

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata (U.N.L.P)

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/TEMA PROPUESTO: Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones.

TÍTULO DEL TRABAJO: DETECCION DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE PROTEASAS EN SEMILLAS DE MACLURA POMIFERA (RAF.) SCHNEID

AUTOR(ES): Lazza, Cristian Martin

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: lazzacmartin@biol.unlp.edu.ar

PALABRAS CLAVES: Inhibidores, Proteasas, *Maclura pomifera*

INTRODUCCION:

Los inhibidores de proteasas (IPs) representan una eficiente vía que tienen los organismos para el control de la actividad de proteasas endógenas que necesitan ser balanceadas en estado normal para obtener una proteólisis controlada, pero también son herramientas que protegen a los tejidos frente a una proteólisis descontrolada en estados patológicos. Adicionalmente, los IPs pueden controlar la actividad de proteasas exógenas como las de virus, bacterias y parásitos y de este modo estar involucrados en los mecanismos de defensa del organismo. Seguramente el mayor incentivo para la búsqueda de nuevos IPs es que el control de la proteólisis representa una herramienta terapéutica valiosa, habiendo probado su utilidad no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos^{1,2,3,4}. Los inhibidores de proteasas de plantas son estructuras peptídicas pequeñas, generalmente se encuentran en alta concentración en tejidos de almacenamiento (hasta un 10% del contenido total de proteínas), pero también son detectables en hojas en respuesta al ataque de insectos y microorganismos patógenos. La contribución de los IPs a los mecanismos de defensa de la planta se basa en la inhibición de las proteasas presentes en el intestino de insectos o de las proteasas producidas por microorganismos patógenos⁵. Como los inhibidores son expresados a través de la activación de genes simples, se han generado varias plantas transgénicas que expresan IPs que fueron ensayadas con el fin de incrementar la capacidad defensiva de las mismas frente a diversas plagas. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos^{6,7,8,9,10,11}. Los inhibidores contra proteasas serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas son ubicuos, pero los inhibidores de proteasas aspárticas no han sido hasta ahora detectados en semillas, aún cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar (<http://www.ba.itb.cnr.it/PLANT-PIs/TabII.html>). La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos

¹ Rosenthal, P. J., J. H. McKerrow, M. Aikawa, H. Nagasawa, and J. H. Leech. (1988). "A malarial cysteine protease is necessary for haemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*", *J. Clin. Investig.* **82**: 1560-6.

² Wlodawer A. & J. Vondrasek J. (1998) "Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**: 249-84.

³ Turk, V., J. Kos And B. Turk (2004) "Cysteine cathepsins (proteases)—On the main stage of cancer?", *Cancer Cell*, **5**: 409-410 (review). *Cancer Cell* **5**: 409-20.

⁴ Demeule, M., M. Brossard, M. Page, D. Gingras and R. Beliveau (2000) "Matrix Metalloproteinase inhibition by green tea catechins", *Biochim. Biophys. Acta*, **1478**: 51-60.

⁵ Ryan, C.A. (1990) "Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens" *Annu.Rev.Phytopath.* **28**: 425-49.

⁶ Hass, G.M. and Derr, J.E. (1979) "Purification and Characterization of the Carboxypeptidase Isoinhibitors from Potatoes", *Plant Physiol*, **64**, 1022-1028

⁷ Hass, G.M. and Ryan, C.A. (1981) "Carboxypeptidase inhibitor from potatoes", *Methods in Enzymology*, **80**, 778-91.

⁸ Khan A.R. & M.N. James (1998) "Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes", *Protein Sci* 1998;7:815-36

⁹ Lenarcic, B. and Turk, V. (1999) "Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D", *Biol Chem* **274**: 563-6

¹⁰ Davies, D.R. (1990) "The structure and function of the aspartic proteinases", *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**1: 89-215.

¹¹ Thornberry, N.A. and Lazebnik, Y. (1998) *Science*, **281**, 1312-6.

estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima

OBJETIVOS:

- Obtención de extractos a partir de semillas de la especie vegetal seleccionada.
- Detectar actividad inhibitoria de proteasas en los extractos obtenidos.
- Ensayar la acción de los inhibidores aislados frente a diferentes proteasas.
- Aislamiento, purificación y caracterización de los inhibidores detectados.

MATERIALES Y METODOS:

Preparación del Extracto crudo

Las semillas fueron extraídas del fruto de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid, lavadas con agua destilada y secadas. Se trituraron con molinillo y luego se adiciona buffer Tris-HCl 50 mM 0.15 M NaCl pH 7,2 (20% P/V). La mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se centrifuga a 10000 g por 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido es el extracto crudo (EC).

Purificación preliminar por precipitación con solventes orgánicos

Se trata el extracto crudo con 4 volúmenes de acetona utilizando una ampolla de decantación, con agitación y en frío. Se incuba por 48 horas a -20°C y se centrifuga a 10000 g por 30 min. Se desecha el sobrenadante y el precipitado se seca eliminando el solvente residual en desecador bajo vacío y se resuspende en un volumen de buffer igual al inicial de extracto crudo y se denomina PAR (precipitado acetónico redissuelto).

Determinación de proteínas por el Método de Bradford

Este método se basa en que la unión de Coomassie Blue G-250 a la proteína produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). El método resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales, que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el Método de Lowry.

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 100-900 µg/ml (Macrométodo) y en el de 10-100 µg/ml (Micrométodo)

Se realizó el blanco correspondiente utilizando el buffer de extracción.

Determinación de actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A (CPA):

La actividad inhibitoria de la muestra se manifiesta por una disminución en la velocidad de desaparición del color naranja en la mezcla de reacción, que se corresponde con una disminución en la velocidad de hidrólisis del sustrato.

La actividad es registrada por el descenso de la absorbancia a 350 nm mediante medidas continuas durante 180 seg a 37°C.

Buffer de reacción: Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5

Solución de CPA: bovina (Sigma) 10 µg/ml

Solución de sustrato: N-(4-metoxifenilazofornil)-Phe-OH, de color naranja, disuelto en DMSO 10 mM.

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Determinación de actividad inhibitoria de Papaína

La actividad inhibitoria es registrada por la variación de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 seg a 37°C, midiendo la cantidad de p-nitroanilina liberada por la hidrólisis del sustrato y comparando con el blanco dónde la muestra a evaluar es reemplazada por buffer.

Solución de Papaína: 1mg/ml en buffer fosfato 0.1 M pH 6.5

Sustrato: PFLNA 2 mM disuelto en DMSO

Buffer de reacción : buffer fosfato 0,1 M pH 6,5 EDTA 0.1 mM KCl 0.1M DTT 3 mM

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

Determinación de actividad inhibitoria de Tripsina

La actividad es registrada por la variación de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 seg a 37°C.

Buffer de reacción: Tris 50 mM, CaCl₂ 40 mM, pH:8

Sc de Tripsina: tipo I de páncreas de bovino 0,8 mgr/ml

Sc de sustrato: Bapna 20 mM

Se determinaron los blancos de enzima y sustrato correspondientes.

CARACTERIZACIÓN ELECTROFORÉTICA

SDS-Tricina-PAGE

Preparación de las Muestras: Las muestras se mezclan con buffer de muestra para electroforesis y se llevaron a ebullición durante 5 min.

Preparación de los Geles: Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III, Bio-Rad.

Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida: Se aplicaron las muestras. En los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III, Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Las corridas se realizaron a voltaje constante (30 V) durante el apilado, luego se aumentó lentamente hasta 105 V al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Fijación y Tinción:

- Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250:

Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo.

Sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

- Tinción con Coomassie Coloidal

La tinción de proteínas por éste método (Neuhoff *et. al.*, 1988) provee niveles de detección en el orden de los ng. Finalizada la electroforesis, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 30 min y teñidos por inmersión en solución colorante durante toda la noche. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con agua destilada para eliminar la coloración de fondo.

Isoelectroenfoque

Preparación de las muestras: Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 µg/µl y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a precipitarlas con 5 volúmenes de acetona fría (-20 °C), centrifugarlas a 10.000 rpm durante 30 min, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada.

Preparación de geles: Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo,

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida: Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 5 µl). Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito de la celda de IEF. El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante: 100 V durante los primeros 15 min, 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

Fijación y Coloración: Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 min en solución fijadora, luego se trataron durante 2 h con solución colorante y a continuación fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Estimación del PI: Para la determinación de los puntos isoeléctricos (pI) de las distintas especies proteicas se utilizaron una mezcla de proteínas estándar de amplio rango de pI.

PURIFICACIÓN CROMATOGRÁFICA

Cromatografía de exclusión molecular

Se utilizó una columna Pharmacia (30 x 1,5 cm) rellena con Sephadex G50 Fy equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,2. Se sembraron 2 ml de precipitado acetónico rediseuelto y la elución se llevó a cabo con el mismo buffer utilizando una bomba peristáltica a una velocidad de flujo de 1,25 ml/min. Se recolectaron fracciones de 2.5 ml. Las fracciones que presentaron actividad inhibitoria fueron reunidas y sembradas posteriormente en una columna de intercambio iónico.

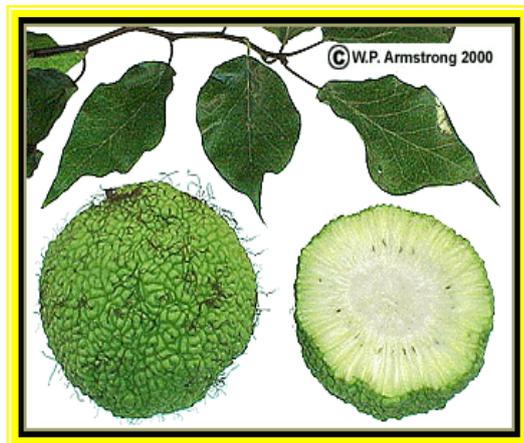
Cromatografía de intercambio iónico

Se utilizó una columna Pharmacia rellena con un intercambiador aniónico (Q-Sepharose Fast Flow) equilibrada con el buffer de partida (Tris-HCl 50 mM de pH 7,20).

Se sembró 1 ml de la fracción con actividad inhibitoria proveniente de la cromatografía de exclusión molecular. Luego de equilibrar la columna con buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,2, se llevó a cabo la elución con un gradiente lineal de NaCl (0 - 2 M) en el mismo buffer. Las experiencias se llevaron a cabo en cámara fría (4 °C) y el flujo de corrida fue de 1 ml/min. Se empleó el sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia).

RESULTADOS:

Material de trabajo: semillas de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid



Actividad inhibitoria (%)

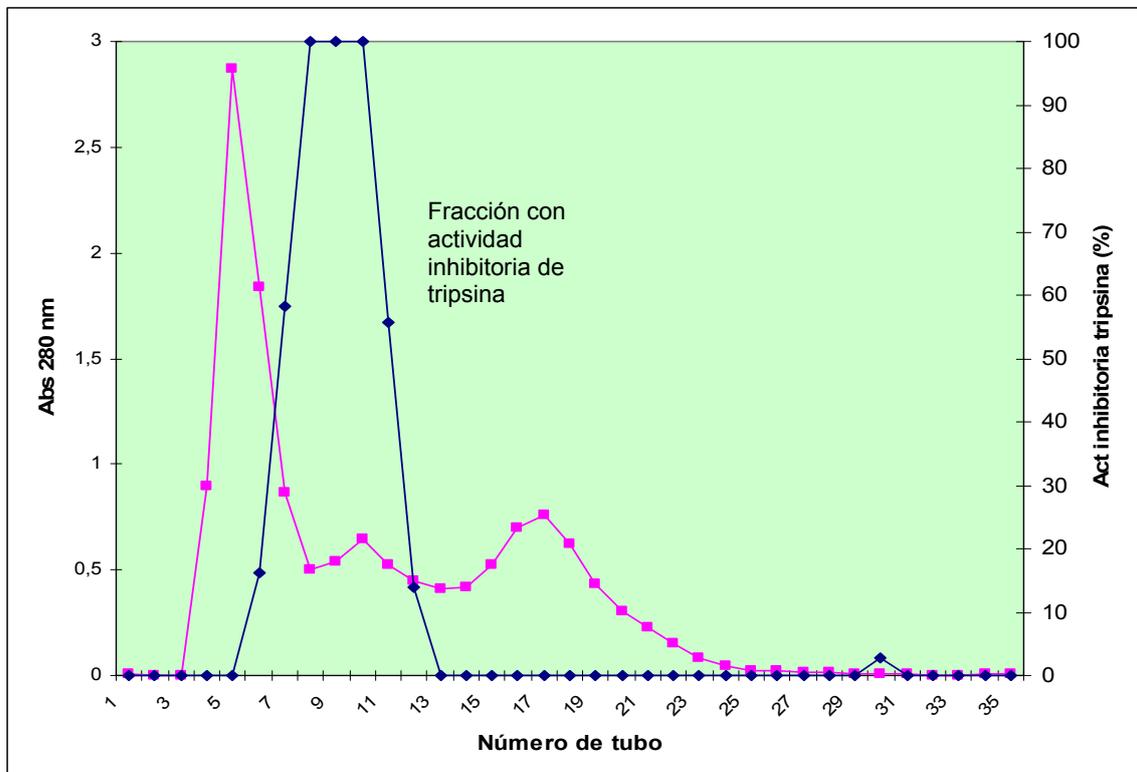
Muestras	Tripsina	Papaina	CPA
Extracto crudo	97.3%	0%	34%
PAR	96.6%	0%	42%

PAR: precipitado acetónico redisolto

CPA: carboxipeptidasa A

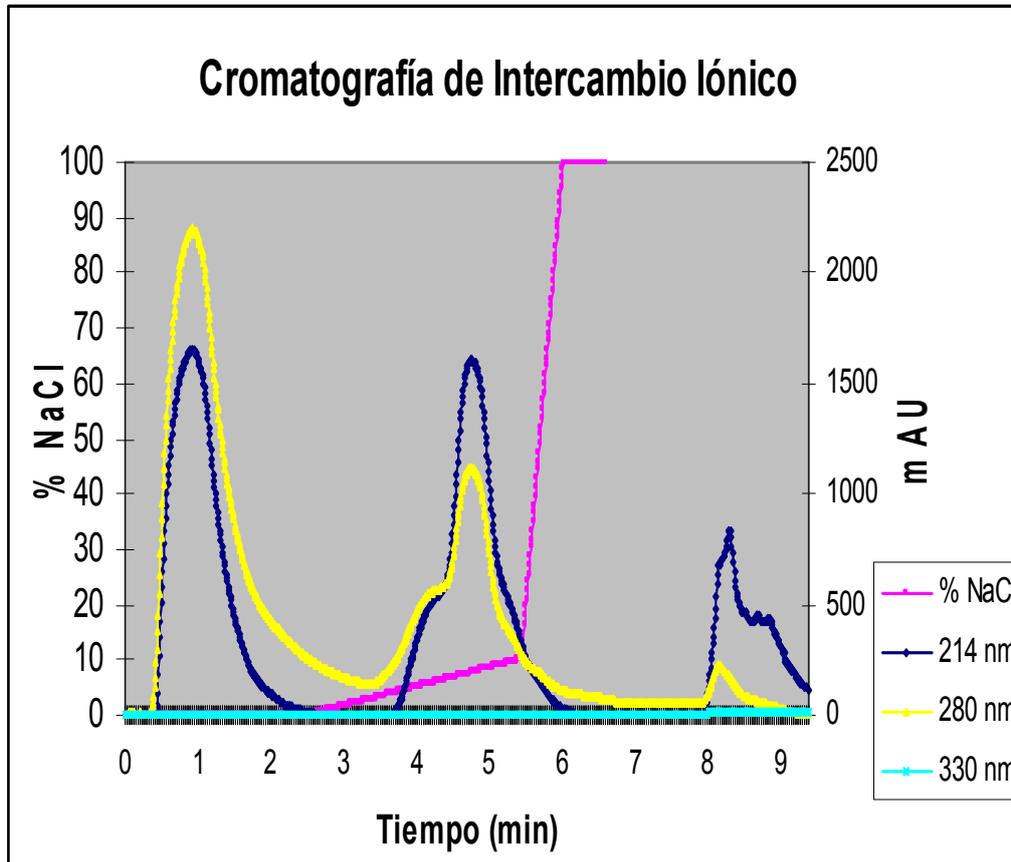
Dado que la actividad inhibitoria de tripsina fue la más alta, se procedió a purificar cromatográficamente dicho inhibidor.

Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G50)



La actividad inhibitoria de tripsina se muestra en color azul y la concentración de proteínas en rosa.

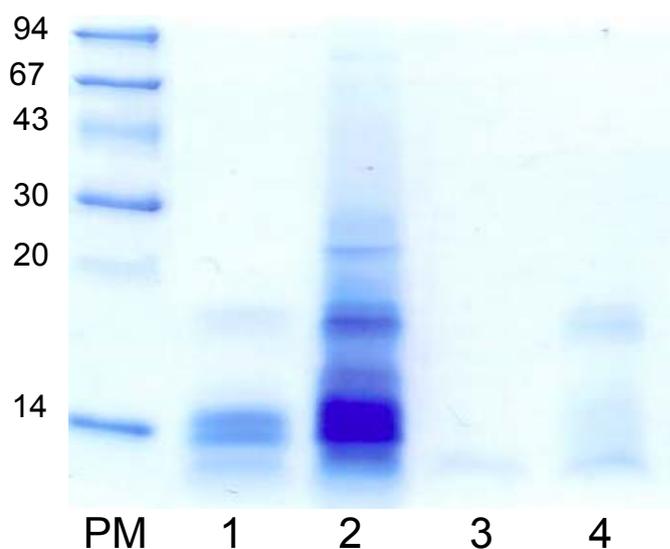
Cromatografía de intercambio aniónico (Q-Sepharose Fast Flow)



Concentración de proteínas (método de Bradford)

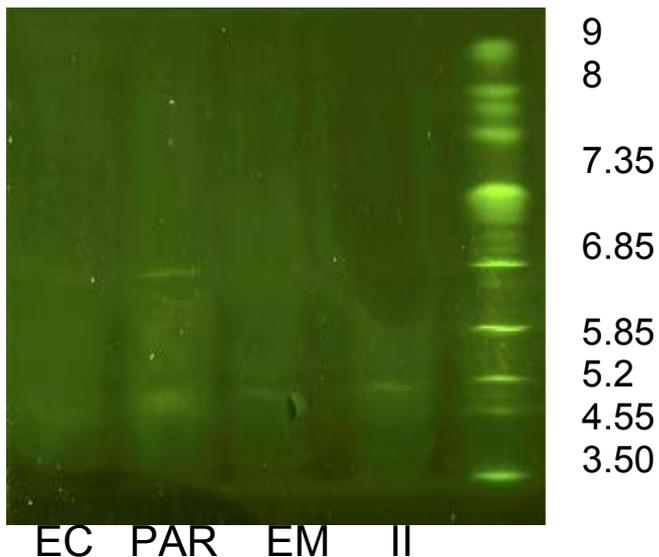
Muestras	(mg/g semillas)
Extracto crudo	19.88
PAR	7.13
Fracción inhibitoria (Sephadex G50 F)	0.45
Fracción inhibitoria (Q-Sepharose FF)	0.036

Caracterización de las muestras por SDS-Tricina-PAGE



PM: marcadores de peso molecular; calle 1: extracto crudo, calle 2: PAR, calle 3: fracción obtenida por intercambio iónico, calle 4: fracción obtenida por exclusión molecular.

Caracterización por Isoelectroenfoque



CONCLUSIONES:

A partir de semillas de *Maclura pomifera* se obtuvieron extractos acuosos donde se determinó la actividad inhibitoria frente a tripsina, papaína y carboxipeptidasa A utilizando sustratos sintéticos. Se detectó una inhibición del 95 % para tripsina, 34% para Carboxipetidasa A y no fue inhibida la papaína. Los extractos fueron purificados por precipitación acetónica seguida de diferentes técnicas cromatográficas y caracterizados mediante SDS-Tricina-PAGE e isoelectroenfoque. Por intercambio iónico se obtuvo una fracción con actividad antitripsina cuya pureza será determinada por HPLC-RP y MALDI-TOF MS.