

Archivos de Medicina
Asociación Española de Médicos Internos Residentes
editorial@archivosdemedicina.com
ISSN (Versión impresa): 1698-9465
ESPAÑA

2005

P. Perez Piñera / A. Suárez / P. Castro / B. Blázquez Menes / M. Menéndez González
KALIKREÍNA 6 COMO BIOMARCADOR DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.
REVISIÓN Y DESCRIPCIÓN DE METOLOGÍA PROPIA PARA SU CLONACIÓN Y
PURIFICACIÓN

Archivos de Medicina, marzo-abril, año/vol. 1, número 002
Asociación Española de Médicos Internos Residentes
Madrid, España
pp. 2-10

Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal

Universidad Autónoma del Estado de México

<http://redalyc.uaemex.mx>



Kalikreína 6 como biomarcador de la Enfermedad de Alzheimer. Revisión y descripción de metodología propia para su clonación y purificación.

Kallikrein 6 as biomarker for Alzheimer's disease. Review and description of own methodology for its cloning and purification.

| | |
|--------------------|---|
| Periodo revisado | 1967-2004 |
| Palabras clave | Kalikreína 6, Enfermedad de Alzheimer, biomarcador, clonación, purificación |
| Keywords | Kallikrein 6, Alzheimer's disease, biomarker, cloning, purification |
| Autores | Perez-Piñera P¹, Suárez A¹, Castro P¹, Blázquez-Menes B², Menéndez-González M². |
| Centro de trabajo | 1. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo. 2. Servicio de Neurología I. Hospital Universitario Central de Asturias. |
| E-mail de contacto | manuelmenendez@gmail.com |
| Correspondencia | M. Menéndez González. Hospital Universitario Central de Asturias. Servicio de Neurología-I. C/Julián Clavería s/n, CP: 33006, Oviedo, Spain. Tlf: 985108000 Ext: 36206 |

Resumen:

La Kalicreína tipo 6 (hk6) es una serín proteasa expresada principalmente en el cerebro humano. En pacientes con Enfermedad de Alzheimer la concentración de hK6 en líquido cefalorraquídeo es 3 veces superior a los controles (aunque otros autores afirman que se encuentran disminuidos) mientras que en sangre se ha encontrado una concentración 10 veces superior a la normal.

hK6 se localiza en las placas seniles y ovillos neurofibrilares en parénquima cerebral de pacientes con EA. El mecanismo patogénico por el que la hK6 puede estar implicada en la EA no está claro, si bien en cierto modo parece que hk6 posee propiedades amiloidogénicas. Se sabe que la proteína amiloide fibrilar inhibe a las proteasas que degradan el beta amiloide cerrándose un círculo que perpetúa el desarrollo de la enfermedad. Otra hipótesis es que hk6 actúa regulando el balance de las distintas secretasas que procesan la proteína beta amiloide, deshaciendo el equilibrio fisiológico en favor de la beta secretasa (BACE) que genera amiloide 1-42 que no puede ser eliminado desencadenándose así la cascada amiloide. Son necesarios estudios más amplios para demostrar la utilidad de esta proteína como biomarcador de la EA.

Por último se describe el procedimiento que sigue nuestro grupo para la clonación y purificación de hk6.

Abstract:

Human Kalikrein 6 (hk6) is a serin protease mainly expressed in the brain. In patients with Alzheimer's Disease the amount of hK6 in cerebrospinal fluid is 3 folds higher than in controls (though other authors affirm that are lower) whereas in blood the concentration seems to be 10 folds higher than in controls. hK6 is located in senile plaques and in neurofibrillar tangles in the brain of patients with Alzheimer's Disease. The pathogenic mechanism hK6 can be involved in the disease is not clear, though in certain way it seems to have amyloidogenic properties. Fibrillization of A β may affect the clearance of A β by inhibiting the brain proteases, thereby increasing the concentration of circulating A β , that may further increase the A β fibrillization. Another hypothesis is that hk6 acts regulating the balance of the different secretases that process the beta amyloid protein precursor, undoing the physiological balance in favor of the beta secretase (BACE) that generates amiloide 1-42 that cannot be eliminated unleashing this way the amyloid cascade. More and wider studies are necessary to demonstrate the usefulness of this protein as biomarcador of AD. Finally it is described the procedure that our group follows for the cloning and purification of hk6.

Introducción: La EA

Datos epidemiológicos

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que resulta devastadora tanto para el paciente como para sus familiares. Su prevalencia se duplica cada cinco años a partir de los 65 años hasta los 85, así varía desde el 1% a los 60 años hasta el 32,2% a los 94 años de edad. La incidencia es superior al 1% para el conjunto de la población de edad igual o mayor a los 65 años. En España la cifra de personas que padece EA asciende a más de 400.000, según el estudio recogido en el Libro Blanco del deterioro cognitivo en el envejecimiento y demencia en España [realizado por el Gabinete de Estudios Sociológicos Bernard Kriel hace ya varios años], que representa el primer estudio nacional sobre este tema. Respecto al coste de los recursos sanitarios los datos que se tienen en España corresponden a un estudio realizado en el año 1999 (Boada, 1999). El resultado medio anual obtenido fue de 19.170€. Uno de los factores que más influye en el coste anual por enfermo es el grado de deterioro cognitivo al diagnóstico, por lo que alcanzar un diagnóstico certero precoz debe ser un reto prioritario y para ello es necesario contar con pruebas complementarias que apoyen el método clínico.

Diagnóstico

Actualmente el diagnóstico de EA se basa en criterios clínicos que ofrecen una sensibilidad y especificidad de aproximadamente el 70% en fases moderadas de la enfermedad. En los últimos años se han multiplicado los esfuerzos por encontrar alguna molécula cuya presencia pueda ser detectada en algún fluido corporal en pacientes con deterioro cognitivo de forma que ayude al

diagnóstico de la EA. Hasta el momento los únicos resultados moderadamente satisfactorios se han obtenido mediante la estimación de los niveles en líquido cefalorraquídeo de dos proteínas que están directamente implicadas en la patogenia de la EA (la proteína tau fosforilada y la proteína β -amiloide), sin embargo su determinación no ha trascendido a la práctica clínica habitual porque supone la realización de una punción lumbar y la relativamente baja eficacia del diagnóstico no justifica el procedimiento. Es prioritario, por tanto, hallar una molécula cuyos niveles, medidos en fluidos periféricos (sangre u orina), se correlacionen con los distintos estadios evolutivos de la EA, permitiendo no solo un diagnóstico sensible y específico sino también la monitorización de la evolución de la EA. En la actualidad varias moléculas están siendo estudiados con este objetivo y como veremos más adelante la Kalikreína 6 es una de las más prometedoras.

Las Kalikreínas.

Genes de la familia de la kalikreína

Las Kalikreínas tisulares son una subfamilia de serín proteasas con un alto grado de especificidad de sustrato y variada expresión in diversos tejidos y fluidos biológicos.

En la actualidad las Kalikreínas se dividen en dos grupos, plasmáticas y tisulares que difieren tanto en peso molecular como especificidad de sustrato, características inmunológicas y estructura génica. Las kalikreinas plasmáticas son sintetizadas exclusivamente en el hígado y están implicadas en coagulación y fibrinólisis, regulación de la presión arterial y reacciones inflamatorias (2). Las kalikreínas tisulares están implicadas en procesamiento post-translacional de péptidos y potencialmente liberación de péptidos de gran importancia biológica como la kinina (3). Las Kalikreínas tisulares, también llamadas kininogenasas, son enzimas que inactivan kininas(4). La Kalikreína K1 digiere kininógeno generando bradiquinina y por lo tanto modulando funciones biológicas tan variadas como presión arterial, balance electrolítico e inflamación así como angiogénesis o control de niveles de factores de crecimiento, hormonas y citocinas a las que puede digerir (5).

Kalikreínas humanas

Los genes que codifican para las Kalikreínas humanas se encuentran localizados como un grupo en el mismo locus cromosómico. Los genes de las Kalikreínas tisulares humanas se encuentran en el cromosoma 19 (6). Todos los genes están localizados dentro de una región de 320 kilobases y codifican para proteínas cuyo peso molecular oscila entre 27 y 40 kDa. Todas las Kalikreínas son serín proteasas con un aminoácido serina conservado en la secuencia Gly-Asp-Ser-Gly del centro activo (7).

| New Symbols | Aliases | OMIM | Previous Symbols | GenBank |
|--------------|---|--------|------------------|----------|
| KLK1 | - | 147910 | KLK1 | L10038 |
| KLK2 | - | 147960 | KLK2 | M18157 |
| KLK3 | PSA, APS | 176820 | KLK3 | M27274 |
| KLK4 | Prostase, KLK-L1, KLK4, PSTS, EMSP, EMSP1 | 603767 | PRSS17 | AF113140 |
| KLK5 | KLK-L2, HSCTE | - | - | AF135128 |
| KLK6 | Zyme, neurosin | 602652 | PRSS9 | AF149289 |
| KLK7 | HSCCE, SCCE | - | PRSS6 | L33404 |
| KLK8 | Neuropsin, TADG14, HNP | - | PRSS19 | AB009849 |
| KLK9 | KLK-L3 | - | - | AF135026 |
| KLK10 | NES1 | 602673 | PRSSL1 | AF055481 |
| KLK11 | TLSP | - | PRSS20 | AB012917 |
| KLK12 | KLK-L5 | - | - | - |
| KLK13 | KLK-L4 | - | - | - |
| KLK14 | KLK-L6 | - | - | - |

Tres proteínas del grupo de las Kalikreínas son llamadas Kalikreínas clásicas en referencia al hecho de que fueron las primeras descritas. Este grupo incluye hK1, hK2 y hK3. El resto se conocen como nuevas Kalikreínas. Numerosas funciones han sido descritas para las Kalikreínas tanto en fisiología normal como en progresión tumoral y las hemos resumido en la tabla que sigue:

| Kalikreína | Substrato | Papel |
|---------------------------|--|---|
| hK1 | <i>Preo-MMP2, pro-MMP9</i> | Activación de MMPs latentes resultando en degradación de la matriz extracelular (ECM). Papel en angiogénesis y invasión y progresión tumoral. |
| | <i>IGFBP3</i> | Libera IGF resultando en proliferación de osteoblastos y células tumorales. |
| hK2 | <i>Pro-hK3</i> | Activación de pro-hK3 |
| | <i>IGFBP 2, 3, 4 y 5</i> | Libera IGF |
| | <i>Pro-uPA</i> | Activación de pro-uPA que resulta en activación de la plasmina y degradación de ECM |
| | <i>Fibronectina</i> | Degradación de ECM, angiogénesis, invasión y metástasis |
| hK3 | <i>IGFBP 3 y 4</i> | Liberación de IGF |
| | <i>TGFb latente</i> | Activación de TGFb resultando en proliferación de osteoclastos y supresión de tumores o progresión. |
| | <i>Fibronectina, laminina, gelatina y fibrinógeno.</i> | Degradación de la ECM |
| | <i>Lys-plasminógeno</i> | Generación de fragmentos anti-angiogénicos |
| | <i>PTHrP</i> | Clivaje e inactivación de PTHrP |
| hK4 | <i>Pro-hK3</i> | Activación de pro-hK3 |
| | <i>Pro-uPA</i> | Activación de pro-uPA que resulta en activación de la plasmina y degradación de ECM |
| hK6 | <i>Fibrinógeno, colageno I y IV, laminina y fibronectina</i> | Degradación de ECM. Papel en angiogénesis invasión y metástasis |
| | <i>Plasminógeno</i> | Generación de fragmentos anti-angiogénicos |
| hK7 hK13 | <i>Fibrinógeno</i> | Degradación de ECM. Papel en angiogénesis invasión y metástasis |
| | <i>Plasminógeno</i> | Generación de fragmentos anti-angiogénicos |
| hK14 | <i>Matrisilina-4, lamininas, colágenos</i> | Potenciales substratos |
| hK15 | <i>Pro-hK3</i> | Activación de pro-hK3 |
| | <i>Pro-uPA</i> | Activación de pro-uPA que resulta en activación de la plasmina y degradación de ECM |

Valor diagnóstico y pronóstico de las Kalikreínas

En 1998 la Federal and Drug Administration (FDA) aprobó para su uso en clínica la determinación de PSA (antígeno prostático específico o hK3) libre como un test diagnóstico que se correlaciona con la probabilidad de existencia de cáncer de próstata. Este test diagnóstico es universalmente aceptado y es clave en el diagnóstico y estudio de la evolución del cáncer de próstata.

| Standard PSA | Probabilidad de cáncer | Porcentaje de PSA libre | Probabilidad de cáncer |
|--------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 0-2 ng/mL | 1% | 0-10% | 56% |
| 2-4 ng/mL | 15% | 10-15% | 28% |
| 4-10 ng/mL | 25% | 15-20% | 20% |
| >10 ng/mL | >50% | 20-25% | 16% |
| | | >25% | 8% |

Están por demostrar los valores predictivos que tienen otras kalikreínas como biomarcadores de aquellas enfermedades con las que se han relacionado. Con la EA se han relacionado de una forma u otra las Kalikreínas 6, 7, 8 y 10, si bien aún no se han realizado los estudios necesarios para conocer su sensibilidad y especificidad.

La Kalikreína 6

Tal como se ha señalado, el gen de la Kalikreína 6 se encuentra localizado en el cromosoma 19q13.3-q13.4, y está compuesto de 7 exones de los cuales los dos primeros no se transcriben (8). La Kalikreína 6 tiene una pauta abierta de lectura de 732 pares de bases que codifican una proteína de 244 aminoácidos sintetiza como pre-pro-hK6. Una vez el péptido señal es liberado la pro-hK6 es liberada al medio extracelular, donde un nuevo clivaje mediado por la cual probablemente es predecesora de una forma activa de 223 aminoácidos aunque esto no ha sido demostrado, compartiendo ~30% de similitud con otras Kalikreínas.

La Kalikreína tipo 6 (hk6), también conocida como neurosina, zyme o proteasa M, es una serín proteasa "similar a tripsina" como demuestran los datos de cristalización (9) expresada principalmente en el cerebro humano (Figura 1).

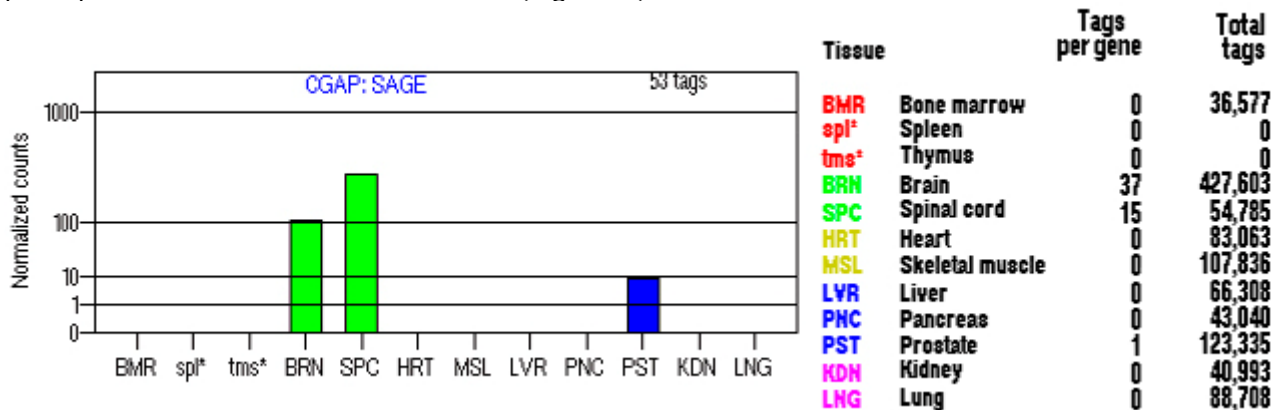


Figura 1. Expresión de hK6. Obtenido de GeneCard for gene *KLK6* GC19M056153.

<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?KLK6&search=KLK6>

En el cerebro, hK6 es expresada en el epitelio del plexo coroideo (10) y en los oligodendrocitos (células productoras de mielina en el sistema nervioso central) maduros (11) existiendo una relación entre hK6 y enfermedades desmielinizantes (12) de forma que el bloqueo de la actividad de hK6 atenua enfermedades inflamatorias del sistema nervioso central (13).

Kalikreína 6 como biomarcador de la Enfermedad de Alzheimer

Se ha encontrado hK6 presente en líquido cefalorraquídeo humano en condiciones de normalidad (14), aunque esta forma aislada corresponde a la proteína completa sin procesamiento de la región

pro como lo demuestra el hecho de que su secuencia N-terminal sea Glu-Glu-Gln-Asn-Lys y por lo tanto presumiblemente inactiva. Curiosamente, en pacientes con Enfermedad de Alzheimer la concentración de hK6 en líquido cefalorraquídeo es ~3 veces superiores (15) aunque otros autores afirman que se encuentran disminuidos (14) mientras que en sangre la concentración es unas 10 veces superior a la normal (15).

No parece existir controversia en los datos que afirman una disminución de los niveles de hK6 en parénquima cerebral de pacientes con EA (16) donde se localiza en las placas seniles y ovillos neurofibrilares (17). El mecanismo patogénico por el que la hK6 puede estar implicada en la enfermedad de Alzheimer no esta claro, si bien en cierto modo parece que hK6 posee propiedades amiloidogénicas (18).

Por un lado se sabe que la proteína beta amiloide fibrilar (fAβ), que es uno de los principales componentes de las pacas amiloides que aparecen en la EA, inhibe la actividad proteásica de ciertas proteínas, tales como la proteasa bovina cerebral de alto peso molecular y la tripsina (19), por lo que muy probablemente también inhiba a hK6. Además fAβ es resistente a la actición proteolítica de la tripsina desde fases tempranas de la enfermedad, cuando se comienzan a formar los agregados de beta-amiloide. Todo ello sugiere que la fibrilación de Abeta puede afectar al propio aclaramiento de Abeta por la inhibición de proteasas cerebrales, cerrándose un círculo vicioso que hace progresar la enfermedad (Figura 2).

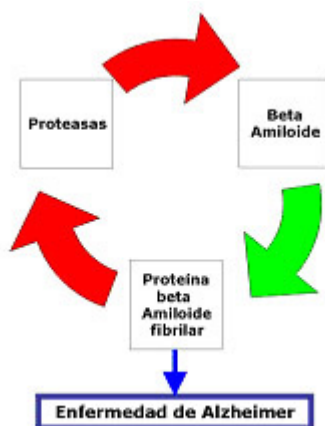


Figura 2. La proteína amiloide fibrilar inhibe a las proteasas que degradan el beta amiloide cerrándose un círculo que perpetúa el desarrollo de la enfermedad.

Por otro lado, una de las hipótesis más plausibles es que hK6 actúa regulando el balance de las distintas secretasas (Figura 3) que procesan la proteína beta amiloide, deshaciendo el equilibrio fisiológico en favor de la beta secretasa (BACE) que genera amiloide 1-42 que no puede ser eliminado desencadenándose así la cascada amiloide.



Figura 3. Hipótesis de la interacción de hK6

con secretasas.

No obstante los estudios realizados hasta el momento incluyen un número escaso de pacientes y no se han incluido otros pacientes con otros tipos de demencia, por lo que para comprobar la sensibilidad y especificidad de esta prueba son necesarios estudios más amplios

Clonación y Purificación de Kalikreína 6:

El primer paso necesario para la determinación y cuantificación de cualquier proteína es su purificación. En las líneas siguientes describimos el procedimiento que nuestro grupo a desarrollado para lograr este objetivo.

Se ha extraído mRNA de células SW-13 usando el kit RNAeasy obtenido de Qiagen, Valencia, CA, siguiendo las instrucciones del proveedor. El DNA fue digerido con DNase obtenida de Ambion, Austin, TX, y cDNA fue sintetizado usando el First-Strand cDNA synthesis kit obtenido de Invitrogen, La Jolla, CA seguido de digestión con RNase obtenida de Ambion, Austin, TX. Se usaron 100 ng de cDNA para amplificar la secuencia de hK6 en una reacción de PCR de 50 μ l con 1 U of Platinum® Taq polymerase High Fidelity, 5 ml de cDNA de la reacción anterior, 60 mM Tris-SO₄pH 8.9, 18 mM (NH₄)₂SO₄, 2mM Mg₂SO₄, usando 0.2 μ M de los primeros.

5'-CACCATGAAGAAGCTGATGGTGGTG-3'
5'-CTTGGCCTGAATGGTTTTTTGGAT-3'

El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa tenido con bromuro de etidio y la la banda correspondiente a hK6 extraída y purificada usando el Gel extracción Kit obtenido de Qiagen siguiendo las instrucciones del proveedor.

La secuencia de la hK6 fue insertada en el plásmido pCDNA6.2/GW/V5/D-TOPO obtenido de Invitrogen en siguiendo las instrucciones del proveedor. El inserto fue secuenciado y su secuencia depositada en GenBank con Accession Number AY785948.

Dicho vector fue transfectado en células HEK293 usando Fugene 6.0 obtenido de Roche, Indianapolis, IN, y las células seleccionadas usando 100 mg/ml de blasticidina en el medio de cultivo durante dos semanas. Los niveles de expresión de hK6 se comprobaron mediante análisis de Western-blot incubados con anticuerpos anti-V5 como se muestra en la Figura 4.

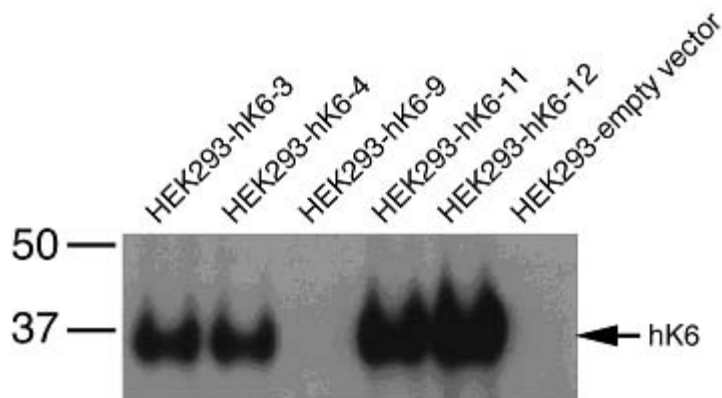


Figura 4.

El clon HEK293-hK6-12 fue seleccionado para obtener 1 litro de medio de cultivo que se uso para purificar hK6. El medio fue filtrado a 0.22 μ m e incubado con 10 mg de anticuerpo anti-V5 y 200 μ l de proteína G-agarosa durante 12 horas. El medio fue pasado a través de una columna para capturar las bolas de agarosa que fueron subsecuentemente lavadas con 5 ml de NaCl 50 mM en HEPES 20 mM, pH 7.4 y eluidas en 5 ml de NaCl 2M en HEPES 20 mM, pH 7.4. La muestra fue dializada contra 1.5 l de NaCl 50 mM en HEPES 20 mM, pH 7.4 y concentrada hasta 100 ml usando Amicon Centrifugal Devices obtenidos de Millipore, Billerica, MA. Los resultados finales se muestran

en la Figura 5.

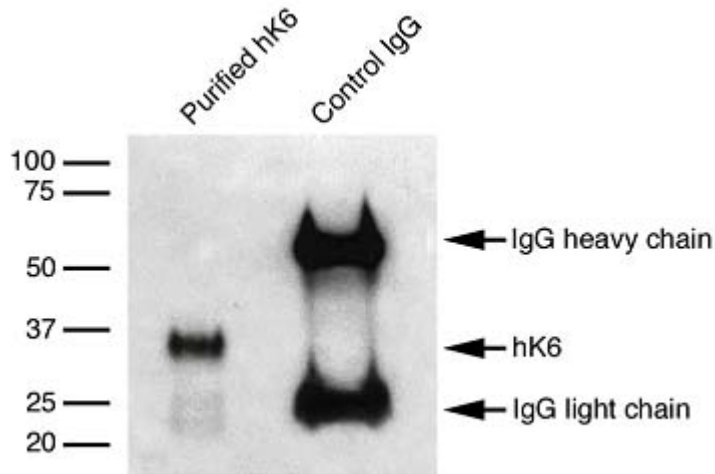


Figura 5.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Boada, M., J. Pena-Casanova, et al. (1999). "Costs of health care resources of ambulatory-care patients diagnosed with Alzheimer's disease in Spain." *Med Clin (Barc)* 113(18): 690-5.
2. Bhoola, K. D., C. J. Elson, et al. (1992). "Kinins--key mediators in inflammatory arthritis?" *Br J Rheumatol* 31(8): 509-18.
3. Clements, J., A. Mukhtar, et al. (1997). "Kallikreins and kinins in inflammatory-like events in the reproductive tract." *Pharmacol Res* 35(6): 537-40.
4. Yousef, G. M. and E. P. Diamandis (2001). "The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease." *Endocr Rev* 22(2): 184-204.
5. Bhoola, K. D., Figueroa C. D., et al. (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." *Pharmacol Rev* 44(1): 1-80.
6. Clements, J., A. Mukhtar, et al. (1997). "Kallikreins and kinins in inflammatory-like events in the reproductive tract." *Pharmacol Res* 35(6): 537-40.
7. Neurath, H., K. A. Walsh, et al. (1967). "Evolution of structure and function of proteases." *Science* 158(809): 1638-44.
8. Yousef, G. M., L. Y. Luo, et al. (1999). "Molecular characterization of zyme/protease M/neurosin (PRSS9), a hormonally regulated kallikrein-like serine protease." *Genomics* 62(2): 251-9.
9. Bennett, M. J., S. I. Blaber, et al. (2002). "Crystal structure and biochemical characterization of human kallikrein 6 reveals that a trypsin-like kallikrein is expressed in the central nervous system." *J Biol Chem* 277(27): 24562-70.
10. Petraki C, Karavana N, Skoufogiannis P, Little S, Howarth D, Yousef G, Diamandis E. The Spectrum of Human Kallikrein 6 (Zyme/Protease M/Neurosin) Expression in Human Tissues as Assessed by Immunohistochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol. 49, 1431-1442.
11. Yamanaka, H., X. He, et al. (1999). "Protease M/neurosin mRNA is expressed in mature oligodendrocytes." *Brain Res Mol Brain Res* 71(2): 217-24.
12. Scarisbrick, I. A., S. I. Blaber, et al. (2002). "Activity of a newly identified serine protease in CNS demyelination." *Brain* 125(Pt 6): 1283-96.
13. Blaber, S. I., B. Ciric, et al. (2004). "Targeting kallikrein 6 proteolysis attenuates CNS inflammatory disease." *Faseb J* 18(7): 920-2.
14. Mitsui, S., A. Okui, et al. (2002). "Decreased cerebrospinal fluid levels of neurosin (KLK6), an aging-related protease, as a possible new risk factor for Alzheimer's disease." *Ann N Y Acad Sci* 977: 216-23.
15. Diamandis, E. P., G. M. Yousef, et al. (2000). "Human kallikrein 6 as a biomarker of alzheimer's disease." *Clin Biochem* 33(8): 663-7.
16. Zarghooni, M., A. Soosaipillai, et al. (2002). "Decreased concentration of human kallikrein 6

- in brain extracts of Alzheimer's disease patients." *Clin Biochem* 35(3): 225-31.
17. Ogawa, K., T. Yamada, et al. (2000). "Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease." *Psychiatry Clin Neurosci* 54(4): 419-26.
 18. Little, S. P., E. P. Dixon, et al. (1997). "Zyme, a novel and potentially amyloidogenic enzyme cDNA isolated from Alzheimer's disease brain." *J Biol Chem* 272(40): 25135-42.
 19. Chauhan V, Sheikh A, Chauhan A, Spivack W, Fenko M and Malik M. "Fibrillar amyloid beta-protein inhibits the activity of high molecular weight brain protease and trypsin" *Journal of Alzheimer's Disease* 7 (2005) 37-44.