NEMBASE ¹²⁸. Identificamos así transcritos que codificarían para varias proteínas Kunitz monodominio solo en algunas especies de parásitos de animales y plantas (clados V y VI, respectivamente) ⁵⁸. De manera que la presencia de este tipo de familias también estaría asociada al parasitismo en nematodos. Es de interés comentar que los nematodos poseen una familia de inhibidores de peptidasas de serina (y metalopeptidasas) característica del filum (la familia I8 en MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) ²¹, de inhibidores de quimotripsina y elastasa tipo *Ascaris*); varios nematodos parásitos (como *Ancylostoma* spp.) expresan miembros de cada una de las dos familias (tanto I8 ¹²⁹ como I2 ⁵⁶).

Globalmente, nuestros resultados apoyan la idea de que los cestodos poseen familias de proteínas Kunitz monodominio secretadas. Si los genes ortólogos identificados en los organismos relacionados a codifican para proteínas con una diversidad funcional análoga a la de los *EgKUs*, el patrón evolutivo de estas moléculas sería similar al descrito para las familias multigénicas presentes en venenos de animales, en las que la selección natural actúa sobre los genes duplicados, permitiendo no solamente la aparición de inhibidores específicos de enzimas particulares (genes parálogos cuyos productos bloquean blancos parálogos), sino también de integrantes con una nueva función asociada a un mismo andamiaje molecular. Teniendo en cuenta que los genes que codifican para las secreciones parasitarias y los venenos de predadores surgen de un “enfrentamiento” entre diferentes organismos, es interesante notar esta similitud en su patrón evolutivo. Así, las características evolutivas del llamado “exogenoma” (la parte del genoma cuyos productos tienen como contraparte blancos exógenos), un término acuñado para los componentes de venenos ¹³⁰, podrían aplicarse también a los genes que codifican para proteínas de secreciones parasitarias.

6.3. ¿Qué podemos decir acerca de los posibles blancos de los inhibidores Kunitz de *E. granulosus*?

Si bien caracterizamos la actividad de varios inhibidores del tipo Kunitz de *E. granulosus*, los resultados no nos permiten definir cuál o cuáles son sus blancos fisiológicos y menos aún cuál sería su función en el contexto de la interacción con los hospederos. De todas maneras, el conocimiento de su actividad nos permite especular acerca de eso. Sabemos que al menos 6 *EgKUs* inhiben peptidasas: *EgKU-2* y *EgKU-3*, tipo quimotripsina; y *EgKU-5*, *EgKU-6*, *EgKU-7* y *EgKU-8*, tipo tripsina; y que al menos dos, *EgKU-1* y *EgKU-4*, bloquean canales Kv y ASICs. Como hemos mencionado (ver sección 6.1), los estudios transcriptómicos y proteómicos de distintos materiales de *Echinococcus* spp. revelaron que, sin perjuicio de su relevancia potencial en la interacción con los hospederos intermediarios, el bloqueo de peptidasas de serina y canales catiónicos por parte de estos *EgKUs* contribuiría a crear un microclima adecuado para la instalación, desarrollo y permanencia del parásito en el duodeno del perro, su hospedero definitivo. En las secciones que siguen nos referiremos a algunos ejemplos de peptidasas de serina y canales de tipo Kv y ASICs involucrados en la regulación de procesos fisiológicos en el epitelio intestinal, en el entendido que son blancos potenciales de estas moléculas.

6.3.1. Posibles blancos de los inhibidores de peptidasas de serina

La inhibición de las peptidasas de serina presentes en el duodeno podría ser muy relevante durante la instalación del protoescólex, y hasta que el gusano desarrolla un glicocálix que protege su tegumento de la acción de las enzimas digestivas. Sin embargo, nos es difícil pensar que los protoescólex puedan secretar cantidades de inhibidores que les permita bloquear la acción de las peptidasas en el duodeno. En este sentido, los *EgKUs* presentes en el líquido hidático (*EgKU-3* y *EgKU-8*), podrían contribuir a proteger a los protoescólex al comienzo de la infección. A su vez, cuando el parásito se instala, establece un contacto muy íntimo con la mucosa por lo que, quizás en ese contexto, la cantidad de inhibidores secretada podría ser suficiente para la protección del escólex, que posee sólo un glicocálix discreto.

Además de las enzimas pancreáticas, en el duodeno están presentes peptidasas de serina secretadas, por ejemplo, por células del sistema inmune, y también peptidasas presentes en la membrana de las células epiteliales. Se ha vinculado a estas últimas con una variedad de procesos como la regulación de la homeostasis, inflamación, dolor, activación de factores de crecimiento, proliferación celular y cicatrización de heridas ^{131,132,133}. Las peptidasas pueden, además, activar, mediante hidrólisis, receptores como los denominados PARs (del inglés “proteinase-activated receptors”). Los PARs son proteínas de membrana cuyo N-terminal, que es extracelular, presenta sitios que pueden ser hidrolizados por diferentes peptidasas de serina. Hasta el momento se conocen cuatro tipos, PAR1-4. Su mecanismo de activación está ligado a la hidrólisis: el fragmento escindido actúa como un ligando (“atado” al receptor previo a la hidrólisis) que se une al receptor hidrolizado y lo activa. Una vez activados, los PARs estimulan vías de señalización intracelular clásicas mediadas por proteína G y arrestina-beta ¹³⁴.

6.3.2. Posibles blancos de los bloqueadores de canales

No se conoce tanto acerca de las propiedades funcionales y la identidad molecular de los canales Kv y ASICs en el intestino delgado. Se ha vinculado a los Kv en procesos como repolarización de la membrana luminal de las células epiteliales, transporte de electrolitos y sustratos, sensado de oxígeno, regulación del volumen celular, migración celular, apoptosis, inflamación y reparación tisular, regulación de la motilidad del músculo liso, y en las propiedades eléctricas de las neuronas aferentes ^{135,136}. Se sabe aún menos de los ASICs, pero se han detectado varias subunidades (ASIC1, ASIC2 y ASIC3) en el tracto gastrointestinal, provenientes de axones periféricos de neuronas aferentes vagales y espinales. Hay poca información de su expresión en otras células pero se sabe que se expresan también en células epiteliales. Existen evidencias de que el sensado de pH en el intestino es de vital importancia ya que se expone repetidas veces a condiciones ácidas; como consecuencia del sensado se estimula rápidamente un aumento de la secreción de mucus, se secreta HCO₃⁻ y aumenta el flujo de sangre en la mucosa. Se ha establecido que principalmente ASIC1 y ASIC3, junto con otros receptores (como los canales TRVP), juegan un papel importante en el sensado de pH; y estarían vinculados a patologías inflamatorias y úlceras ¹³⁷.

6.3.3. La inhibición de peptidasas y el bloqueo de canales podrían tener efectos sinérgicos

Los integrantes de familia de inhibidores Kunitz podrían interferir de manera sinérgica con varios procesos fisiológicos en el duodeno, y generar un microclima adecuado para la permanencia del parásito. No sabemos cuál es el órgano responsable de la secreción de los EgKUs. No obstante, es posible especular que serían secretados por la glándula rostellar, cuya secreción es rica en cistina (ver 1.1.3 y Figura 1.2). De hecho, estudios preliminares de hibridación *in situ* mostraron que EgKU-1 y EgKU-2 se expresarían en ese órgano (Silvia González, resultados no publicados), es decir en la región dónde el escólex establece un contacto íntimo con el duodeno. En este contexto, los EgKUs podrían contribuir a generar un entorno con mayor disponibilidad de nutrientes para el parásito, mediante el bloqueo de canales Kv que disminuiría la absorción del hospedero. Este bloqueo también podría disminuir la secreción de electrolitos, facilitadores de la propulsión del contenido intestinal, y la motilidad intestinal de manera de evitar la expulsión del parásito. Además, el bloqueo de ASICs podría disminuir el pH en el entorno del parásito y, concomitantemente, la actividad de las

enzimas del hospedero en ese entorno. Por su parte, el bloqueo de peptidasas mantendría la impermeabilidad del epitelio; de hecho, se ha visto que el aumento de la permeabilidad, que es crucial para la expulsión de nematodos intestinales, depende principalmente de peptidasas de mastocitos ¹³⁸.

Por otro lado, como hemos mencionado (ver 1.2.3), si bien el perro desarrolla una respuesta inmune medible, la presencia del parásito no genera un infiltrado celular que refleje una respuesta inflamatoria, lo que indica que es capaz de regular la respuesta del hospedero de manera de evitar ser expulsado. La inhibición de peptidasas y el bloqueo de canales también podrían ser importantes en este aspecto.

Existen evidencias de que PAR-2 se expresa en el tracto gastrointestinal y que estaría vinculado con patologías del intestino asociadas a la inflamación del tejido. Estudios recientes mostraron que PAR-2 se expresa en el duodeno canino, y que su estimulación por tripsina lleva a un aumento de la expresión de citoquinas inflamatorias y quimioquinas en el tejido duodenal. Más aún, el aumento de expresión de estas citoquinas en respuesta a la estimulación con tripsina disminuye cuando se trata previamente el tejido con PMSF (inhibidor irreversible de peptidasas de serina). Además, la expresión de PAR-2 en las células de las vellosidades y en criptas es mayor en perros con inflamación intestinal que en perros sanos; y es posible detectar un aumento de actividad del tipo tripsina en las heces de perros con inflamación intestinal respecto a los sanos ¹³⁹. Por tanto, el bloqueo de peptidasas de serina por los *EgKUs* podría ser relevante en los procesos de inflamación mediados por PARs. PAR-2 puede ser activado por tripsina, triptasas y kalerina 4 de mastocitos, y por peptidasas de membrana como la matriptasa y TMRSS2. De hecho, la matriptasa induce la expresión de citoquinas inflamatorias en células endoteliales a través de la activación de PAR-2 ¹³³. Se han descrito dos inhibidores de membrana, SPINT1 y SPINT2, cada uno de los cuales posee dos dominios Kunitz asociados a otros dominios; SPINT1 y SPINT2 participan en la regulación de la expresión, activación de zimógenos e inhibición de proteasas de membrana como la matriptasa, hepsina y prostasina ¹³³. Es interesante que los bucles anti-peptidasa de *EgKU-3* y *EgKU-8* poseen similitud con los dominios Kunitz de SPINT1 (KD1) y SPINT2 (KD2), en particular, en los residuos ubicados hacia C-terminal del sitio P1, por lo que estos inhibidores del parásito también podrían bloquear peptidasas de serina de membrana (Figura 6.2).

	NH ₂ -	P ₆	P ₅	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	P ₆ '	-COOH
<i>EgKU-3</i>	-	K	A	G	M	C	L	G	Y	F	P	K	W	-
<i>EgKU-8</i>	-	D	P	G	F	C	R	A	Y	F	P	R	W	-
SPINT1	-	K	V	G	R	C	R	G	S	F	P	R	W	-
SPINT2	-	V	T	G	P	C	R	A	S	F	P	R	W	-

Figura 6.2 Similitud entre los bucles anti-peptidasa de *EgKU-3* y *EgKU-8* y los de SPINT1 y SPINT2. SPINT1 y SPINT2 (códigos en UniPROTKB: O43278 y O43291, respectivamente) son inhibidores de membrana que inhiben peptidasas de serina de membrana. Se muestra la similitud entre los bucles anti-peptidasa de *EgKU-3* y *EgKU-8* con los de uno de los dominios Kunitz de SPINT1 y SPINT2.

En los últimos años, se han acumulado evidencias que indican que los canales de tipo Kv y ASIC están involucrados en la activación y maduración de las células dendríticas (DCs), activadoras de la respuesta inmune, y los macrófagos. Se ha visto que los canales Kv, en particular Kv1.3 y Kv1.5, junto con KCa3.1, son importantes en la modulación de la entrada de Ca²⁺ en DCs y macrófagos. Se cree que colaboran en la entrada de Ca²⁺ al mantener la polaridad de la membrana, de manera que participan en las funciones dependientes de Ca²⁺ de estas células. Por ejemplo, cuando se bloquean Kv1.3 y Kv1.5 con inhibidores específicos en DCs estimuladas con LPS, se atenúan los efectos del LPS sobre la activación¹⁴⁰. Recientemente se describió que Hg1, un inhibidor del tipo Kunitz aislado del veneno de un escorpión, bloquea Kv1.3 con alta afinidad y se observó que la actividad depende de algunos residuos básicos e hidrofóbicos ubicados en el extremo C-terminal del dominio y en una corta extensión C-terminal de la molécula¹⁴¹. Es interesante que EgKU-4 presenta en su extensión C-terminal residuos básicos e hidrofóbicos en posiciones equivalentes a los de Hg1 (nótese que EgKU-4 posee 3 residuos básicos adicionales en esa región de la molécula; ver Figura 1.18).

En cuanto a los ASICs, se ha visto que las DCs expresan ASIC1, ASIC2 y ASIC3 y que la acidosis extracelular activa corrientes que son bloqueadas por inhibidores de ASICs; más aún, la acidosis induce la activación de DCs (aumento de MHC II, CD80, CD86 y capacidad de estimular células T), y dicha activación es revertida por inhibidores de ASIC. Estos resultados son muy relevantes en el inicio de una infección, y consiguiente activación de una respuesta innata, puesto que la acidosis extracelular ocurre en contextos de inflamación. Las propias DCs activadas por agonistas de receptores tipo Toll aumentan, en escala temporal de minutos, su metabolismo glucolítico, con la consiguiente acidificación extracelular¹⁴². También se describió que los macrófagos expresan ASIC1 y ASIC3, pero no ASIC2, que la acidosis extracelular aumenta la captación de antígeno, la expresión de moléculas co-estimuladoras y la secreción de IL-10 y que estos efectos son bloqueados por inhibidores de ASIC¹⁴³.

El conjunto de estos antecedentes permite proponer que la secreción de los EgKUs y consiguiente bloqueo de canales e inhibición de peptidasas, son herramientas del parásito para regular la respuesta inmune del hospedero activada por su presencia. De alguna manera en apoyo de esta hipótesis, es interesante mencionar que recientemente se verificó que una proteína Kunitz del trematodo *Fasciola hepatica* inhibe la activación y función inmunoestimuladora de DCs estimuladas con LPS¹⁴⁴. Esta molécula comparte características de secuencia con EgKU-1 y EgKU-4 y también posee una actividad inhibidora de peptidasas marginal⁵⁷.

6.4. Perspectivas

En este trabajo, demostramos que la familia de inhibidores del tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus* es funcionalmente diversa y, por lo tanto, que constituiría otro ejemplo de diversificación funcional derivado de la adaptación a la supervivencia de un organismo que coloniza un entorno complejo y variable. Los resultados de nuestros estudios generan nuevas preguntas que nos interesa responder en un futuro.

En el caso de los inhibidores de peptidasas de serina (EgKU-3, EgKU-7 y EgKU-8), sería interesante estudiar su actividad sobre otras peptidasas presentes in situ en el que el parásito se instala en el intestino del perro; en particular, la de EgKU-3 y EgKU-8 sobre peptidasas de

membrana, en virtud de la similitud de su bucle antipeptidasa con el de SPINT1 y SPINT2. También sería relevante analizar el comportamiento de estos inhibidores sobre las peptidasas de serina del parásito y comparar su actividad con la que se observa sobre las del hospedero. En el caso de *EgKU-7*, que presentó un comportamiento atípico en la inhibición de tripsinas, estudios de cristalografía de complejos del inhibidor con diferentes tripsinas podrían permitir entender mejor el mecanismo de la inhibición, y quizás, el sentido biológico de esta inhibición atípica.

En cuanto a los bloqueadores de canales (*EgKU-1* y *EgKU-4*), sería informativo estudiar su actividad sobre células transfectadas con diferentes canales, en particular Kv1.3, Kv1.5, ASIC1, ASIC2 y ASIC3 que son los que están más representados en el epitelio intestinal y en las células inmunes. A partir de los resultados de esos estudios, se tendrían más elementos acerca de su posible función en el contexto de la infección.

También sería interesante estudiar si estas proteínas afectan la respuesta de células de la respuesta innata, en experimentos similares a los realizados con el inhibidor de *F. hepática* caracterizado recientemente. De esta manera, se tendrían datos acerca de una posible participación de los *EgKUs* en la regulación a la baja de la respuesta inmune del perro.

Asimismo, dado que el número de integrantes de la familia es mayor del que conocíamos al comienzo de esta tesis, sería interesante estudiar y caracterizar la actividad de los restantes *EgKUs*, en particular de aquellos muy expresados como *EgKU-9* que se encuentra entre los transcritos más abundantes de la oncosfera y, por tanto, podría contribuir al establecimiento de la infección en los hospederos intermediarios.

Finalmente, cabe mencionar que, debido a su especificidad y alta afinidad por sus blancos, se considera que los inhibidores Kunitz tienen potencial para ser utilizados como drogas y/o herramientas experimentales para la caracterización de las peptidasas que inhiben o los canales catiónicos que boquean. De hecho, existen ejemplos de ambos tipos de usos; por ejemplo, el BPTI se ha utilizado como fármaco, por su capacidad inhibidora de tripsina y trombina; las dendrotoxinas en la caracterización de canales catiónicos, por su capacidad de bloquear subtipos particulares de canales Kv. Así, el estudio de los *EgKUs* reviste interés también en este sentido.

7. Bibliografía

1. Thompson, R. C. A. *Echinococcus and Hydatid Disease*. (1995).
2. Smyth, J. & McManus, D. *The physiology and biochemistry of cestodes*. (1989).
3. Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T. & Ito, A. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* **43**, 1017–29 (2013).
4. Brunetti, E. & White, a. C. Cestode Infestations. Hydatid Disease and Cysticercosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 421–435 (2012).
5. Cardona, G. a. & Carmena, D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet. Parasitol.* **192**, 10–32 (2013).
6. Ganong, W. F. *Review of Medical Physiology*. (2001).
7. Grant Guilford W, S. A. C., Donald, R., Strombeck, D. A., Williams, D. J. & Meyer. *Strombeck's Small Animal Gastroenterology*. (1996).
8. Radtke, F. & Clevers, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* **307**, 1904–1909 (2005).
9. Heath, D. D. in *Echinococcus and Hydatid Disease* (eds. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A.) 183–194 (1995).
10. Heath, D. D. in *Echinococcus and Hydatid Disease* (eds. Thompson, R. C. A. & Lymbery, A.) 164–182 (1995).
11. Benavides, U., Shozawa, J., Altamirano, Z. & Carmona, C. *Interacción entre Echioicoccus granulosis y la mucosa intestinal del huésped definitivo: evidencias experimentales y discusión de mecanismos protectivos*. En: *XI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias. 2005; XI Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias* (2005).
12. Maizels, R. M. & Yazdanbakhsh, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 733–744 (2003).
13. Barriga, O. O. & Al-Khalidi, N. W. Humoral immunity in the prepatent primary infection of dogs with *Echinococcus granulosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **11**, 375–389 (1986).
14. Deplazes, P., Thompson, R. C., Constantine, C. C. & Penhale, W. J. Primary infection of dogs with *Echinococcus granulosis*: systemic and local (Peyer's patches) immune responses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **40**, 171–184 (1994).
15. Jenkins, D. J. & Rickard, M. D. Specific antibody responses in dogs experimentally infected with *Echinococcus granulosis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **35**, 345–349 (1986).

16. Moreno, M. *et al.* Local and systemic immune responses to *Echinococcus granulosus* in experimentally infected dogs. *Vet. Parasitol.* **119**, 37–50 (2004).
17. Gemmell, M. a, Lawson, J. R. & Roberts, M. G. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: biological parameters of *Echinococcus granulosus* in dogs and sheep. *Parasitology* **92 (Pt 3)**, 599–620 (1986).
18. Rossi, A. *et al.* *Echinococcus granulosus*: Different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs. *Exp. Parasitol.* **130**, 110–115 (2012).
19. Hartley, B. B. S. By B. S. (1959).
20. Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. *Chem. Rev.* **102**, 4501–4523 (2002).
21. Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J. & Bateman, A. MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **42**, (2014).
22. Rawlings, N. D., F.R. Morton, F. R. & Barrett, A. J. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 325–331 (2006).
23. Barrett, a J., Rawlings, N. D. & O'Brien, E. a. The MEROPS database as a protease information system. *J. Struct. Biol.* **134**, 95–102 (2001).
24. Schechter, I. & Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157–162 (1967).
25. Branden, C. & Tooze, J. *Introduction to protein structure*. (Garland Publishing, Inc., 1991).
26. Cleland, W. W., Frey, P. a & Gerlt, J. a. in *Enzymatic Catalysis* *. 25529–25532 (1998).
27. Shokhen, M. & Albeck, A. Is There a Weak H-bond ??? LBHB Transition on Tetrahedral Complex Formation in Serine Proteases? *Proteins Struct. Funct. Genet.* **54**, 468–477 (2004).
28. Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* **378**, 705–716 (2004).
29. Christeller, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J.* **272**, 5710–5722 (2005).
30. Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F. & Otlewski, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2427–2444 (2003).
31. Grütter, M. G. *et al.* Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J.* **9**, 2361–2365 (1990).
32. Richardson, J. L. *et al.* Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor. *EMBO J.* **19**, 5650–5660 (2000).

33. Radisky, E. S. & Koshland, D. E. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10316–10321 (2002).
34. Bode, W. & Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433–451 (1992).
35. Laskowski, M. & Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 593–626 (1980).
36. Salameh, M. a., Soares, A. S., Hockla, A. & Radisky, E. S. Structural basis for accelerated cleavage of bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) by human mesotrypsin. *J. Biol. Chem.* **283**, 4115–4123 (2008).
37. Zakharova, E., Horvath, M. P. & Goldenberg, D. P. Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11034–11039 (2009).
38. Dixon, M. & Webb, E. . *Enzymes*. (1974).
39. Copeland, R. A. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists*. (2005).
40. Pritchard, L. & Dufton, M. J. Evolutionary trace analysis of the Kunitz/BPTI family of proteins: functional divergence may have been based on conformational adjustment. *J. Mol. Biol.* **285**, 1589–1607 (1999).
41. Rezaie, A. R. Kinetics of Factor Xa Inhibition by Recombinant Tick Anticoagulant Peptide: Both Active Site and Exosite Interactions Are Required for a Slow- and Tight-Binding Inhibition Mechanism. *Biochemistry* **43**, 3368–3375 (2004).
42. Valdés, J. J. *et al.* Tryptogalinin Is a Tick Kunitz Serine Protease Inhibitor with a Unique Intrinsic Disorder. *PLoS One* **8**, (2013).
43. Vassilevski, a a, Kozlov, S. a & Grishin, E. V. Molecular diversity of spider venom. *Biochemistry. (Mosc)*. **74**, 1505–1534 (2009).
44. Harvey, A. L. Twenty years of dendrotoxins. *Toxicon* **39**, 15–26 (2001).
45. Harvey, A. L. & Robertson, B. Dendrotoxins: structure-activity relationships and effects on potassium ion channels. *Curr Med Chem* **11**, 3065–3072 (2004).
46. Schweitz, H. *et al.* Calcicludine, a venom peptide of the Kunitz-type protease inhibitor family, is a potent blocker of high-threshold Ca²⁺ channels with a high affinity for L-type channels in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 878–882 (1994).
47. Gilquin, B. *et al.* Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: Solution structure of the Ca²⁺ channel blocker calcicludine. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **34**, 520–532 (1999).

48. Bayrhuber, M. *et al.* Conkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family: Structural and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **280**, 23766–23770 (2005).
49. Elliger, C. A. *et al.* Diversity of conotoxin types from *Conus californicus* reflects a diversity of prey types and a novel evolutionary history. *Toxicon* **57**, 311–322 (2011).
50. Yuan, C. H. *et al.* Discovery of a distinct superfamily of kunitz-type toxin (KTT) from Tarantulas. *PLoS One* **3**, (2008).
51. Hisada, M. *et al.* Molecular components and toxicity of the venom of the solitary wasp, *Anoplius samariensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 1048–1054 (2005).
52. You, D. *et al.* The first gene-encoded amphibian neurotoxin. *J. Biol. Chem.* **284**, 22079–22086 (2009).
53. Mourão, C. B. F. & Schwartz, E. F. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. *Mar. Drugs* **11**, 2069–2112 (2013).
54. Schwarz, A., Cabezas-Cruz, A., Kopecký, J. & Valdés, J. J. Understanding the evolutionary structural variability and target specificity of tick salivary Kunitz peptides using next generation transcriptome data. *BMC Evol. Biol.* **14**, 4 (2014).
55. Shimakura, K. *et al.* Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **135**, 69–75 (2004).
56. Milstone, A. M., Harrison, L. M., Bungiro, R. D., Kuzmič, P. & Cappello, M. A broad spectrum Kunitz type serine protease inhibitor secreted by the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*. *J. Biol. Chem.* **275**, 29391–29399 (2000).
57. Bozas, S. E. *et al.* Characterisation of a novel Kunitz-type molecule from the trematode *Fasciola hepatica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **74**, 19–29 (1995).
58. González, S. *et al.* A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk. *PLoS One* **4**, (2009).
59. Dai, S.-X., Zhang, A.-D. & Huang, J.-F. Evolution, expansion and expression of the Kunitz/BPTI gene family associated with long-term blood feeding in *Ixodes Scapularis*. *BMC Evol. Biol.* **12**, 4 (2012).
60. Gasparini, S. *et al.* Delineation of the functional site of α -dendrotoxin: The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins. *J. Biol. Chem.* **273**, 25393–25403 (1998).
61. Harvey, A. L. Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *Gen. Pharmacol.* **28**, 7–12 (1997).
62. Kandel, E. R. & Schwartz, James. Harris Jessell, T. M. *Essentials of Neural Science and Behavior.* (1995).

63. Choe, S. Potassium channel structures. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 115–121 (2002).
64. Cohen, J. & Khalili-araghi, F. Case Study : Structure of Ion Channels. 1–20 (2007).
65. Grunnet, M., Rasmussen, H. B., Hay-Schmidt, A. & Klaerke, D. a. The voltage-gated potassium channel subunit, Kv1.3, is expressed in epithelia. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1616**, 85–94 (2003).
66. Vogalis, F. Potassium channels in gastrointestinal smooth muscle. *Journal of Autonomic Pharmacology* **20**, 207–219 (2000).
67. Zsiros, E. *et al.* Developmental switch of the expression of ion channels in human dendritic cells. *J. Immunol.* **183**, 4483–4492 (2009).
68. Gutman, G. a *et al.* International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* **57**, 473–508 (2005).
69. Coetzee, W. a *et al.* Molecular diversity of K⁺ channels. *Ann.N.Y.Acad.Sci* **868**, 233–285 (1999).
70. Doyle, D. a *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**, 69–77 (1998).
71. McCoy, J. G. & Nimigean, C. M. Structural correlates of selectivity and inactivation in potassium channels. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1818**, 272–285 (2012).
72. Hopkins, W. F., Miller, J. L. & Miljanich, G. P. Voltage-gated potassium channel inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* **2**, 389–396 (1996).
73. Sherwood, T. W., Frey, E. N. & Askwith, C. C. Structure and activity of the acid-sensing ion channels. *AJP Cell Physiol.* **303**, C699–C710 (2012).
74. Gründer, S. & Chen, X. Structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels (ASICs): Focus on ASIC1a. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2**, 73–94 (2010).
75. Diochot, S., Salinas, M., Baron, a., Escoubas, P. & Lazdunski, M. Peptides inhibitors of acid-sensing ion channels. *Toxicon* **49**, 271–284 (2007).
76. Peigneur, S. *et al.* A natural point mutation changes both target selectivity and mechanism of action of sea anemone toxins. *FASEB J.* **26**, 5141–5151 (2012).
77. Blanchard, M. G., Rash, L. D. & Kellenberger, S. Inhibition of voltage-gated Na⁺ currents in sensory neurones by the sea anemone toxin APETx2. *Br. J. Pharmacol.* **165**, 2167–2177 (2012).
78. Diochot, S. *et al.* Capsule: Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* **490**, 552 (2012).

79. Rodríguez, A. A. *et al.* A novel sea anemone peptide that inhibits acid-sensing ion channels. *Peptides* (2013). doi:10.1016/j.peptides.2013.06.003
80. Bohlen, C. J. *et al.* A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain. *Nature* **479**, 410–414 (2011).
81. Tsai, I. J. *et al.* The genomes of four tapeworm species reveal adaptations to parasitism. *Nature* **496**, 57–63 (2013).
82. Zheng, H. *et al.* The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *Nat. Genet.* **45**, 1168–75 (2013).
83. Smith, L. A. *et al.* Site-directed mutagenesis of dendrotoxin K reveals amino acids critical for its interaction with neuronal K⁺ channels. *Biochemistry* **36**, 7690–7696 (1997).
84. Waritani, T. *et al.* Development and characterization of monoclonal antibodies against canine trypsin. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **80**, 333–338 (2001).
85. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
86. Schägger, H. & von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368–379 (1987).
87. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
88. Fernández, C., Gregory, W. F., Loke, P. & Maizels, R. M. Full-length-enriched cDNA libraries from *Echinococcus granulosus* contain separate populations of oligo-capped and trans-spliced transcripts and a high level of predicted signal peptide sequences. *Mol. Biochem. Parasitol.* **122**, 171–180 (2002).
89. Otero, L. *et al.* Thioredoxin and glutathione systems differ in parasitic and free-living platyhelminths. *BMC Genomics* **11**, 237 (2010).
90. Parkinson, J. *et al.* A Transcriptomic Analysis of *Echinococcus granulosus* Larval Stages: Implications for Parasite Biology and Host Adaptation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
91. Salinas, G., Pellizza, L., Margenat, M., Fló, M. & Fernández, C. Tuned *Escherichia coli* as a host for the expression of disulfide-rich proteins. *Biotechnology Journal* **6**, 686–699 (2011).
92. Fló, M. EgKU-8, una proteína tipo Kunitz de *Echinococcus granulosus*, como inhibidor de proteasas de serina caninas. (Udelar, 2006).
93. Morrison, J. F. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **185**, 269–286 (1969).

94. Greco, W. R. & Hakala, M. T. Evaluation of methods for estimating the dissociation constant of tight binding enzyme inhibitors. *J. Biol. Chem.* **254**, 12104–12109 (1979).
95. Kuzmic, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**, 260–273 (1996).
96. Williams, J. W. & Morrison, J. F. The kinetics of reversible tight-binding inhibition. *Methods Enzym.* **63**, 437–67 (1979).
97. Morrison, J. F. & Walsh, C. T. The behavior and significance of slow-binding enzyme inhibitors. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **61**, 201–301 (1988).
98. Morrison, J. F. The slow-binding and slow, tight-binding inhibition of enzyme-catalysed reactions. *Trends in Biochemical Sciences* **7**, 102–105 (1982).
99. Salceda, E., Garateix, A. & Soto, E. The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **303**, 1067–74 (2002).
100. Vincent, J. P. & Lazdunski, M. Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry* **11(16)**, 2967–77. (1972).
101. Estell, D., Wilson, K. & Laskowski, M. jr. Thermodynamics and kinetics of the hydrolysis of the reactive-site peptide bond in pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) by *Dermasterias imbricata* trypsin 1. *Biochemistry* **19**, 131–7 (1980).
102. Perona, J. J. & Craik, C. S. Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. *J. Biol. Chem.* **272**, 29987–29990 (1997).
103. Helland, R., Leiros, I., Berglund, G. I., Willassen, N. P. & Smalås, a O. The crystal structure of anionic salmon trypsin in complex with bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Eur. J. Biochem.* **256**, 317–324 (1998).
104. Huber, R. *et al.* Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **89**, 73–101 (1974).
105. Lima, C. a., Torquato, R. J. S., Sasaki, S. D., Justo, G. Z. & Tanaka, A. S. Biochemical characterization of a Kunitz type inhibitor similar to dendrotoxins produced by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) hemocytes. *Vet. Parasitol.* **167**, 279–287 (2010).
106. Bhattacharyya, A., Mazumdar, S., Leighton, S. M. & Babu, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* **67**, 232–241 (2006).
107. Chand, H. S., Schmidt, A. E., Bajaj, S. P. & Kisiel, W. Structure-Function Analysis of the Reactive Site in the First Kunitz-type Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor-2. *J. Biol. Chem.* **279**, 17500–17507 (2004).

108. Gráf, L., Szilágyi, L. & Venekei, I. Chymotrypsin. *Handb. Proteolytic Enzym.* 2626–2633 (2013). doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00582-2
109. Hudáky, P., Kaslik, G., Venekei, I. & Gráf, L. The differential specificity of chymotrypsin A and B is determined by amino acid 226. *Eur. J. Biochem.* **259**, 528–533 (1999).
110. Finkenstadt, W. R. & Laskowski, M. Resynthesis by trypsin of the cleaved peptide bond in modified soybean trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* **242**, 771–773 (1967).
111. Figueiredo, A. C. *et al.* Unique thrombin inhibition mechanism by anophelin, an anticoagulant from the malaria vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E3649–58 (2012).
112. Hall, a, Stow, J., Sorensen, R., Dolly, J. O. & Owen, D. Blockade by dendrotoxin homologues of voltage-dependent K⁺ currents in cultured sensory neurones from neonatal rats. *Br. J. Pharmacol.* **113**, 959–967 (1994).
113. Kaczmarek, L. K. Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN Neurosci.* **2013**, (2013).
114. Kim, G. E. & Kaczmarek, L. K. Emerging role of the KCNT1 Slack channel in intellectual disability. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 1–12 (2014).
115. Báez, A. *et al.* α -Dendrotoxin inhibits the ASIC current in dorsal root ganglion neurons from rat. *Neurosci. Lett.* **606**, 42–47 (2015).
116. Diochot, S. *et al.* A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons. *EMBO J.* **23**, 1516–1525 (2004).
117. Chen, X., Kalbacher, H. & Gründer, S. The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H⁺ affinity. *J. Gen. Physiol.* **126**, 71–79 (2005).
118. Escoubas, P. *et al.* Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J. Biol. Chem.* **275**, 25116–25121 (2000).
119. Chagot, B. *et al.* Solution structure of APETx2, a specific peptide inhibitor of ASIC3 proton-gated channels. *Protein Sci.* **14**, 2003–2010 (2005).
120. Bacongus, I. & Gouaux, E. Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel–spider toxin complexes. *Nature* **489**, 400–405 (2012).
121. Imredy, J. P., Chen, C. & MacKinnon, R. A snake toxin inhibitor of inward rectifier potassium channel ROMK1. *Biochemistry* **37**, 14867–14874 (1998).
122. Katoh, E. *et al.* Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker. *Biopolymers* **54**, 44–57 (2000).
123. Zang, X. & Maizels, R. M. Serine proteinase inhibitors from nematodes and the arms race between host and pathogen. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 191–197 (2001).

124. Aziz, A. *et al.* Proteomic characterisation of Echinococcus granulosus hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *J. Proteomics* **74**, 1560–1572 (2011).
125. Verjovski-Almeida, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite Schistosoma mansoni. *Nat. Genet.* **35**, 148–157 (2003).
126. Hu, W. *et al.* Evolutionary and biomedical implications of a Schistosoma japonicum complementary DNA resource. *Nat. Genet.* **35**, 139–147 (2003).
127. Robb, S. M. C., Ross, E. & Alvarado, A. S. SmedGD: The Schmidtea mediterranea genome database. *Nucleic Acids Res.* **36**, (2008).
128. Parkinson, J., Whitton, C., Schmid, R., Thomson, M. & Blaxter, M. NEMBASE: a resource for parasitic nematode ESTs. *Nucleic Acids Res.* **32**, D427–D430 (2004).
129. Cappello, M., Vlasuk, G. P., Bergum, P. W., Huang, S. & Hotez, P. J. Ancylostoma caninum anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 6152–6156 (1995).
130. Olivera, B. M. Conus peptides: Biodiversity-based discovery and exogenomics. *J. Biol. Chem.* **281**, 31173–31177 (2006).
131. Zhao, P., Metcalf, M. & Bunnett, N. W. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* **5**, 1–16 (2014).
132. Buzza, M. S. *et al.* Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4200–4205 (2010).
133. Antalis, T. M., Buzza, M. S., Hodge, K. M., Hooper, J. D. & Netzel-Arnett, S. The cutting edge: membrane-anchored serine protease activities in the pericellular microenvironment. *Biochem. J.* **428**, 325–346 (2010).
134. Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D. & Kaufmann, R. Proteinase-activated receptors (PARs) - focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun. Signal.* **11**, 86 (2013).
135. Heitzmann, D. & Warth, R. Physiology and pathophysiology of potassium channels in gastrointestinal epithelia. *Physiol. Rev.* **88**, 1119–1182 (2008).
136. Warth, R. & Barhanin, J. Function of K⁺ channels in the intestinal epithelium. *Journal of Membrane Biology* **193**, 67–78 (2003).
137. Holzer, P. Acid-sensitive ion channels in gastrointestinal function. *Neurpharmacology* 72–79 (2015). doi:doi: 10.1016/j.neuropharm.2014.12.009
138. McDermott, J. R. *et al.* Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7761–7766 (2003).

139. Maeda, S. *et al.* Intestinal protease-activated receptor-2 and fecal serine protease activity are increased in canine inflammatory bowel disease and may contribute to intestinal cytokine expression. *J. Vet. Med. Sci.* **76**, 1119–1127 (2014).
140. Matzner, N. *et al.* Ion channels modulating mouse dendritic cell functions. *J. Immunol.* **181**, 6803–6809 (2008).
141. Chen, Z. *et al.* Genomic and Structural Characterization of Kunitz-Type Peptide LmKTT-1a Highlights Diversity and Evolution of Scorpion Potassium Channel Toxins. *PLoS One* **8**, 1–10 (2013).
142. Everts, B. *et al.* TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKKe supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nat. Immunol.* **15**, 323–32 (2014).
143. Kong, X. *et al.* Extracellular acidosis modulates the endocytosis and maturation of macrophages. *Cell. Immunol.* **281**, 44–50 (2013).
144. Falcón, C. R. *et al.* Fasciola hepatica Kunitz Type Molecule Decreases Dendritic Cell Activation and Their Ability to Induce Inflammatory Responses. *PLoS One* **9**, e114505 (2014).
145. Tamura, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**: 1596–1599 (2007).

Agradecimientos

En primer lugar agradecer a mi tutora la Dra. Cecilia Fernandez que fue esencial en mi formación tanto académica como personal desde antes que se iniciara ésta tesis (más de 10 años tolerándome). También a mi Co-tutora Dra. Beatriz Alvarez que fue clave en el trabajo relacionado con enzimas e inhibidores. Silvia Gonzales (la teniente o loba, como prefieran llamarla) fue muy importantes en los inicios de mi trabajo en el laboratorio, la teniente inicio en el laboratorio el trabajo con los inhibidores Kunitz. Y a todos los compañeros del laboratorio (los que fueron, los que vinieron y los que se quedaron) no nombro a ninguno para evitar el olvido y también por pereza.

Por otra parte, quiero agradecer a los otros estudiantes del grupo que me ayudaron mucho durante mi trabajo de mesada, en particular Mag. Mariana Margenat, Lic. Leonardo Pellizza y Mag. Fernanda Alonso.

Finalmente le doy las gracias a los colaboradores, a la Dra Rosario Duran y al Dr Carlos Serbeñanski por ayudar con los servicios de proteómica que disponen en su Unidad del Instituto Pasteur. También a Dr. Angel Caputi, Dr Javier Nogueia, Dr Felipe Sierra, Dr Aldo Cagliari y al Dr. Jose Sotelo del Instituto Clemente Estable que me enseñaron a prepara cultivos de neuronas y a realizar los estudios de *whole cell patch clamp*. Y ahora si, finalmente agradezco al Dr Omar López, Dr Emilio Salceda y al Dr Enrique Soto de la universidad

Autónoma de Puebla Mexico, por dar un esencial aporte técnico e intelectual para todos los experimentos de electrofisiología que se muestran en esta tesis.