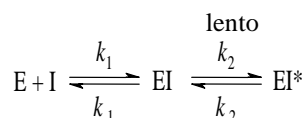
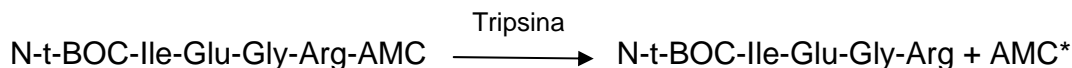

SISTEMA TRIPSINA/KUNITZ INHIBICIÓN LENTA DE ALTA AFINIDAD

Martín Fló y Beatriz Alvarez

Los inhibidores del tipo Kunitz son proteínas que actúan como inhibidores competitivos de alta afinidad de proteasas serínicas. La cinética de la inhibición es lenta, ya que lleva varios minutos alcanzar el equilibrio entre el inhibidor y la enzima. El mecanismo de la inhibición involucra dos equilibrios, el primer equilibrio implica la formación de un complejo inicial enzima-inhibidor y el segundo, más lento, estabiliza dicho complejo.



En esta práctica vamos a estudiar la cinética y el mecanismo de inhibición de *EgKU-8*, inhibidor del tipo Kunitz de *E. granulosus*, frente a tripsina pancreática bovina. Se seguirá el curso temporal de la inhibición de tripsina por *EgKU-8* a 37 °C. La reacción catalizada por la enzima se seguirá utilizando un sustrato artificial cuyas propiedades de fluorescencia se incrementan como resultado de la actividad de la tripsina, el sustrato N-t-BOC-Ile-Gly-Arg-AMC, donde N-t-BOC es N-tert-butoxicarbonil y AMC es aminometil cumarina. El K_M de la tripsina bovina para este sustrato es de $(85 \pm 9) \mu\text{M}$.



Materiales

- Amortiguador Tris-HCl 50 mM, pH 8, 0.01% Tritón.
- AMC 1.25 μM . Se prepara un stock (100 μM) en dimetilformamida (DMF). Se guarda a -20 °C y se diluye en amortiguador.
- N-t-BOC-Ile-Gly-Arg-AMC 10 μM . Se prepara un stock (aproximadamente 10 mM) en dimetilsulfóxido (DMSO). Se guarda a -20 °C y se diluye en amortiguador.
- Tripsina pancreática bovina (DIFCO Trypsin 250). Se prepara 1 mg/mL en HCl 1 mM. Se alicuota 5 μL y se guarda a -80 °C. Al momento de trabajar, se deja descongelar en hielo y se lleva a 1.2 nM con amortiguador.
- Inhibidor recombinante de tripsina de *E. granulosus* (*EgKU-8*), expresado en *E. coli*. Se guarda en amortiguador a -20°C.
- Placa para lector de ELISA de fluorescencia de 96 pocillos.
- Lector de placas de fluorescencia (Varioskan Thermo).

Procedimiento

a) Curva de calibración

Preparar en tubos eppendorf 4 diluciones de 1.25, 0.75, 0.1 y 0.025 μM de AMC, con un volumen final de 250 μL .

b) Preparación de las diluciones de EgKU-8

Preparar por duplicado en tubos eppendorf 6 diluciones entre 1 y 40 nM de EgKU-8, en amortiguador Tris-HCl, con un volumen final de 60 μL .

c) Siembra en la placa

1. Sembrar en la placa negra de 96 pocillos en el siguiente orden:

A1-A4: calibración, 200 μL .

A5 y A6: blanco (100 μL de amortiguador + 100 μL de N-t-BOC-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC 10 μM)

A7 – B6: 50 μL de las diluciones de EgKU-8 (en concentración creciente) + 100 μL de sustrato. **B7 y B8:** 50 μL de amortiguador + 100 μL de sustrato

2. Comenzar la reacción agregando 50 μL de tripsina 1.2 nM.

3. Medir el curso temporal de la reacción hasta que se alcance el equilibrio/estado estacionario, a 37 $^{\circ}\text{C}$ en el Varioskan con longitudes de onda de excitación de 390 nm y de emisión de 460 nm.

Procesamiento de los datos

Utilizando la curva de calibración, graficar formación de producto *versus* tiempo para cada curso temporal.

Determinar la constante exponencial k_{obs} para cada curso temporal a partir del ajuste de los datos a la ecuación:

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

Graficar k_{obs} en función de la concentración de EgKU-8. Determinar K_1 (constante de disociación del primer equilibrio), K_1^* (constante de disociación global), k_2 y k_{-2} a partir del ajuste del gráfico a la ecuación:

$$k_{\text{obs}} = k_{-2} + \frac{k_2 [I]}{[I] + K_1 (1 + [S]/K_M)}$$

$$K_1^* = K_1 \frac{k_{-2}}{k_2 + k_{-2}}$$

Preguntas

¿Cómo se afecta k_{obs} si se varía la concentración de enzima?

¿Qué experimento haría para tener otra determinación del valor de K_1^* ?

¿Qué pasa si se repite utilizando más sustrato?

Referencia

González G, Fló M, Margenat M, Durán R, González-Sapienza G, Graña M, Parkinson J, Maizels RM, Salinas G, Alvarez B, Fernández C (2009) A family of diverse Kunitz inhibitors from *Echinococcus granulosus* potentially involved in host-parasite cross-talk. PLoS One 4(9):e7009.

Tablas:

	Amortiguador (μL)	EgKU-8 (40 nM)
1		
40		

Placa de 96 pocillos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												