

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN CINÉTICA Y ESTRUCTURAL DE DOS VARIANTES RECOMBINANTES DE SHPI-1, INHIBIDOR DE PROTEASAS DE LA ANÉMONA *STICHODACTYLA HELIANTHUS*, Y DE SUS COMPLEJOS CON TRIPSINA, QUIMOTRIPSINA Y ELASTASA PANCREÁTICAS

Autoría principal: Rossana García Fernández

Otros autores: María de los Ángeles Chávez Planes, Yamile González González, Tirso Pons Hernández, Dayrom Gil Pradas y Caridad Mireya Romero Tió

Colaboradores: Maday Alonso del Rivero, Christian Betzel, Ulrich Hahn, Manuel Mansur, Lars Redecke y Pedro Valiente

Entidad ejecutora principal: Centro de Estudios de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH)

Autor de correspondencia

Dra. María de los Ángeles Chávez Planes: Calle 25 #455 e/ J e I, Vedado, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba, CP 10 400. Teléfono. 832 4830, Fax. 832 1321, e-mail: mchavez@infomed.sld.cu

Rossana García Fernández (40%). Realizó la mayor parte del trabajo experimental que incluyó la purificación y caracterización cinética y estructural del inhibidor rShPI-1A y la mutagénesis sitio-específica para la obtención del mutante rShPI-1/K13L, así como su purificación y caracterización. Realizó los experimentos de cristalización del inhibidor rShPI-1A y de captura y cristalización de los complejos entre el inhibidor rShPI-1A y las enzimas tripsina (Tr) y quimotripsina (QTr) y entre el mutante rShPI-1/K13L y EPP. Participó en las etapas de medición de datos de difracción de rayos X y en el refinamiento, análisis y anotación en bases de datos de las estructuras 3D obtenidas. Participó en el diseño de los experimentos, el análisis de los resultados en todas las etapas del trabajo y en la escritura de los artículos científicos publicados.

María de los Ángeles Chávez Planes (25%). Diseñó el proyecto y dirigió su ejecución. Coordinó los experimentos de espectrometría de masas durante la caracterización molecular de los inhibidores rShPI-1A y rShPI-1/K13L y de interacción molecular con proteasas de varias clases mecanísticas. Participó en el análisis de los resultados, así como en la escritura de los artículos científicos publicados.

Tirso Pons Hernández (10%). Ejecutó los cálculos realizados con tres de las cuatro estructuras cristalográficas obtenidas y asesoró el análisis de los datos obtenidos y la comparación con estructuras homólogas. Participó en el diseño de las estrategias realizadas con este objetivo, en el análisis de los resultados y

colaboró en la escritura de los artículos científicos relacionados con ese tópico, publicados en *Acta Cryst* y *J. Struct. Biol.*

Dayrom Gil Pradas (10%). Ejecutó los experimentos relacionados con el clonaje y expresión en *P. pastoris* del inhibidor rShPI-1A y su efecto protector durante la expresión de miniproteína. Participó en la purificación y caracterización cinética de rShPI-1A. Realizó el diseño y escritura del artículo que comprende dichos resultados, publicado en la revista *FEMS Yeast Res.*

Yamile González (10%). Coordinó y asesoró el trabajo de expresión y purificación del inhibidor rShPI-1A. Participó en el análisis de los resultados de esta línea de trabajo y en la escritura del artículo (*FEMS Yeast Res.*) que resume dichos resultados.

Caridad Mireya Romero Tió (5%). Ejecutó el trabajo técnico necesario para la producción sistemática y purificación de los inhibidores.

RESUMEN

El inhibidor de proteasas ShPI-1 es una proteína previamente aislada de la anémona *Stichodactyla helianthus* (*Premio ACC. 1995-1996. MA Chávez y col. Stichodactyla helianthus: Fuente de polipéptidos bioactivos*) que presenta características excepcionales por su capacidad de inhibir proteasas de varias clases mecanísticas. Este amplio espectro motivó el empleo del inhibidor natural en la biotecnología, para incrementar los rendimientos y estabilidad de proteínas obtenidas por vía recombinante y de los componentes de un juego diagnóstico neonatal de fibrosis quística. Estas y otras aplicaciones biomédicas potenciales determinaron como objetivos la expresión de ShPI-1 por vía recombinante y la determinación de su estructura cristalográfica, la obtención y caracterización funcional y estructural de un mutante más específico, con mayor actividad frente a enzimas tipo elastasa y la determinación de las estructuras 3D de los complejos con tres proteasas de tipo serino. Como primera etapa se abordó la obtención en *Pichia pastoris*, purificación y caracterización de una variante recombinante (rShPI-1A) similar al inhibidor natural y un mutante en el sitio reactivo (rShPI-1/K13L) con mayor fortaleza de inhibición de elastasa de neutrófilos humanos (ENH), diana terapéutica de enfermedades inflamatorias y respiratorias. Como resultado, se obtuvieron dos nuevas entidades moleculares derivadas de ShPI-1, con altos niveles de expresión y grado de pureza, lo que permitió demostrar su aplicación biotecnológica sin afectar la fuente natural, así como contar con un mutante más selectivo de ENH para iniciar estudios biomédicos. Como segunda etapa, se determinaron las estructuras cristalográficas del inhibidor libre y en complejos con dos proteasas de tipo serino. A partir de estos resultados se informa la primera estructura cristalográfica de rShPI-1 y las primeras estructuras tridimensionales (3D) de complejos entre un dominio BPTI-Kunitz de un organismo invertebrado y las enzimas tripsina y quimotripsina pancreáticas. El análisis de estas estructuras demostró la conservación en anémonas de la mayoría de las

interacciones enzima inhibidor descritas para mamíferos y la mayor contribución del sitio P3 (Arg11) de ShPI-1 a la fortaleza de la inhibición y estabilidad del complejo con tripsina, lo cual resulta novedoso en la familia de inhibidores BPTI-Kunitz. En una tercera etapa se determinó la estructura 3D del complejo entre el mutante rShPI-1/K13L y EPP, que constituye la primera estructura 3D informada de un complejo entre un dominio BPTI-Kunitz y una enzima tipo elastasa. El análisis de esta nueva estructura reveló la contribución de la Arg¹¹ en el sitio P3 y su posible influencia en la selectividad frente a ENH o EPP. El impacto científico de estos resultados radica en que se describen características estructurales que contribuyen a ampliar el conocimiento de ShPI-1 y de la familia de inhibidores BPTI-Kunitz. Este conocimiento abre el camino al diseño y desarrollo de variantes más específicas frente a proteasas de interés biomédico. Los resultados están publicados en cinco artículos científicos, además de uno enviado, una tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, una tesis de maestría y cuatro nuevas estructuras anotadas en el banco de datos de proteínas (PDB).

Estos resultados forman parte de 13 presentaciones en 10 eventos nacionales e internacionales, un Premio Anual de Investigación Universidad de La Habana 2008 y un premio internacional al mejor trabajo en la escuela internacional de cristalización biológica, Granada, 2009.

COMUNICACIÓN CORTA

Los inhibidores de proteasas (IP) son biomoléculas que participan en la regulación de la actividad de las enzimas proteolíticas, la protección de los zimógenos y los mecanismos de defensa en diferentes organismos [1,2]. Estas funciones han motivado su uso en la biotecnología, la biomedicina [3,4] y en estudios de la estructura-función de sus proteasas diana. La detección de proteasas que constituyen dianas terapéuticas enfermedades sistémicas como las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, inflamatorias etc, así como la función de estas enzimas en los mecanismos de invasión y replicación de patógenos evidencian las potencialidades de los IP [5,6]. En muchos casos estas aplicaciones han sido posibles, a partir del conocimiento de los mecanismos moleculares de interacción proteasa-inhibidor [4,7].

El inhibidor ShPI-1, aislado de la anémona *S. helianthus*, es una proteína de 55 aminoácidos con un 34% de identidad de secuencia con el inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI), prototipo de la familia BPTIKunitz de inhibidores canónicos de proteasas de tipo serino (PS). En concordancia, ShPI-1 inhibe fuertemente tripsina (Tr), plasmina y calicreína pancreática, lo que está acorde con la presencia de Lys¹³ en el sitio reactivo (sitio P1). También inhibe, aunque con menor fortaleza, a la quimotripsina (QTr) y la elastasa de neutrófilos humanos (ENH) y no inhibe a la elastasa pancreática porcina (EPP). De manera inusual en la familia, ShPI-1 es activo frente a proteasas de tipo cisteíno como la papaína, y de tipo aspártico como la pepsina [8]. Este amplio espectro ha posibilitado su empleo como ligando para la purificación de proteasas [8] y como aditivo para

incrementar los rendimientos de proteínas expresadas en *P. pastoris* [9] y la estabilidad del juego de reactivos “UMELISA TIR” para el diagnóstico neonatal de fibrosis quística. También se ha demostrado su efecto en la viabilidad de *Leishmania amazonensis* y *Trypanosoma cruzi*, agentes causales de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas, respectivamente [10,11]. El empleo de ShPI-1 y el desarrollo de nuevas aplicaciones requieren la expresión de este inhibidor por vía recombinante para obtener cantidades suficientes sin afectar la fuente natural, e imponen la necesidad de estudiar su relación estructurafunción. Además, sería de gran utilidad la obtención y caracterización de variantes más específicas hacia proteasas de interés biomédico, como la elastasa pancreática (EPP) implicada en la pancreatitis, y la elastasa de neutrófilos humanos (ENH), involucrada en enfermedades inflamatorias y respiratorias [12,13]. Vale destacar que no se ha descrito la estructura 3D de complejos entre dominios BPTI-Kunitz y este tipo de enzimas, por lo que se desconocen las interacciones que contribuyen a su inhibición. En este sentido, la obtención de una variante activa frente a EPP permitiría emplear a esta enzima como modelo en los estudios estructurales, teniendo en cuenta el alto costo de la ENH.

En este trabajo se abordó, en una primera etapa, el clonaje y la expresión en la levadura *P. pastoris* de una variante de ShPI-1 que presenta residuos adicionales en los extremos amino y carboxilo para aumentar los niveles de expresión en esta levadura. Esta nueva molécula, nombrada *rShPI-1A*, se purificó en una única etapa de cromatografía de intercambio catiónico. La pureza de la fracción activa se comprobó mediante RPHPLC, SDS-PAGE y espectrometría de masas, que a su vez corroboró la identidad de la molécula. Se estimó un nivel de expresión de 1,2 g/L, que se encuentra entre los valores más altos informados en *P. pastoris*. **Esta alta productividad permitió abordar su caracterización y profundizar en los estudios de aplicación biotecnológica, sin afectar la fuente natural** (ver resúmenes del evento 3. Biotec. Hab. 2008). La caracterización funcional mostró que ***rShPI-1A* reproduce el espectro de actividad del inhibidor natural** [8], pues inhibe PS como Tr, QTr y ENH y proteasas de otras clases mecanísticas como pepsina y papaína. Al igual que el inhibidor natural, *rShPI-1A* no inhibe EPP. De acuerdo a los valores de K_i reales *rShPI-1A* inhibe fuertemente Tr (K_i : $2,5 \cdot 10^{-9}$ mol/L), QTr (K_i : $1,48 \cdot 10^{-8}$ mol/L) y ENH (K_i : $2,35 \cdot 10^{-8}$ mol/L). Es importante resaltar que el valor de K_i frente a ENH no había sido informado para ShPI-1. Estos resultados están incluidos en el artículo de Gil *et al.* (2011), y las tesis de maestría de Gil (2010) y de doctorado de García-Fernández (2013).

Las mediciones de dispersión dinámica de la luz (DLS) revelaron que *rShPI-1A* agrega a concentraciones en el orden mM y que el grado de agregación varía en dependencia del método de concentración utilizado para abordar su cristalización. Además, la disminución del radio hidrodinámico (R_H) de las partículas en solución (7,69 nm) después de la interacción con Tr (2,63 nm), en comparación con la enzima libre (2,33 nm) indicaron la formación del complejo *rShPI-1A*:Tr. En su conjunto estos resultados: *i*) permitieron seleccionar a la solución liofilizada en los experimentos posteriores y *ii*) revelaron la estabilidad del complejo con Tr, dada

por la permanencia de la señal de DLS de la nanopartícula en solución por más de 15 días en las condiciones ensayadas. Estos resultados forman parte de las publicaciones de García-Fernández *et al.* (2009, 2012a y 2012b y de la tesis de doctorado de García-Fernández (2013).

La obtención de cristales de *rShPI-1A* brindó la posibilidad de determinar su estructura cristalográfica y comparar con la estructura en solución descrita para el inhibidor natural [14]. Este análisis demostró la similitud estructural entre ambas moléculas y evidenció que **la inclusión de residuos adicionales, no afectó el plegamiento ni la integridad de los lazos de interacción de *rShPI-1A*, lo que en conjunto con la similitud funcional con el inhibidor natural, valida su empleo en estudios posteriores.** El análisis de esta nueva estructura tridimensional (3D), reveló que los enlaces Cys³-Cys⁵³ y Cys²⁸-Cys⁴⁹ se orientan hacia la izquierda, a diferencia del enlace Cys¹²-Cys³⁶, orientado hacia la derecha. Esta quiralidad de los puentes disulfuro, no descrita a partir de la estructura en solución de *ShPI-1* natural [14], brinda una nueva evidencia de la posible correlación, no confirmada hasta el presente, entre ambas características. Asimismo, se realizó una comparación con los dominios con estructura cristalográfica conocida que reveló que los ángulos *phi* en las posiciones 17 y 30 de *ShPI-1*, descritos como inusuales [14], son independientes de la presencia de prolina. Estos ángulos son característicos de la familia y no explican las diferencias en la estabilidad a la temperatura entre *ShPI-1* y el BPTI, como fue sugerido previamente [14]. Estos resultados constituyen **aportes teóricos al conocimiento de los inhibidores BPTI-Kunitz**, incluidos en el artículo de García-Fernández *et al.* (2012a) y la tesis de doctorado de García-Fernández (2013). La estructura 3D de *rShPI-1A* está publicada en la base de datos PDB (código 3OFW).

En la segunda parte del trabajo se abordó la cristalización de los complejos con Tr y QTr. Para esto se estableció una estrategia previa que combina la captura mediante cromatografía de exclusión molecular y el análisis mediante DLS y SDS-PAGE y que constituye un procedimiento relativamente sencillo, reproducible y eficiente. Estas características permitieron la obtención de cristales de los complejos con tres PS, con el consecuente ahorro de tiempo y recursos. Dicho **procedimiento y las condiciones de cristalización descritas en este trabajo, constituyen una guía práctica para futuros trabajos de cristalización.** El análisis estructural reveló que la interacción de *rShPI-1A* con Tr y QTr sigue el mecanismo canónico y abarca los sitios P5-P4', con una contribución mayoritaria de Lys¹³ (sitio P1). Estas características, similares a las informadas para dominios BPTI-Kunitz de mamíferos, **evidencian la conservación de esta interacción en anémonas (Phylum Cnidaria).** En comparación con el BPTI, se detectó una menor contribución de los sitios P4, P2, el lado Pn' y del lazo secundario de *rShPI-1A* a la interacción con Tr, que explica la menor fortaleza de inhibición de *rShPI-1A*. De modo contrario, hay una notable participación del sitio P3 (Arg¹¹) de *rShPI-1A*, que penetra en el sitio S3 de la Tr y establece numerosos contactos que no establece el residuo equivalente (Pro¹³) del BPTI. A ello se suma la formación de

puentes de hidrógeno que en el BPTI establecen la Arg³⁹ y que no se detectan en la posición equivalente (Gly³⁷) de rShPI-1A. Dado que dichas interacciones contribuyen a la afinidad y la estabilidad del complejo BPTI:Tr [15], este resultado indica que **Arg¹¹, en conjunto con el sitio P1, estabiliza el complejo rShPI-1A:Tr y contribuye a mantener el valor de Ki de ShPI-1 en 10⁻⁹-10⁻¹⁰ mol/L. Este hallazgo constituye un aporte novedoso al conocimiento de la familia BPTI-Kunitz y brinda nuevos elementos para el diseño de inhibidores más específicos.**

La interacción entre rShPI-1A y QTr implica el acomodo de Lys¹³ (P1) a la entrada del bolsillo S1, aunque con una contribución menor en comparación con Tr, que concuerda con la menor inhibición de QTr. En comparación con el BPTI hay una mayor contribución de Cys¹² (sitio P2) de rShPI-1A y de Arg¹¹ (sitio P3), que podría compensar la ausencia de otras interacciones. No obstante, la contribución de Arg¹¹ (P3) a la interacción con QTr es menor, en comparación con Tr. De acuerdo a estos elementos, las diferencias en las interacciones de los subsitios de rShPI-1A y BPTI en complejos con QTr, no generan grandes cambios en la fortaleza de inhibición de QTr, en consonancia con la similitud de los valores de Ki de estos inhibidores.

Este conjunto de resultados forma parte del artículo de García-Fernández *et al.* (2012b) y la tesis de doctorado García-Fernández (2013). Las estructuras 3D de los complejos rShPI-1A:Tr y rShPI-1A:QTr están publicadas en la base de datos PDB (códigos 3M7Q y 3T62, respectivamente).

En una tercera parte del trabajo, se expresó, purificó y caracterizó un mutante de ShPI-1, a partir de la inclusión de leucina en el sitio P1. Esta nueva molécula (rShPI-1/K13L) mostró menor actividad frente a Tr y mayor actividad frente a QTr y ENH que el inhibidor nativo. A diferencia de este, rShPI-1/K13L inhibe fuertemente a la EPP lo que, teniendo en cuenta el alto costo de ENH, permitió abordar la cristalización y determinación de la **primera estructura 3D de un dominio BPTI-Kunitz en complejo con una enzimatipo elastasa**. El análisis estructural reveló **características novedosas en la familia BPTI-Kunitz y otros inhibidores canónicos**, como es la mayor contribución de los residuos de glicina del lazo secundario. La superposición de esta estructura con las informadas para el elafin y SLPI/D2, en complejos con ENH y EPP, reveló que la cadena lateral de Arg¹¹ (sitio P3) de rShPI-1/K13L se ubica en una región con marcadas diferencias entre ambas enzimas, y que contribuyen a las diferencias en selectividad entre dichos inhibidores de la familia WAP [16]. Por tanto, este trabajo brinda la **primera evidencia estructural de la posible participación del sitio P3 en la selectividad frente a enzimas tipo elastasa, lo que contribuirá al diseño futuro de inhibidores más específicos a partir de un dominio BPTI-Kunitz**. Estos resultados forman parte de la tesis de doctorado García-Fernández (2013) y fueron parcialmente publicados en Pentón-Madrugal (2013). También forman parte de un artículo enviado a *J. Biol. Chem.* La estructura 3D del complejo rShPI-1/K13L:EPP está publicada en la base de datos PDB (código 3UOU).

El aporte fundamental del trabajo propuesto es de tipo científico, pues se informan por primera vez características estructurales de ShPI-1 que amplían el conocimiento de la familia BPTI-Kunitz y de los inhibidores aislados de invertebrados marinos. Este estudio constituye el primer informe de mutagénesis sitio-específica de ShPI-1 y de cristalización y determinación de las estructuras 3D de complejos entre un dominio BPTI-Kunitz de un invertebrado marino y proteasas tipo-tripsina, quimotripsina y elastasa. Las metodologías utilizadas constituyen aportes prácticos para futuros estudios. Además, la alta productividad en la expresión de dos nuevas entidades moleculares derivadas de ShPI-1, permite abordar sus aplicaciones.

Referencias bibliográficas

Referencias que forman parte del trabajo (ver detalles en la descripción científico-técnica detallada del resultado):

- García-Fernández, R. (2013). Tesis en opción al título de Doctor en C. Biológicas: Facultad de Biología, UH, Cuba.
- Gil, D.F. (2010) Tesis de Maestría. Facultad de Biología, UH, Cuba.
- Artículos científicos:
 - 1.- Gil, D.F., *et al.* (2011) *FEMS Yeast Res.* **11**(7), 575-86.
 - 2.- García-Fernández, R., *et al.* (2012). *Acta Cryst.* **F68**, 1289-1293
 - 3.- García-Fernández, R., *et al.* (2012). *J. Struct. Biol.* **180**, 271-279.
 - 4.- García-Fernández, R., *et al.* (2009) *Rev. Cub. Fís.*, **26**(1), 76-82.
 - 5.- Pentón-Madrigal, A., *et al.* (2013) *Rev. Cub. Fis.* **30**, 36-41.
 - 6.- García-Fernández, R., *et al.* (Enviado). *J. Biol. Chem*

Otras referencias:

- [1].- Laskowski, M. Jr., Kato, I. (1980) *Annu. Rev. Biochem.* 49, 593-626
- [2].- Bode, W., Huber R. (1992) *Eur. J. Biochem.* 204, 433-451;
- [3].- Laskowski, M. Jr., Qasim, M.A., Lu, S.M. (2000) *Frontiers in Mol. Biol. Series* Vol. 31, (Kleanthous, C., Ed.), 228-279, Oxford Univ. Press;
- [4].- Abbenante, G., Fairlie, D.P. (2005) *Med. Chem.* 1, 71-104;
- [5].- Turk, B. (2006) *Nature Rev. Drug Discov.* 5, 785-799;
- [6].- Białas, A., Kafarski, P. (2009) *Anticancer Agents Med. Chem.* 9(7), 728-62;
- [7].- Tomoo, K. (2010) *Curr. Top. Med. Chem.* 10(7), 696-707;
- [8].-Delfín, J., Morera, V., González, Y., Díaz, J., Márquez, M., *et al.* (1996) *Toxicol* 34, 1367-1376;
- [9].- Mansur, M. (2007) Tesis de doctorado. Facultad de Biología, UH;
- [10].- Pereira de Almeida *et al.* (2013) *Acta Tropica* 128 (1), 27-35
- [11].- Silva-López, R.E., Morgado-Díaz, J.A., Chávez, M.A., Giovanni-De-Simone, S. (2007). *Parasitol. Res.* 101, 1627-1635;
- [12].- Groutas, W.C., Dou, D., Alliston, K.R. (2011) *Expert Opin Ther Pat.* 21(3), 339-54;
- [13].- Moroy, G., Alix, A.J., Sapi, J., Hornebeck, W., Bourguet, E. (2012) *Anticancer Agents Med Chem.* 12(6), 565-79.

- [14].- Antuch, W., Berndt, K.D., Chávez, M.A., Delfín, J., Wuethrich, K. (1993) *Eur. J. Biochem.* 212, 675-684;
- [15].-Helland, R., Leiros, L., Berglund, G.I., Willasen, N.P., Smala, A. (1998) *Eur. J. Biochem.* 256, 317-324;
- [16].-Koizumi, M., Fujino, A., Fukushima, K., Kamimura, T., Takimoto, M. (2008) *J. Synchrotron Rad.* 15, 308-311.