

## **2. PEPTIDASAS VEGETALES**

### **2.1. ESTRATEGIAS PARA EL AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VEGETALES**

#### **2.1.1. Aislamiento de proteínas**

La metodología empleada en la extracción de proteínas determina su naturaleza y estabilidad, permitiendo validar los resultados obtenidos en procedimientos posteriores. En particular, la extracción de proteínas vegetales presenta problemas inherentes a la estructura de la célula vegetal, pues comparada con los tejidos animales y las células bacterianas, tiene menor contenido de proteínas y contienen en sus vacuolas peptidasas, alcaloides y compuestos polienólicos (flavonoides, taninos) que pueden interferir en la actividad proteica. En consecuencia, la estrategia de extracción depende de las características específicas de la proteína en estudio y de su localización (Michaud & Asselin, 1995).

La primera etapa en el aislamiento de una proteína es su liberación de las células que la contienen. El método elegido depende de las características mecánicas del tejido de procedencia, así como de la localización celular de la proteína de interés. Como métodos de ruptura mecánica de las células vegetales para liberar sus proteínas se pueden mencionar: 1) trituración con arena o alúmina, 2) trituración en mezclador de alta velocidad, 3) homogeneizador a pistón, 4) prensa francesa, 5) sonicación y 6) congelación con nitrógeno líquido y macerado (Voet & Voet, 1992).

La diversidad de proteínas involucradas en procesos de crecimiento, desarrollo y defensa impide la formulación de un procedimiento de extracción universal que permita recuperar todas las proteínas de un tejido vegetal. Sin embargo, la solubilidad de las proteínas de plantas, que está relacionada con la localización intracelular, permite formular diferentes métodos de extracción. Ellos incluyen: 1) extracción con buffer acuoso, 2) extracción con detergentes, 3) precipitación directa con TCA, 4) precipitación con acetona y 5) precipitación con TCA-acetona (Michaud & Asselin, 1995).

Para prevenir la proteólisis durante la extracción se debe utilizar alguno/s de los procedimientos siguientes: 1) extraer con buffer que contenga SDS (sodio dodecil sulfato), 2) extraer con TCA frío al 10 % (p/v), 3) adicionar un cóctel de inhibidores de peptidasas al buffer de extracción, 4) trabajar a baja temperatura durante períodos cortos de tiempo, 5) usar buffers de pH por encima o por debajo del óptimo, 6) adicionar agentes protectores como dimetil sulfóxido (10 %, v/v) o glicerol (25 % v/v) o agentes reductores

como ditioneitol (1mM), L-cisteína (5 mM) o  $\beta$ -mercaptoetanol (1mM)) o 7) adicionar agentes quelantes como EDTA (2 mM) o EGTA (2mM) para remover cationes bivalentes que son cofactores de metalopeptidasas y de varias peptidasas serínicas (Michaud & Asselin, 1995).

Los compuestos fenólicos pueden inactivar las proteínas al formar puentes de hidrógeno con los átomos de oxígeno de los enlaces peptídicos y también cuando los fenoles son oxidados a quinonas pueden condensarse con los grupos -SH y -NH<sub>2</sub> de las proteínas. Estas interacciones químicas determinan la formación de dímeros y polímeros de proteína entrecruzadas por polifenoles, afectando la calidad del patrón proteico observado en los geles. Para evitar la acción de los compuestos fenólicos se pueden usar varias estrategias: 1) precipitar todas las proteínas triturando los tejidos en TCA frío (no permite medir actividad biológica), 2) adicionar polivinilpirrolidona (PVP) que compleja los fenoles y alcaloides, 3) en combinación con PVP, inactivar la fenoloxidasas con agentes reductores como ascorbato,  $\beta$ -mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), dietilditiocarbamato de sodio, metabisulfito de sodio o tiourea, 4) agregar EDTA que secuestra el cobre que es un cofactor necesario para la expresión de la polifenoloxidasas, 5) usar un buffer de extracción de bajo pH que ayuda a prevenir la formación de quinonas y favorece la unión de PVP a fenoles y 6) remover fenoles y alcaloides por gel filtración (Michaud & Asselin, 1995).

### **2.1.2. Purificación de proteínas**

Las proteínas se purifican mediante procedimientos de fraccionamiento. En una serie de etapas independientes, se aprovechan las diversas propiedades fisicoquímicas de las proteínas que interesan para separarlas progresivamente de otras proteínas y/o de las demás sustancias.

Las características de las proteínas que se emplean en los diversos procedimientos de separación son: solubilidad, carga iónica, tamaño molecular, propiedades de absorción y capacidad de unión a otras moléculas biológicas (Voet & Voet, 1992).

#### *2.1.2.1. Solubilidad*

Los múltiples grupos ácido-base de una proteína determinan que sus propiedades de solubilidad dependan de la concentración de las sales disueltas, de la polaridad del disolvente, del pH y de la temperatura (Voet & Voet, 1992).

### *2.1.2.2. Separaciones cromatográficas*

La fase móvil de una cromatografía consiste en una mezcla de sustancias que se van a fraccionar disueltas en un líquido, que se hace fluir a través de una columna de una matriz porosa, que constituye la fase estacionaria. Las interacciones de los solutos individuales con la fase estacionaria determinan que cada componente migre con velocidades diferentes y que la mezcla se separe en bandas de sustancias puras. Los diversos métodos cromatográficos surgen de la interacción dominante entre la fase estacionaria y las sustancias que están siendo separadas y son: cromatografía de intercambio iónico, de adsorción, de exclusión molecular, de interacción hidrofóbica o de afinidad (Voet & Voet, 1992).

### *2.1.2.3. Separaciones electroforéticas*

La electroforesis es un método analítico de alto poder resolutivo que permite la separación de moléculas biológicas cargadas por la combinación de su migración en un campo eléctrico y el efecto de tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Las proteínas, al ser moléculas anfotéricas polivalentes, migran en un campo eléctrico de acuerdo con su carga neta, que a su vez depende de la carga macromolecular, del tamaño y de la forma, como así también de las propiedades fisicoquímicas del medio electroforético (Makowski & Ramsby, 1997).

La incorporación del detergente SDS a la solución proteica permite separar todos los tipos de proteínas, incluyendo las insolubles en agua. El SDS se une a las regiones hidrofóbicas de las moléculas proteicas haciendo que se desplieguen las cadenas polipeptídicas, liberándolas de sus asociaciones con otras moléculas proteicas o lipídicas. En estas condiciones la electroforesis separa los polipéptidos en función de su tamaño, lo que proporciona información sobre su peso molecular. Además, el agregado de un agente reductor como el  $\beta$ -mercaptoetanol reduce los enlaces disulfuro que pudieran existir en las proteínas, de modo que se pueden visualizar todos los polipéptidos constitutivos de las moléculas poliméricas (Voet & Voet, 1992).

### *2.1.2.4. Detección inmunológica*

La exposición de las proteínas presentes en una muestra a un anticuerpo específico contra la proteína en estudio y el revelado con un anticuerpo contra el primero acoplado a una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina) o a un colorante fluorescente, permite su identificación tanto en separaciones electroforéticas (Western blotting) como en los tejidos (inmunohistoquímica).

Las ventajas de estos métodos son las siguientes: a) no se necesitan reactivos radiactivos, b) no se requieren precauciones especiales para mantener la conformación nativa de la proteína y c) regiones de la proteína que están ocultas en la conformación nativa pueden exponerse durante la electroforesis desnaturante, lo que permite usar anticuerpos anti-peptídicos (Scheidtmann *et al.*, 1997).

## **2.2. ROL FISIOLÓGICO DE LAS PEPTIDASAS VEGETALES**

La mayor importancia de las peptidasas radica en que permiten la reutilización de los aminoácidos constituyentes de proteínas, lo que es fundamental en los procesos de desarrollo. Así, durante la germinación movilizan las reservas proteicas; durante el crecimiento y desarrollo permiten el recambio de las proteínas existentes por aquellas que la planta necesita para adaptarse a los cambios ambientales y, durante la senescencia producen los aminoácidos que serán reservados para su uso por la próxima generación.

Sin embargo, se han identificado varias peptidasas que no parecen cumplir ninguna función en el crecimiento y desarrollo o se encuentran en cantidades muy superiores a las que la planta necesita para estas funciones. A tales peptidasas se las llama proteínas secundarias, por analogía con los metabolitos secundarios (Boller, 1986).

### **2.2.1. Adquisición de nutrientes**

Debido a que las plantas son autótrofas, los procesos digestivos no presentan en general gran importancia. Las excepciones las constituyen las plantas carnívoras y el establecimiento de relaciones parasitarias o simbióticas.

#### ***Plantas carnívoras***

Las peptidasas de las plantas insectívoras son capaces de digerir las proteínas presentes en la presa capturada y por lo tanto aportar nutrientes a la planta. Las plantas carnívoras que muestran mayor secreción de enzimas digestivas son las de la familia *Nepenthaceae*, quienes presentan hojas transformadas en órganos huecos que atrapan insectos y otros invertebrados pequeños (Mutlu & Gal, 1999). Las peptidasas aisladas de *Nepenthes* tienen un pH óptimo en el rango ácido y son inhibidas por pepstatina (Tökes *et al.*, 1974). También se encuentran secreciones digestivas en especies de los géneros *Drosera*, *Dionaea*, *Drosophyllum* y *Pinguicula* (Boller, 1986).

Al igual que en el estómago de los vertebrados, las plantas insectívoras secretan HCl para mantener una alta acidez de los fluidos digestivos. Las diferentes plantas insectívoras utilizan mecanismos especiales para secretar el ácido y las peptidasas. En *Nepenthes* las glándulas secretan un fluido neutro que contiene las peptidasas pero que

a ese pH están prácticamente inactivas; frente a la captura de la presa, se secretan protones y se inicia la actividad digestiva. En *Pinguicula* las peptidasas se acumulan en las células glandulares superiores, mientras que el HCl lo hace en las células basales y se libera después de la estimulación (Boller, 1986).

### ***Plantas parásitas***

Las plantas parásitas presentan órganos diferenciados, los haustorios, que penetran en el huésped estableciendo un contacto directo con las células del xilema y/o del floema y toman sus nutrientes. La penetración y el desarrollo de los haustorios parece requerir de la acción de peptidasas (Boller, 1986).

### **2.2.2. Defensa contra patógenos y predadores**

Al igual que muchos metabolitos secundarios, algunas peptidasas son consideradas agentes protectores contra patógenos, parásitos y herbívoros (Bell, 1981). En general, estas peptidasas están localizadas en la vacuola o en la pared celular. Al lesionarse un tejido, las hidrolasas liberadas de las vacuolas rotas constituyen la primera línea de defensa contra potenciales patógenos. La presencia de abundantes peptidasas en algunos frutos (ananá, kiwi, papaya) podría relacionarse con esta función (Boller, 1986).

En el caso de *Cynara cardunculus* L., Ramalho-Santos *et al.* (1997) postulan que a semejanza de los inhibidores de peptidasas que desencadenan una hiperproducción de peptidasas digestivas en el tracto digestivo de los insectos, la cardosina podría cumplir la función de proteger al estigma floral del ataque de herbívoros.

Recientemente Schaller & Ryan (1996) han determinado que las heridas, el metil jasmonato y la sistemina inducen la síntesis del mRNA de una AP en las hojas de tomate postulando que estas enzimas intervendrían en las respuesta de defensa de las plantas de tomate contra el ataque de herbívoros.

### **2.2.3. Movilización de reservas**

Durante la germinación, las proteínas almacenadas en las semillas son expresadas en órganos específicos (endosperma o mesófilo del cotiledón), siendo generalmente sintetizadas como precursores que serán procesados antes de su depósito en los cuerpos proteicos. Para ello pareciera que es importante la co-localización en la misma organela de varias peptidasas (Mutlu & Gal, 1999).

Muchas peptidasas están involucradas en la movilización de las proteínas de reserva de la semilla, proveyendo los aminoácidos para el crecimiento de la planta. Entre ellas se encuentran las cisteín-peptidasas de *Vigna* y de maíz (Boller, 1986), las amino- y dipeptidasas de cebada (Mikola & Mikola, 1986) y las aspartil peptidasas de arroz (Doi *et*

*al.*, 1980), trigo (Belozerski *et al.*, 1989), cebada (Kervinen *et al.*, 1993; Sarkkinen *et al.*, 1992), cacao (Biehl *et al.*, 1993) y colza (D'Hondt *et al.*, 1993). También Voigt *et al.* (1997) asocia las altas actividades de peptidasas aspárticas encontradas en semillas no germinadas de varias angiospermas a funciones biológicas durante la maduración.

La movilización de reservas de la aleurona de cebada se encuentra bajo control hormonal. El ácido giberélico (GA<sub>3</sub>) derivado del embrión estimula la secreción de enzimas proteolíticas y su acción es antagonizada por el ácido abscísico (ABA). Esto se debería a que el GA<sub>3</sub> incrementaría la síntesis y transporte de peptidasas (cisteínicas y aspárticas) hacia las vacuolas que almacenan proteínas y/o a la disminución del pH del lumen de esta organela, lo que activaría dichas enzimas. Se comprobó que el tratamiento con GA<sub>3</sub> incrementa la actividad de tres peptidasas cisteínicas, mientras que no estimula significativamente a las APs (Bethke *et al.*, 1996; Swanson & Jones, 1996; Swanson *et al.*, 1998).

#### **2.2.4. Senescencia**

Es conocida la participación de peptidasas en los procesos de muerte celular de animales y plantas. La senescencia es un proceso programado dentro del desarrollo de la planta que involucra una serie de cambios enzimáticos y metabólicos que tienen lugar de forma simultánea o secuencial en los diferentes tejidos que envejecen. Se produce una movilización y exportación masiva de carbono, nitrógeno y minerales con un eficiente reciclaje de los nutrientes (Kaur-Sawhney & Galston, 1986).

En general, los estudios sobre la enzimología de los procesos degradativos en plantas adolecen de rigor técnico y han sido realizados en circunstancias experimentales muy diferentes que han llevado a resultados conflictivos. Un elemento de confusión adicional es que si bien el 95 % de las péptido-hidrolasas se encuentran en las vacuolas de las células del mesófilo, la mayor degradación de proteínas en la senescencia ocurre en el interior del cloroplasto. Actualmente, parece claro que el cloroplasto tiene sus propias peptidasas que serían codificadas en el núcleo, pues no se ha identificado en el ADN cloroplástico ninguna secuencia homóloga a las peptidasas conocidas. El control de la actividad de estas peptidasas durante la senescencia podría ocurrir bien por síntesis *de novo* de la proteína, por activación de enzimas preexistentes en forma de proenzimas o por compartimentalización, es decir co-localizando enzima y sustrato (Valpuesta *et al.*, 1993).

Ejemplos de un posible rol en la senescencia lo constituyen las APs encontradas en hojas de naranjo (García-Martínez & Moreno, 1986), de cebada (Kervinen *et al.*, 1995) y de flores de cardo (Heimgartner *et al.*, 1990, Cordeiro *et al.*, 1994a).

### 2.2.5. Interacción polen-pistilo

La papila estigmática es el lugar donde interactúa primero el polen con el tejido esporofítico femenino en su camino hacia el ovario. En la superficie del estigma es capturado, hidratado y germina. Todos estos procesos involucran eventos moleculares de reconocimiento, señalización y respuesta (Elleman & Dickinson, 1990, 1994).

El hecho que la cardosina A esté localizada en las vacuolas de las papilas estigmáticas de *C. cardunculus* L. llevó a Ramalho-Santos *et al.* (1997) a postular que esta enzima estaría involucrada en la interacción polen-pistilo, participando en eventos extracelulares de degradación proteica que permitan la correcta adhesión y/o germinación del polen. Además, la presencia de la triada Arg-Gly-Asp (RGD) en la secuencia de la cardosina A (característica de las proteínas celulares que unen integrina) que puede ser reconocida por una proteína de 100 kDa del polen, apoyan la hipótesis de la intervención de la cardosina A en el interacción polen-pistilo (Frazão *et al.*, 1999).