



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Tesina de Grado

Estudio de la proteasa del virus de la leucemia bovina y búsqueda de inhibidores

Mariana Salinas

Tutores: Martín Fló Díaz y Natalia Olivero Deibe

Laboratorio de Inmunovirología/Unidad de Biofísica de Proteínas. "Prof. Dr. Otto Pritsch" Institut Pasteur de Montevideo

Resumen

La infección por el virus de la leucemia bovina (VLB) afecta significativamente al ganado bovino lechero siendo el agente causal de la leucosis bovina enzoótica. Perteneció al género *Deltaretrovirus*, de la familia *Retroviridae*, e infecta células B bovinas integrando su material genético en el genoma en forma de provirus, dando lugar a una infección persistente. Esta infección tiene un importante impacto económico en la industria láctea y se encuentra diseminada globalmente, con alta prevalencia en diferentes regiones, incluyendo Uruguay. Hasta el momento no se dispone de vacunas ni de tratamientos con antivirales contra el VLB. Por lo tanto, es esencial encontrar estrategias efectivas para controlar la enfermedad y disminuir su transmisión.

En este sentido, el uso de antivirales puede ser un insumo importante en el control de la transmisión del VLB. En el ciclo replicativo del VLB, las proteínas retrovirales esenciales podrían ser blancos para el desarrollo de fármacos anti VLB. Una de las proteínas clave para la replicación viral es la proteasa del VLB. Cuando la partícula viral brota de la célula infectada contiene la poliproteína Gag ensamblada en su forma inmadura, que resulta en partículas virales no infecciosas. Algunas versiones más largas de Gag incluyen a las enzimas replicativas, entre ellas a la proteasa. Para que el virus adquiriera la capacidad infectiva, se requiere que la proteasa se libere de la poliproteína mediante auto-proteólisis (dimerizando y activándose) y escinda a Gag. Este proceso provoca un reordenamiento estructural que determina la forma infectiva del virus.

Esta tesis tuvo como objetivo el estudio de PR-VLB y la búsqueda de inhibidores pertenecientes a la quimioteca de la familia de paullonas. Para ello se realizó la producción de una variante de la proteasa (PRL41I-VLB) diseñada para reducir su auto-proteólisis. A través de diferentes estrategias de purificación, se logró obtener una proteína activa. Caracterizamos a PR-VLBL41I combinando técnicas biofísicas y de cinética enzimática, mediante un ensayo de actividad en formato de placas de 96 pocillos, utilizando un sustrato fluorogénico. En cuanto a la cinética enzimática, la mutación L41I disminuyó la afinidad por el sustrato sin afectar notablemente la capacidad catalítica.

Además, se identificaron 25 nuevos inhibidores de PRL41I-VLB pertenecientes a la familia de las paullonas. Los compuestos identificados, podrían ser el punto de partida de nuevos proyectos biotecnológicos enfocados en generar antivirales que permitan desarrollar estrategias de control de la enfermedad.

Palabras clave

- Virus de la leucemia bovina
- Proteasa del virus de la leucemia bovina
- Antivirales
- Inhibidores de la proteasa
- Paullonas

Abreviaturas

2YT: Medio 2× Yeast Extract Tryptone (por sus siglas en inglés)	mg: Miligramos
°C: Grados Celsius	MPM: Marcador de peso molecular
ADN: Ácido desoxirribonucleico	mL: Mililitros
ARN: Ácido ribonucleico	mM: Milimolar
CA: Cápside	NC: Nucleocápside
CAT1: Transportador catiónico de aminoácidos	ng: Nanogramos
cm: Centímetro	Ni-NTA: Nitrilotriacético de níquel
DABCYL: 4-(Dimetilamino)cinnamylidene)-amino)fenil)-metil	nm: Nanómetro
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	ns: No significativo
DMSO: Dimetilsulfóxido	NRTIs: Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa
DNAsa: Desoxirribonucleasa	ON: <i>Over Night</i> (por sus siglas en inglés)
DTT: Ditiotreititol	pH: Potencial de hidrógeno
EDANS: Ácido 5-[(2-aminoetil)tiol]-1-naftalenosulfónico	pI: Punto isoeléctrico
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	PIs: Inhibidores de la proteasa
<i>E. coli</i> : <i>Escherichia coli</i>	PR: Proteasa
g: Gramos	RT: Transcriptasa reversa
GFP: Green Fluorescent Protein	SDS: Lauril sulfato de sodio
H6: Etiqueta de 6 histidinas	SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
VLH: Virus linfotrópico de células T humano	SFB: Suero fetal bovino
IMAC: Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados	STLV: Virus de la leucemia de células T de simio
IN: Integrasa	TB: Terrific Broth
IPTG: Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido	TEV: Proteasa del virus del mosaico del tabaco
Ile: Isoleucina	Temed: N'-Tetrametiletildiamina
kb: Kilobase	Tm: Temperatura de fusión
k _{cat} : Constante catalítica (Turnover number)	Ton: Temperatura de inicio
kDa: Kilo Dalton	Trp: Triptófano
K _M : Constante de Michaelis-Menten	µg: Microgramo
LB: Luria Bertani	µL: Microlitro
LBE: Leucosis Bovina Enzoótica	µm: Micrómetro
Leu: Leucina	UV: Radiación ultravioleta
LTR: Long Terminal Repeat	VIH: Virus de inmunodeficiencia humana
MA: Matriz	VLB: Virus de la leucosis bovina
mA: Miliampere	g: Aceleración gravitatoria
MBP: Proteína de Unión a Maltosa	

Tabla de contenido

1	Introducción	7
1.1	Virus de la leucemia bovina	7
1.1.1	Generalidades	7
1.1.2	Estructura viral y organización del genoma	9
1.1.3	Ciclo replicativo	12
1.2	Proteínas retrovirales como potenciales blancos farmacológicos	14
1.2.1	Moléculas con actividad antiviral para el VLB	15
1.2.2	PR de VLB como blanco farmacológico.....	16
1.2.3	Búsqueda de inhibidores de la PR de VLB	17
1.3	Proteasas retrovirales	19
1.3.1	Generalidades	19
1.3.2	Clasificación de las proteasas retrovirales	20
1.3.3	Retro-pepsina del VLB (PR-VLB).....	20
1.4	Antecedentes del laboratorio en la búsqueda de inhibidores para PR-VLB	22
1.4.1	Expresión de la proteasa recombinante de VLB.....	22
1.4.2	Ensayo de actividad y mecanismo catalítico de la PR-VLB	22
1.4.3	Ensayo de actividad en la búsqueda de inhibidores para la PR-VLB	24
1.5	Familia de paullonas	24
2	Hipótesis	25
3	Objetivo General	26
3.1	Objetivos específicos	26
4	Materiales y Métodos	26
4.1	Producción de la PRL41I-VLB recombinante en <i>E. coli</i>	26
4.1.1	Construcción del plásmido pQE80L modificado para la expresión de PRL41I-VLB recombinante	26
4.1.2	Transformación química de bacterias quimio-competentes	27
4.1.1	Expresión de la H6-MBP-tev-VLB-PR recombinante	28
4.1.2	Lisis celular mediante sonicación.....	29
4.1.3	Purificación H6-MBP-tev-PRL41I-VLB por IMAC.....	29
4.1.4	Activación de PRL41I-VLB mediante TEV y posterior purificación	30
4.1.5	Purificación de PRL41I-VLB mediante cromatografía de intercambio iónico.....	30
4.2	Cuantificación de PRL41I-VLB.....	31
4.3	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %	31
4.4	Evaluación de auto-proteólisis de PRL41I-VLB	31
4.5	Evaluación de estabilidad termodinámica de PRL41I-VLB.....	32

4.6	Determinación de parámetros cinéticos de la enzima PRL41I-VLB	32
4.6.1	Condiciones de los ensayos de actividad enzimática	32
4.6.2	Determinación de la constante catalítica de PRL41I-VLB a partir de la velocidad en función de la concentración de enzima.	34
4.6.1	Determinación de la constante de Michaelis-Menten de PRL41I-VLB.....	34
4.7	Cribado de PRL41I-VLB con compuestos de la familia de paullonas.....	35
4.8	Determinación del IC ₅₀ de los inhibidores encontrados.	36
5	Resultados	37
5.1	Expresión y purificación de PRL41I-VLB en <i>Escherichia coli</i>	37
5.2	Caracterización de PRL41I-VLB	41
5.2.1	Caracterización cinética de PRL41I-VLB	41
5.2.2	Estudio de la actividad de auto-proteólisis de PRL41I-VLB	44
5.2.3	Estudio de la estabilidad termodinámica de PRL41I-VLB.....	45
5.3	Cribado de las paullonas.....	46
5.4	Determinación del valor de IC ₅₀ de compuestos seleccionados	53
6	Discusión	54
6.1	Expresión, purificación y caracterización de la PRL41I-VLB	54
6.2	Cribado enzimático de PRL41I-VLB de una biblioteca de paullonas.....	57
7	Conclusiones	59
8	Perspectivas	60
9	Agradecimientos	61
10	Referencias bibliográficas	62
11	Anexo	67
11.1	Introducción.....	67
11.2	Resultados	68
11.2.1	Expresión de PRL41I-VLB recombinante en <i>E.coli</i>	68
11.2.2	Cribado.....	¡Error! Marcador no definido.

1 Introducción

1.1 Virus de la leucemia bovina

1.1.1 Generalidades

El virus de la leucemia bovina (VLB) es un retrovirus linfocitotrópico B oncogénico, agente causal de la enfermedad linfoproliferativa llamada leucosis bovina enzoótica (LBE) ¹. La infección con el VLB afecta de manera significativa al ganado bovino lechero, siendo la enfermedad neoplásica más importante para este grupo de distribución cosmopolita ²⁻⁴. De acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía Viral (ICTV) el VLB forma parte de la familia *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae* y del género *Deltaretrovirus* (Figura 1) ^{5,6}. Comparte este género con el Virus linfotrópico de células T humanas (VTLH-I, VTLH-II y VTLH-III) y el virus de la leucemia de células T de simio (STLV-I, STLV-II y STLV-III) ^{6,7}.

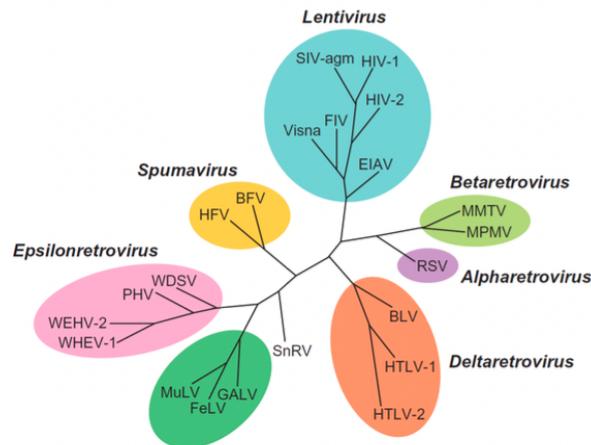


Figura 1. Análisis filogenético de retrovirus, utilizando la secuencia del gen *pol* de los retrovirus. Figura extraída de International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012 ⁸.

El VLB tiene tropismo por las células del sistema inmunitario de los bovinos, especialmente por las células B, pero también puede infectar células T, monocitos y granulocitos. Cuando infecta a las células bovinas se integra su material genético al genoma celular, generando una infección persistente durante toda la vida del animal con distintas manifestaciones clínicas ^{3,4,9}. Aproximadamente el 65% de los bovinos infectados son asintomáticos o aleucémicos, ^{4,10-12} y el 30% desarrolla linfocitosis persistente (proliferación policlonal benigna de células B CD5⁺ o IgM⁺) ^{3,13}. Por último, aproximadamente el 5% desarrollan neoplasias o linfosarcomas, que pueden generarse en diferentes tejidos y órganos del animal, y fallecen a los pocos meses ^{1-3,9}.

El VLB se transmite a través del intercambio de fluidos, como sangre y leche, conteniendo células infectadas, mediante el contacto entre animales infectados y sanos. Esta transmisión

ocurre principalmente durante la manipulación a granel de los animales, en el parto y la lactancia ^{1,3,4}. En menor medida, también se transmite a través de insectos o artrópodos hematófagos ^{3,4}.

La infección natural no está limitada únicamente a los bovinos, se ha observado también en otras especies como, por ejemplo; carpinchos (capybaras - *Hydrochoerus hydrochaeris*) y búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) ^{4,13}. La infección en humanos por VLB se encuentra en discusión y se ha hipotetizado sobre su asociación al cáncer de mama ¹⁴.

Respecto a la prevalencia y distribución, la infección por VLB está diseminada globalmente, excepto en aquellos países y/o regiones que han logrado erradicar al virus mediante costosas campañas de control, por ejemplo, en Europa occidental (Figura 2) ^{1,3,7,15}. En Uruguay, Macchi y colaboradores ¹⁶ reportaron en el año 2020 una prevalencia de la LBE del 80,1% en 102 predios lecheros seleccionados aleatoriamente, no obstante, los datos empleados corresponden al año 2015.

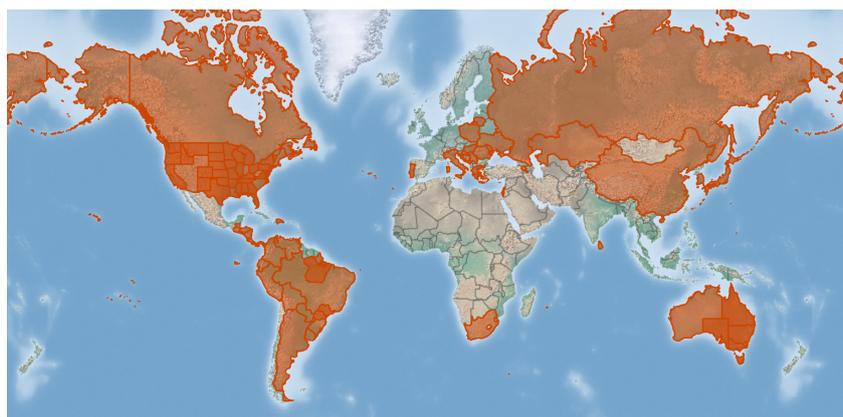


Figura 2. Distribución mundial de LBE basada en la información provista en la libería digital de CABI última vez actualizada el 19 de julio 2023 (<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompndium.91714#REF-DDB-206699>). En naranja, se indican los países con rebaños bovinos afectados por LBE. En América Latina la prevalencia oscila desde 17% hasta 90% ^{4,8}.

El impacto de la infección por VLB en la salud del ganado bovino genera importantes pérdidas económicas en la industria ganadera ^{3,6}. Se ha reportado que rebaños VLB positivos tienen una menor eficiencia productiva de leche ^{2,9,17}. Asimismo, reduce la longevidad de las vacas al desregular su sistema inmune, que predispone a los animales a infecciones oportunistas ^{1,4,9,12}. En países como Estados Unidos, se estima que las pérdidas globales anuales en la producción de leche causadas por la infección por VLB representan del 2,5-3,5% ^{17,18}. Por otro lado, de manera indirecta resulta una pérdida económica en la industria ganadera, debido a que algunos países implementaron regulaciones estrictas sobre la importación y exportación de ganado en pie, prohibiendo la entrada o salida de estos mismos si están infectados ^{2,9}. Al

mismo tiempo, de confirmarse que el VLB infecta humanos, las restricciones actuales podrían volverse aún más estrictas. En suma, todas las consecuencias que tiene la infección por VLB han despertado el interés por parte del sector agropecuario de encontrar una forma de controlar y disminuir la transmisión de dicho virus ¹⁹.

1.1.2 Estructura viral y organización del genoma

Las partículas de VLB tienen un diámetro aproximado de 80-100 nm, y se caracterizan por ser virus esféricos con una envoltura lipídica derivada de la membrana plasmática de la célula hospedera. La superficie de la partícula viral contiene ancladas las glicoproteínas virales (Env), por debajo de esta envoltura, se encuentra la proteína de matriz (MA) rodeando la cápside (CA) (Figura 3 A) ^{6,20}. La cápside contiene el genoma de ARN viral recubierto con la proteína nucleocápside (NC), y las enzimas transcriptasa inversa (RT), integrasa (IN) y proteasa retroviral (PR), formando el núcleo retroviral ²¹.

El genoma de VLB consta de dos copias idénticas de 8714 nucleótidos de ARN, unidas por regiones complementarias de pares de base, siendo pseudo-diploides. Una vez integrado en el genoma de la célula hospedera en forma de provirus, presenta dos secuencias de repetición terminal larga (LTRs) en ambos extremos, que son esenciales para su regulación y transcripción ^{7,22}. Dentro del genoma viral, se encuentran las secuencias que codifican para proteínas estructurales (Gag y Env), enzimas (Pro o PR, Pol o RT, IN), y una región pX que da lugar a las proteínas reguladoras Tax y Rex, y dos proteínas accesorias R3 y G4 (Figura 3 B) ^{7,8,13}. Además de codificar para las proteínas retrovirales, VLB posee secuencias para microARNs (miARN) ubicados entre las regiones *env* y pX del genoma viral. Las funciones de estas proteínas virales y el miARN se resumen en la Tabla 1.

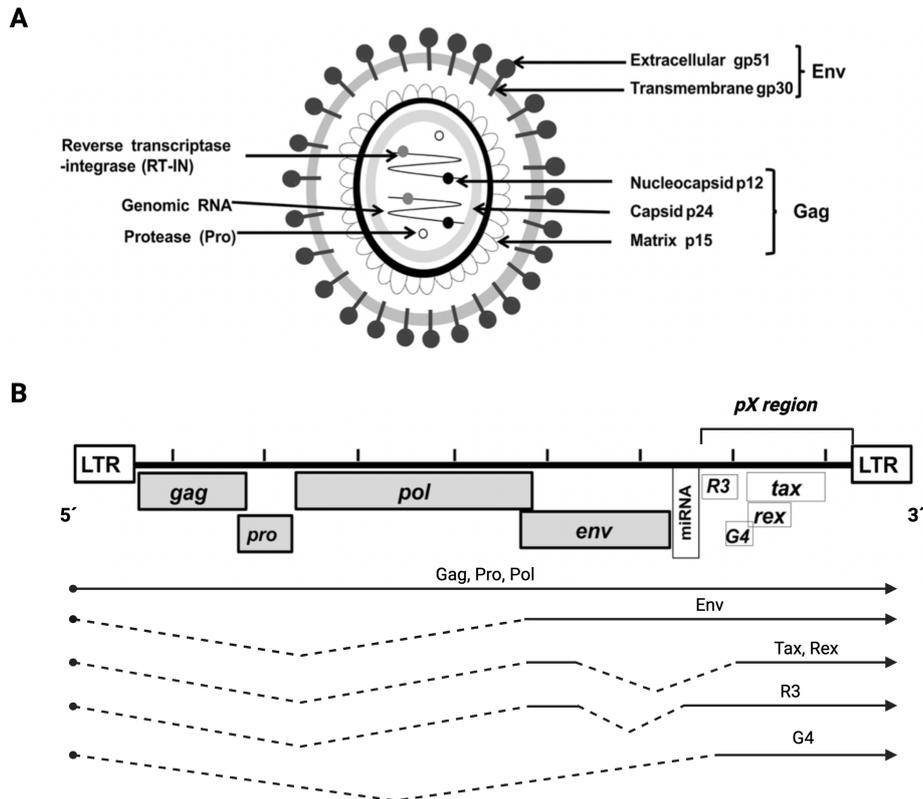


Figura 3. Representación esquemática de la estructura del VLB. A) Partícula viral de VLB madura. Incluye a la glicoproteína de Env (gp51 y gp30), codificadas por el gen *env*, las proteínas Gag (matriz p15, cápside p24, y nucleocápside p12), codificadas por el gen *gag*, transcriptasa inversa (RT) - integrasa (IN) codificadas por los genes *pol* y la proteasa (PR) codificada por el gen *pro*. **B) Estructura del genoma pro-viral de VLB.** Se indica entre los LTRs la secuencia y organización de los genes que codifican para las poliproteínas estructurales (*gag* y *env*), las enzimas codificadas en versiones más largas de *gag* conteniendo a *pro* y *pol*, regulatorias (*tax* y *rex*); accesorias como *R3* y *G4*; y miRNA. Se muestran los ARNs transcritos más comunes del provirus (flechas negras) con los nombres de las proteínas codificadas. Figura adaptada de Polat y colaboradores (2017)⁷ y Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Family RetRoviRidae (2012)⁸.

Una característica importante, es que varios genes se expresan como una poliproteína Gag (que contiene a la MA, CA y NC). Además, como consecuencia de dos posibles cambios estocásticos en el marco ribosómico de Gag (mecanismo ribosomal *frameshifting* -1) se expresan versiones más largas de Gag, por un lado como Gag-Pro, que incluye a la PR^{12,15,23}, y por otro Gag-Pro-Pol que contiene, además de la PR, a la RT, e IN, (Figura 4)⁶. En este contexto, la traducción del gen de PR depende de estos eventos de frameshifting, por lo que su expresión es menos frecuente que la de Gag^{12,15,23}.

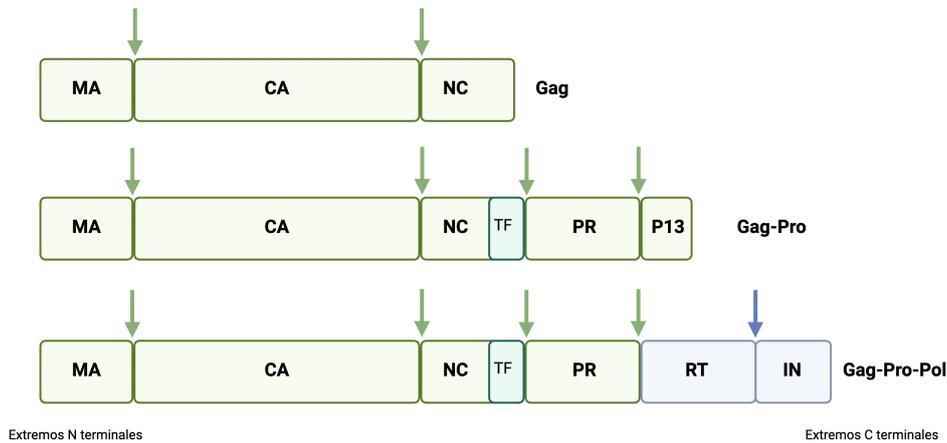


Figura 4. Representación esquemática de las poliproteínas precursoras de VLB: Gag, Gag-Pro y Gag-Pro-Pol. Las poliproteínas son procesadas por PR liberando las proteínas MA, CA, NC, PR, RT e IN. En la poliproteína inmadura, PR se encuentra fusionada al extremo C-terminal de Gag, separada por una región transframe (TF) y unida a un péptido P13 en su extremo C-terminal. Las flechas indican los sitios de hidrólisis. Figura adaptada de Fló y colaboradores (2022)¹² y Centazzo y colaboradores (2023)^{12,24}.

Tabla 1. Moléculas virales del VLB y sus funciones.

Molécula viral	Función reportada
Proteasa (PR)	Participa en la maduración de la partícula viral. Cliva de manera ordenada varios sitios específicos de poliproteínas virales (Gag, Gag-Pro o Gag-Pro-Pol), induciendo un reordenamiento estructural que le brinda capacidad infectiva al virus ^{15,25} .
Retrotranscriptasa (RT)	Utiliza al genoma viral como molde para la síntesis de ADN bicatenario, con la concomitante digestión del ARN viral, mediante la actividad RNasa H de la RT ^{20,26} .
Integrasa (IN)	Reconoce a los extremos del ADN del genoma del virus y lo integra en el genoma de la célula hospedera ^{20,26,27} .
Matriz (MA)	Interacciona con la bicapa lipídica celular facilitando la asociación del complejo ribonucleoprotéico durante la formación de la partícula viral ^{6,7,28} .
Cápside (CA)	Forma una estructura protectora que encierra el genoma ARN viral, participando en la estabilización del núcleo del virión y en la liberación del genoma viral al núcleo de la célula hospedera ^{12,29} .
Núcleocapside (NC)	Se une al ARN genómico y actúa como chaperona, dirigiendo el rearreglo de los ácidos nucleicos a la estructura termodinámicamente más estable ³⁰ .
Env	Compuesta por un dominio extracelular gp51 y uno transmembrana gp30. Tiene un rol importante en la infectividad del virus y en la formación de sincicios. La región N-terminal de gp51 contiene el sitio de unión al receptor mediando la entrada a la célula hospedera ²⁸ .
Tax	Activa transcripcionalmente la expresión viral y tiene rol oncogénico, participando de la inducción de leucemia por VLB ^{7,8,13} .
Rex	Responsable de la exportación nuclear del ARN viral al citoplasma y de la traducción del ARNm viral en células infectadas por VLB ^{7,8,13} .
G4	Se encarga de mantener la carga proviral alta. También se ha descrito su participación en la leucemogénesis ^{7,8,13} .
R3	Se encarga de mantener la carga proviral alta ^{7,8,13} .
miARN	Su acción puede alterar la carga proviral y, por ende, la replicación viral en el huésped, afectando la patogénesis del virus. Estos miRNAs virales están altamente expresados en células preleucémicas y malignas, lo que sugiere que pueden influir en el desarrollo y progresión del cáncer ^{7,13} .

1.1.3 Ciclo replicativo

El ciclo replicativo del VLB (Figura 5) inicia cuando la proteína Env reconoce y se une al receptor de la superficie celular llamado CAT1 (transportador catiónico de aminoácidos: arginina, lisina e histidina), miembro 1 de la familia de transportadores de solutos 7 (SLC7A1). Esta unión desencadena la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática y liberación de la cápside viral al citoplasma de la célula hospedera^{6,20,21,28}. La RT comienza a utilizar al genoma viral como molde para la síntesis de ADN bicatenario, con la concomitante digestión del ARN viral, mediante la actividad RNasa H de la RT^{6,21}.

El complejo pre-integración (ADN viral, IN y otras proteínas) ingresa al núcleo para integrarse en forma de provirus al ADN cromosómico de la célula hospedera²⁷, de forma estable y permanente, dando lugar a una infección persistente^{6,21}. El provirus es transcrito por la ARN polimerasa II celular; parte de los ARN se destinan a la síntesis de proteínas virales como ARNm, y otra parte a formar nuevos genomas virales^{4,12,15,20}. El ADN proviral se replica principalmente mediante la división mitótica de las células B infectadas⁶.

Las diferentes versiones de Gag recién sintetizadas unidas al genoma viral se unen a zonas de la membrana celular conocidos como balsas lipídicas, para ensamblar la partícula viral inmadura y brotar de la célula^{4,8,12,15}. Cuando la partícula viral brota, contiene la poliproteína Gag ensamblada en su forma inmadura resultando en partículas virales no infecciosas^{12,15,31,32}.

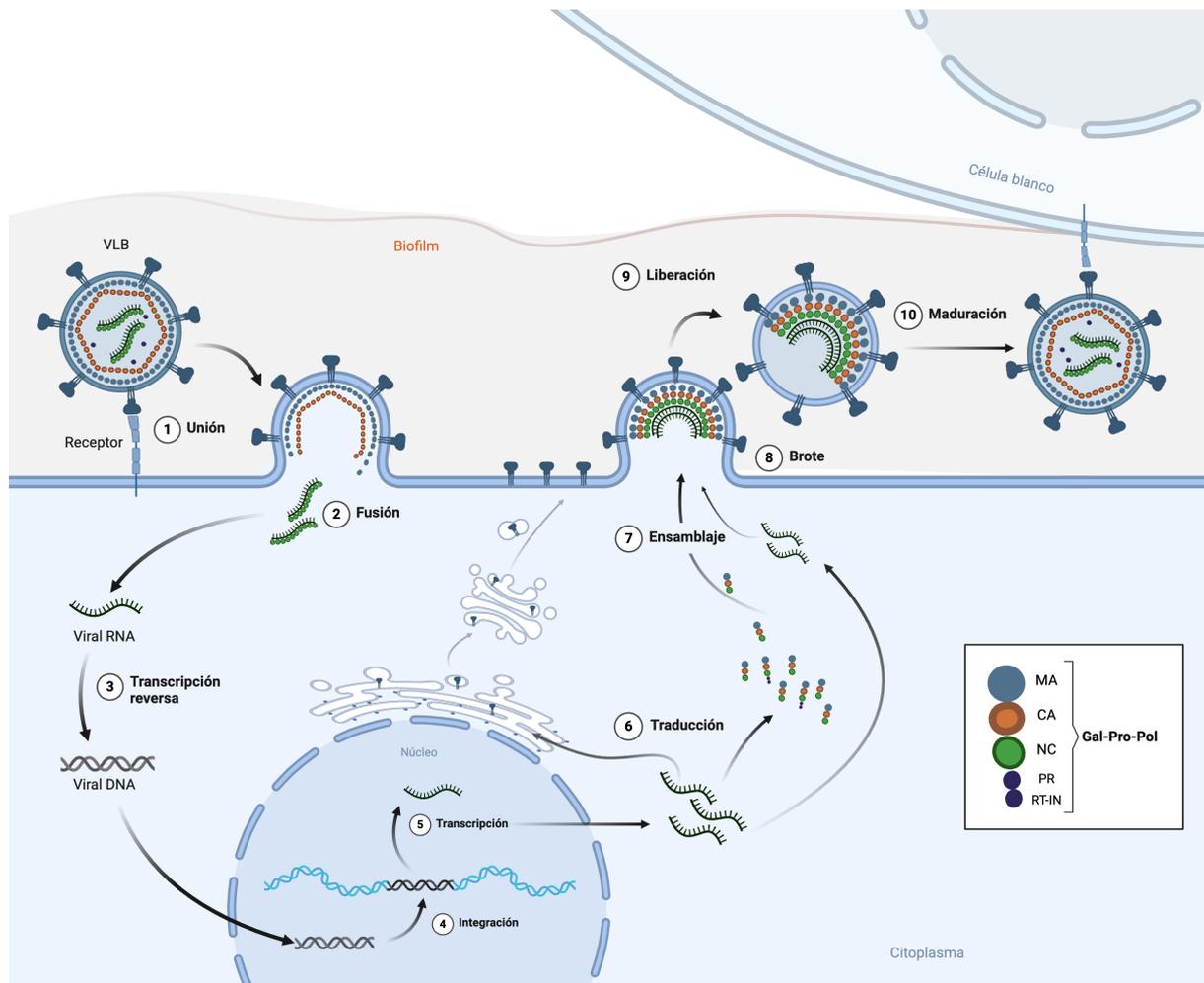


Figura 5. Ciclo viral representativo de VLB. Se esquematiza desde la entrada hasta la producción de viriones, con las etapas enumeradas: (1) Reconocimiento y unión específica del VLB al receptor celular CATL-1, (2) fusión y desnudamiento viral, (3) transcripción reversa, (4) integración al genoma celular hospedero, (5) transcripción del genoma viral, (6) traducción de las proteínas Env (en el retículo endoplasmático y luego transportadas por el aparato de Golgi donde son glicosiladas y clivadas) y las poliproteínas virales en el citoplasma; (7) ensamblaje, (8) brotamiento y (9) liberación de la partícula viral inmadura, (10) maduración de la partícula viral. Adaptado de Kalinichenko y colaboradores (2022)³³. Imagen realizada en Biorender (<https://www.biorender.com/>).

Para que el virus adquiera la capacidad infectiva, se requiere que la PR se libere de la poliproteína mediante auto-proteólisis. Una vez que la enzima es activa escinde a Gag, dando lugar a las proteínas de MA (que continúa siendo procesada por dicha proteasa liberando las proteínas p4 y p10), CA y NC; y, por último, también libera a RT e IN (Figura 4)^{12,23}. Esto provoca un reordenamiento estructural que determina la forma madura del virus, completando así el ciclo replicativo^{4,15}. Por este motivo, la actividad de esta enzima es crucial en el proceso de maduración y adquisición de la capacidad infectiva de la partícula viral. Este proceso de maduración, común en los retrovirus ha sido ampliamente estudiado en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Mediante micrografías electrónicas de partículas inmaduras y maduras de VIH (Figura 6), se han observado los cambios estructurales esenciales para que el virus adquiera su capacidad infectiva¹⁵.

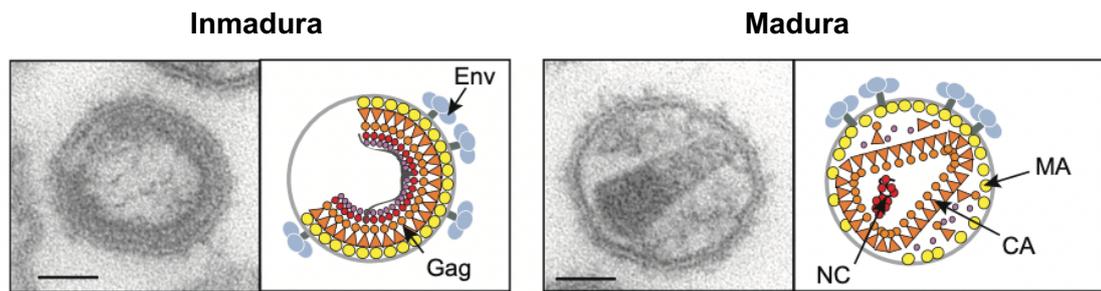


Figura 6. Maduración proteolítica de Gag y reorganización estructural de la partícula de VIH. Se muestran micrografías electrónicas de partículas inmaduras y maduras, junto con esquemas que indican la posición de los dominios de Gag. Barras de escala: 50 nm. Figura tomada de Konvalinka et al. 2015 ¹⁵.

1.2 Proteínas retrovirales como potenciales blancos farmacológicos

El ciclo replicativo de los retrovirus incluye etapas que son clave para el éxito del virus. Si alguna falla, el virus no podrá producir una progenie viral infecciosa. Las más estudiadas son: la entrada del virus a la célula hospedera, la retrotranscripción, la integración en forma de provirus al genoma de celular, y maduración de la partícula viral (Figura 7) ²⁶. Las proteínas virales que desempeñan roles esenciales en estas etapas clave representan potenciales blancos farmacológicos para el desarrollo de antivirales. En el caso de VIH actualmente se dispone de varios antirretrovirales, aprobados por la FDA. Éstos son pequeñas moléculas no tóxicas para el organismo hospedero que presentan una efectiva actividad antiviral, logrando suprimir la carga viral, retrasando el progreso de la enfermedad y reduciendo el riesgo de transmisión. Hasta el año 2023, se aprobaron clínicamente 33 moléculas como drogas antivirales para VIH, entre ellos se encuentran inhibidores de la RT (NRTIs), inhibidores de la proteasa (PIs), integrasa y bloqueantes de la interacción de Env con el receptor de la célula hospedera (Figura 7) ^{32,34}. Lograron disminuir la mortalidad y prolongar la esperanza de vida de los pacientes enfermos, volviendo a la infección por VIH crónica pero controlable ³⁴.

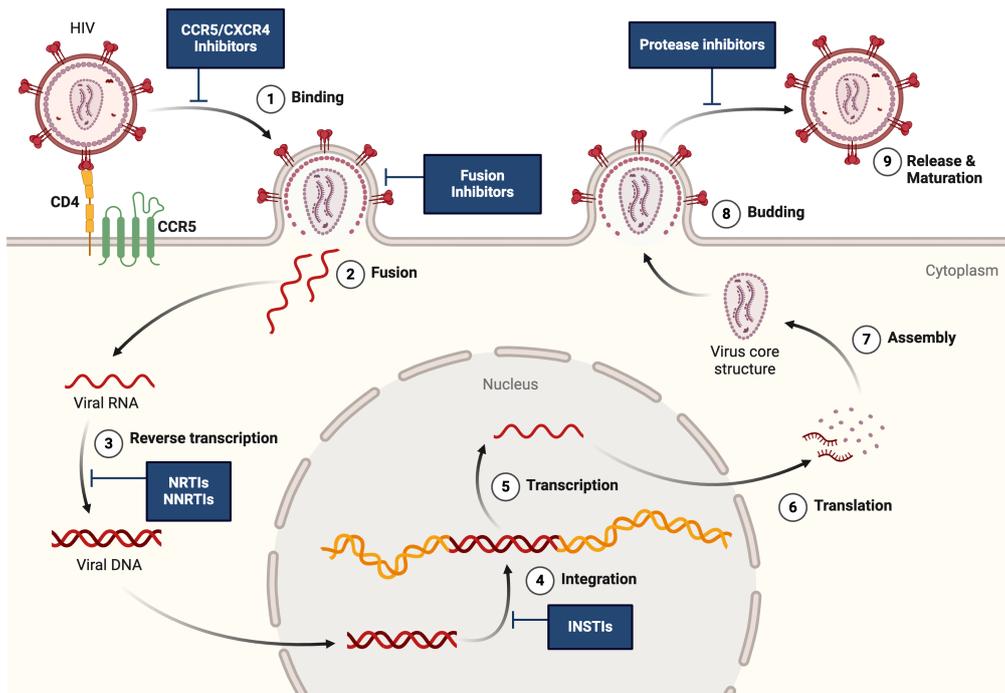


Figura 7. Representación del ciclo replicativo del VIH y sus blancos farmacológicos. Los pasos clave en el ciclo viral se muestran enumerados y los posibles inhibidores en azul.

Las proteínas blanco de los antivirales de VIH están muy conservadas en los retrovirus. De hecho, se ha encontrado antivirales utilizados para el VIH, que también tienen actividad inhibidora de las proteínas de VTLH, se puede observar ejemplos en la Tabla A1 en anexo 19,35.

1.2.1 Moléculas con actividad antiviral para el VLB

Al igual que en el caso del VTLH, para VLB aún no existen antivirales ni vacunas específicas y efectivas comercialmente disponibles, lo que resalta la necesidad de identificar fármacos activos contra estos virus ³⁵. Dado que VTLH y VLB están estrechamente relacionados y comparten blancos terapéuticos similares, un compuesto con actividad antiviral contra uno de ellos podría también ser efectivo contra el otro ¹⁹. Por esta razón, y debido a estas similitudes, la infección por VLB puede utilizarse como modelo experimental para estudiar estrategias terapéuticas contra la infección por VTLH.

Se han descrito pocas moléculas con actividad antiviral inhibidores de las etapas del ciclo replicativo de VLB, en la Tabla 2 se muestran blancos más relevantes reportados que inhiben a proteínas y a la transmisión del VLB.

Tabla 2. Inhibidores de varias etapas del ciclo replicativo del VLB con actividad antiviral más relevantes.

Inhibidor	Blanco en VLB	Etapas que inhibe en el ciclo viral	Estudio	Referencia
BSI-625	No especificado.	Transcripción	In vitro, cultivos celulares.	Sato y colaboradores (2023) ³⁶
BSI-679	No especificado.	Antes de la transcripción reversa	In vitro, cultivos celulares.	Sato y colaboradores (2023) ³⁶
Violaceoid E	Tax	Transcripción	In vitro, cultivos celulares.	Murakami y colaboradores (2021) ³⁷
Plásmido recombinante pAGR con un gen de ARN antisentido dirigido a la región R-U5 (nt 147-342) del genoma viral.	ARN antisentido dirigido a la región R-U5 del genoma viral.	Transcripción y replicación del ADN y síntesis de ARN viral	In vitro, cultivos celulares.	Borisenko y colaboradores (1992) ³⁸
Ácido mitorubrinico	PR	Maduración del virión.	In vitro, ensayos enzimáticos y en cultivos celulares.	Murakami y colaboradores (2023) ³⁹

Los escasos avances muestran la necesidad de continuar en la búsqueda de inhibidores de las proteínas que participan en la replicación viral para ampliar el arsenal farmacológico disponible para VLB, y más en general para otras infecciones por retrovirus.

1.2.2 PR de VLB como blanco farmacológico

Un tercio de los antivirales descritos para el VIH son inhibidores de la PR, ver Tabla 3 ³². En este sentido, la PR de VLB podría ser también un blanco atractivo para el desarrollo de fármacos antivirales, capaces de inhibir la maduración del virión y de este modo reducir transmisión del virus.

Tabla 3. Resumen de PIs clínicamente aprobados para terapia anti-VIH. La mayoría se caracterizan por ser inhibidores competitivos de la enzima ^{15,32}.

Drug Name	Company	Target	Brand name	Approval Year
Saquinavir	F. Hoffmann-La Roche	HIV protease	Invirase	1995
Indinavir Sulfate	Merck Sharp & Dohme	HIV protease	Crixivan	1996
Ritonavir	AbbVie	HIV protease	Norvir	1996
Nelfinavir	Agouron Pharmaceuticals LLC	HIV protease	Viracept	1997
Amprenavir	GSK Plc	HIV-1 protease	Agenerase	1999
Lopinavir	AbbVie	Protease inhibitor	Kaletra	2000
Atazanavir Sulfate	Bristol Myers Squibb	HIV protease	Reyataz	2003
Fosamprenavir Calcium	ViiV Healthcare	HIV protease	Lexiva	2003
Tipranavir	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	HIV protease	Aptivus	2005
Darunavir Ethanolate	Tibotec Virco NV	HIV protease	Prezista	2006

Aunque el VLB y el VIH son retrovirus (y comparten muchas características), se debe tener en cuenta que pertenecen a géneros diferentes: VLB/VTLH son *Deltaretrovirus* y VIH que es un *Lentivirus*. Estas diferencias taxonómicas implican variaciones clave en su ciclo replicativo, lo que podría influir en la eficacia y aplicación de los inhibidores de proteasa diseñados para

cada virus. Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre en VIH, en el caso de los *Deltaretrovirus* como VLB o VTLH la infección de linfocitos B o T, respectivamente, mediante partículas virales libres es muy ineficiente. De hecho, es muy difícil detectar viriones libres en plasma sanguíneo de animales o personas infectadas. Sin embargo, la eficiencia de la transmisión mejora mucho con el establecimiento de contactos célula-célula. En particular para el caso de VTLH, los mecanismos de transmisión célula-célula que han sido descritos son: la formación de conductos intercelulares, mediante biofilms virales o sinapsis viral ^{40,41,44}.

El comportamiento diferente a nivel del tipo de infección que provoca el VIH indica que, aunque el desarrollo de inhibidores de PR ha sido exitoso en el tratamiento del VIH, se debe investigar si esta estrategia farmacológica podría ser aplicable al tratamiento de la infección por VLB.

1.2.3 Búsqueda de inhibidores de la PR de VLB

Las PRs de VLB, VLTH y VIH tienen una similitud en la secuencia aminoacídica aproximada de 25% (Figura 8 A) ^{12,19}. Esta diferencia en secuencia es característica en las PRs de diferentes retrovirus. No obstante, a pesar de estas variaciones, todas las PRs comparten una alta homología estructural, (Figura 8 B) ^{19,42}. Por tanto, estas similitudes estructurales sugieren que los antivirales diseñados para el VIH podrían ser efectivos contra otras PR de VLB o ser una guía para el diseño de nuevos compuestos ¹⁹.

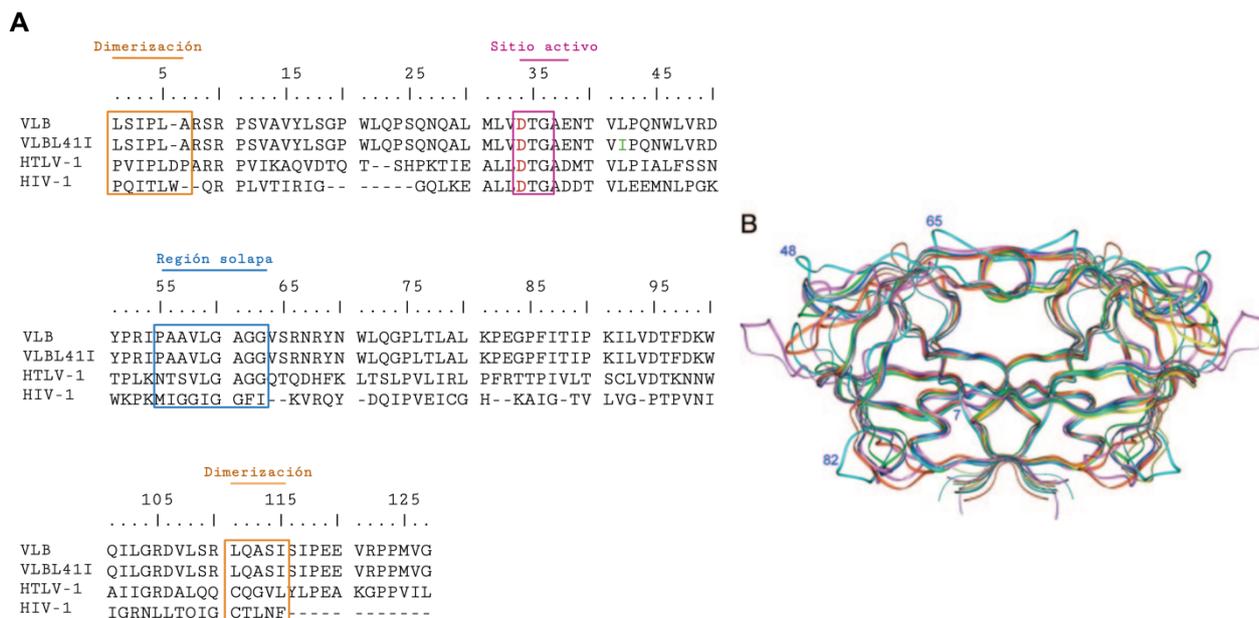


Figura 8. Comparación entre la proteasa de VIH, VTLH y VLB. A) Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de VLB, VLB con una mutación sentido en la posición 41, modificando a la leucina por isoleucina (VLBL41I), del VTLH-1 y VIH-1. Se marcan las regiones de dimerización (naranja), sitio activo (fucsia) y región solapa (azul). B) Superposición de de estructuras cristalográficas de siete PRs retrovirales mostradas en representación de cinta. La PR de VTLH-1 está coloreada en azul; la PR de VIH-1, en verde; la PR de VIH-2, en azul oscuro; la PR del virus de la inmunodeficiencia simia en gris; la PR del virus del sarcoma de Rous en magenta; la PR del virus de la anemia infecciosa equina en amarillo; y la PR del virus de la inmunodeficiencia felina en rojo. Los números indican los residuos dentro de las regiones de la PR de VLTH-1, con las diferencias estructurales más pronunciadas en comparación con otras enzimas retrovirales. Tomado de Li y colaboradores (2005) ⁴².

Sin embargo, a pesar de las similitudes estructurales, existen diferencias entre las PRs de los *Deltaretrovirus* y los *Lentivirus*, que deben tenerse en cuenta al momento de desarrollar inhibidores específicos para el VLB. Por ejemplo, se ha estudiado la actividad cruzada de algunos inhibidores de la PR de VIH (Figura 9) sobre las PRs de VLTH y VLB, observándose diferencias en su eficacia (Tabla A1, anexo). Inhibidores como Saquinavir y Nelfinavir no mostraron actividad contra las PRs de VLTH y VLB, mientras que Indinavir presentó inhibición moderada, y Ritonavir especialmente frente a la PR de VLB ¹⁹. Más aún, dentro de los *Deltaretrovirus* también se observan diferencias, por ejemplo, la especificidad de sustratos (e inhibidores) de la PR-VLTH tampoco es la misma que la de PR-VLB y cuando la tienen la afinidad no es la misma ²⁵.

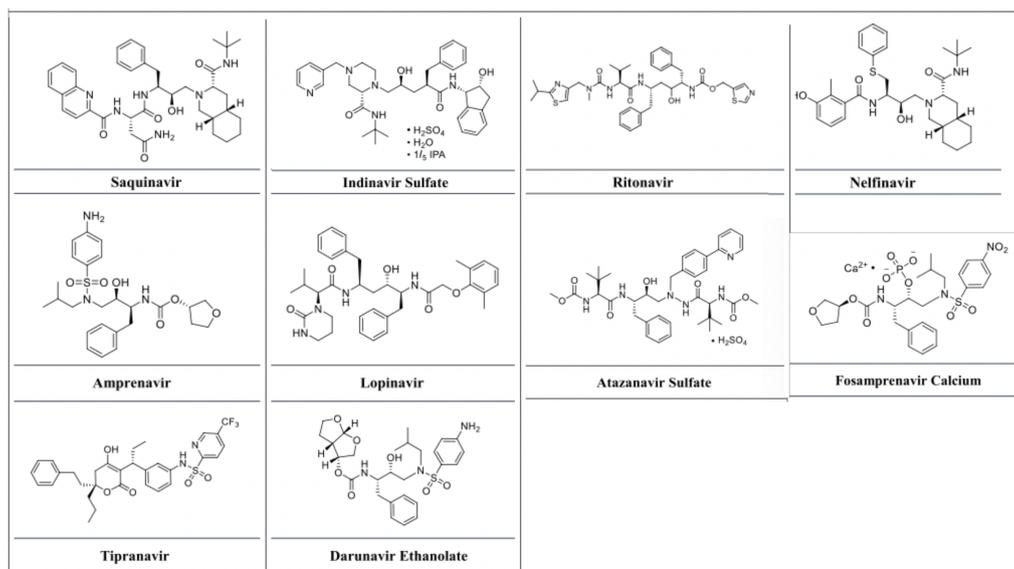


Figura 9. Estructuras de los PIs clínicamente aprobados para su terapia anti-VIH.

1.3 Proteasas retrovirales

1.3.1 Generalidades

Las proteasas (también llamadas peptidasas o proteinasas) retrovirales son las enzimas proteolíticas más estudiadas. Estas enzimas desempeñan un papel clave en la estrategia de ahorro de espacio genético al procesar poliproteínas precursoras en proteínas funcionales esenciales para la maduración viral. Además, esta estrategia permite simplificar y modular los procesos transcripcionales y traduccionales, optimizando la producción de diversas proteínas virales ¹⁵.

En este contexto, además de desempeñar un papel clave en la maduración viral, se ha observado que interactúan con diversas proteínas celulares, lo que amplía su función más allá del ciclo viral. En los últimos años se ha identificado para la PR de VIH, varios sustratos celulares involucrados en varios procesos biológicos de la célula hospedera como síntesis proteica, inmunidad innata, apoptosis y remodelación del citoesqueleto. Interesantemente, en el laboratorio LIV/UBP, mediante experimentos preliminares de 'pool down' en líneas celulares transfectadas con una versión inactiva de PR-VLB, se encontró asociación de PR-VLB con proteínas celulares. Estos en su mayoría están relacionados con el citoesqueleto celular, lo que sugiere, como en HIV, un rol de PR de VLB en el control del transporte viral dentro de la célula. Además, algunos se relacionan con la apoptosis celular, sugiriendo que la PR de VLB también participa en el control de la supervivencia y su transmisión viral a otros linfocitos B ⁴³.

1.3.2 Clasificación de las proteasas retrovirales

Las PRs son del tipo aspartil proteasa (peptidasa aspártica) homodiméricas, que se definen por la naturaleza química del sitio activo, endopeptidasas que requieren de dos residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica ⁴⁴.

Más en detalle, las proteasas aspárticas pertenecen a la clasificación de enzimas EC 3.4, del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB) ⁴⁵. Sin embargo, dentro de esta clasificación las peptidasas varían dependiendo de la afinidad por un sustrato, la composición de los aminoácidos en torno al sitio activo, etc. Cada proteasa específica se nombra según el sistema MEROPS, el cual contiene información sobre más de 4000 peptidasas y casi 700 inhibidores, clasificadas por su estructura molecular, origen en familias y clanes diferentes ^{46,47}.

1.3.3 Retro-pepsina del VLB (PR-VLB)

La PR-VLB se clasifica en MEROPS como parte del clan AA, familia A2, subfamilia A, con el holotipo A02.013 (acceso a UniProt P10270). La mayoría de las peptidasas del clan AA tienen un pH óptimo ácido y prefieren residuos hidrofóbicos cerca del enlace escindible ⁴⁶.

La secuencia aminoacídica del monómero de PR-VLB consiste en 126 aminoácidos, de los cuales ninguno es cisteína o histidina, y presenta un punto isoeléctrico aproximado de 10 ²³. Esta enzima es una proteasa dimérica, que posee un único sitio activo, el cual se forma únicamente al ensamblarse el dímero. El sitio activo está compuesto de 3 aminoácidos por monómero: un residuo de ácido aspártico junto con una treonina y una glicina. Ambos aspartatos del sitio activo participan en el mecanismo catalítico mediante ataque nucleofílico formando una diada catalítica ^{12,15}.

Hasta la fecha, no hay reportes de la estructura de esta proteína; sin embargo, recientemente en nuestro laboratorio se logró resolver la estructura cristalográfica de la proteasa en complejo con un inhibidor peptídico (Figura 10 A, resultados no publicados). Este péptido corresponde al sitio de corte con MA-CA con el aminoácido no ribosómico, estatina, en lugar de los aminoácidos P1-P1' (Figura 10 B).

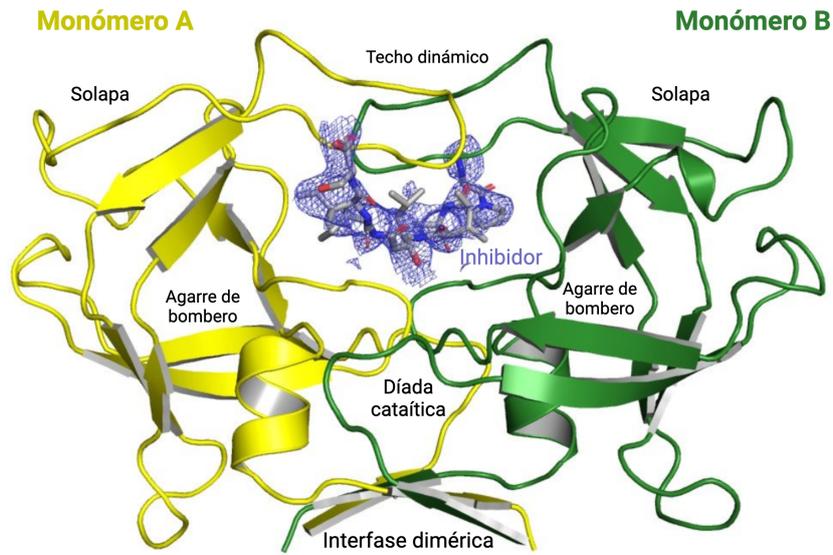
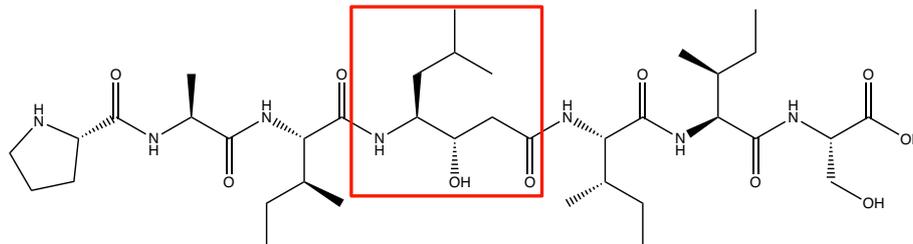
A**B**

Figura 10. A) Estructura tridimensional del complejo inhibidor: PR-VLB, con 2.4 Å de resolución. Figura obtenida en el Laboratorio de LIV/UBP en conjunto con la Unidad de Cristalografía de Proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo. **B) Secuencia del inhibidor peptídico: PAI(sta)IIS**. El recuadro rojo indica la estatina.

Una red de enlaces de hidrógeno cerca del sitio activo, llamado “agarre de bombero” (“fireman's grip”) mantiene la rigidez de la enzima. Por otro lado, una región flexible rica en glicina (comúnmente llamada “solapa”) forma un techo dinámico (dynamic sunroof), conformada por dos horquillas β , una por monómero, que participa el reconocimiento del sustrato. Esta última región puede cambiar estructuralmente entre una conformación abierta, semi abierta y cerrada ^{12,15}. Si se encuentra abierta se podrá unir el sustrato, pasando a la conformación cerrada para que el sustrato sea procesado y luego se abra la solapa liberando a los productos (Figura 10 A) ¹².

Esta flexibilidad del sitio activo de la PR-VLB permite que tenga promiscuidad en el proceso de reconocimiento del sustrato, ya que reconoce de manera específica diferentes secuencias de aminoácidos a lo largo del sustrato proteico, como se puede observar en la Figura 11. En efecto, no se encuentra un patrón específico de la secuencia primaria del sustrato ^{15,23,47}. Si bien poseen ciertas preferencias como la leucina, no se puede asociar a un patrón de secuencia claro de los sitios de corte.

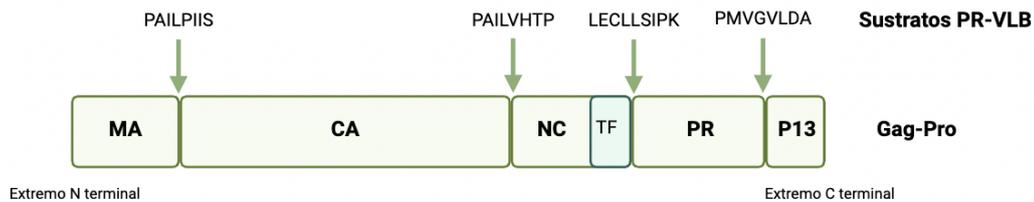


Figura 11. Representación esquemática de los sustratos para la PR-VLB de la poliproteína precursora de VLB Gag-Pro. Incluye a MA, CA, NC y PR, así como las regiones *transframe* (TF) en el extremo N-terminal y P13 en el extremo C-terminal de PR-VLB, las cuales forman parte de la versión inmadura de la enzima. Las flechas verdes marcan los sitios de hidrólisis con la secuencia de aminoácidos.

1.4 Antecedentes del laboratorio en la búsqueda de inhibidores para PR-VLB

1.4.1 Expresión de la proteasa recombinante de VLB

En el Laboratorio de LIV/UBP, en el año 2016 se comenzó con una línea de trabajo focalizada en su estudio. Se optimizó la expresión de la PR-VLB soluble en *E. coli*. Sin embargo, la auto-proteólisis de la enzima resultó problemática, ya que, al incubarla en un amortiguador adecuado para su actividad enzimática, casi a los 5 minutos, esta se degradaba por completo (Figura 12). Para abordar la alta actividad de auto-proteólisis de la enzima, se generó una variante con una mutación de leucina a isoleucina en la posición 41 (PRL41I-VLB, se muestra su secuencia aminoacídica en la Figura 8), que estabiliza la enzima, permitiendo así ampliar los estudios sobre ella, entre ellos los estructurales (Figura 10).

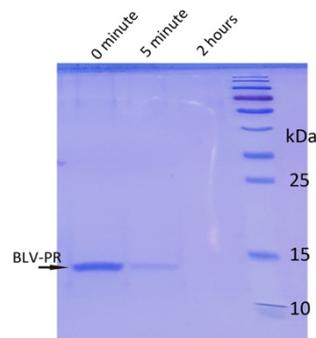


Figura 12. Auto-proteólisis de la PR-VLB en el tiempo. Electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS convencional de la incubación de PR-VLB en amortiguador de reacción fosfato (pH 5,6) y su progreso en el tiempo. En cada carril se indica el tiempo de incubación en el cual se tomó la muestra y el marcador de peso molecular correspondiente, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

1.4.2 Ensayo de actividad y mecanismo catalítico de la PR-VLB

Se desarrolló un ensayo sensible para cuantificar la actividad enzimática utilizando sustratos peptídicos fluorogénicos adaptado a placas de 96 y 384 pocillos. Además, se caracterizó el

mecanismo enzimático de la PR-VLB, incluyendo su dimerización y cambios conformacionales ¹².

El procesamiento del sustrato por la PR-VLB está coordinado por dos equilibrios moduladores; en primer lugar, se mantiene un equilibrio lento entre el monómero (M) y dímero (E). Una vez formado el dímero de la enzima, hay un equilibrio lento entre una conformación (E*, cerrada) que no es capaz de interactuar con el sustrato y una conformación activa (E, abierta), que si puede. Esto causa una tardanza en su actividad enzimática para llegar a su estado estacionario ¹².

El mecanismo de acción de la enzima es una catálisis ácido-base (Figura 13). Los dos residuos aspárticos de cada monómero conformando la diada catalítica actúan como donadores y aceptores de protones, sosteniendo a una molécula de agua. La molécula de agua que reside entre ellos realiza un ataque nucleofílico al carbono carbonílico específico del sustrato. Esto provoca que el oxígeno unido al carbono carbonílico del sustrato capture un protón de otro ácido aspártico en el sitio activo, dando como resultado un intermedio tetraédrico neutro no covalente. Este estado de transición convierte al amino del sustrato en un mejor grupo saliente, rompiendo finalmente el enlace peptídico y liberando los productos de la reacción ^{46,48}.

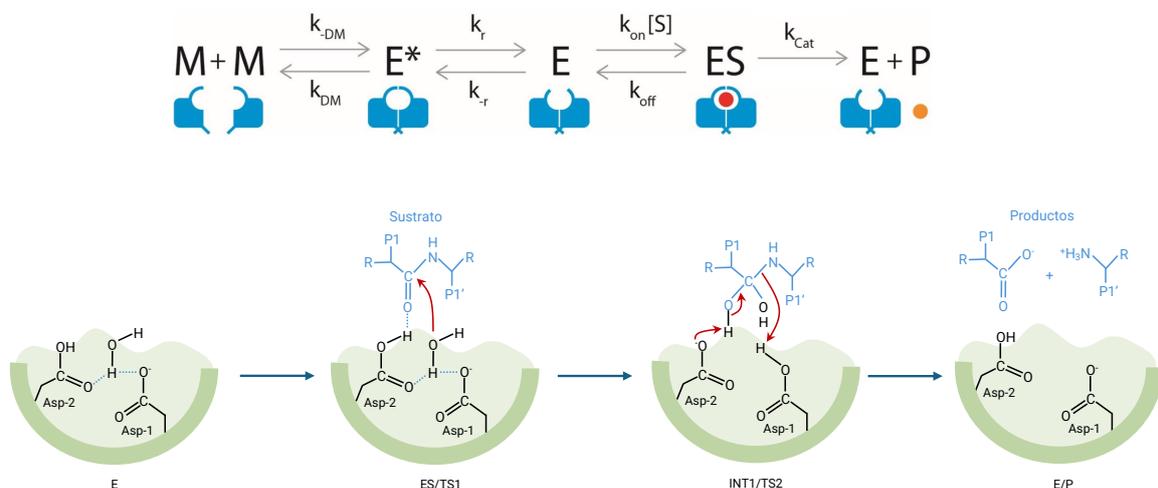


Figura 13. Mecanismo de formación y catálisis ácido-base de la PR-VLB. Se indica al monómero de PR-VLB como M, la constante cinética de asociación del monómero (k_{DM}), constante cinética de disociación del dímero E* inactivo (k_{DM}), las constantes cinéticas de los cambios conformacionales de E* a la enzima activa E (k_r y k_r), la constante de equilibrio de disociación del sustrato S (k_{off}) y de asociación (k_{on}), y, por último, la constante catalítica de la reacción de sustrato a producto P (k_{cat}).

1.4.3 Ensayo de actividad en la búsqueda de inhibidores para la PR-VLB

Los ensayos de actividad enzimática se pudieron adaptar para realizar un ensayo miniaturizado de alto rendimiento, que permitió comenzar a cribar una quimoteca de ~2,000 compuestos (quimoteca de alta diversidad química disponible en el laboratorio Biología Redox de Tripanosomátidos del IPMon) (Figura 14 A, B y C). De un primer tamizaje de 100 compuestos, se encontraron 19 hits capaces de inhibir a la PR-VLB. Catorce de estos compuestos pertenecen a la familia de paullonas. Además, se diseñaron 4 péptidos como análogos potenciales del estado de transición, que mostraron constantes de inhibición notables ($K_i \leq 10$ nM).

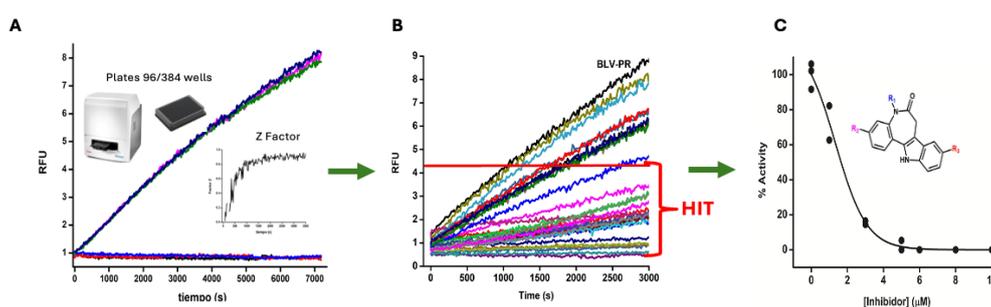


Figura 14. A) Optimización del ensayo de detección. Formación de producto en función del tiempo en ausencia y presencia de la PR-VLB (20 nM, $n=3$) con $[S]/K_M < 1$. El recuadro muestra el análisis estadístico Z. **B) Ensayo de detección de compuestos contra la PR-VLB.** *hit*: Compuestos que inhiben la actividad enzimática en un 50% o más a una concentración de 10 μ M. **C) Curva representativa de respuesta a la dosis.** Porcentaje de actividad en función de la concentración del inhibidor ([inhibidor], 0,1-10 μ M). La línea negra representa el ajuste a la ecuación de respuesta a la dosis.

1.5 Familia de paullonas

Los compuestos pertenecientes a la familia de paullonas (Figura 15) son indolobenzazepinas sintéticas, una clase de moléculas estructuralmente basadas en el esqueleto parental 7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepin-6(5H)-ona⁴⁹. Se han estudiado a las paullonas y compuestos derivados de ellas previamente como inhibidores de quinasas de la superfamilia CMGC, de proteasas y de tripanotona sintetasas de parásitos como *Leishmania*, presentando baja citotoxicidad⁵⁰⁻⁵². Las paullonas tienen un gran número de compuestos que integran esta familia, los cuales tienen capacidad de atravesar la membrana celular. Esto permite que puedan actuar en diversos procesos biológicos, por ejemplo, actuando como antitumorales al inhibir quinasas dependientes de ciclina, enzimas claves en la progresión del ciclo celular. Lo cual llevó a que varios de estos compuestos se encuentren comercialmente disponibles, para ser ampliamente utilizadas como herramientas bioquímicas en la investigación básica y el desarrollo de fármacos durante más de una década⁴⁹.

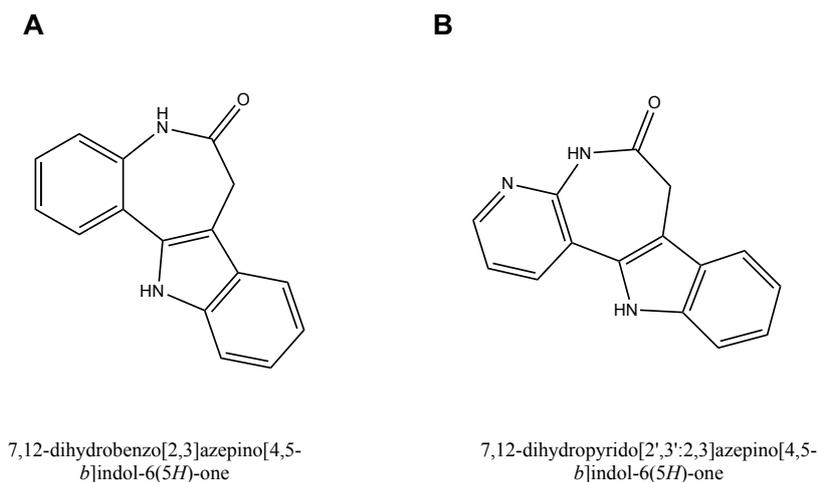


Figura 15. A) Estructura consenso de los compuestos pertenecientes a la familia de las paullonas. B) Análogo de las paullonas con el esqueleto heterocíclico modificado.

Además de su potencial como inhibidores de diferentes enzimas, estudios previos han reportado que las paullonas, dependiendo de la dosis, actúan como agentes protectores como los podocitos, células especializadas del riñón para la filtración glomerular. Actúan a nivel de la actina filamentosa y los microtúbulos, además de la inhibir vías de señalización relacionadas con las proteínas quinasas GSK3 y p38 MAPK, implicadas en procesos como inflamación y daño celular⁵³. También se han reportado que reducen el dolor patológico en roedores con lesiones nerviosas y cáncer de hueso, al aumentar los niveles de un gen transportador de iones que está involucrado en el mantenimiento de la neurotransmisión GABAérgica inhibitoria⁵⁴. Aunque, las paullonas posean beneficios para los modelos estudiados y reportados, interfieren en varios procesos celulares, que podría llegar a dificultar el desarrollo de inhibidores selectivos contra el objetivo específico, en este caso la PR-VLB.

2 Hipótesis

Proponemos que completar la caracterización biofísica y bioquímica de la PRL41I-VLB será esencial para avanzar en la comprensión integral de esta proteasa viral. Mientras que la caracterización bioquímica permitirá evaluar cómo la mutación L41I afecta su actividad enzimática, los estudios biofísicos aportarán información clave sobre su estabilidad y propiedades estructurales. En conjunto, estos análisis proporcionarán una base sólida para evaluar la eficacia de los compuestos inhibidores identificados.

Por otro lado, se identificaron 14 compuestos pertenecientes a la familia de las paullonas capaces de inhibir a la PRL41I-VLB. Sin embargo, falta analizar si otros 185 paullonas, disponibles en nuestra quimioteca, presentan actividad inhibidora de la PRL41I-VLB.

Planteamos que el estudio de los compuestos de la familia de las paullonas podría dar lugar a la identificación de nuevos inhibidores para la PR-VLB. Estos compuestos no solo serían herramientas valiosas para investigar la inhibición de la proteasa viral y como impacta en la biología del virus, sino que también podrían contribuir al desarrollo de antivirales.

3 Objetivo General

Profundizar en la caracterización biofísica, bioquímica y enzimática de PRL41I-VLB y búsqueda de inhibidores de la PRL41I-VLB pertenecientes a la quimioteca de la familia de paullonas.

3.1 Objetivos específicos

1. Producir la proteasa PRL41I-VLB recombinante soluble, y activa enzimáticamente.
2. Completar la caracterización PRL41I-VLB por métodos biofísicos, bioquímicos y enzimáticos.
3. Identificar inhibidores de PRL41I-VLB pertenecientes a la familia de paullonas.

4 Materiales y Métodos

4.1 Producción de la PRL41I-VLB recombinante en *E. coli*

4.1.1 Construcción del plásmido pQE80L modificado para la expresión de PRL41I-VLB recombinante

La PRL41I-VLB se expresó en *E. coli* BL21(DE3) pLysS utilizando una construcción realizada sobre el plásmido pQE80L (Qiagen) modificado, cedido por Correa y colaboradores⁵⁵. Este vector confiere resistencia a ampicilina y contiene el promotor del bacteriófago T5 para la ARN polimerasa de *E. coli* con el operador lac incorporado. El represor lac se une al operador lac e inhibe la transcripción en *E. coli*. Esta represión puede ser revertida agregando lactosa o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) lo que induce la expresión de la proteína recombinante.

La construcción de PRL41I-VLB de 126 aminoácidos, presenta los codones optimizados para su expresión en *E. coli* (Genscript, NJ, USA), y está fusionado en su extremo N-terminal a la proteína de unión a maltosa (MBP) con una etiqueta de 6 histidinas (H6-MBP) para su purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC). Además, incluye

un sitio de hidrólisis para la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV) diseñado para liberar la PRL41I-VLB sin añadir aminoácidos adicionales, entre H6-MBP y el gen de interés PRL41I-VLB, (Figura 16) ¹². El extremo C terminal contiene al péptido P13 de 26 aminoácidos de la versión inmadura de la proteína PR-VLB, con su sitio de hidrólisis nativo de PR-VLB.

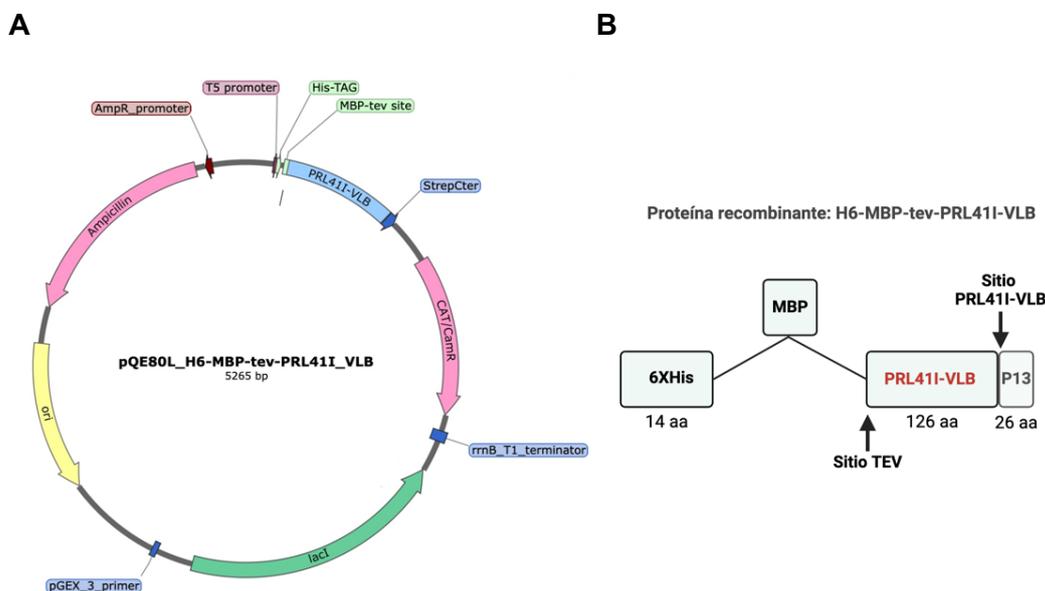


Figura 16. Diseño del plásmido pQE80L modificado para la expresión de PRL41I-VLB recombinante. A) Representación esquemática del vector pQE80L utilizado para la expresión de H6-MBP-tev-PRL41I-VLB, obtenida y modificada en SnapGene ⁵⁶. B) Esquema de la construcción de H6-MBP-tev-PRL41I-VLB recombinante, que se obtiene al inducir su expresión. En flechas negras se marcan los sitios de hidrólisis de la proteasa TEV y de PR-VLB.

4.1.2 Transformación química de bacterias quimio-competentes

Las células competentes de *E.coli* BL21(DE3) pLysS se incubaron con 2 μ L del plásmido de interés a una concentración aproximada de 100 ng/ μ L, durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, se sometieron a un choque térmico mediante incubación a 42 °C durante 2 minutos en termobloque, seguido de 2 minutos en hielo. Luego, se recuperaron las bacterias en 400 μ L de caldo LB durante 1 hora a 37 °C en agitación (650 rpm). Finalmente, se sembraron 200 μ L en placa agar con medio LB y ampicilina, y se incubaron a 37 °C "overnight (ON)".

4.1.1 Expresión de la H6-MBP-tev-VLB-PR recombinante

Para la expresión y purificación de la proteasa PRL41I-VLB recombinante, se adoptó el protocolo detallado por Flo y colaboradores (2022)¹² (Figura 17). Cinco colonias de bacterias transformadas, seleccionadas al azar, se cultivaron ON en 100 mL de medio LB con 100 µg/L de ampicilina en agitación (220 rpm) a 37 °C. Posteriormente, se utilizaron 8 mL de este cultivo ON para inocular 800 mL de medio 2YT conteniendo 100 µg/L de ampicilina, en matraces de 5 L, y se incubaron ON con agitación (220 rpm) a 37 °C, hasta alcanzar la fase logarítmica tardía del crecimiento bacteriano (Absorbancia 600 nm de $1,0 \pm 0,2$). Una vez llegado a la densidad óptica deseada, se indujo la expresión de la proteína de interés con 0,1 mM IPTG durante 4 horas. Finalmente, se recolectaron las células por centrifugación a 4000 g durante 30 minutos a 4 °C. Los pellets de células se resuspendieron en amortiguador de Lisis (Tris 20 mM, 300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 0,45 µg/mL DNAsa, pH 8), utilizando 8 mL de amortiguador por cada 100 mL de medio de cultivo.

Se tomaron alícuotas de 100 µL del cultivo de antes y después de inducir y se diluyeron en 1 mL de amortiguador Tris 20 mM, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 8, para analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS, como se detalla más adelante.

Esquema de producción y purificación de PR-VL411 recombinante en *E. coli*

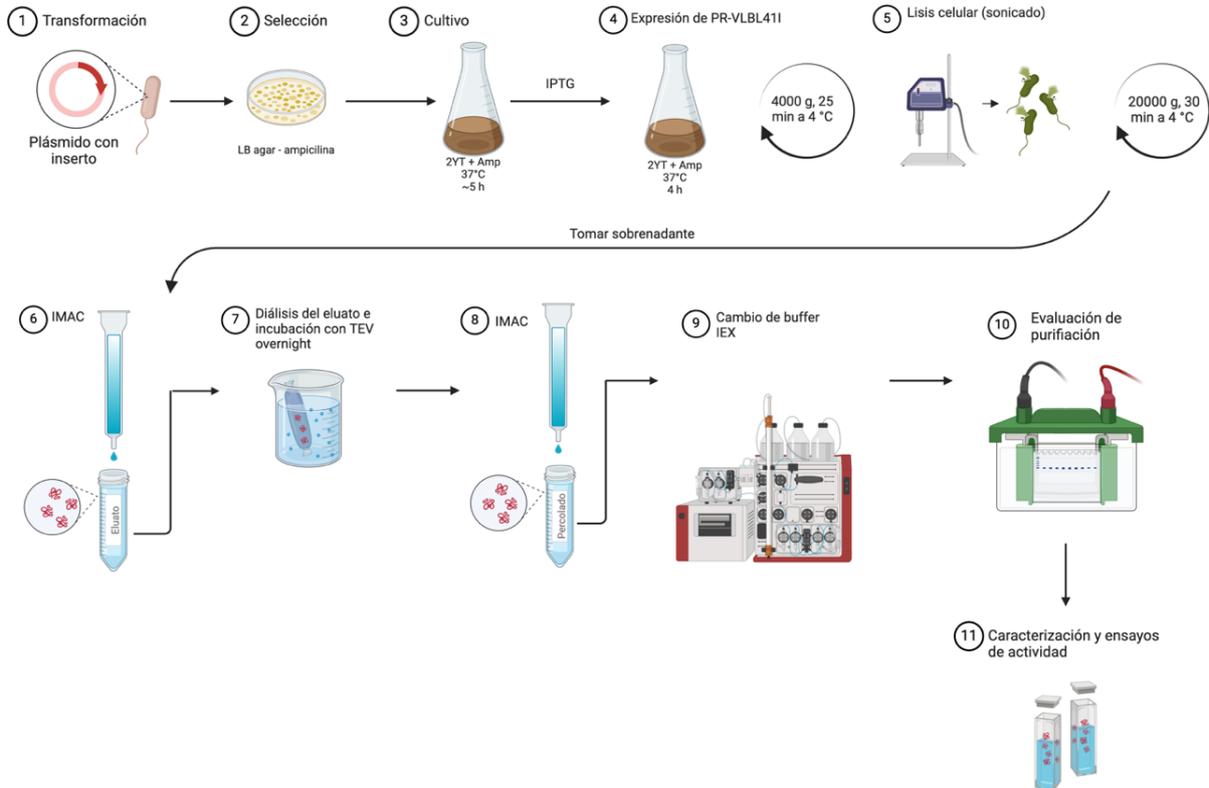


Figura 17. Representación esquemática del proceso de la producción y purificación de la proteasa PRL411-VLB recombinante en *E.coli*. Realizado con BioRender (<https://www.biorender.com/>).

4.1.2 Lisis celular mediante sonicación

El extracto celular se sometió a sonicación, en hielo, aplicando 120 pulsos de 5 segundos cada uno, con una amplitud de 30-40%, con intervalos de 10 segundos entre cada pulso. Posteriormente, se centrifugó a 20.000 g durante 30 minutos a 4 °C. A partir del sobrenadante se procedió a purificar PRL411-VLB mediante IMAC.

Para analizar por electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS, se tomó una alícuota del sobrenadante y otra del pellet resuspendida con 1 mL del amortiguador de lisis.

4.1.3 Purificación H6-MBP-tev-PRL411-VLB por IMAC

A un volumen entre 250 y 300 mL de sobrenadante del lisado celular, se le agregó 1,5 mL de matriz de afinidad Ni-NTA (Invitrogen) y se incubó aproximadamente 15 minutos, a temperatura ambiente, para que se establezca la interacción entre la proteína recombinante y

la matriz. Una vez pasado el tiempo, se vertió en una columna de purificación abierta. Se recogió la fracción no unida y se realizaron 3 lavados de 10 mL con amortiguador de Lisis. Por último, se eluyó a un flujo lento con 20 mL (se recogió el eluato 1 como los primeros 10 mL y eluato 2 en los siguientes 10 mL) del amortiguador de elución (Tris 20 mM, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol, pH 8).

4.1.4 Activación de PRL41I-VLB mediante TEV y posterior purificación

Al eluato obtenido en la purificación mediante IMAC se le agregó H6-TEV⁵⁵ (1 mg de H6-TEV por cada 5 mg de proteínas en el extracto) y se dializó utilizando una membrana de 3,5 kDa (SnakeSkin 3.5K MWCO), contra una solución de Tris 50 mM, 300 mM NaCl, 0.1 mM DTT, pH 8; durante 12 horas a 4 °C. Luego se recuperó la fracción dializada, y se purificó la proteasa PRL41I-VLB mediante una segunda cromatografía por afinidad IMAC, realizando el mismo procedimiento que en la etapa anterior (sección 4.1.3). Se recogió el percolado (donde se encuentra la proteasa PRL41I-VLB), los lavados y el eluato (el cual contiene H6-MBP y H6-TEV).

4.1.5 Purificación de PRL41I-VLB mediante cromatografía de intercambio iónico

Después del segundo percolado en la columna IMAC, se cambió el amortiguador a Tris 50 mM, 10 mM NaCl, pH 8, utilizando una columna PD10 (Sigma-Aldrich), siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, se realizó la purificación de la proteína recombinante PRL41I-VLB mediante cromatografía de intercambio iónico. Para ello, la muestra se dividió en dos volúmenes iguales, con el fin de evaluar el rendimiento de la purificación por intercambio aniónico y catiónico, utilizando columnas Mono Q HR 5/50 y Mono S HR 5/50 (GE Healthcare), respectivamente.

Dado que el punto isoeléctrico aproximado de PRL41I-VLB es 10, la proteína presenta una carga neta positiva a pH 8. En el intercambio aniónico (Mono Q), que contiene resinas cargadas positivamente, la proteína con carga neta positiva no queda retenida. Se colectó el percolado y las proteínas retenidas eluidas mediante un gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM.

La otra mitad de la muestra se sometió a cromatografía intercambio catiónico (Mono S), que contiene resinas cargadas negativamente. En este caso, las proteínas con carga neta positiva son las que quedan retenidas. La elución se llevó a cabo utilizando un gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM, recuperando la proteína en esta fracción.

Las fracciones recolectadas de ambas cromatografías fueron analizadas por electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS para confirmar la presencia y evaluar la pureza de PRL41I-VLB.

4.2 Cuantificación de PRL41I-VLB

Se calculó la concentración y cantidad de PRL41I-VLB a través de la absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente teórico de extinción molar y el peso molecular calculado con la herramienta protoparam de la página web de ExPASy (<https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam>).

4.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE 15 %

Se realizó siguiendo el protocolo convencional. Los geles, de 1,5 mm de espesor, se corrieron en el sistema Mini PROTEAN II (Bio-Rad, EUA). Las muestras para la corrida en el gel se prepararon agregando a 50 μ L de cada muestra 10 μ L del amortiguador de carga 6x (Tris-HCl 0,375 M; glicerol 60% (v/v); SDS 12% (P/v); azul de bromofenol 0,006%; DTT 0,05 M; pH 6,8). Se calentaron en termobloque (Eppendorf Thermomixer comfort) 8 - 10 min a 99 °C. Se realizó la corrida electroforética a 30 mA. Los geles fueron teñidos con Coomassie Blue.

4.4 Evaluación de auto-proteólisis de PRL41I-VLB

Se incubó a 1 μ M del dímero de PRL41I-VLB a 30 °C durante 24 h en tres amortiguadores diferentes: a) de almacenamiento (Tris 50 mM, 100 mM NaCl, pH 8); b) de reacción fosfato (fosfato 250 mM, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glicerol, 1% DMSO, pH 5,6) y c) de reacción acetato (acetato 100 mM, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glicerol, 1% DMSO, pH 5,6). Se tomaron alícuotas de a 50 μ L a tiempos crecientes (0; 0,5; 1; 2; 4 y 24 horas) frenando inmediatamente la reacción al agregar 10 μ L de amortiguador de carga 6x. Posteriormente, se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS.

4.5 Evaluación de estabilidad termodinámica de PRL41I-VLB

Se evaluó la estabilidad termodinámica de 1 μM del dímero de PRL41I-VLB en diferentes condiciones de amortiguadores de: almacenamiento, reacción fosfato y reacción acetato (ver sección 4.4). Para las mediciones, la proteína se diluyó cinco veces en cada uno de los respectivos amortiguadores. Se analizaron los cambios en la fluorescencia intrínseca de la proteína durante una rampa térmica de 20 °C hasta 95 °C, con un incremento de 1 °C por minuto, mediante el equipo Prometheus NT.48 nanoDSF (Nanotemper Technologies).

Esta técnica se basa en que las proteínas cuando se encuentran en su forma nativa (plegadas), sus triptófanos (Trp), tienen un pico de emisión de fluorescencia a 330 nm. A medida que aumenta la temperatura, las proteínas se van desnaturalizando, exponiendo todos sus aminoácidos a la solución, incluyendo a los residuos de Trp, cambiando sus propiedades de emisión y exponiendo un máximo de fluorescencia a 350 nm. Por lo tanto, la relación de fluorescencia 350/330 nm depende de la relación de proteína desnaturaliza/plegada, en otras palabras.

El equipo registró la fluorescencia a longitudes de onda de 330 y 350 nm, para posteriormente obtener el punto de inflexión (T_m , temperatura de fusión) así como la temperatura a la que comienza el despliegue térmico (T_{on}). Es decir, la T_m , que corresponde cuando el 50% de la proteína se encuentra plegada en su forma nativa y el 50% se encuentra en su forma desnaturalizada.

4.6 Determinación de parámetros cinéticos de la enzima PRL41I-VLB

4.6.1 Condiciones de los ensayos de actividad enzimática

Se realizaron los ensayos de actividad enzimática en placa de fluorescencia de 96 pocillos, utilizando como sustrato para PRL41I-VLB un péptido fluorogénico, sintetizado por la empresa United Biosystems, tal como se describe en Flo y colaboradores ¹². El sustrato se basa en la transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) entre el dador ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico (EDANS) y el aceptor ácido 4-((4-(4-(dimetilamino)fenil)azo)benzoico (DABCYL). El péptido consta de 12 aminoácidos con una arginina en cada extremo para mejorar la solubilidad del sustrato, en la posición 2 posee un glutamato modificado con EDANS y en la posición 11 una lisina modificada con DABCYL; el resto de los aminoácidos comprenden el sitio de hidrólisis, para esta tesina se utilizó el de cápside - nucleocápside CA-NC (secuencia aminoacídica: PAILVHTP) (Figura 18 A).

Cuando EDANS se excita a una longitud de onda de 340 nm, emite fluorescencia a 490 nm. En el sustrato, la proximidad de DABCYL absorbe la energía emitida por EDANS. Entonces, cuando el sustrato es hidrolizado por la proteasa PRL41I-VLB, DABCYL se aleja de EDANS, y se vuelve detectable la fluorescencia a 490 nm emitida por EDANS excitado a 340 nm (Figura 18 B).

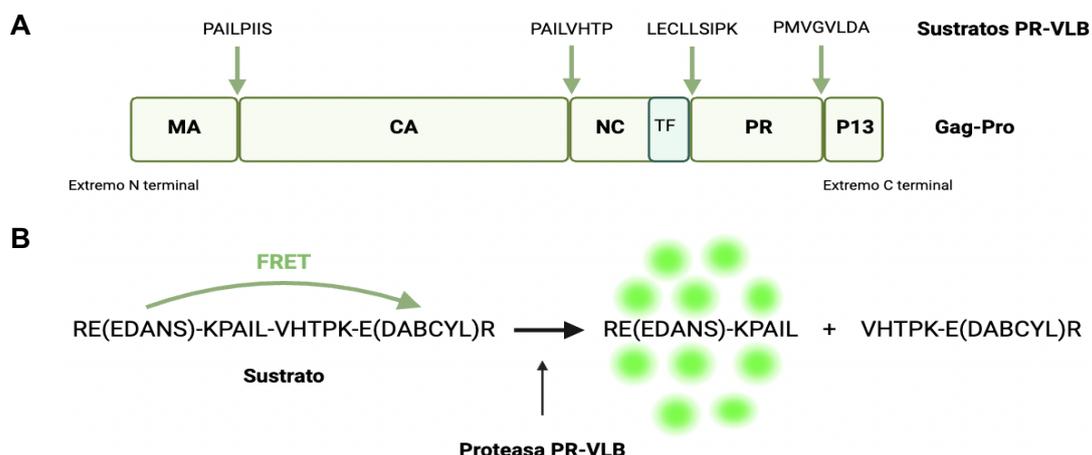


Figura 18. Representación esquemática de los sustratos para la PR-VLB. A) Poliproteína precursora de VLB: Gag-Pro que incluye a MA, CA, NC y PR, así como las regiones *transframe* (TF) en el extremo N-terminal y P13 en el extremo C-terminal de PR-VLB, las cuales forman parte de la versión inmadura de la enzima. Las flechas verdes marcan los sitios de hidrólisis con la secuencia de aminoácidos. **B) Sustrato fluorogénico peptídico CA-NC** (secuencia: RE(EDANS)-KPAIL-VHTPK-E(DABCYL)R) diseñada para imitar el sitio de corte específico de la proteasa PR-VLB. Contiene un sistema FRET compuesto por EDANS como donador y DABCYL como aceptor. La hidrólisis de este sustrato por la PR-VLB separa el par FRET, lo que genera un aumento de la fluorescencia, permitiendo la cuantificación de la actividad enzimática.

Se registró las unidades de fluorescencia relativa (RFU) de EDANS a lo largo del tiempo, generada por la hidrólisis del sustrato por PRL41I-VLB a 490 nm de emisión, con una longitud de onda de 340 nm de excitación. Las mediciones se realizaron en el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

Para cada ensayo enzimático, se llevaron a cabo curvas de calibración, por duplicado, utilizando diferentes concentraciones del fluoróforo EDANS (0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00 y 5,00 μM). Se registraron los valores de unidades de fluorescencia relativas (RFU) correspondientes a cada concentración de EDANS.

4.6.2 Determinación de la constante catalítica de PRL41I-VLB a partir de la velocidad en función de la concentración de enzima.

Se realizó el experimento en amortiguador de reacción fosfato y amortiguador de reacción acetato. A 100 μL del sustrato fluorogénico 2x, para una concentración final de 10 μM , se le agregó 100 μL de la enzima 2x para concentraciones finales de 0 a 15 nM (1,3; 2,5; 3,8; 5; 10 y 15 nM). Se midió el RFU en función del tiempo a 37 °C durante 2 horas. Posteriormente, se calculó la concentración de producto ajustando los valores de RFU en la curva de calibración de EDANS libre. Se determinaron las velocidades iniciales, para cada concentración de sustrato, a partir de la sección lineal de la curva de concentración del producto (μM) en función del tiempo (s). Luego, se graficaron las velocidades iniciales ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM) y se calculó la pendiente (pend) del grafico a partir de la ecuación de la recta. Se calculó k_{cat} , también llamada número de recambio, a partir de la ecuación (1), usando el valor de K_M , que fue previamente calculado (sección siguiente, 4.6.3):

$$k_{cat} = \frac{pend * (K_M + [S])}{[S]} \quad \text{ec. (1)}$$

4.6.3 Determinación de la constante de Michaelis-Menten de PRL41I-VLB

Para determinar la constante de Michaelis - Menten (K_M) y estimación de la k_{cat} de la PR41-VLB se analizó la actividad enzimática de 10 nM de enzima a concentraciones crecientes del sustrato peptídico fluorogénico CA-NC (1; 2; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 y 20 μM) en el amortiguador de reacción fosfato. A cada pocillo de la microplaca de 96 se agregó 100 μL del sustrato fluorogénico 2x y 100 μL de la enzima 2x. Inmediatamente, se registró el curso temporal de la reacción a 37 °C durante 2 horas.

Posteriormente, las velocidades fueron determinadas a partir de la sección lineal de la curva de concentración del producto (μM) en función del tiempo (s) para cada concentración de sustrato. La concentración de producto se calculó ajustando los valores de RFU en la curva de calibración de EDANS libre.

Se aplicaron correcciones por efecto de filtro interno a las medidas de velocidades para compensar que DABCYL puede absorber la fluorescencia emitida por EDANS libre a altas concentraciones del sustrato. Para ello, primero se midió la fluorescencia (f) de cada concentración de sustrato utilizada en el ensayo cinético en un volumen final de 200 μL de amortiguador de reacción, definido como f (sustrato). Luego, se agregaron 2 μL de EDANS

(500 μM) a cada dilución de sustrato (concentración final de 5 μM de EDANS), y se realizó la lectura de fluorescencia, f (sustrato + EDANS). Simultáneamente, se midió un pocillo con 5 μM de EDANS en amortiguador de reacción, f (referencia/EDANS). La corrección por efecto de filtro interno en cada concentración de sustrato ($corr$) se calculó según la ecuación (2):

$$corr = \frac{f(\text{sustrato} + \text{EDANS}) - f(\text{sustrato})}{f(\text{referencia}/\text{EDANS})} \quad \text{ec. (2)}$$

Luego, las velocidades de la sección lineal (v) fueron corregidas mediante la ecuación (3):

$$v = \frac{v}{corr} \quad \text{ec. (3)}$$

Por último, se graficó velocidad ($\mu\text{M}/\text{s}$) en función de la concentración del Sustrato (μM) y se ajustaron los valores a la ecuación no lineal de Michaelis – Menten, ecuación (4):

$$v = k_{cat} \frac{E * [S]}{K_M + [S]} = \frac{v_{m\acute{a}x} * [S]}{K_M + [S]} \quad \text{ec. (4)}$$

4.7 Cribado de PRL411-VLB con compuestos de la familia de paullonas

Para el cribado enzimático de PRL411-VLB, se incubó 10 μL de cada compuesto a 200 μM (para llegar a una concentración final de 10 μM) junto con 90 μL del amortiguador de reacción 1 y 80 μL de 50 nM del dímero de PRL411-VLB (para llegar a una concentración final de 20 nM), se incubó durante 30 minutos a 28 $^{\circ}\text{C}$ en la placa de 96 pocillos. Luego se largó la reacción agregando 20 μL del sustrato CA-NC 50 μM , llegando a una concentración final de 5 μM , con una relación de $K_M/[S]$ de 0,4. Se midió el RFU en función del tiempo a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora. Los compuestos se encontraban en DMSO 100%, por lo tanto, en la reacción final, la concentración de DMSO se ajustó al 6%.

Se realizaron los controles: 1) enzima en ausencia de compuestos, 2) sustrato sin enzima, y 3) de inhibidores previamente identificados por el grupo de trabajo. Los valores fueron normalizados en comparación con el control de la enzima con DMSO, sin inhibidor, considerando la actividad de la enzima en el control 1 como el 100%.

Además, se controló que el ensayo presente buenos parámetros de señal-ruido y del factor Z' . El cálculo del factor Z' se realizó utilizando las medias (μ) y desviaciones estándar (σ) de los controles 1 y 2 mediante la ecuación (5) descrita por Zhang y colaboradores (1999)⁵⁷:

$$Z' = 1 - \frac{3(\sigma_{c+} + \sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|} \quad \text{ec. (5)}$$

En el cual, un valor de Z' mayor a 0,5 indica que el ensayo es robusto y adecuado para la identificación de inhibidores. Consideramos que identificamos un inhibidor (*hit*) cuando la actividad enzimática se vea reducida en un 50% en presencia de 10 μM del compuesto.

4.8 Determinación del IC_{50} de los inhibidores encontrados.

Para determinar los valores de IC_{50} , se realizó el mismo ensayo descrito en el cribado (sección 4.7), utilizando concentraciones crecientes de inhibidores (0,14; 0,41; 1,23; 3,7; 11,1; 33,3 y 100 μM). A partir de los cursos temporales obtenidos, se calcularon las pendientes (s^{-1}) de la región lineal, que luego se graficaron en función de la concentración del compuesto-Inhibidor. El valor de IC_{50} se determinó mediante el ajuste de la curva (3 parámetros de inhibidor vs respuesta) con la ecuación (6):

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top}-\text{Bottom}}{1+(\frac{X}{\text{IC}_{50}})^n} \quad \text{ec (6)}$$

Donde:

- X: la concentración del compuesto,
- Y: las pendientes (s^{-1}): la respuesta, que disminuye al aumentar X,
- Top: el valor del plató superior, que representa el nivel máximo de respuesta (Y) observado cuando X es muy bajo o nulo (concentración mínima del compuesto),
- Bottom: el valor del plato inferior, que representa el nivel mínimo de respuesta (Y) alcanzado cuando X es muy alto (concentración máxima del compuesto);
- IC_{50} : la concentración del compuesto (X) en la que la respuesta (Y) es la mitad del intervalo entre Top y Bottom, expresada en las mismas unidades que X.

5 Resultados

5.1 Expresión y purificación de PRL41I-VLB en *Escherichia coli*

La proteasa recombinante PRL41I-VLB se expresó en *E. coli* BL21(DE3) pLysS como parte de una construcción inactiva (H6-MBP-tev-VLB-PR), diseñada para activarse tras el tratamiento con la proteasa TEV. Se preparó a PRL41I-VLB siguiendo el protocolo descrito por Fló y colaboradores (2022)¹², que implica dos pasos de purificación por IMAC, uno antes y otro después de activar a la PRL41I-VLB con TEV, finalizando con un paso de purificación mediante intercambio iónico. Las diferentes fracciones obtenidas a lo largo de la purificación fueron analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15% con SDS (Figura 19).

En el gel de electroforesis correspondiente a la primera purificación por IMAC (IMAC 1, Figura 19 A) se destacan dos bandas: una con el peso molecular esperado para H6-MBP-tev-PRL41I-VLB (~57 kDa) y otra para H6-MBP (~42 kDa). Estas bandas están presentes en la fracción inducida, pero ausentes en la fracción no inducida. Además, se observa un enriquecimiento de estas en la fracción del eluato, indicando que ambas proteínas se inducen con IPTG y se purifican por IMAC. Por otro lado, también se identificó bandas con peso molecular esperado para H6-MBP y H6-MBP-tev-PRL41I-VLB en los carriles correspondientes al percolado y lavados con el amortiguador de lisis. Este resultado podría deberse a la gran cantidad de proteína recombinante en la fracción soluble, que satura la matriz de afinidad Ni-NTA, lo que limita su capacidad de retener todas las proteínas de interés. Cabe mencionar que, en las diferentes proteínas recombinantes de diferente naturaleza, que se han expresado en este vector, MBP se co-purifica en la IMAC 1^{12,55}. Por ello, se asumió que la presencia de MBP no es consecuencia de la actividad proteolítica de la PRL41I-VLB, sino asociado al vector de expresión utilizado.

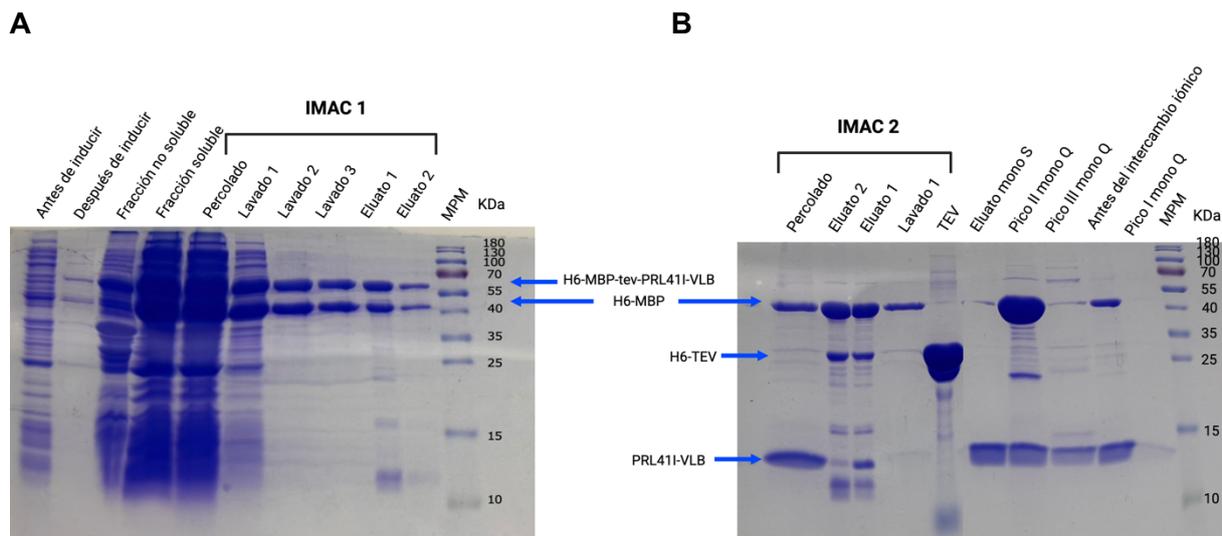


Figura 19. Expresión y purificación de PRL41I-VLB recombinante en *E.coli*. **A)** Se muestran las fracciones: antes de inducir; inducido; la fracción no soluble y soluble obtenidas luego de lisar las bacterias; y las tres fracciones de la IMAC 1 (percolado, lavados 1, 2 y 3 y eluatos 1 y 2 de la columna de Ni-NTA); y MPM. **B)** Se muestran las tres fracciones de la IMAC 2 (percolado, eluatos 1 y 2 y lavado de la columna de Ni-NTA); TEV; eluato de la columna mono S; los picos I, II y III observados en el cromatograma del intercambio aniónico, columna mono Q (en la Figura 20 se muestran los cromatogramas correspondientes); la fracción antes de purificación por intercambio iónico y MPM. Las flechas azules indican a las proteínas H6-MBP-tev-PRL41I-VLB, H6-MBP, H6-TEV y PRL41I-VLB. MPM: marcador de peso molecular (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa).

Con el objetivo de activar a PRL41I-VLB y separarla de su extensión N-terminal (H6-MBP), a la fracción completa del eluato de la IMAC 1 (eluato 1 y 2, mostrado en Figura 19 A) se trató con la proteasa de H6-TEV. Posteriormente, se realizó la IMAC 2.

El análisis de la IMAC 2 (Figura 19 B) muestra que la fracción del percolado está compuesta principalmente por PRL41I-VLB y H6-MBP. Esta última proteína, H6-MBP, a pesar de tener una etiqueta de histidinas, no se retuvo completamente en la matriz Ni-NTA. Por otro lado, en ninguna de las fracciones recolectadas después de tratar con TEV se observó una banda correspondiente a H6-MBP-tev-PRL41I-VLB (~57 kDa), indicando que TEV escindió correctamente a la proteína recombinante, en el sitio de corte para TEV ubicado entre H6-MBP y PRL41I-VLB. En el eluato de la IMAC 2 quedó retenida H6-MBP, la proteasa TEV y también otras proteínas de *E. coli* que tienen afinidad por Ni-NTA. En suma, se logró obtener la PRL41I-VLB madura, pero aún con algunas proteínas que no eran de nuestro interés, entre ellas H6-MBP, requiriendo un siguiente paso de purificación por intercambio iónico.

A la fracción correspondiente al percolado de la IMAC 2, que contenía H6-MBP y PRL41I-VLB, se le cambió el amortiguador a Tris 50 mM, 10 mM NaCl, pH 8. Dado que el punto isoeléctrico (pI) de PRL41I-VLB es 9,69, la proteína tiene una carga neta positiva a pH 8. Por otra parte, MBP, la principal proteína contaminante de la muestra a pH 8 tiene una carga neta

negativa, debido a que su pI es de 5,2. Por lo tanto, se decidió dividir la fracción en dos mitades para analizar dos estrategias de purificación mediante intercambio iónico. Una de ellas consistió en la estrategia previamente optimizada en el laboratorio ¹², utilizando intercambio catiónico en una columna Mono S HR 5/50, donde se retiene en la columna PRL41I-VLB, y H6-MBP permanece en el percolado. La otra estrategia consistió en el uso de intercambio aniónico, con una columna mono Q HR 5/50, donde se esperaba que quedara retenida H6-MBP en la columna, permitiendo que PRL41I-VLB continúe en el percolado. En ambos casos, a las proteínas retenidas se las eluyeron mediante gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM (Figura 20).

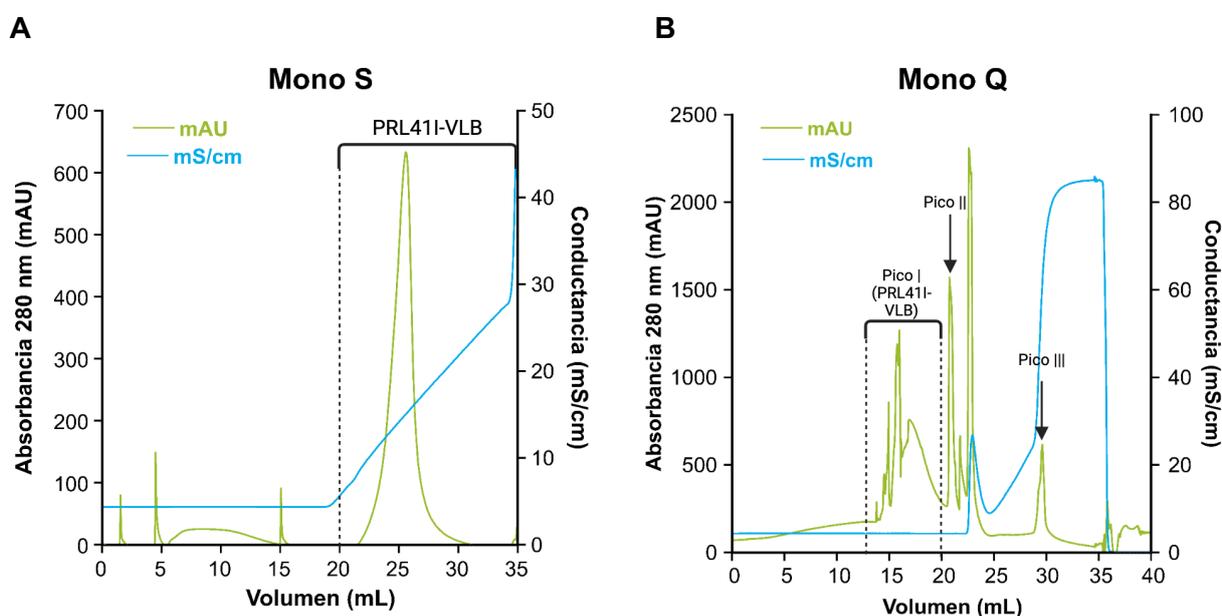


Figura 20. Purificación por intercambio iónico de PRL41I-VLB. A) Cromatografía de intercambio catiónico con columna Mono S HR 5/50 (GE Healthcare), la proteína de interés fue eluida con un gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM. **B) Cromatografía de intercambio aniónico** con columna Mono Q HR 5/50 (GE Healthcare). El percolado se recogió hasta que disminuyó la absorbancia a 280 nm (Pico I), luego se recolectó el siguiente pico identificado como Pico II, y por último se realizó un gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM en el cual se recolectó otro pico de absorbancia a 280 nm, identificado como Pico III, para posterior análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS. La línea verde representa la absorbancia a 280 nm en mAU y la azul la conductancia en mS/cm. La llave en negro indica la fracción que se recolectó correspondiente a la PRL41I-VLB purificada.

En el cromatograma de la purificación mediante intercambio catiónico (columna Mono S), se observó un pico único, de absorbancia 280 nm, en el eluido, (Figura 20 A). El análisis por electroforesis en gel (Figura 19 B), muestra que este pico se corresponde a la PRL41I-VLB (~14 kDa) con alta pureza, lo cual fue posteriormente confirmado por espectrometría de masa LC-MS/MS, con una cobertura de secuencia del 97,6% (anexo, Figura A1). Si bien en el carril se observa una banda de baja intensidad correspondiente a H6-MBP, está parece ser contaminación del carril de al lado, dado que esa banda no se observó en los siguientes gels

que realizamos con esta fracción, por ejemplo, como se evidencia en la Figura 24. Además, se realizó un análisis por densitometría de gel, que indicó que la densidad de la banda correspondiente a PRL411-VLB en la muestra previa al intercambio iónico fue más del doble de la densidad observada en la fracción del eluato recolectada tras la purificación en la columna Mono S. Se obtuvieron valores de 97.700.642 píxeles (100%) antes de la columna Mono S, y de 43.833.463 píxeles (45 %) de las bandas luego del intercambio iónico. Dado que se concentró aproximadamente 3 veces más la muestra al finalizar la purificación con la columna Mono S, esto indica que se perdió parte de la proteína en el proceso.

La Figura 20 B muestra el cromatograma del intercambio aniónico (columna Mono Q). A diferencia de la purificación por intercambio catiónico, el cromatograma no mostró un pico de absorbancia a 280 nm claramente definido y regular. Se pueden identificar varios picos, entre ellos se destacan tres. Primero, en el Pico I se recolectó la primera parte del percolado, correspondiente a proteínas que no se unieron a la matriz aniónica. Posteriormente, se recolectó el siguiente pico (Pico II), seguido de un gradiente de NaCl de 10 mM a 500 mM, durante el cual se obtuvo un tercer pico (Pico III). Aparte, en la Figura 20 B, cerca de los 23 mL, aparece un pico extra (sin nombre) cuando hay un problema con el gradiente debido a un salto de conductancia inesperado que eluyó parte de la proteína retenida.

En la Figura 19 B se puede ver que el Pico I se corresponde con la PRL411-VLB, con una densidad de banda menor con 6.164.941 píxeles (6%). Por este motivo, se decidió concentrar la fracción de PRL411-VLB obtenida a partir de la columna Mono Q utilizando un filtro ultracel amicon ultra 15 (Regenerated cellulose 3000 NMWL).

El Pico II y el III, también contenían una banda correspondiente al peso molecular de la PRL411-VLB. Además, el Pico II también contiene otras proteínas de distinto tamaño molecular, incluyendo a H6-MBP de la cual se quería purificar. En el Pico III se eluye la proteína que permanecía retenida, al aumentar la concentración de NaCl. Nuestros resultados muestran que, aunque PRL411-VLB este cargada positivamente, llamativamente también interacciona parcialmente con la matriz de la Mono Q.

El rendimiento de la purificación fue de 0,9 mg por litro de cultivo cuando se finalizó la purificación mediante Mono S (obtención de la proteína en el eluato), y de 0,6 mg por litro de cultivo mediante Mono Q (obtención de la proteína en el percolado). Esta diferencia se explica por la inesperada retención de la PRL411-VLB en la Mono Q. Con el pico obtenido de la Mono S se continuó trabajando en el marco de la tesina para caracterizar a la PRL411-VLB y para el cribado de los compuestos.

5.2 Caracterización de PRL41I-VLB

Para caracterizar la proteína de interés, previamente producida de forma soluble y con pureza adecuada, se evaluó su estabilidad y actividad mediante técnicas biofísicas y bioquímicas. En este sentido, un aspecto importante a estudiar fue la influencia del pH y la composición del amortiguador en la estabilidad y actividad enzimática. Para ello evaluamos tres amortiguadores específicos:

1. **Amortiguador de almacenamiento:** Tris 50 mM, 100 mM NaCl, pH 8. Previamente se vio que la enzima presentaba poca actividad en condiciones de pH básico; y es un potencial amortiguador para conservar la proteína en condiciones estables.
2. **Amortiguador de reacción fosfato:** compuesto por: fosfato 250 mM, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glicerol, 1% DMSO, pH 5,6. Este amortiguador, adecuado para que la enzima se encuentre activa, fue utilizado en estudios previos para caracterizar los parámetros cinéticos de la proteasa de VLB, ya evaluados y publicados ^{12,19}. Sin embargo, el fosfato tiene limitaciones como amortiguador; debido a que posee 3 valores de pKa (2,5; 7,2; y 12,3), y a pH 5,6 se encuentra lejos del pKa más cercano (7,2), que resulta en una reducción de su capacidad de amortiguación.
3. **Amortiguador de reacción acetato:** compuesto por: acetato 100 mM, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glicerol, 1% DMSO, pH 5,6. Tiene mejores condiciones de amortiguación, este mantiene la misma composición que el amortiguador de reacción 1, pero reemplaza fosfato por acetato, el cual tiene un pKa de 4,76, más cercano al pH de trabajo. Además, posee una menor concentración de sales, ocasionando menor estrés iónico en el sistema. Por lo que se esperaba que favorezca una mayor estabilidad y actividad enzimática de PRL41I-VLB.

5.2.1 Caracterización cinética de PRL41I-VLB

Primero se verificó que la proteína recombinante tuviera actividad enzimática en los dos amortiguadores de reacción (Figura 21).

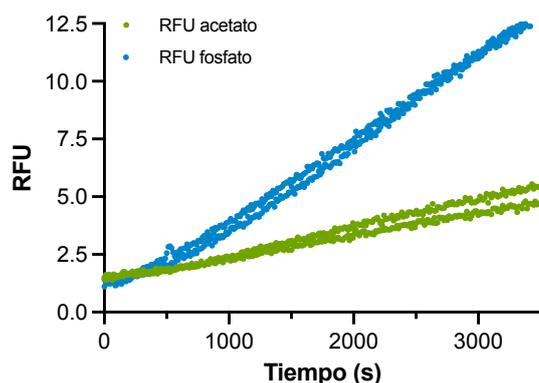


Figura 21. Curso temporal de RFU en función del tiempo (s) de la reacción en presencia del sustrato peptídico fluorogénico CA-NC. La reacción fue realizada con una concentración de PRL411-VLB de 15 nM y sustrato de 10 μM . Se compararon dos amortiguadores de reacción: 1. fosfato (puntos azules) y 2. acetato (puntos verdes), con mediciones por duplicado.

Para evaluar el desempeño de la enzima en los amortiguadores de reacción fosfato y acetato ambos a pH 5,6, se compararon las pendientes de velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM) (Figura 22), siendo la pendiente = $k_{\text{cat}} \cdot [\text{S}] / ([\text{S}] + K_{\text{M}})$ (ec. 1). La pendiente se obtuvo de un ajuste lineal de estos datos, ya que la velocidad de reacción es directamente proporcional a la concentración de la enzima. El valor de la pendiente para el amortiguador de reacción acetato, fue 10 veces menor que para el amortiguador de reacción fosfato. Esto indica que en el amortiguador de reacción fosfato la enzima se encuentra más activa. Por tanto, se eligió solamente el amortiguador fosfato, ya que la enzima presenta mejor desempeño en la actividad enzimática en el amortiguador de reacción fosfato que en el acetato; y no continuamos con posteriores estudios de K_{M} con este segundo amortiguador.

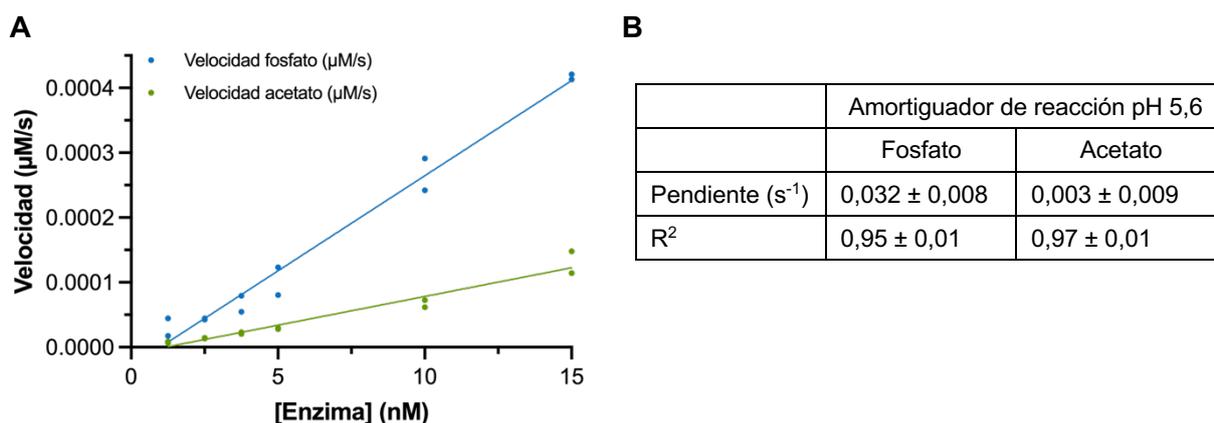


Figura 22. Determinación de la k_{cat} de la enzima PRL411-VLB. A) Curva de velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM) para una concentración de sustrato CA-NC 10 μM en el amortiguador de reacción fosfato en azul y de reacción acetato, en verde, a 37°C, con un ajuste lineal. La velocidad fue determinada de la sección lineal del aumento de producto en función del tiempo. B) Pendientes obtenidas a partir del ajuste lineal de la curva de velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM). Los valores son el promedio de tres medidas independientes \pm el error estándar.

Asimismo, los parámetros cinéticos de K_M y v_{max} de PRL41I-VLB fueron determinados utilizando el sustrato fluorogénico CA-NC, en amortiguador de reacción fosfato pH 5,6 con una concentración de la enzima 10 nM. Para ello, se realizó un ajuste no lineal de Michaelis – Menten de la curva de velocidad de la reacción en función de la concentración del sustrato (Figura 23). El valor de K_M obtenido para el sustrato CA-NC fue $21,9 \pm 4,0 \mu\text{M}$.

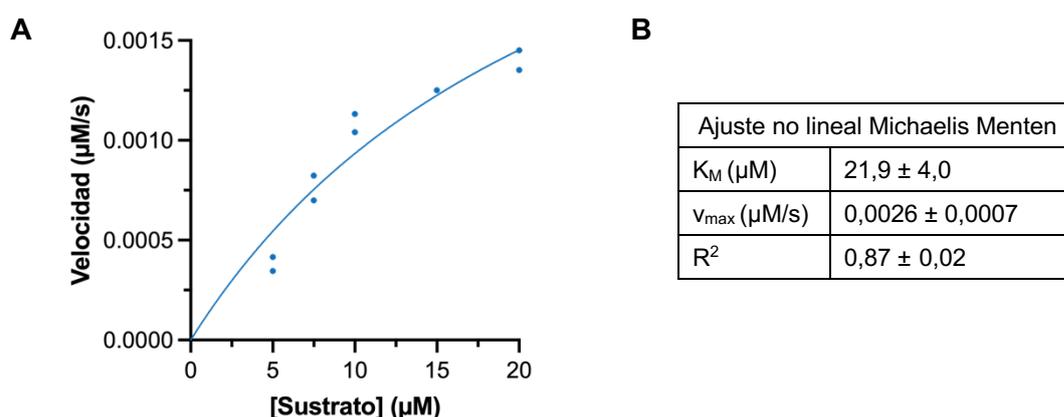


Figura 23. Determinación de la constante de Michaelis-Menten de la enzima PRL41I-VLB. A) Curva de velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración del sustrato CA-NC (μM) para una concentración de la enzima 10 nM en el amortiguador de reacción fosfato a 37°C . La velocidad fue determinada de la sección lineal del aumento de producto en función del tiempo. Los valores se ajustaron a la ecuación no lineal de Michaelis – Menten. B) Valores obtenidos a partir del ajuste no lineal de Michaelis – Menten, los valores son promedios de mediciones triplicadas independientes \pm el error estándar.

Considerando que la enzima contiene un único sitio activo, se estimó el valor del número de recambio, k_{cat} ($0,38 \pm 0,07 \text{ s}^{-1}$) como el cociente entre v_{max} y la concentración de la enzima (Figura 23). Posteriormente, se determinó la eficiencia catalítica k_{cat}/K_M .

Además, con los valores de la pendiente de la velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM) (Figura 22), se calculó la k_{cat} ($0,12 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$) y la eficiencia catalítica k_{cat} / K_M para el amortiguador de reacción fosfato (Tabla 4). Los valores de k_{cat} calculados a partir de las dos estrategias son diferentes, pero del mismo orden.

Tabla 4. Valores de k_{cat} y k_{cat} / K_M calculados a partir de: A) la pendiente del ajuste lineal de la curva de velocidad ($\mu\text{M/s}$) en función de la concentración de la enzima (nM) (Figura 22); B) la v_{max} determinada en el ajuste no lineal de Michaelis – Menten (Figura 23).

	A	B
k_{cat} (s^{-1})	$0,12 \pm 0,02$	$0,38 \pm 0,07$
k_{cat} / K_M ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	$5,5 \pm 1,4$	$17,4 \pm 4,5$

5.2.2 Estudio de la actividad de auto-proteólisis de PRL41I-VLB

Se analizó la actividad de auto-proteólisis de la enzima PRL41I-VLB, que tiene la mutación estabilizadora en uno de sus sitios de auto-proteólisis. Para esto, se incubó a la enzima a 30 °C durante 24 horas en el amortiguador de almacenamiento (tris, pH 8), amortiguador de reacción fosfato (pH 5,6) y acetato (pH 5,6). Se tomaron alícuotas antes de incubar (tiempo 0) y a los tiempos crecientes de: 0,5, 1, 2, 4 y 24 horas, frenando inmediatamente la reacción al mezclar con amortiguador de carga de SDS-PAGE 6x. Posteriormente, se analizaron las muestras mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 15% en presencia de SDS (Figura 24).

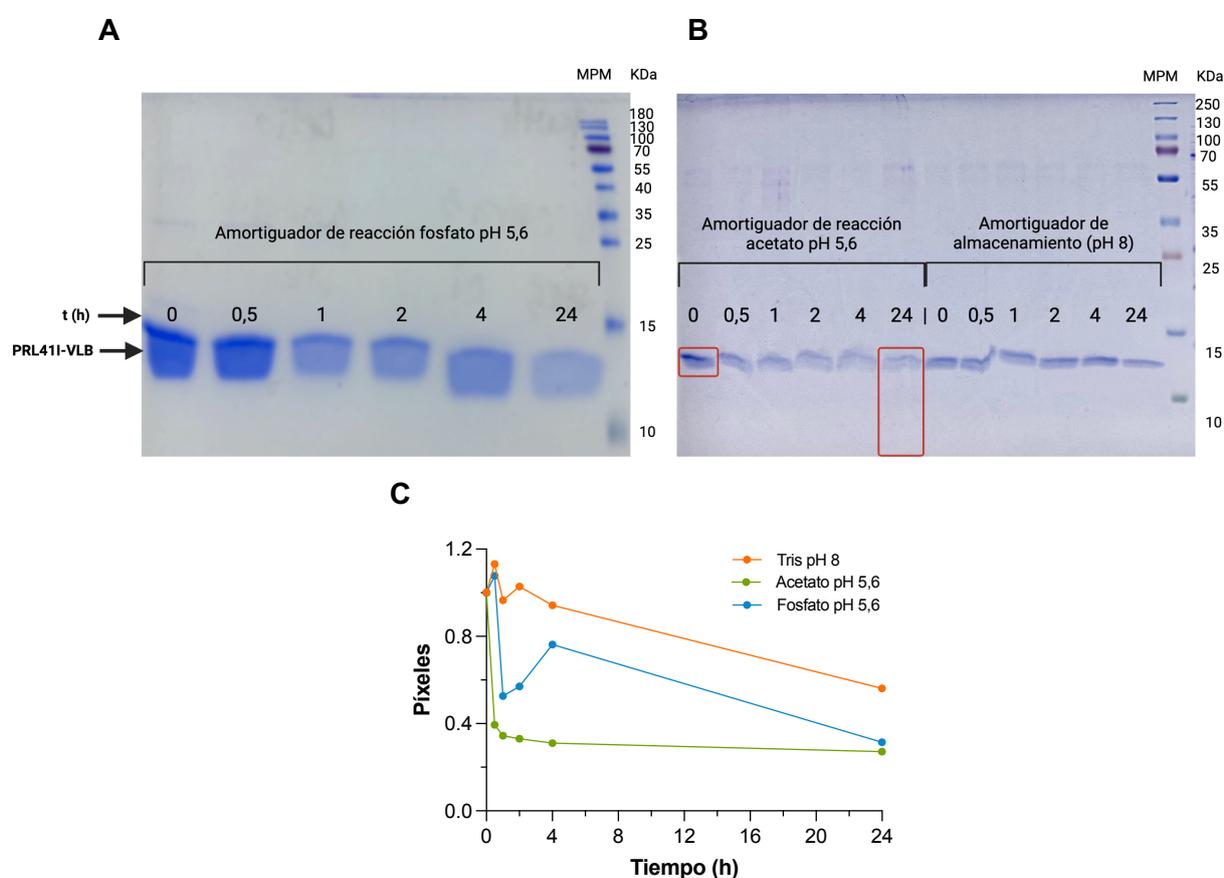


Figura 24. Estudio de la influencia de los tres amortiguadores en la actividad de auto-proteólisis de PRL41I-VLB. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS 15% convencional de la cinética de auto-proteólisis de PRL41I-VLB a 30 °C, en amortiguador de reacción fosfato en (A); y, en (B) amortiguador de reacción acetato y amortiguador de almacenamiento. En cada carril se indica el tiempo de incubación en el cual se tomó la muestra y el marcador de peso molecular correspondiente (MPM), PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, en el gel (A) de 10 a 180 kDa y en (B) de 10 a 250 kDa. Los recuadros rojos indican los posteriores recortes del gel que se analizaron por LC-MS/MS. (C) **Análisis de densitometría** de los geles normalizados en (A) y (B) realizados en Image J.

Nuestros resultados muestran que, la intensidad de la banda correspondiente a PRL41I-VLB disminuye a lo largo del tiempo cuando se la incubó con los tres amortiguadores (Figura 24).

Esta disminución, en el caso del amortiguador de almacenamiento es notoriamente menor respecto a los amortiguadores de reacción, como se observa en análisis por densitometría de las bandas (Figura 24 C). Además, se puede notar en la Figura 24 C, que para los amortiguadores de reacción fosfato y acetato la digestión es inicialmente rápida y luego se enlentece. Para el caso del amortiguador de reacción fosfato parece haber una leve disminución en el peso molecular de las bandas de PRL41I-VLB en el tiempo, sugiriendo que la proteína se está fragmentando lentamente. Esta disminución podría deberse a la actividad de auto-proteólisis de la proteasa en su región C-terminal que se encuentra libre. Para los casos de amortiguador de almacenamiento y de reacción acetato no se visualiza tan claro este efecto.

Con el objetivo de identificar los sitios de auto-proteólisis, analizamos por espectrometría de masas la banda de PRL41I-VLB del carril correspondiente a las 0 horas, y la región por debajo de la banda de PRL41I-VLB del carril correspondiente a las 24 horas, como se muestran los recuadros en rojos de la Figura 24 B. Se extrajeron los péptidos de los recortes de gel ya tripsinizados y se analizaron por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS). Buscamos identificar péptidos no trípticos de manera de identificar sitios de auto-proteólisis de la proteasa. No obstante, mediante esta técnica nuestros resultados no nos permitieron identificar péptidos no trípticos correspondientes a la PR-VLB. Por lo que, no alcanzamos una conclusión específica sobre otros posibles sitios de auto-proteólisis.

5.2.3 Estudio de la estabilidad termodinámica de PRL41I-VLB

Se evaluó la estabilidad termodinámica de PRL41I-VLB en los 3 amortiguadores. Se analizó el efecto en la fluorescencia intrínseca a 330 y 350 nm, a medida que aumenta la temperatura de 20 a 95 °C a una tasa de 1 °C min⁻¹ (Figura 25 A). A partir de la relación de fluorescencia 350/330 nm frente al gradiente de temperatura, obtuvimos el punto de inflexión (T_m) así como la temperatura a la que comienza el despliegue térmico (T_{on}) de PRL41I-VLB (Figura 25 B).

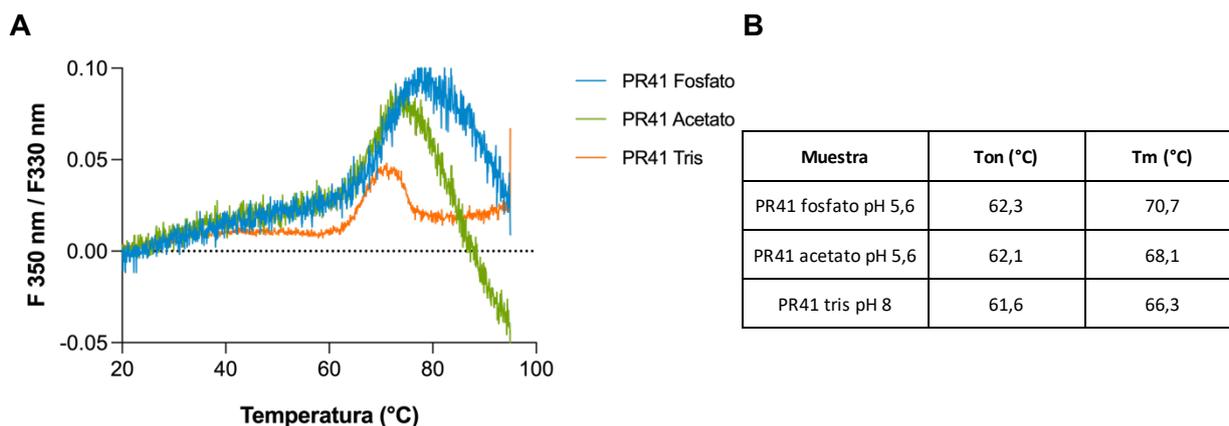


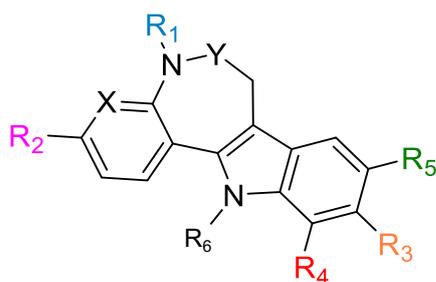
Figura 25. A) Relación de fluorescencia a 350 nm / 330 nm de la PRL41I-VLB frente al gradiente de temperatura, disueltos 1/5 en cada amortiguador; de reacción fosfato, de reacción acetato y de almacenamiento. B) Tabla de los valores de temperatura de inicio (Ton) y de fusión (Tm) de la PRL41I-VLB (PR41) en las diferentes soluciones obtenido de la gráfica en A.

Los resultados mostraron que PRL41I-VLB en el amortiguador de reacción fosfato muestra la Tm de mayor valor ($T_m = 70,7 \text{ }^\circ\text{C}$), $2,6 \text{ }^\circ\text{C}$ por encima que el del amortiguador de reacción acetato ($T_m = 68,1 \text{ }^\circ\text{C}$), y $4,4 \text{ }^\circ\text{C}$ de el de almacenamiento (tris, pH 8) (Tabla en la Figura 25 B). A la vez, este resultado es concordante con la Ton, que aumenta coincidiendo en el mismo orden que la Tm. Valores de Tm y el Ton altos implican que la proteína es estructuralmente más estable. Esto indica que PRL41I-VLB es estructuralmente más estable en el amortiguador de reacción fosfato.

5.3 Cribado de las paullonas

Se cribó la actividad inhibidora de PRL41I-VLB de 166 compuestos pertenecientes a la familia de las paullonas, análogos o fragmentos de esta misma, mediante un ensayo de actividad en placa de 96 pocillos. El ensayo implica incubar, durante 30 minutos a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, una mezcla de PRL41I-VLB e inhibidor ($10 \text{ } \mu\text{M}$). Luego, se inicia la reacción con el agregado de sustrato con una concentración sub-KM ($5 \text{ } \mu\text{M}$). Se consideró como *hit* cualquier compuesto que inhibiera al menos el 50% de la actividad enzimática. Esta estrategia de ensayo fue dirigida para encontrar inhibidores de la PR con un IC_{50} menor o igual a $10 \text{ } \mu\text{M}$.

De los 166 compuestos identificamos 25 *hits* con una buena relación señal-ruido y factor Z (Tabla 5), todos con el esqueleto completo de paullonas. Los *hits* se pueden clasificar en 3 grupos según su estructura consenso (A, B y C), con algunas variaciones en el sistema de anillos y por sus distintos sustituyentes en cada posición (Rs) (Figura 26).



Estructura **A**:
X=CH, Y = CO

Estructura **B**:
X=N, Y=CO

Estructura **C**:
X=CH, Y=CH₂

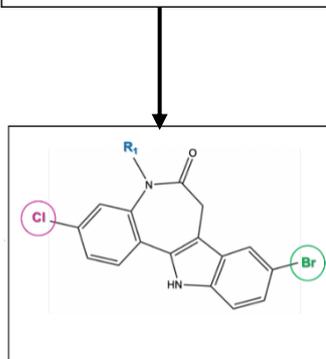
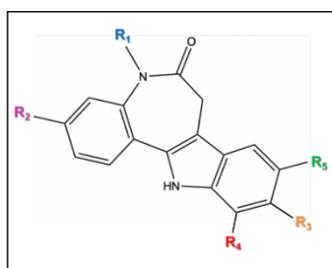
Figura 26. Estructura consenso de los compuestos que inhibieron a PRL41I-VLB en más de un 50% de su actividad enzimática, pertenecientes a la familia de las paullonas (estructura A) y análogo de las paullonas con el esqueleto heterocíclico modificado (estructura B) con sus posibles sustituyentes (R1, R2, R3, R4, R5 y R6); y, por último, la estructura C: análogo de las paullonas sin el grupo carbonilo (=O), con sustituyentes adicionales cloro en R2 y bromo en R3.

Dieciocho compuestos comparten la estructura A, (7,12-dihidrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-ona), ésta estructura tienen un anillo de benceno fusionado al anillo de azepina, que lo hace relativamente hidrofóbico. Esta configuración es propia de las paullonas, donde se ha reportado que anillos aromáticos, como el benceno en este caso, contribuyen a la afinidad del compuesto con ciertas enzimas, como la polimerasa NS5B del virus de la hepatitis C ⁵⁸. Mientras que, los seis compuestos que comparten la estructura B (7,12-dihidropirido[2',3':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-ona) que dieron *hits*, tienen un anillo de piridina (en lugar del anillo de benceno) fusionado al anillo de azepina. La piridina tiene un heteroátomo de nitrógeno en su anillo, que modifica las propiedades electrónicas de la estructura, aumentando la polaridad, ofreciendo un potencial sitio para la formación de enlaces de hidrógeno. Por último, se encontró un único compuesto con la estructura C, 859: KuOrb133 (9-bromo-3-cloro-5,6,7,12-tetrahidrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol), con 60,8 % de inhibición, que mantiene el esqueleto estructural de las paullonas, pero carece del grupo carbonilo (=O) en la posición 6 del anillo de azepina.

Tabla 5. Resumen de los compuestos que inhibieron en más del 50% de la actividad enzimática a PRL41I-VLB, ordenados por su estructura consenso. Cada compuesto se encuentra indicado con su número, clasificación, código y nombre de la quimioteca del Laboratorio de Biología redox de Tripanosomas IPMont, el porcentaje promedio de inhibición y sus sustituyentes. Se representan los compuestos coloreados en verdes que superan más del 90% de inhibición, amarillo que se encuentran entre 80 y 90 %; y rojo en menos del 80% de inhibición.

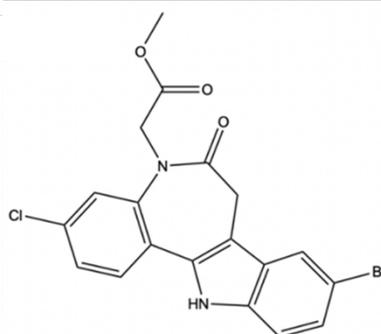
n° de compuesto	Estructura	Código	Nombre	% inhibición 10 µM	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	A	397	KURK 221	100,0	C6H5-CH2-NH-CO-CH2 (Un grupo fenetilo unido a un grupo amida, seguido de un grupo metileno).	Cl	Br	-	-	-
2	A	365	KuRK 114	97,6	3-(dietoximetil)-2-metil-1-(fenilsulfonil)-1H-pirrol	Cl	Br	-	-	-
3	A	766	KuOrb 117	95,0	carbamato de tert-butilo (4-acetamidobutilo)	Cl	Br	-	-	-
4	A	406	KURK 256	93,0	carbamato de tert-butilo (2-acetamidoetilo)	Cl	Br	-	-	-
5	A	614	KuOrb 63	92,5	N-(1,3-dihidroxi-2-(hidroximetil)propan-2-il)acetamida	Cl	Br	-	-	-
6	A	625	Korb 81	89,5	N-(1H-1,2,4-triazol-3-il)acetamida	Cl	Br	-	-	-
7	A	140	KuRK 60	88,0	acetato de metilo	Cl	Br	-	-	-
8	A	762	KuOrb 111	86,6	carbamato de tert-butilo (2-(2-(2-acetamidoetoxi)etoxi)etilo)	Cl	Br	-	-	-
9	A	617	Korb66	86,5	N-etilacetamida	Cl	Br	-	-	-
11	A	470	KuOrb38	82,5	N-(2-clorobencil)acetamida	Cl	Br	-	-	-
13	A	476	KuOrb46	76,8	N-(4-(trifluorometil)bencil)acetamida	Cl	Br	-	-	-
14	A	616	Korb65	73,3	N-(1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida	Cl	Br	-	-	-
15	A	398	KuRK 268	71,4	N-fenilacetamida	Cl	Br	-	-	-
16	A	1073	KuMue090	67,8	N-(2-(2-(4-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetrametil-5H-4λ4,5λ4-dipirrol[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborin-10-il)fenil)-1H-1,2,3-triazol-1-il)etoxi)etoxi)etilo)acetamida		Br	-	-	-
17	A	362	KuRK 174	66,1	acetato de etilo	Cl	Br	-	-	-
19	A	618	KuOrb 69	64,5	N-(5-metil-1H-pirazol-3-il)acetamida	Cl	Br	-	-	-
21	A	364	KuRK 93	62,0	-	Cl	Br	methyl-λ1-oxidane	-	-
24	A	624	Korb 80/2	56,5	-	Cl	Br	-	-	etano
10	B	413	KuMai 348EE	86,1	-	No	No	-	N-benzylacrylamide	-
12	B	416	KuMai 339	77,0	-	No	No	-	ác carboxílico	-
18	B	412	KuMai 360EE	65,3	-	No	No	N-phenylacrylamide	-	-
20	B	417	KuMai 405	63,3	-	No	No	-	F	-
23	B	422	KuMai 380	60,2	-	No	No	-	1-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one	-
25	B	426	KuMai 381	51,5	-	No	No	1-(4-chlorophenyl)prop-2-en-1-one	-	-
22	C	859	KuOrb133*	60,8	-	Cl	Br	-	-	-

En caso del grupo A, todos los *hits* poseen un átomo de cloro en R2 y de bromo en R3 (Figura 27), conocidos como clorokenpaullonas⁵⁹. La mayoría (16 de 18 compuestos) presentan variaciones en la posición R1, que se encuentran enlazados al átomo de nitrógeno en la posición 5 del anillo de azepina. Se puede subclasificar la estructura A en seis subgrupos según los grupos funcionales presentes en los sustituyentes: 1) éster (2 *hits*), 2) acetamida y/o acetamida con carbamato (12 *hits*), 3) pirrol (1 *hit*), 4) borodipirrometano (1 *hit*), también conocido como BODIPY (4-4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno), y 5) un único *hit* con sustituyente (metoxi) en R4, y 6) un sustituyente (etano) en R6. En los primeros cuatro subgrupos los sustituyentes se encuentran en R1, y para los últimos dos en R4 y R6, respectivamente. Además, los últimos cuatro grupos son *singletos*, compuestos que no se relacionan estrechamente con los demás grupos.



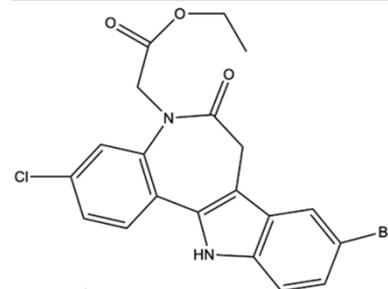
1) Ésteres – contienen el grupo funcional éster (-COO-)

7: 140: KuRK 60: 88%



Methyl 2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5(6H)-yl)acetate

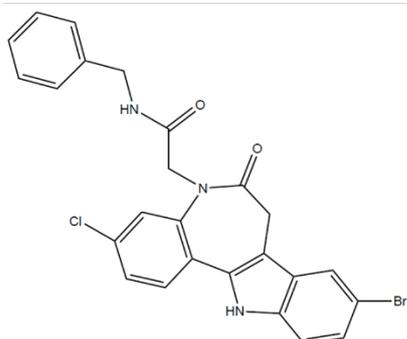
17: 362: KuRK 174: 66%



Ethyl 2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5(6H)-yl)acetate

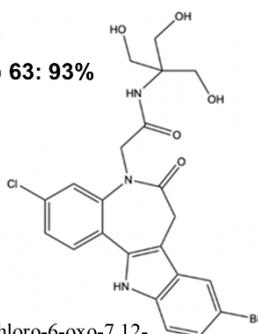
2) Acetamidas – contienen el grupo funcional acetamida (-CONH-)

1: 397: KuRK 221: 100%



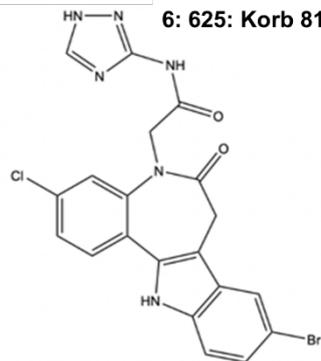
N-benzyl-2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5(6H)-yl)acetamide

5: 614: KuOrb 63: 93%

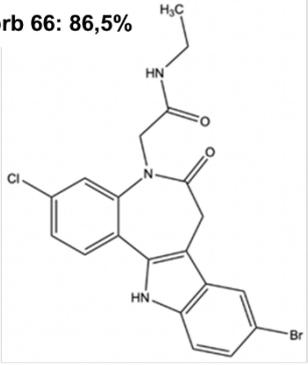
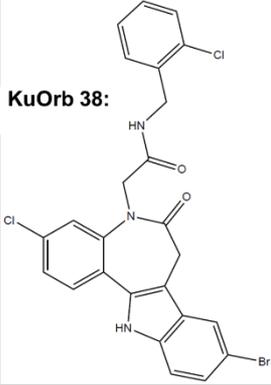
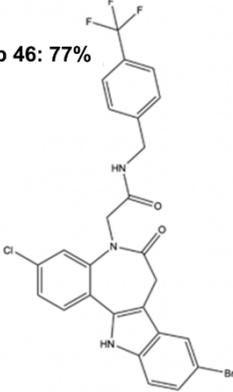
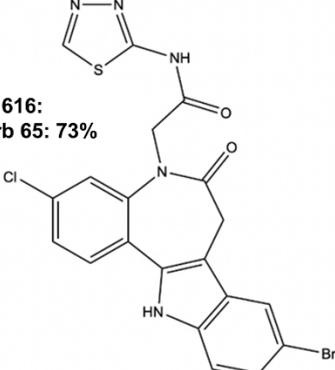
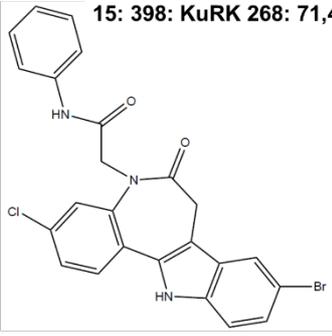
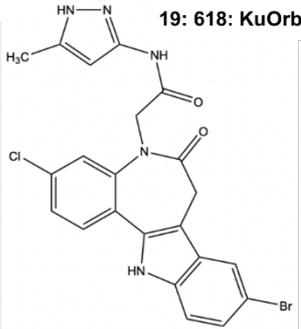
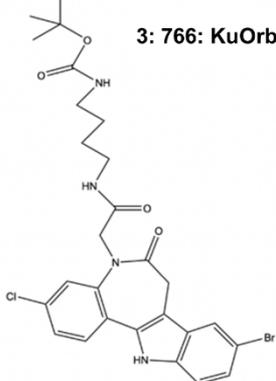
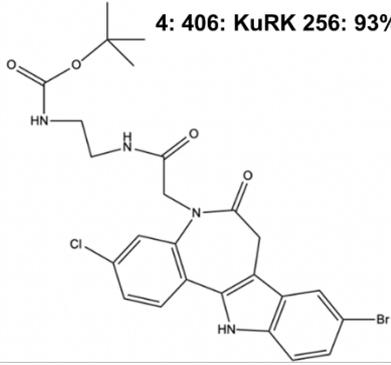
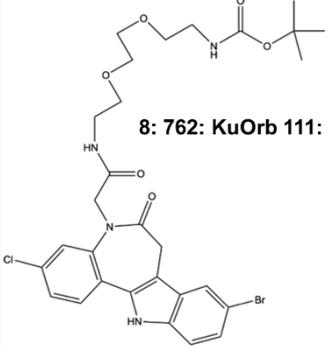


2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5(6H)-yl)-*N*-(1,3-dihydroxy-2-(hydroxymethyl)propan-2-yl)acetamide

6: 625: Korb 81: 90%



2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5(6H)-yl)-*N*-(1H-1,2,4-triazol-3-yl)acetamide

<p>9: 617: Korb 66: 86,5%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-ethylacetamide</p>	<p>11: 470: KuOrb 38: 83%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-(2-chlorobenzyl)acetamide</p>	<p>13: 476: KuOrb 46: 77%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-(4-(trifluoromethyl)benzyl)acetamide</p>
<p>14: 616: Korb 65: 73%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-(1,3,4-thiadiazol-2-yl)acetamide</p>	<p>15: 398: KuRK 268: 71,4%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-phenylacetamide</p>	<p>19: 618: KuOrb 69: 65%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)-<i>N</i>-(5-methyl-1<i>H</i>-pyrazol-3-yl)acetamide</p>
<p>Acetamidas - Carbamatos (que contienen el grupo funcional carbamato (-OCONH-))</p>		
<p>3: 766: KuOrb 117: 95%</p>  <p><i>tert</i>-butyl (4-(2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)acetoamido)butyl)carbamate</p>	<p>4: 406: KuRK 256: 93%</p>  <p><i>tert</i>-butyl (2-(2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)acetoamido)ethyl)carbamate</p>	<p>8: 762: KuOrb 111: 87%</p>  <p><i>tert</i>-butyl (2-(2-(2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino [4,5-<i>b</i>]indol-5(6<i>H</i>)-yl)acetoamido)ethoxy)ethyl)carbamate</p>

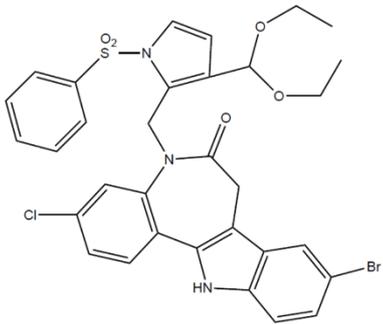
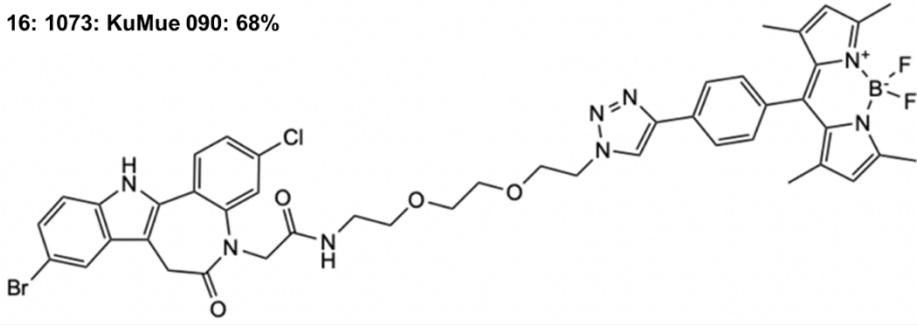
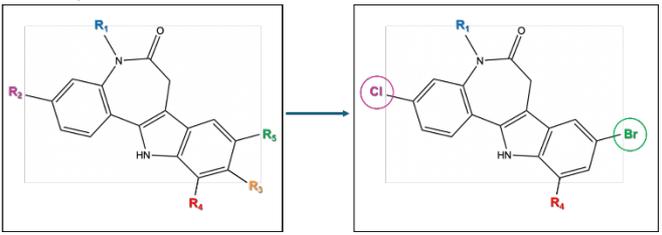
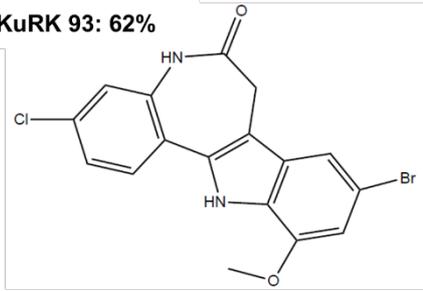
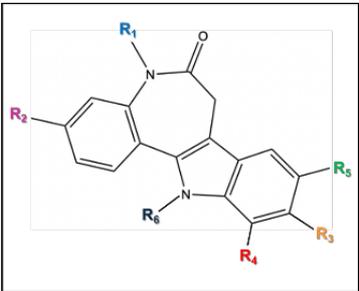
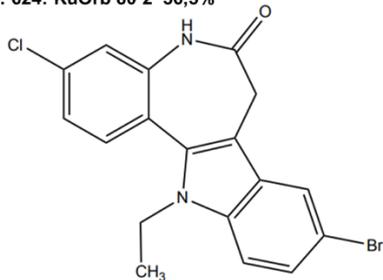
<p>3) Pirrol – contiene el anillo de pirrol</p>	<p>2: 365: KuRK 114: 98%</p>  <p>9-bromo-3-chloro-5-((3-(diethoxymethyl)-1-(phenylsulfonyl)-1H-pyrrol-2-yl)methyl)-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-one</p>
<p>4)</p>	<p>16: 1073: KuMue 090: 68%</p>  <p>2-(9-bromo-3-chloro-6-oxo-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-yl)-N-(2-(2-(2-(4-(5,5-difluoro-1,3,7,9-tetramethyl-5H-4λ4,5λ4-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,2]diazaborinin-10-yl)phenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl)acetamide</p>
<p>5)</p> 	<p>21: 364: KuRK 93: 62%</p>  <p>9-bromo-3-chloro-11-methoxy-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-one</p>
<p>6)</p> 	<p>24: 624: KuOrb 80 2 56,5%</p>  <p>9-bromo-3-chloro-12-ethyl-7,12-dihydrobenzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-one</p>

Figura 27. Estructuras de los compuestos que dieron *hit* contra PRL41-VLB pertenecientes a la estructura A. Cada compuesto se encuentra organizado según su subgrupo, con su código, nombre y porcentaje de inhibición.

En el caso de la estructura B, un análogo del esqueleto original de la estructura de paullonas (7,12-dihidropirido[2',3':2,3]azepino[4,5-b]indol-6(5H)-ona), encontramos que los sustituyentes varían solamente en la posición R4 y R5 en los 6 *hits* identificados (Figura 28). Se pueden subclasificar en tres subgrupos: 1) Con estructuras aromáticas en los sustituyentes, 2) un *hit* con grupo carboxilato en R5, y 3) otro *hit* con un átomo de flúor en R5.

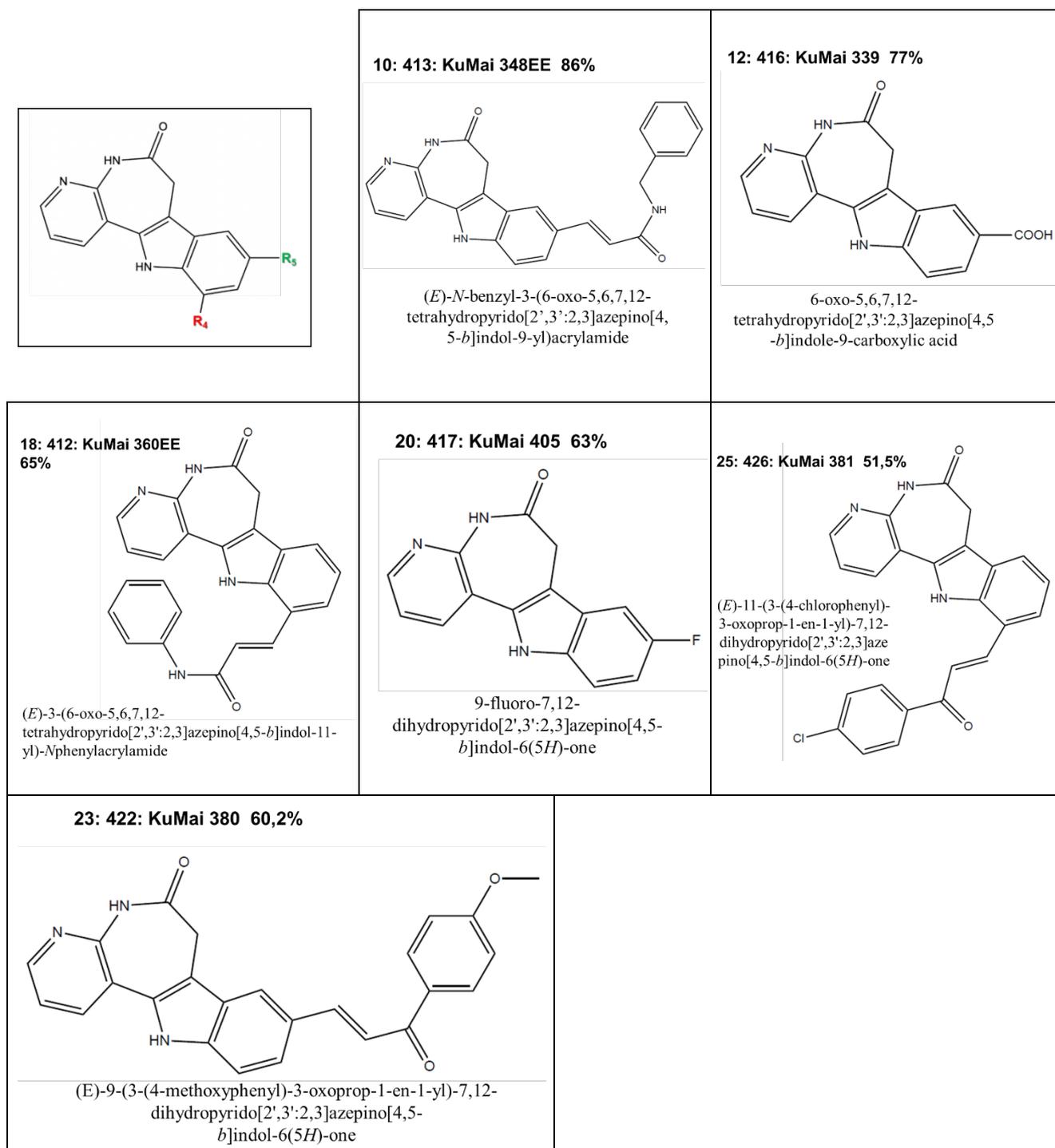


Figura 28. Estructuras de los compuestos que dieron *hit* contra PRL41I-VLB pertenecientes a la estructura B, organizado según su subgrupo con su código, nombre y porcentaje de inhibición.

5.4 Determinación del valor de IC₅₀ de compuestos seleccionados

A partir de los *hits* obtenidos en el cribado, procedimos a determinar los IC₅₀ de 4 compuestos seleccionados según su disponibilidad y priorizando aquellos con mayor porcentaje de inhibición a 10 µM. Se incubó la enzima PRL411-VLB, bajo las mismas condiciones que en el cribado, pero, variando la concentración del compuesto (de 0,14 a 100 µM). Para cada concentración del compuesto se obtuvo una gráfica de fluorescencia relativa en función del tiempo, de la cual se logró obtener la tasa de cambio (pendiente). Posteriormente se graficaron las pendientes en función de las concentraciones de los compuestos y se ajustó a una curva adecuada de 3 parámetros de inhibidor vs respuesta (ver sección 4.8). Esto nos permitió obtener la concentración del compuesto necesaria para reducir en un 50% la actividad enzimática de 10 nM de enzima, mejor conocida como IC₅₀. Los valores obtenidos fueron del orden µM y se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Valores de IC₅₀ (µM) correspondientes a la concentración del compuesto que inhibe el 50% de la actividad enzimática de PRL411-VLB. Cada compuesto se encuentra indicado con el número, código y nombre (según denominación en la quimioteca del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomádos), el porcentaje promedio de inhibición (con n=3) e IC₅₀ correspondiente.

Número de compuesto	Estructura	Código	Nombre	% inhibición a 10 µM	IC ₅₀ (µM)
1	A	397	KURK 221	100 ± 2	5,2
4	A	406	KURK 256	93 ± 6	3,6
5	A	614	KuOrb 63	93 ± 5	3,5
10	B	413	KuMai 348EE	86 ± 4	5,6

6 Discusión

En esta tesis de grado se purificó y caracterizó a la PRL41I-VLB, una variante de la enzima PR-VLB nativa diseñada para disminuir su actividad de auto-proteólisis. Además, se hizo una búsqueda de inhibidores de PRL41I-VLB dentro de una familia de compuestos denominados paullonas.

6.1 Expresión, purificación y caracterización de la PRL41I-VLB

En la expresión y purificación de PRL41I-VLB en *E.coli*, se obtuvo a la proteína recombinante, verificada por espectrometría de masa, activa, y con un alto grado de pureza. No obstante, el rendimiento de la purificación podría haber sido mayor, debido a que parte de la proteína no se logró recuperar completamente. En este sentido, algunas etapas podrían ser optimizadas. En particular, en ambas etapas de la purificación por IMAC, en el percolado se observaron proteínas fusionadas a una etiqueta de poli-histidinas, que no se retuvieron en la matriz de afinidad Ni-NTA. Este resultado podría deberse a un exceso de proteína en relación con la cantidad de la matriz Ni-NTA utilizada, lo que limita su capacidad de retener todas las proteínas de interés. Por otro lado, no se puede descartar que parte de la proteína producida no tuviera la cola de poli-histidinas completamente expuesta. Algunas posibles soluciones podrían ser ajustar la proporción de matriz y sobrenadante, y/o disminuir la concentración de imidazol en el amortiguador de lisis y lavado.

En la etapa final de la purificación que involucra un intercambio iónico, exploramos si el intercambio aniónico era una alternativa viable para su purificación. Esperábamos con esta estrategia obtener a la enzima en el percolado y que las proteínas contaminantes se retengan en la columna. De esta manera, se evitaría aumentar la concentración de la PRL41I-VLB, dado que a concentraciones altas la enzima parece ser más propensa a auto-proteolizarse. Al evaluar el rendimiento y la efectividad de la etapa de purificación por intercambio iónico, la columna del intercambio catiónico fue más eficiente que la del intercambio aniónico. Esta diferencia se explica por la retención de la PRL41I-VLB en la Mono Q, que podría deberse a que la proteína contenga algún residuo cargado negativamente expuesto que cause interacción con la matriz de la columna, impidiendo que la proteína pase en su totalidad al percolado como se esperaba. Una solución al problema podría ser aumentar la concentración de sales para evitar que se retenga la proteína en la columna. Por otro lado, el eluato de la Mono S no contiene la totalidad de PRL41I-VLB, indicando que perdemos proteína en esta etapa. Esto probablemente se deba a que, cuando aumenta la concentración de la enzima, esta se auto-proteoliza. Por lo tanto, considerando que la columna Mono Q no resultó efectiva,

una alternativa para evitar concentrar la muestra durante la purificación podría ser incorporar un paso de gel filtración.

Una vez mejorados los aspectos de la purificación, si bien obtuvimos suficiente proteína para alcanzar nuestros objetivos, sería conveniente mejorar los niveles de expresión basal para experimentos que requieran mayor cantidad de proteína, como por ejemplo los ensayos de cristalografía. Hay varios detalles por mejorar para poder obtener una mejor cantidad de proteína por litro de cultivo. Una de ellas podría ser utilizar un medio de cultivo con más nutrientes y complementos. Por ejemplo, el Terrific Broth (TB), que a diferencia de 2YT contiene glicerol, que ayuda a reducir el estrés por exceso de nutrientes, y un amortiguador con sales de fosfato, que puede soportar la acidificación del cultivo, entre otras cualidades. Por lo tanto, podría llegar a permitir una mayor densidad celular por mL de cultivo, y una mejora en el rendimiento de mg proteína por mL de cultivo ⁶⁰. Por otro lado, el vector de expresión utilizado permite la producción de la proteasa, pero tiene la desventaja que se expresa MBP libre en exceso, dificultando la purificación de PRL41I-VLB. Para resolver este inconveniente, se podría clonar PRL41I-VLB a otro vector, por ejemplo, uno con tioredoxina (disponible en el laboratorio), en lugar de MBP, que no se ha observado que exprese tioredoxina libre ⁵⁵. Quizás con esta nueva construcción, se podría llegar a purificar PRL41I-VLB con un alto grado de pureza por afinidad a histidina, sin etapas adicionales como intercambio iónico o exclusión molecular.

Los parámetros cinéticos obtenidos de la PRL41I-VLB para el sustrato CA-NC y el amortiguador de reacción fosfato utilizado (Figuras 22 y 23) presentan ciertas diferencias con los reportados para la proteasa nativa PR-VLB (Tabla 7) ¹². El valor de la K_M con la mutación en PR (PRL41I-VLB, $21,9 \pm 4 \mu M$) aumenta aproximadamente 6 veces más que la proteasa nativa (PR-VLB, $3,4 \pm 0,7 \mu M$), lo que sugiere que la mutación en la posición L41I disminuye la interacción y afinidad de la enzima por el sustrato CA-NC. Esto implica que la enzima mutada requiere una mayor concentración de sustrato para alcanzar la mitad de su velocidad máxima. Como la leucina esta cercana al sitio activo de la enzima, es coherente pensar que pudo haber afectado la interacción de la enzima con el sustrato.

En cambio, la k_{cat} de PRL41I-VLB, que representa el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en producto por unidad de tiempo cuando la enzima está saturada; este parámetro no cambió notablemente en comparación con PR-VLB. Utilizando la velocidad máxima del ajuste no lineal de Michaelis Menten, se obtuvo un valor de k_{cat} de $0,38 s^{-1}$ del mismo orden al reportado para PR-VLB ($0,33 s^{-1}$) calculada de la misma manera. Lo mismo observamos cuando el k_{cat} se calculó a partir de la velocidad en función de la concentración de enzima,

valor de k_{cat} $0,12 \text{ s}^{-1}$ y $0,21 \text{ s}^{-1}$, PR-VL41I y PR-VLB, respectivamente ¹². Esto sugiere que, aunque la mutación afecta la interacción inicial (afinidad), no tiene un impacto considerable en la capacidad catalítica de la enzima una vez que el sustrato está unido al sitio activo.

Por último, la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) varía al tener un K_M más grande de la PRL41I-VLB ($17,4$ vs $61 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$), que refleja una menor eficiencia enzimática para convertir el sustrato en producto. Esto se debe a una menor afinidad de la enzima por el sustrato.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de PR-VLB con el sustrato fluorogénico CA-NC. Adaptado de Fló y colaboradores ¹².

parameter	CA-NC
K_M (μM) ^(a)	3.4 ± 0.7
k_{Cat} (s^{-1}) ^(b,c,d)	0.33 ± 0.07 ^(c)
	0.21 ± 0.05 ^(d)
k_{Cat}/K_M ($\text{mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ^(e)	61 ± 11

(a) K_M , las constantes de Michaelis-Menten, se calcularon a partir de los ajustes no lineales de las gráficas de v frente a la concentración de sustrato. Los valores son promedios de mediciones duplicadas independientes \pm el error estándar ($n \geq 3$).

(b) k_{Cat} , las constantes catalíticas, se calcularon mediante dos métodos. Los valores son promedios de mediciones duplicadas independientes \pm el error estándar ($n \geq 3$).

(c) Los valores de k_{cat} se calcularon a partir de los ajustes no lineales de las gráficas de velocidad frente a la concentración de sustrato.

(d) Los valores de k_{cat} se calcularon a partir de los ajustes lineales de las gráficas de v frente a la concentración de enzima.

(e) k_{cat}/K_M , las constantes de especificidad, se calcularon a partir de los valores de k_{cat} en (c) y los valores de K_M .

A pesar de que la mutación afecta la eficiencia catalítica estabiliza a la proteasa, evitando que se auto-proteolice. Esto se verificó en los estudios de auto-proteólisis donde a las 24 horas de incubación se sigue observando la banda correspondiente a la proteína en los tres amortiguadores estudiados. En contraposición la PR-VLB nativa a las 2 horas de estar incubada en el amortiguador de reacción fosfato desaparece completamente esta banda (Figura 12, sección 1.4.1).

Sin embargo, los resultados denotan, que, aunque PR-VLB fue estabilizada, aún posee cierta actividad auto-proteolítica. Se observó que la densidad de la banda correspondiente a PRL41I-VLB disminuye durante la incubación en los tres amortiguadores. La enzima continúa siendo inestable, probablemente porque sigue teniendo actividad auto-proteolítica ya sea en el sitio mutado y/o en algún otro sitio que no identificamos aún. Lamentablemente los estudios de espectrometría de masa no nos dieron información en este sentido. Si bien no podemos descartar que se siga hidrolizando en la isoleucina de la mutación, es altamente probable que tenga otros sitios de proteólisis. De hecho, las proteasas de VIH y VLTH se identificaron además del sitio principal de corte, otros sitios de cortes secundarios ⁶¹. Para identificar los sitios de corte de la PRL41I-VLB se deberían abordar nuevas estrategias, como, por ejemplo;

realizar las incubaciones similares a las descritas en este estudio y, posteriormente separar los péptidos generados mediante HPLC para analizarlos por espectrometría de masas. Esta metodología podría aislar los péptidos facilitando el análisis por espectrometría y de esta manera identificar los sitios de proteólisis.

En el caso del amortiguador de almacenamiento a pH 8 la disminución de la banda es notoriamente menor respecto a los amortiguadores de reacción fosfato y acetato a pH 5,6. Esto es esperable ya que la enzima se encuentra menos activa en un amortiguador alcalino, porque tiene un pH óptimo ácido. Si bien este amortiguador es menos favorable para su actividad catalítica, la proteasa aún podría estar sufriendo el proceso de auto-proteólisis, pero más lento que en los amortiguadores específicos para su correcta actividad. Por lo tanto, se eligió este amortiguador para almacenar a la PRL41I-VLB. Entre los amortiguadores de reacción fosfato y acetato no se observaron mayores diferencias en la actividad auto-proteolítica, aunque en la actividad enzimática si hay un cambio notorio entre estos amortiguadores.

Por otro lado, los resultados de la estabilidad termodinámica (T_m y T_{on}) mostraron que PRL41I-VLB en el amortiguador de reacción fosfato (pH 5,6) tiene una mayor estabilidad estructural termodinámica que en el amortiguador de reacción acetato (pH 5,6), y esta segunda mayor que en el de almacenamiento (tris, pH 8). Esto indica que PRL41I-VLB es estructuralmente más estable en el amortiguador de reacción fosfato. Si bien en el amortiguador de almacenamiento es estructuralmente menos estable, presenta menos actividad auto-proteolítica. Por lo que, cuanto mayor estabilidad termodinámica, mayor actividad enzimática, y por lo tanto auto-proteolítica.

6.2 Cribado enzimático de PRL41I-VLB de una biblioteca de paullonas

En cuanto al cribado enzimático, además de encontrar compuestos que inhiben a la PRL41I-VLB (un 15% de la biblioteca analizada), también encontramos similitudes entre estos compuestos que dieron *hits* dentro de las paullonas o análogos. Cabe consignar que la biblioteca cribada contenía no solo paullonas y análogos, sino también fragmentos de las mismas. Un resultado importante de esta tesina es que ninguno de los 25 *hits* fueron fragmentos de paullonas, sino que poseían el esqueleto completo. Esto nos lleva a afirmar que, efectivamente la estructura completa de las paullonas es muy importante para tener capacidad inhibitoria de PRL41I-VLB.

Los compuestos con mayor porcentaje de inhibición corresponden a la estructura A (Tabla 5). Dentro de esa estructura, los compuestos activos fueron aquellos con Cl como R2 y Br como R3. Aquellos que tienen como sustituyente R1, una acetamida o un pirrol, en la posición N5 de las paullonas, resultaron con mayor inhibición. Resulta interesante que las paullonas N5 sustituidas, mantienen capacidad inhibitoria de la enzima trypanotona sintetasa de *Trypanosoma brucei*, pero pierden esta capacidad inhibitoria de quinasas de proteínas CMGC en mamíferos⁵⁹. Esto sugiere que esta sustitución tiene diferentes efectos sobre la inhibición de distintas enzimas.

Por otro lado, estos resultados nos llevan a preguntarnos si tienen alguna similitud con los fármacos antivirales inhibidores de la PR-VIH (Figura 9). La mayoría de los inhibidores de la PR-VIH poseen grupos amidas o acetamidas, al igual que la mayoría de las paullonas que son inhibidores potentes de PRL41I-VLB (4 de los 5 *hits* > 90% a 10 μ M). Esto puede explicarse porque el grupo amida contiene grupos dadores o aceptores de hidrógeno, lo que podría potenciar la inhibición.

Los inhibidores identificados, además del interés en la búsqueda de antivirales, pueden ser usados como herramientas en el laboratorio para estudiar a la enzima y su relación con la biología del virus. En este sentido, un *hit* interesante fue la clorokenpaulona, 1073: KuMue090, la cual contiene un sustituyente en la posición (R1) integrado con BODIPY. El BODIPY se conoce en la bioquímica, ya que son compuestos fluorescentes, que funcionan como sensores químicos, tintes de láser, marcadores fluorescentes, etc^{62,63}. Se excitan en el rango de 450-500 nm y pueden emitir en el rango de 500-600 nm. Por lo que, ésta clorokenpaulona podría ser útil para estudiar posteriormente su ubicación dentro de las células o para marcar a la proteasa, etc.

Posteriormente, se analizó el IC₅₀ de compuestos seleccionados. Los mejores *hits* a 10 μ M (KURK 221, KURK 256, y KuOrb 63), presentaron valores de IC₅₀ entre 3 y 6 μ M. Como el IC₅₀ es dos órdenes de magnitud mayor que la concentración de enzima, podemos deducir que no son inhibidores de alta afinidad, a diferencia de los inhibidores de la PR-VIH utilizados como fármacos, que tienen una constante de inhibición (K_i) del orden de nano o pico molar⁶⁴. Una optimización de estos compuestos podría conducir a mejores IC₅₀. Los resultados obtenidos sirven para en un futuro hacer una búsqueda más orientada hacia estructuras similares, que compartan alguna de estas características. Por lo que, nos da una buena referencia para saber que cualidades buscar a la hora de encontrar un potencial antiviral anti VLB con blanco farmacológico su proteasa.

Los compuestos identificados como potenciales antivirales podrían no solo aplicarse a la PR-VLB, sino también a otras proteasas virales o aquellas con funciones nativas en organismos que requieran intervención farmacológica. Se podría empezar a probar la inhibición de VTLH con los compuestos que inhibieron a PRL41I-VLB, aunque se debe tener en cuenta que hay una diferencia en la especificidad de los sustratos ¹⁹. Además, también se podrían probar con PR-VIH, ya que el VIH tiene una alta demanda por la búsqueda de un tratamiento eficiente, dada la alta tasa de mutación que presentan ^{32,34}. Esto permitiría ampliar los resultados y estrategias para el desarrollo de fármacos en biomedicina y salud animal, abordando infecciones virales y enfermedades relacionadas con proteasas.

Para finalizar, en Uruguay la prevalencia de la LBE supera el 80%. En este contexto las estrategias clásicas de detección y sacrificio y/o segregación resultan desde el punto de vista económico difíciles de implementar ³. Los programas de control que incluyan mejoras de las prácticas veterinarias, vacunas y antivirales, en suma, ayudarían a reducir la transmisión del VLB ^{3,42}. Los resultados obtenidos podrían dar lugar a futuros proyectos destinados a la búsqueda, diseño y desarrollo de compuestos con actividad antiviral. En caso de identificar un compuesto con potencial para ser utilizado como antiviral, este podría combinarse con otras herramientas y formar parte de un programa integral de control de la LBE, contribuyendo así a reducir la transmisión del virus.

7 Conclusiones

Esta tesis hace una contribución significativa al conocimiento básico sobre la bioquímica de la proteasa PR-VLB, a través de su caracterización biofísica y enzimática, además de los esfuerzos para identificar inhibidores específicos.

Se encontraron las condiciones adecuadas en las que la enzima mutante PRL41I-VLB es activa y termodinámicamente estable (amortiguador de fosfato 250 mM, 500 mM NaCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 5% glicerol, 1% DMSO, pH 5,6), así como una condición apropiada para su almacenamiento (Tris 50 mM, 10 mM NaCl, pH 8).

Por otro lado, la caracterización bioquímica muestra que la mutación en la variante PRL41I-VLB afecta el K_M indicando que interfiere en la interacción de la enzima con el sustrato. Sin embargo, es una variante muy útil para el cribado de compuestos dado que no se autoliza cuando se la incuba.

Finalmente, se identificaron 25 compuestos pertenecientes a la familia de las paullonas que inhibieron más del 50% de la actividad enzimática a una concentración menor o igual que 10 μM . Se establecieron relaciones y similitudes estructurales entre estos, además del esqueleto compartido de las paullonas. Esto logró ampliar la limitada lista de inhibidores reportados previamente, incluidos aquellos descubiertos en nuestro laboratorio.

8 Perspectivas

Nuestros resultados de esta tesina abren varias perspectivas, como:

- a) Evaluar la citotoxicidad y actividad antiviral de aquellos inhibidores de la PR-VLB. Para ello, disponemos de las líneas celulares FLK-VLB y CC81 reportera, que sirven para evaluar la actividad antiviral mediante el ensayo de inhibición de formación de sincicios puesto a punto en el laboratorio^{65,66}. De esta forma, se espera identificar inhibidores de la PR-VLB no citotóxicos y con actividad antiviral.
- b) Continuar determinando los IC_{50} de las paullonas que restan, y su mecanismo de inhibición. Al conocer qué clase de inhibidor es y la K_M se podrá calcular los valores de la constante de inhibición (K_i).
- c) Al tener puesto a punto un protocolo de cristalización desarrollado en el laboratorio se propone que los *hits* obtenidos puedan someterse a estudios de co-cristalización con PRL411-VLB. Se podrían obtener nuevas estructuras de los complejos PR-VL411:inhibidor (paullonas), informativas para entender los mecanismos de inhibición y proporcionar datos estructurales que contribuyan al diseño racional de nuevos inhibidores.
- d) Los resultados obtenidos en el cribado de inhibidores de PRL411-VLB, también se pueden utilizar para entrenar modelos de cribado computacional basados en algoritmos de inteligencia artificial. Estos modelos pueden integrar los *hits* identificados, los compuestos no activos, así como la información estructural de la proteína.
- e) Evaluar si los inhibidores pertenecientes a la familia de las paullonas presentan actividad cruzada con otras proteasas de otros retrovirus como la retropepsina del VLTH o VIH.

- f) Continuar con la evaluación de las condiciones óptimas para la estabilidad y actividad enzimática de la PRL41I-VLB, incluyendo pruebas con más condiciones de amortiguadores, sales, iones, rangos de pH, entre otros.
- g) Identificar otros sitios de auto-proteólisis de la proteasa, por análisis mediante HPLC acoplado a espectrometría de masa.

9 Agradecimientos

A mis tutores, Martín Fló y Natalia Olivero, por confiar en mí y darme la oportunidad de hacer mi tesis de grado en su laboratorio. Gracias por enseñarme, guiarme y motivarme a seguir adelante. Por permitirme crecer personal y profesionalmente, y por su enorme paciencia.

A Estefanía Dibello y Gabriel Lassabe, por su generosidad y disposición para corregir esta tesis.

A Marcelo Comini, por su disponibilidad y ayuda siempre que fue necesaria, así como por facilitarnos la quimioteca del laboratorio de Biología Redox de Tripanosomas, lo que hizo posible realizar el cribado de compuestos.

A Magdalena Portela y la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo, por su disposición a la hora de realizar el análisis por espectrometría de masa.

Al Instituto Pasteur de Montevideo, por abrirme sus puertas y permitir la realización de este proyecto. A mis compañeros e integrantes del laboratorio de Inmunovirología, por incluirme y hacerme sentir parte de un equipo. También a muchos integrantes y compañeros del Pasteur que, en distintos momentos, me acompañaron y ayudaron cuando lo necesité.

A mi familia, por estar presente en cada etapa de mi vida, apoyándome incondicionalmente. En especial, a mis padres, por inspirarme a superarme día a día y enseñarme que, con esfuerzo y actitud, es posible lograr cualquier objetivo.

A mis amigas de la infancia y a mis amigos de la facultad, quienes estuvieron a mi lado en mis logros y en los momentos difíciles. Gracias por ser un pilar constante de apoyo y amistad.

Por último, a mis perras, compañeras peludas que estuvieron conmigo durante largas noches de estudio, siendo un apoyo incondicional.

10 Referencias bibliográficas

1. Enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal*. 2015;13(7). doi:10.2903/j.efsa.2015.4188
2. Lv G, Wang J, Lian S, Wang H, Wu R. The Global Epidemiology of Bovine Leukemia Virus: Current Trends and Future Implications. *Animals*. 2024;14(2):297. doi:10.3390/ani14020297
3. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, et al. Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: Lessons for HTLV. *Viruses*. 2011;3(7):1210-1248. doi:10.3390/v3071210
4. Kuczewski A, Orsel K, Barkema HW, Mason S, Erskine R, van der Meer F. Invited review: Bovine leukemia virus—Transmission, control, and eradication. *J Dairy Sci*. 2021;104(6):6358-6375. doi:10.3168/jds.2020-18925
5. Krupovic M, Blomberg J, Coffin JM, et al. Ortervirales: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. 2018;92:515-533. doi:10.1128/JVI
6. <https://ictv.global/report/chapter/retroviridae/retroviridae/deltaretrovirus>.
7. Polat M, Takeshima SN, Aida Y. Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus. *Virol J*. 2017;14(1). doi:10.1186/s12985-017-0876-4
8. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses Family RetRoviRidae.*; 2012.
9. Frie MC, Coussens PM. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015;163(3-4):103-114. doi:10.1016/j.vetimm.2014.11.014
10. Shrestha S, Orsel K, Barkema HW, Martins L, Shrestha S, van der Meer F. Effects of bovine leukemia virus seropositivity and proviral load on milk, fat, and protein production of dairy cows. *J Dairy Sci*. 2024;107(1):530-539. doi:10.3168/jds.2023-23695
11. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms. *Journal of Dairy Research*. 2012;79(4):445-450. doi:10.1017/S0022029912000520
12. Fló M, Carrión F, Olivero-Deibe N, et al. Kinetics of Bovine leukemia virus aspartic protease reveals its dimerization and conformational change. *PLoS One*. 2022;17(7 July). doi:10.1371/journal.pone.0271671
13. Aida Y, Murakami H, Takahashi M, Takeshima SN. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front Microbiol*. 2013;4(4):328. doi:10.3389/fmicb.2013.00328

14. Gao A, Kouznetsova VL, Tsigelny IF. Bovine leukemia virus relation to human breast cancer: Meta-analysis. *Microb Pathog.* 2020;149:104417. doi:10.1016/j.micpath.2020.104417
15. Konvalinka J, Kräusslich HG, Müller B. Retroviral proteases and their roles in virion maturation. *Virology.* 2015;479-480:403-417. doi:10.1016/j.virol.2015.03.021
16. Macchi M V., Suanes A, Salaberry X, Fernandez F, Piaggio J, Gil AD. Epidemiological study of neosporosis in Uruguayan dairy herds. *Prev Vet Med.* 2020;179:105022. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.105022
17. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT. Association between bovine leukemia virus, production, and population age in Michigan dairy herds. *J Dairy Sci.* 2012;95(2):727-734. doi:10.3168/jds.2011-4760
18. VanLeeuwen JA, Haddad JP, Dohoo IR, Keefe GP, Tiwari A, Tremblay R. Associations between reproductive performance and seropositivity for bovine leukemia virus, bovine viral-diarrhea virus, Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis, and Neospora caninum in Canadian dairy cows. *Prev Vet Med.* 2010;94(1-2):54-64. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.11.012
19. Sperka T, Miklóssy G, Tie Y, et al. Bovine leukemia virus protease: Comparison with human T-lymphotropic virus and human immunodeficiency virus proteases. *Journal of General Virology.* 2007;88(7):2052-2063. doi:10.1099/vir.0.82704-0
20. Coffin J, Blomberg J, Fan H, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Retroviridae 2021. *Journal of General Virology.* 2021;102(12):001712. doi:10.1099/JGV.0.001712
21. Jane Flint S; Enquist LW RVSAmjFSELRVSA. *Principles of Virology.* 3rd Edition.; 2009.
22. Pluta A, Jaworski JP, Douville RN. Regulation of expression and latency in BLV and HTLV. *Viruses.* 2020;12(10). doi:10.3390/v12101079
23. Sperka T, Matúz K, Tözsér J. Bovine Leukemia Virus Retropepsin. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes.* Vol 1. ; 2013:218-220.
24. Centazzo M, Manganaro L, Alvisi G. Cellular Targets of HIV-1 Protease: Just the Tip of the Iceberg? *Viruses.* 2023;15(3):712. doi:10.3390/v15030712
25. Zahuczky G, Boross P, Bagossi P, et al. Cloning of the bovine leukemia virus proteinase in Escherichia coli and comparison of its specificity to that of human T-cell leukemia virus proteinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000;161478(1):1. www.elsevier.com/locate/bba

26. Krebs AS, Mendonça LM, Zhang P. Structural analysis of retrovirus assembly and maturation. *Viruses*. 2022;14(1):54. doi:10.3390/v14010054
27. Murakami H, Yamada T, Suzuki M, Nakahara Y, Suzuki K, Sentsui H. Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia. *Virus Res*. 2011;156(1-2):107-112. doi:10.1016/j.virusres.2011.01.004
28. Bai L, Sato H, Kubo Y, Wada S, Aida Y. CAT1/SLC7A1 acts as a cellular receptor for bovine leukemia virus infection. *The FASEB Journal*. 2019;33(12):14516-14527. doi:10.1096/fj.201901528R
29. Olivero-Deibe N, Tomé-Poderti L, Carrión F, et al. Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in Drosophila S2 Cells. *Frontiers in Virology*. 2021;1:756559. doi:10.3389/fviro.2021.756559
30. Qualley DF, Sokolove VL, Ross JL. Bovine leukemia virus nucleocapsid protein is an efficient nucleic acid chaperone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;458(3):687-692. doi:10.1016/j.bbrc.2015.02.025
31. Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: Current drugs. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28(3):371-402. doi:10.1016/j.idc.2014.06.001
32. Sun L, Nie P, Luan L, Herdewijn P, Wang YT. Synthetic approaches and application of clinically approved small-molecule Anti-HIV drugs: An update. *Eur J Med Chem*. 2023;261:115847. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115847
33. Kalinichenko S, Komkov D, Mazurov D. HIV-1 and HTLV-1 Transmission Modes: Mechanisms and Importance for Virus Spread. *Viruses*. 2022;14(1):152. doi:10.3390/v14010152
34. Menéndez-Arias L, Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy. *Trends Pharmacol Sci*. 2022;43(1):16-29. doi:10.1016/j.tips.2021.10.004
35. Wang TT, Hirons A, Doerflinger M, et al. Current State of Therapeutics for HTLV-1. *Viruses*. 2024;16(10):1616. doi:10.3390/v16101616
36. Sato H, Fukui JN, Hirano H, et al. Application of the Luminescence Syncytium Induction Assay to Identify Chemical Compounds That Inhibit Bovine Leukemia Virus Replication. *Viruses*. 2023;15(1):4. doi:10.3390/v15010004
37. Murakami H, Murakami-Kawai M, Kamisuki S, et al. Specific antiviral effect of violaceoid E on bovine leukemia virus. *Virology*. 2021;562:1-8. doi:10.1016/j.virol.2021.06.010
38. Borisenko A, Miroshnickhenko O, Tikchonenko TI. Inhibition of bovine leukaemia virus replication by the antisense RNA in cell line CC81. *Virus Res*. 1992;23(1-2):89-97. doi:10.1016/0168-1702(92)90069-L

39. Murakami H, Fujikawa Y, Mori M, et al. Development of a novel fluorogenic assay method for screening inhibitors of bovine leukemia virus protease and identification of mitorubrinic acid as an anti-BLV compound. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2023;87(9):946-953. doi:10.1093/bbb/zbad073
40. Lv W, Li Z, Wang S, He J, Zhang L. A role for tunneling nanotubes in virus spread. *Front Microbiol.* 2024;15:1356415. doi:10.3389/fmicb.2024.1356415
41. Herrmann D, Meng S, Yang H, Mansky LM, Saad JS. The Assembly of HTLV-1—How Does It Differ from HIV-1? *Viruses.* 2024;16(10):1528. doi:10.3390/v16101528
42. Li M, Laco GS, Jaskolski M, et al. Crystal structure of human T cell leukemia virus protease, a novel target for anticancer drug design. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005;102(51):18332-18337. doi:10.1073/pnas.0509335102
43. Arhancet Y. *Búsqueda de Los Interactores Moleculares de Las Proteínas Tax y Proteasa Del Virus de La Leucemia Bovina Como Potenciales Blancos Farmacológicos.* Universidad ORT Uruguay; 2024.
44. Rawlings ND, Barrett AJ. *Evolutionary Families of Peptidases.* Vol 290.; 1993.
45. <https://iubmb.qmul.ac.uk/enzyme/EC3/cont3bb.html>.
46. <https://www.ebi.ac.uk/merops/about/merops.shtml>.
47. Rawlings ND, WST and MKB. MEROPS - the Peptidase Database. MEROPS database.
48. Pearl LH. The catalytic mechanism of aspartic proteinases. *FEBS Lett.* 1987;214(1):8-12. doi:10.1016/0014-5793(87)80003-0
49. Tolle N, Kunick C. Paullones as Inhibitors of Protein Kinases. *Curr Top Med Chem.* 2011;11(11):1320-1332. doi:doi:10.2174/156802611795589601
50. Casanova S, Cayota M, Clavijo C, Espiga J, Estrada F, Mendivil S. Proteasas del SARS-CoV-2 como blanco farmacológico. Revisión bibliográfica y ensayo enzimático. Ciclo de Metodología Científica II. In: ; 2022. Accessed July 2, 2025. https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/37586/1/MCII_G4_2022.pdf
51. Lindhof JC, Ihnatenko I, Müller MJ, et al. Discovery of Antitrypanosomal Indolylacetamides by a Deconstruction–Optimization Strategy Applied to Paullones. *ChemMedChem.* 2023;18(10):e202300036. doi:10.1002/cmdc.202300036
52. Mühlgassner G, Bartel C, Schmid WF, Jakupec MA, Arion VB, Keppler BK. Biological activity of ruthenium and osmium arene complexes with modified

- paullones in human cancer cells. *J Inorg Biochem.* 2012;116:180-187. doi:10.1016/j.jinorgbio.2012.06.003
53. Lee HW, Arif E, Altintas MM, et al. High-content screening assay-based discovery of paullones as novel podocyte-protective agents. *American Journal of Physiology-Renal Physiology.* 2018;314(2):F280-F292. doi:10.1152/ajprenal.00338.2017
 54. Michele Y, Yong C, Ru-Rong J. Cancer Drug “Junkyard” Screen Identifies Compound that Resets Genetic Switch to Reduce Chronic Pain. *Genetic Engineering and Biotechnology News: GEN.* <https://www.genengnews.com/topics/drug-discovery/cancer-drug-junkyard-screen-identifies-compound-that-resets-genetic-switch-to-reduce-chronic-pain/>. October 27, 2021. Accessed July 2, 2025.
 55. Correa A, Ortega C, Obal G, Alzari P, Vincentelli R, Oppezzo P. Generation of a vector suite for protein solubility screening. *Front Microbiol.* 2014;5(67). doi:10.3389/fmicb.2014.00067
 56. https://www.snapgene.com/plasmids/qiagen_vectors/pQE-80L.
 57. Zhang JH, Chung TDY, Oldenburg KR. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discovery.* 1999;4(2):67-73. doi:10.1177/108705719900400206
 58. Ding M, He F, Poss MA, et al. The synthesis of novel heteroaryl-fused 7,8,9,10-tetrahydro-6H-azepino[1,2-a]indoles, 4-oxo-2,3-dihydro-1H-[1,4]diazepino[1,7-a]indoles and 1,2,4,5-tetrahydro-[1,4]oxazepino[4,5-a]indoles. Effective inhibitors of HCV NS5B polymerase. *Org Biomol Chem.* 2011;9(19):6654. doi:10.1039/c1ob05525a
 59. Medeiros A, Benítez D, Korn RS, et al. Mechanistic and biological characterisation of novel N^5 -substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in *Leishmania*. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020;35(1):1345-1358. doi:10.1080/14756366.2020.1780227
 60. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5(172). doi:10.3389/fmicb.2014.00172
 61. Louis JM, Oroszlan S, Tözsér J. Stabilization from autoproteolysis and kinetic characterization of the human T-cell leukemia virus type 1 proteinase. *Journal of Biological Chemistry.* 1999;274(10):6660-6666. doi:10.1074/jbc.274.10.6660
 62. Ni Y, Wu J. Far-red and near infrared BODIPY dyes: synthesis and applications for fluorescent pH probes and bio-imaging. *Org Biomol Chem.* 2014;12(23):3774. doi:10.1039/c3ob42554a

63. Bañuelos J. BODIPY Dye, the Most Versatile Fluorophore Ever? *The Chemical Record*. 2016;16(1):335-348. doi:10.1002/tcr.201500238
64. López Galera RM, Gómez Domingo MR, Pou Clavé L, Ruiz Camps I, Ribera Pascuet E, Monterde Junyent J. Inhibidores de la proteasa del VIH: actualización y monitorización terapéutica de las concentraciones plasmáticas en el tratamiento antirretroviral. *Farmacia Hospitalaria*. 1999;23(2):55-66. <https://www.revistafarmaciahospitalaria.es/es-inhibidores-proteasa-del-vih-actualizacion-articulo-13119057>
65. Olivero N. *Producción y Caracterización de Inmunógenos Contra El Virus de La Leucemia Bovina*. Institut Pasteur - Udelar; 2021.
66. Rammauro F, Fló M, Carrión F, et al. A versatile reporter system to study cell-to-cell and cell-free bovine leukemia virus infection. *Preprint*. Published online February 27, 2024. doi:10.1101/2024.02.26.581980

11 Anexo

11.1 Introducción

Tabla A1. Inhibición de las PRs de VLB y VIH-1 por inhibidores específicos de la PR de VIH-1 y por análogos de sustrato basados en el sitio de escisión de VTLH. Tomado de Sperka y colaboradores 2007¹⁹.

Inhibidor	Ki (nM)		
	PR-VLB	PR-VTLH-1	PR-VIH-1
Saquinavir	>20,000	>20,000	0.001
Ritonavir	11,472	>20,000	0.366
Nelfinavir	>20,000	>20,000	0.088
Amprenavir	114	>20,000	0.001
Indinavir	9,475	3,475	0.440
DMP-323	>20,000	>20,000	0.914
Compound 3	63	244	5.5
HBV-7935	1,005	439	26
UK 88,947II	>20,000	>20,000	1.5
KH 164#	1,715	5,605	28
LP-149#	12,959	12,582	0.54
Ala-Pro-Gln-Val-Sta-Val-Met-His-Pro*	181	2,3	530
Lys-Thr-Lys-Val-Sta-Val-Gln-Pro-Lys*	10,857	>20,000	>20,000
IB-269: Ala-Pro-Gln-Val-Leu-r-Pro-Val-Met-His-Pro	88	>465	20
IB-268: Lys-Thr-Lys-Val-Leu-r-Val-Val-Gln-Pro-Lys	13	298	11,215

11.2 Resultados

11.2.1 Expresión de PRL41I-VLB recombinante en *E.coli*

```
001 LSIPLARSRP SVAVYLSGPW LQPSQQALM LVDTGAENTV IPQNWLVRRDY PRIPAAVLGA 060  
061 GGVSRNRNRYNW LQGPLTLALK PEGPFITIPK ILVDTFDKWQ ILGRDVLSRL QASISIPEEV 120  
121 RPPMVG
```

Figura A1. Cobertura de secuencia de PRL41I-VLB 0,976 (123 de 126 aminoácidos) obtenida por espectrometría de masa LC-MS/MS.