



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
LIPROVE

Aislamiento, purificación y caracterización de las endopeptidasas cisteínicas presentes en frutos de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*)



Adriana Brullo

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas

Directores: Néstor O. Caffini y Claudia L. Natalucci

Año 2003

“... el que no canta no puede imaginarse
lo que es el placer de cantar”

Gabriel García Márquez (“Vivir para contarla”)

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido realizar mis estudios de grado y de posgrado.

Al Prof. Néstor O. Caffini, mi director de tesis, porque luego de haber rendido el examen final de Botánica tuve la intuición de que junto a él podría crecer, tanto desde el punto de vista profesional como humano.

A la Prof. Claudia Natalucci, mi codirectora de tesis (y también mi ex-ayudante de Botánica), por su abnegación en la enseñanza de mis primeras armas en la investigación, por inculcarme el concepto de trabajar con espíritu de grupo y por tener la humildad de hacerme sentir a su mismo nivel.

A la Prof. Nora Priolo, por su apoyo moral, su comprensión y todo el afecto recibido durante los momentos compartidos en el laboratorio, cuyo recuerdo siempre está presente, a pesar de la distancia que ahora nos separa.

A la Dra. Laura López, porque además de su tranquilidad contagiosa demostró ser una colega solidaria.

A la Dra. María Cecilia Arribére, por su compañerismo e interés en mi trabajo, a pesar de estar trabajando en temas diversos.

Al Prof. Aníbal Amat, quien con sus conocimientos botánicos aumentó mi curiosidad en este campo. Sin él no hubiera sido posible la realización de esta tesis, porque se ocupó, entre otras cosas, de recolectar los frutos de *Pseudananas macrodentes* a partir de los cuales se extrajeron la proteasas en estudio.

A la Dra. Marta Butazzoni, por su sensibilidad y el afecto demostrado en el laboratorio, a pesar del poco tiempo compartido.

En lo que respecta a la actividad desarrollada en el Dipartimento di Scienze Biochimiche della Facoltà di Medicina dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", debo expresar mi agradecimiento:

A la Prof. Donatella Barra, porque aceptó mi estadía en su laboratorio como becaria del Instituto Italiano de Cultura (Embajada de Italia) y me ayudó a profundizar algunos aspectos bioquímicos de las proteasas estudiadas.

Al Prof. Bruno Maras, por aportar sus conocimientos técnicos con gran dedicación y voluntad, todo ello a través de su elevado grado de calidad humana.

Al Prof. Francesco Bossa, Decano della Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", por colaborar en la discusión de mi Tesi di Laurea Sperimentale (Corso di Laure in Chimica), habiendo sido el director de la misma.

A las Dras. Pina Mignogna y Alessandra Franco, por la cordialidad demostrada en el Dipartimento de Biochimica.

Al Prof. Gino Amiconi, experto en enzimas proteolíticas, por la guía proporcionada en las características funcionales de las proteasas en estudio.

Y además, en el plano familiar y afectivo, mi agradecimiento:

A mis padres y hermano por el coraje brindado en momentos de desilusión y por el amor que nos une, aun estando tan lejos, y que se incrementa con el tiempo.

A Graciela Bartuccio, amiga argentina de siempre, con quien compartí varias noches insomnes de charlas y estudio.

A Alvaro Muraglia, entusiasta amigo italiano, que siempre evaluó con enorme positividad mis ideas y decisiones.

Adriana Brullo

1. Introducción	1
1.1. Terminología y Nomenclatura de las Peptidasas	1
1.2. Clasificación	1
1.2.1. El Sistema EC de Clasificación de Peptidasas	2
1.2.2. El Sistema MEROPS de Clasificación de Peptidasas	4
1.3. Familias y Clanes de Peptidasas Cisteínicas	5
1.3.1. Clan CA	5
1.3.2. Clan CC	6
1.3.3. Clanes CB, CD y CE	6
1.3.4. Familias de Peptidasas Cisteínicas	7
1.3.5. Familia de la Papaína (C1)	10
1.4. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas	12
1.4.1. Mecanismo Catalítico General	13
1.4.2. Características Estructurales de las Peptidasas Cisteínicas	14
1.4.3. Unión del Sustrato y Acilación	16
1.4.4. Intermediarios Tetraédricos y Estados de Transición	17
1.5. <i>Bromeliaceae</i>: Características Generales	17
1.6. Taxonomía de <i>Bromeliaceae</i>	19
1.7. Endopeptidasas de <i>Bromeliaceae</i>	21
1.7.1. Endopeptidasas de <i>Ananas comosus</i> L.	21
1.7.1.1. Bromelaína de Tallo	22
1.7.1.2. Bromelaína de Fruto	23
1.7.1.3. Ananaína	23
1.7.1.4. Comosaína	24
1.7.1.5. Otras Proteasas de Frutos de <i>Bromeliaceae</i>	25
2. Objetivos	28
3. Materiales y Métodos	30
3.1. Material Vegetal	30

3.2. Obtención del Extracto Crudo	33
3.3. Precipitación Acetónica Fraccionada	33
3.4. Determinación del Contenido de Proteínas	34
3.5. Determinación del Contenido de Carbohidratos	34
3.6. Determinación de la Actividad Proteolítica	35
3.6.1. Sustratos Proteicos	35
3.6.1.1. Caseína	35
3.6.1.2. Azocaseína	35
3.6.1.3. Proteínas de Soja	36
3.6.2. Sustratos Sintéticos	37
3.6.2.1. N- α -CBZ- <i>p</i> -Nitrofenil Esteres de Aminoácidos	37
3.6.2.2. Sustratos Fluorogénicos	37
3.7. Efecto de Inhibidores	38
3.8. Determinación de la Concentración Óptima de Activador	38
3.9. Efecto del Congelamiento y de la Liofilización sobre la Actividad Proteolítica	39
3.10. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica	39
3.11. Estabilidad en el Rango de pH de Mayor Actividad Proteolítica	40
3.12. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica	40
3.13. Estabilidad Térmica	40
3.14. Purificación Cromatográfica	41
3.14.1. Cromatoenfoque	41
3.14.2. Cromatografía de Intercambio Iónico	41
3.14.3. Cromatografía de Exclusión Molecular	42
3.15. Electroforesis en Gradiente de Poliacrilamida	42
3.15.1. Preparación de las Muestras	43
3.15.1.1. Muestras para la Estimación de Pesos Moleculares	43
3.15.1.2. Muestras de Hidrolizados de Proteínas de Soja	43
3.15.2. Preparación de los Geles	44
3.15.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	45
3.15.4. Fijación y Coloración	45
3.15.5. Estimación de los Pesos Moleculares	45
3.16. Electroforesis Discontinua Desnaturalizante	46
3.16.1. Preparación de las Muestras	46
3.16.2. Preparación de los Geles	46
3.16.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	47

3.16.4. Fijación y Coloración	48
3.16.5. Electrotransferencia	48
3.17. Isoelectroenfoque	48
3.17.1. Preparación de las Muestras	49
3.17.2. Preparación de los Geles	49
3.17.3. Desarrollo del Isoelectroenfoque	49
3.17.4. Fijación y Coloración	50
3.17.5. Estimación de los Puntos Isoeléctricos	51
3.18. Zimograma	51
3.18.1. Preparación de las Placas de Agarosa-Caseína	51
3.18.2. Incubación	52
3.18.3. Fijación y Coloración	52
3.19. Electroforesis Bidimensional	52
3.19.1. Preparación de las Muestras	53
3.19.2. Preparación de los Geles para Electroforesis Nativa	53
3.19.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	53
3.19.4. Segunda Dimensión (Desnaturalizante)	54
3.20. Espectrometría de Masas	54
3.21. Estructura Primaria de Macrodontaína	55
3.21.1. Determinación de la Secuencia Aminoacídica	55
3.21.1.1. Péptido N-Terminal	56
3.21.1.2. Obtención de la Secuencia Completa	57
3.21.1.2.1. Tratamiento Previo de la Muestra	57
3.21.1.2.2. Digestión Enzimática	58
3.21.1.2.3. Tratamiento con Bromuro de Cianógeno	59
3.21.1.2.4. Purificación de los Péptidos Obtenidos	60
3.21.1.2.5. Secuenciamiento de los Péptidos Obtenidos	61
3.21.1.3. Determinación del Carácter Glicoproteico	61
4. Resultados y Discusión	63
4.1. Obtención y Purificación Parcial del Extracto Crudo	63
4.2. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica	65
4.3. Efecto de Inhibidores sobre la Actividad Enzimática	65
4.4. Efecto del Agregado de Cisteína al Medio de Reacción	67

4.5. Efecto del Congelamiento y de la Liofilización sobre la Actividad Proteolítica	67
4.6. Estabilidad en el Rango de pH de Mayor Actividad Proteolítica	68
4.7. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica	69
4.8. Estabilidad Térmica	69
4.9. Hidrólisis de Proteínas de Soja	70
4.9.1. Concentrado de Soja	70
4.9.2. Grado de Hidrólisis	71
4.9.3. Perfil Electroforético de los Hidrolizados	72
4.10. Estrategia de Purificación Cromatográfica	73
4.10.1. Isoelectroenfoque y Zimograma de Macrodomina	73
4.10.2. Cromatoenfoque	75
4.10.3. Cromatografía de Intercambio Iónico	75
4.10.4. Cromatografía de Exclusión Molecular	79
4.11. Caracterización de las Endopeptidasas Purificadas	80
4.11.1. SDS-PAGE	80
4.11.2. Isoelectroenfoque y Zimograma	81
4.11.3. Electroforesis Nativa y Zimograma	82
4.11.4. Electroforesis Bidimensional	82
4.11.5. Perfil de pH	83
4.11.6. Actividad sobre Sustratos Sintéticos	84
4.11.7. Efecto de Inhibidores	85
4.11.8. Actividad sobre Sustratos Fluorogénicos	86
4.11.9. Espectrometría de Masas	87
4.11.10. Determinación de la Secuencia del Péptido N-terminal	88
4.11.11. Determinación de la Secuencia de Macrodomina I	94
4.11.12. Determinación del Carácter Glicoproteico	97
5. Conclusiones	98
5.1. Obtención de Macrodomina	98
5.2. Purificación de Macrodomina	100
5.3. Caracterización de Macrodominas I y II	101
6. Referencias Bibliográficas	105

Introducción

1.1. Terminología y Nomenclatura de las Peptidasas

Las enzimas que desempeñan el rol central en la degradación de las proteínas han sido conocidas tradicionalmente como "proteasas", término equivalente al de "enzimas proteolíticas" y también al más moderno de "péptido-hidrolasas". El Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB, 1984) recomendó el uso del término *peptidasa* para designar al subgrupo de las hidrolasas que escinden uniones peptídicas (péptido-hidrolasas, subclase EC. 3.4). Los términos ampliamente utilizados "proteasas" y "enzimas proteolíticas" son sinónimos de peptidasas.

Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las *endopeptidasas* y las *exopeptidasas*, que rompen uniones peptídicas en distintos puntos del interior de la proteína o que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino, respectivamente. El término "oligopeptidasa" es a menudo usado para referirse a endopeptidasas que actúan preferentemente sobre sustratos más pequeños que las proteínas (Barrett, 2001).

1.2. Clasificación

Las proteasas difieren de casi todas las demás enzimas en que su especificidad de sustrato resulta extremadamente difícil de definir, hecho que llevó a Hartley (1960) a proponer una clasificación de las mismas basada en las características de sus respectivos mecanismos catalíticos, diferenciando así cuatro grupos: serínicas, cisteínicas, aspárticas (primeramente denominadas proteasas ácidas) y metalopeptidasas. Cada una de las clases de proteasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, pero aún así pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas y cisteínicas) y las que no forman complejos enzima-sustrato covalentes (aspárticas y metalopeptidasas). A pesar de las diferencias señaladas, debe tenerse en cuenta que el proceso principal (la escisión de la unión peptídica) es

idéntico en todos los casos y que las diferencias entre los mecanismos catalíticos son mas bien sutiles. Los grupos específicos que llevan a cabo las distintas etapas de la proteólisis son diferentes en las cuatro clases de proteasas mencionadas, pero el resultado neto es el mismo.

Las peptidasas serínicas y cisteínicas son catalíticamente muy diferentes a las aspárticas y a las metalopeptidasas, ya que el nucleófilo del sitio catalítico de las primeras es parte de un aminoácido (serina o cisteína, respectivamente), mientras que en los últimos dos grupos es una molécula de agua activada.

El aporte inicial de Hartley (1960) al ordenamiento de las enzimas proteolíticas contribuyó al establecimiento de los dos sistemas actuales de clasificación y nomenclatura de peptidasas: el de la Comisión de Enzimas y el sistema MEROPS.

1.2.1. El Sistema EC de Clasificación de Peptidasas

El sistema internacionalmente reconocido para la clasificación y nomenclatura de todas las enzimas, incluidas las peptidasas, es el de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB). El Comité de Nomenclatura de la IUBMB es el sucesor de la Comisión de Enzimas (Enzyme Commission, EC), quien en 1961 asignó un código numérico a los distintos tipos de enzimas¹, agrupándolas en seis clases: Oxidorreductasas (1), Transferasas (2), Hidrolasas (3), Liasas (4), Isomerasas (5) y Ligasas (6).

Las hidrolasas que rompen específicamente las uniones peptídicas (peptidasas) integran la subclase 3.4, que a su vez contiene trece diferentes sub-subclases, como muestra la Tabla 1.1.

De todos modos se pueden reconocer dos grandes grupos: el primero de ellos incluye a las *exo*peptidasas (EC 3.4.11-19) y el segundo a las *endo*peptidasas (EC 3.4.21-24 y EC 3.4.99).

Las *exo*peptidasas actúan únicamente sobre los extremos de la cadena polipeptídica. Las que atacan el N-terminal pueden liberar un único residuo aminoacídico (aminopeptidasas, EC 3.4.11) o un di- o tripéptido (di- y tripeptidil-peptidasas, EC 3.4.14). A su vez las que actúan sobre el C-terminal pueden liberar un único amino ácido (carboxipeptidasas, EC 3.4.16-18) o un dipéptido (peptidil-dipeptidasas, EC 3.4.15). Las

¹ Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry (1961), Pergamon Press, Oxford.

carboxipeptidasas se agrupan en sub-subclases diferentes sobre la base de sus mecanismos catalíticos: carboxipeptidasas serínicas (EC 3.4.16), cisteínicas (EC 3.4.18) y metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17). Otras exopeptidasas son específicas para dipéptidos (dipeptidasas, EC 3.4.13) o remueven residuos terminales que están sustituidos, ciclados o unidos por uniones isopeptídicas (omegapeptidasas, EC 3.4.19).

Sub-subclase	Tipo de peptidasa
EC 3.4.11	Aminopeptidasas (19)
EC 3.4.13	Dipeptidasas (12)
EC 3.4.14	Di- y Tripeptidil-peptidasas (8)
EC 3.4.15	Peptidil-dipeptidasas (3)
EC 3.4.16	Carboxipeptidasas serínicas (4)
EC 3.4.17	Metalocarboxipeptidasas (19)
EC 3.4.18	Carboxipeptidasas cisteínicas (1)
EC 3.4.19	Omega peptidasas (11)
EC 3.4.21	Endopeptidasas serínicas (75)
EC 3.4.22	Endopeptidasas cisteínicas (26)
EC 3.4.23	Endopeptidasas aspárticas (32)
EC 3.4.24	Metaloendopeptidasas (69)
EC 3.4.99	Endopeptidasas de tipo desconocido (2)

Tabla 1.1. *Sistema EC de clasificación de peptidasas*. El número entre paréntesis indica el número de entradas registradas hasta la fecha (Barrett, 2001)

Las *endopeptidasas* hidrolizan uniones internas en las cadenas polipeptídicas. En el sistema EC las endopeptidasas son divididas en sub-subclases en función de su mecanismo catalítico, tal como lo propusiera originalmente Hartley (1960). Así, las endopeptidasas serínicas (EC 3.4.21) poseen un residuo serina en el sitio activo, las endopeptidasas cisteínicas (EC 3.4.22) exhiben un residuo cisteína y las endopeptidasas aspárticas (EC 3.4.23) un residuo aspártico (frecuentemente dos); por su parte las metalopeptidasas (EC 3.4.24) requieren de la presencia de un ion metálico (a menudo, aunque no siempre, Zn^{2+}). Recientemente (Barrett *et al.*, 1998 a) se han encontrado peptidasas en cuyo sitio activo hay un residuo treonina en lugar de serina, lo que podría generar una nueva sub-subclase, la de las endopeptidasas treonínicas.

Habitualmente una endopeptidasa puede hidrolizar cadenas peptídicas de cualquier longitud, pero se ha detectado un grupo de ellas –genéricamente denominadas oligopeptidasas– que sólo actúan sobre pequeños péptidos (Barrett, 2001).

1.2.2. El Sistema MEROPS de Clasificación de Peptidasas

Como puede verse en la Tabla 1.1, el mayor número de peptidasas corresponde a las endopeptidasas (204 sobre un total de 281), las que están distribuidas en sólo 5 sub-subclases, lo que inevitablemente coloca dentro del mismo grupo a muy diferentes tipos de peptidasas. Pero la mayor falencia del sistema EC es que no tiene en cuenta la existencia de grupos estructurales que reflejan las relaciones evolutivas de sus integrantes.

En 1993 Rawlings & Barrett dan a conocer un nuevo sistema de clasificación de peptidasas diseñado para agruparlas de modo de reflejar las características estructurales esenciales y las relaciones evolutivas entre las mismas, aprovechando el conocimiento de las secuencias aminoacídicas disponibles en ese entonces. El sistema se fue enriqueciendo a través de sucesivas comunicaciones (Rawlings & Barrett, 1994 a,b y 1995 a,b), lo que finalmente dio lugar a la base de datos MEROPS (URL: <http://www.merops.co.uk>), un sistema de clasificación de peptidasas en el que las mismas son asociadas en familias y clanes, como puede verse en la Tabla 1.2.

Una familia está constituida por un grupo de peptidasas en el que la secuencia aminoacídica de cada miembro muestra una relación estadísticamente significativa con al menos la de otro miembro de la familia en la zona de la molécula responsable de la actividad peptidásica (Rawlings & Barrett, 1993).

En este ordenamiento evolutivo dado a las peptidasas, se usa el término clan para describir un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de una proteína ancestral común, pero que han divergido tanto que su relación no puede ser establecida simplemente por la comparación de sus estructuras primarias (Rawlings & Barrett, 1993; Barrett & Rawlings, 1995).

Nivel	Descripción	Identificadores
<i>Clan</i>	Conjunto de familias en las que todas las peptidasas han evolucionado a partir de un único ancestro. Las familias en el mismo clan tienen en común que las peptidasas que las integran exhiben tipos de plegamiento similares	A, C, M, P, S
<i>Familia</i>	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica	A, C, M, S, T, U
<i>Peptidasa</i>	Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético	A, C, M, S, T, U

Tabla 1.2. *Los tres niveles del Sistema MEROPS de clasificación de peptidasas.* Los identificadores usados comienzan con una letra que indica el tipo catalítico de las peptidasas (A: aspárticas; C: cisteínicas; M: metalopeptidasas; S: serínicas; T: treonínicas; U: sin clasificar). La letra P se usa para identificar clanes que contienen peptidasas de más de un tipo catalítico.

Un clan puede incluir familias de más de un tipo catalítico, como ocurre en el Clan PA, que contiene a la fecha diez familias de peptidasas serínicas y cinco de peptidasas cisteínicas (Barrett 2001).

1.3. Familias y Clanes de Peptidasas Cisteínicas

Dentro de las peptidasas cisteínicas se reconocen cinco clanes bien diferenciados (CA, CB, CC, CD y CE) y uno (CX) que nuclea a peptidasas cuyo mecanismo catalítico no es aún suficientemente conocido (Barrett *et al.*, 1998 b).

En las peptidasas cisteínicas el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo cisteína (Cys). El mecanismo catalítico es similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas, en las cuales se requieren un nucleófilo y un donador de protones, que es también un residuo histidina (His). Aunque en algunas familias se requiere un tercer residuo para orientar el anillo imidazol de la histidina (un rol análogo al que cumple el aspartato en algunas peptidasas serínicas), en otras sólo es necesaria una díada catalítica.

1.3.1. Clan CA

Papaína, prototipo de la familia C1 y del clan CA, fue la primer peptidasa reconocida como de tipo cisteínico. Se han determinado las estructuras cristalinas de la papaína y de

varias peptidasas de la familia C1, en las cuales los residuos catalíticos fueron identificados como Cys, His y Asn, encontrándose en este orden en la secuencia. Un cuarto residuo, una glutamina (Gln) precediendo a la Cys catalítica, es también esencial para la actividad catalítica y se cree que ayuda a formar el “hueco oxianiónico”.

La familia C12 se incluye dentro del clan CA porque la estructura cristalina de una hidrolasa de ubiquitina-C terminal² de esta familia muestra un plegamiento muy similar al de la papaína, por lo que parece razonable concluir que tiene un origen común con papaína, a pesar de que la conservación de la secuencia aminoacídica es reducida. No hay estructuras tridimensionales para las peptidasas de las familias C2, C10 ni C19, pero éstas son colocadas en el clan CA basándose en el orden Cys-His de la díada catalítica y en la conservación de aminoácidos alrededor de los residuos catalíticos, además de algunas similitudes en otras propiedades (Barrett, 2001).

1.3.2. Clan CC

Un segundo grupo de peptidasas cisteínicas que mantienen el orden Cys-His en la díada catalítica está constituido por las endopeptidasas “tipo papaína” de virus de ARN. Las secuencias dentro de este grupo son muy diversas y no hay aún información de estructura terciaria de sus componentes. Estas peptidasas no contienen residuos que sean equivalentes a los residuos esenciales Gln19 y Asn175, por lo que en ausencia de una evidencia sustancial de que ellos compartan un ancestro común con papaína han sido colocadas en un clan separado, el clan CC. No se puede excluir la posibilidad de que cuando se disponga de una estructura cristalina ésta muestre el mismo plegamiento que la papaína y que, por lo tanto, los clanes CA y CC deban ser reunidos, como se ha propuesto recientemente (Barrett, 2001).

1.3.3. Clanes CB, CD y CE

Tres clanes de peptidasas cisteínicas (CB, CD y CE) contienen la díada catalítica en un orden inverso (His-Cys).

² La peptidasa que escinde la unión específica de la glicina C-terminal de la ubiquitina en su unión con el residuo N-terminal o con un grupo ϵ -amino de la lisina de proteínas destinadas a ser degradadas en los proteasomas (la ubiquitina es un polipéptido de 76 aminoácidos que constituye la “señal molecular” que llevan las proteínas que deben ser degradadas).

Las peptidasas del clan CB, todas ellas de origen viral, ejemplifican las similitudes mecánicas entre las peptidasas de tipo cisteínico y serínico, ya que ellas evolucionaron a partir de un ancestro común con quimotripsina y otras peptidasas del clan SA de las peptidasas serínicas, propuesta basada en la comparación de las secuencias aminoacídicas y luego confirmada por la similitud en la estructura tridimensional de la picornaína 3C del virus de la hepatitis A con la quimotripsina.

En vista del evidente origen común de las peptidasas de los clanes SA y CB, se ha propuesto recientemente (Barrett, 2001) que los mismos se reúnan en un nuevo clan (PA), lo que no había sido hecho inicialmente debido a la importancia otorgada a la clasificación basada en el tipo catalítico.

Inicialmente el clan CD incluía solamente a la familia de las caspasas (C14), un grupo de endopeptidasas citosólicas relacionadas con la apoptosis celular (Salvesen & Stennicke, 1999), cuya estructura terciaria muestra un plegamiento α/β típico y una estricta especificidad para hidrolizar enlaces aspartilo, a lo que deben su nombre (cisteín-aspartil proteasas). Más recientemente (Barrett, 2001) se incluyeron dentro del clan otras tres familias (C11, C13 y C 25).

Se cree que la endopeptidasa del adenovirus tiene un mecanismo catalítico similar al de la papaína, involucrando cuatro aminoácidos. Sin embargo ellos se presentan en el orden His, Glu (o Asp), Gln, Cys, y el plegamiento terciario es diferente al de la papaína o cualquier otra peptidasa de tipo cisteínico. Por esta razón la familia C5, que contiene este único componente, ha sido colocada en un clan separado (CE).

Hay un número de otras familias de peptidasas para las cuales la estructura terciaria es a la fecha desconocida y por otra parte tampoco se posee un conocimiento preciso acerca de los mecanismos catalíticos que utilizan como para permitir aventurar alguna conclusión acerca del clan al que pertenecen. Todas estas peptidasas han sido transitoriamente agrupadas por conveniencia en un único clan, denominado CX. La permanencia de las mismas en dicho clan es efímera, ya que en cuanto se disponga de información estructural adicional serán transferidas a alguno de los otros clanes.

1.3.4. Familias de Peptidasas Cisteínicas

Actualmente (Barrett, 2001) se reconoce la existencia de 32 familias de endopeptidasas cisteínicas (Tabla 1.3). En todas ellas la actividad depende de la

existencia de la díada catalítica cisteína-histidina. El orden en que se dispongan los residuos aminoacídicos (Cys-His o His-Cys) en la secuencia lineal difiere entre las distintas familias, sugiriendo que los distintos integrantes de esta clase de peptidasas reconocen diversos orígenes evolutivos. Hasta el momento se conocen las estructuras terciarias de algunos miembros de las familias de peptidasas cisteínicas, por lo que las relaciones entre las mismas distan aún de ser claras.

Más de la mitad de las familias de peptidasas cisteínicas pertenecen al clan CA. Hasta hace poco tiempo (Barrett *et al.*, 1998 b) el clan CA estaba integrado sólo por las familias C1, C2, C10, C12 y C19, que incluía a la papaína y a las peptidasas con las que poseía mayor parentesco evolutivo. La propuesta actual (Barrett, 2001) incluye dentro del mismo clan a la mayoría de las familias de proteasas virales “del tipo papaína” (“papainlike”) que antes integraban el clan CC. Casi todas las peptidasas cisteínicas de origen vegetal pertenecen a la familia C1, cuya enzima representativa es la papaína.

El clan CD incluyó en un principio únicamente a la familia de las caspasas (C14), enzimas relacionadas con los procesos de muerte celular programada, pero ahora contiene también familias de peptidasas bacterianas (C11 y C25), además de la familia de la legumaína (C13), que nuclea a peptidasas de eucariotes de diverso origen.

El clan CE contiene una sola familia (C5) que incluye a las endopeptidasas de diferentes tipos de adenovirus.

Por su parte el clan CX está integrado por cinco familias de peptidasas (C15, C26, C33, C40 y C41) de las cuales no hay aún suficiente información como para que puedan ser asignadas a un clan de características más definidas.

Finalmente en el clan PA se asocian cinco familias de peptidasas cisteínicas de origen viral (C3, C4, C24, C30 y C37), responsables del procesamiento de poliproteínas virales, con las diez familias de peptidasas serínicas que originalmente integraban el clan SA, que incluye a la familia de la tripsina (S1), la familia de peptidasas más grande, tanto en cuanto al número de proteínas secuenciadas como en la cantidad de distintas actividades peptidásicas reconocibles (Barrett *et al.* 1998 a).

Clan	Familia	Enzima representativa
CA	C1	Papaína
	C2	Calpaína
	C6	HC-proteinasa del virus de la corrosión del tabaco
	C7	Endopeptidasa p29 del virus del tizón del castaño
	C8	Endopeptidasa p48 del virus del tizón del castaño
	C9	Endopeptidasa nsP2 del virus Sindbis
	C10	Streptopapaína
	C12	Peptidasa deubiquitinante Yuh1
	C16	Endopeptidasa del virus de la hepatitis de ratón
	C19	Isopeptidasa T
	C21	Endopeptidasa del virus del mosaico amarillo del nabo
	C23	Endopeptidasa del carlavirus abrasador del arándano
	C27	Endopeptidasa del virus de la rubéola
	C28	L proteinasa del virus de la enfermedad pie-y-boca
	C29	Endopeptidasa 2 tipo papaína del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C31	α -Endopeptidasa del arterivirus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
	C32	α -Endopeptidasa del virus PCP de la arteritis equina
C36	Endopeptidasa tipo papaína del furovirus de la necrosis amarilla de las nervaduras de remolacha	
CD	C11	Clostripaína
	C13	Legumaína
	C14	Caspasa 1
	C25	Gingipaína R
CE	C5	Endopeptidasa de adenovirus
CX	C15	Piroglutamil-peptidasa I
	C26	γ -Glutamil hidrolasa
	C33	Endopeptidasa Nsp2 del arterivirus equino
	C40	Dipeptidil-peptidasa VI
	C41	Cisteín proteinasa de la hepatitis E
PA	C3	Picornaína 3C del virus de la poliomielitis
	C4	Endopeptidasa NIa del virus de la corrosión del tabaco
	C24	Endopeptidasa del calicivirus felino
	C30	Endopeptidasa tipo picornaína 3C del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C37	Peptidasa procesadora del virus Southampton

Tabla 1.3. *Clanes y familias de peptidasas cisteínicas (tomado de Barrett, 2001)*. El clan PA incluye a las peptidasas cisteínicas del ex clan CB junto a las peptidasas serínicas del ex clan SA

1.3.5. Familia de la Papaína (C1)

La familia de peptidasas cisteínicas mejor conocida es la de la papaína (C1), que contiene peptidasas con una gran variedad de actividades, incluyendo endopeptidasas con amplia especificidad (tal como la propia papaína), endopeptidasas con especificidad más estrecha (como la glicil-endopeptidasa que acompaña a la papaína en el látex de papaya), aminopeptidasas, una dipeptidil-peptidasa y peptidasas con actividades tanto endo- como exopeptidásicas (como las catepsinas B y H). La distinción entre exo- y endopeptidasas se hace difusa en estos últimos casos: la dipeptidil-peptidasa I actúa principalmente como una exopeptidasa, removiendo dipéptidos N-terminales, pero puede tener limitada actividad endopeptidásica y las catepsinas lisosomales B y H también son más importantes por su actividad exopeptidásica que por la endopeptidásica.

Las enzimas de esta familia se encuentran en una gran variedad de formas vivas: endopeptidasas de virus de ADN, protozoos, plantas y animales y exopeptidasas de bacterias gram-positivas, hongos y animales. Los homólogos de la papaína son generalmente proteínas lisosomales o secretadas. En las plantas se encuentran generalmente en las vacuolas, pero también en el látex de papaya o de higos, en tanto que en artrópodos tales como langostas y garrapatas forman parte de las enzimas digestivas. Como excepción en este sentido puede citarse a la bleomicina-hidrolasa, una enzima citosólica presente en hongos y mamíferos.

Las enzimas que entran a la vía secretora suelen ser sintetizadas como precursores, con propéptidos N-terminales. La mayoría de los miembros de la familia C1 tienen propéptidos homólogos al de la papaína y se piensa que actúan del mismo modo, bloqueando el sitio activo de la enzima al unirse a él en una posición invertida a la que lo haría un sustrato. El propéptido de la papaína es homólogo al de las proteínas CTLA-2 α y CTLA-2 β de las células T activadas, que mostraron ser inhibidores de endopeptidasas cisteínicas (Delaria *et al.*, 1994).

La activación de las peptidasas de la familia C1 por remoción del propéptido N-terminal es seguido de posterior procesamiento. En el caso de las catepsinas B, H y L las enzimas maduras consisten de dos cadenas (pesada y liviana), que se forman por clivaje proteolítico de la cadena inicial.

Las extensiones C-terminales de varias peptidasas de plantas, como las de tomate, *Arabidopsis thaliana*, abeto Douglas, clavel, arveja y las orizaínas α y β de arroz, son homólogas a la de papaína.

Los residuos catalíticos de la papaína son Cys-25 e His-159, que se encuentran conservados en todos los miembros de la familia. Otros residuos importantes para la catálisis incluyen a Gln-19, que ayuda a la formación del “hueco oxianiónico”, y a Asn-175, que orienta el anillo imidazol de la His-159. Bromelaína de tallo carece de Asn-175, pero en general hay una fuerte conservación de la secuencia en la vecindad de los residuos esenciales de cisteína, histidina y asparagina mencionados (Tabla 1.4.).

Papaína	VKNQ GS CGS C WAFSAVVTIEGII	CGNKVD---H AV AAVGYG	PNYILIK N SWG TG WG EN GYIRIKR
Quimopapaína	VKNQ GA CGS C WAFSTIATVEGIN	CGTKLD---H AV TAVGYG	KNYII IK N SWG PN W GE KGYMR L KR
Caricaína	VRH Q SGCS C WAFSAVATVEGIN	CGTKVD---H AV TAVGYG	KGYILIK N SWG TAW GE K GYIRIKR
Glicilendop.	VKH Q GYCES C WAFSTVATVEGIN	CGTKVD---H AV TAVGYG	KGYILIK N SWG PG WG EN GYIRIRR
Bromelaína	VKN N PC GA C C WAFAAIATVESIY	CGTSLN---H AV TAIGYG	IIY---PK K W GA K W GE AG YIRMAR
Actinidina	IKS Q GE CG CGS C WAFSAIATVEGIN	CGTAID---H AV TIVGYG	IDYWIV K N SW DT T W GE EG YMR L ILR
Tomate ^a	VKD Q SGCS C WAFSAVAAMESIN	CGTAVD---H G VVIAGYG	MDYWIV R N SWG AN CRE NG YLR V QR
Poroto mung ^a	VKD Q Q CG CGS C WAFSTIVAVEGIN	CNTDLN---H G VAVIGYG	TNYWIV R N SWG PE W GE Q GY IRMQR
Guisante ^a	VKD Q SGCS C WAFSTTGALEGAH	CAKSRLD--H G VLLVGFY	KPYW I IK N SWG QN W GE Q GY YKICR
Aleuraina	VKN Q AH CG CGS C WTFSTTGALEAAY	CGTTPDDVN H AVLAVGYG	VPYWL T K N SWG AD W GD NGYFKMEM
Orizaína- α	IKD Q GG CG CGS C WAFSAIAAVEDIN	CGTALD---H G VAAVGYG	KDYWIV R N SWG K SW GE SGYVRMER
Orizaína- γ	VKD Q GH CG CGS C WPFSTTGSLEARY	CGTSPMDVN H AVLAVGYG	VPYWL IK N SWG AD W GD NGYFTMEM
Tabaco ^a	VKNQ GS CGS C W S FS T TGA V EGAH	PLICFKRQD H G V LLVGYG	KAYW I IK N SWG EN W GE H GY YKICR
Catepsina B ^b	ILD Q GH CG CGS C WAFAAVEALQDRF	GGVMGG---H AV K L IG W G	EDYW L L AN Q W N R G W G DD GY FK I IR

Tabla 1.4. Conservación de la secuencia alrededor del sitio activo en proteasas vegetales pertenecientes a la familia de la papaína. Se ha destacado la posición de Cys-25, His-159 y Asn-175 (no conservada en bromelaína). Las letras en azul indican aminoácidos conservados en la secuencia, en relación con la papaína. ^a material vegetal del que se ha aislado la endopeptidasa; ^b aislada de trigo (adaptado de Rawlings & Barrett, 1994 b).

La papaína, como la mayoría de los otros miembros de la familia, muestra preferencia porque un voluminoso residuo hidrofóbico ocupe el subsitio S2, en tanto que la catepsina B prefiere que ese subsitio sea ocupado por arginina (al menos en el caso de sustratos pequeños). En la papaína la Ser-205 yace en el fondo del bolsillo, pero es

reemplazada por Glu en la catepsina B, que es más apropiada para formar un puente iónico con una cadena lateral de arginina. Otros homólogos de papaína que contienen Glu en esta posición incluyen las peptidasas de *Brassica sp.*, tomate, cebada y arroz.

Muchos miembros de la familia contienen un residuo prolina en posición 2 en la enzima madura, el cual serviría para prevenir la proteólisis no deseada del extremo amino por aminopeptidasas, ya que las uniones Xaa-Pro son resistentes a este tipo de enzimas.

Un análisis evolutivo de la familia C1 permite distinguir dos subfamilias. La mayor de ellas incluye enzimas secretadas y lisosomales (o vacuolares) y entre ellas pueden distinguirse dos grupos, las del “tipo catepsina B” y las del “tipo papaína”. Dentro de este último grupo se encuentran la mayoría de las peptidasas cisteínicas de plantas. La subfamilia menor contiene varias aminopeptidasas intracelulares solubles.

Se han elucidado las estructuras tridimensionales de algunas fitoproteasas que pertenecen a esta familia, entre ellas la propia papaína (Kamphuis *et al.*, 1984), actinidina (Baker, 1980) y calotropina (Heinemann *et al.*, 1982), revelando que se trata de moléculas bilobadas en las que el sitio catalítico está colocado en un surco entre ambos lóbulos.

De acuerdo a la información disponible en la Base de Datos MEROPS existen ya 157 peptidasas de la familia C1 de las que se conoce la secuencia aminoacídica, 13 de las cuales cuentan además con datos de la estructura tridimensional obtenida por cristalografía de rayos X con diferente grado de resolución, en algunos casos formando complejos con inhibidores: actinidaína (Varughese *et al.*, 1992), bleomicina-hidrolasa (Joshua-Tor *et al.*, 1995), caricaína (Katerelos *et al.*, 1996), catepsina B (Turk *et al.*, 1995), catepsina H (Guncar *et al.*, 1998), catepsina K (Zhao *et al.*, 1997), catepsina L (Coulombe *et al.*, 1996), catepsina X (Sivaraman *et al.*, 2000), cruzipapaína (Gillmor *et al.*, 1997), glicilendopeptidasa (O’Hara *et al.*, 1995), papaína (Yamamoto *et al.*, 1991), quimopapaína (Maes *et al.*, 1996) y zingipapaína (Choi *et al.*, 1999),

1.4. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas

Las peptidasas cisteínicas son una clase de enzimas que han sido ampliamente estudiadas, por lo que los principios básicos de reconocimiento del sustrato, catálisis e inhibición se hallan razonablemente documentados. Sin embargo, las bases moleculares de estas propiedades no están aún claramente establecidas. Así, por ejemplo, el

mecanismo por el cual las peptidasas cisteínicas hidrolizan sus sustratos se encuentra aún pobremente definido a nivel atómico (Storer & Ménard, 1994).

1.4.1. Mecanismo Catalítico General

Las peptidasas cisteínicas de la familia de la papaína catalizan la hidrólisis de uniones peptídicas, amidas, ésteres y tiol-ésteres. Las características principales del mecanismo catalítico incluyen la formación de un intermediario covalente, la acil-enzima, resultante del ataque nucleofílico del grupo tiol presente en el sitio activo de la enzima sobre el carbono carbonílico de la unión éster o amida del sustrato unido a la enzima. El mecanismo completo de hidrólisis implica un número de pasos que están representados esquemáticamente en la Figura 1.1. para la hidrólisis de una amida.

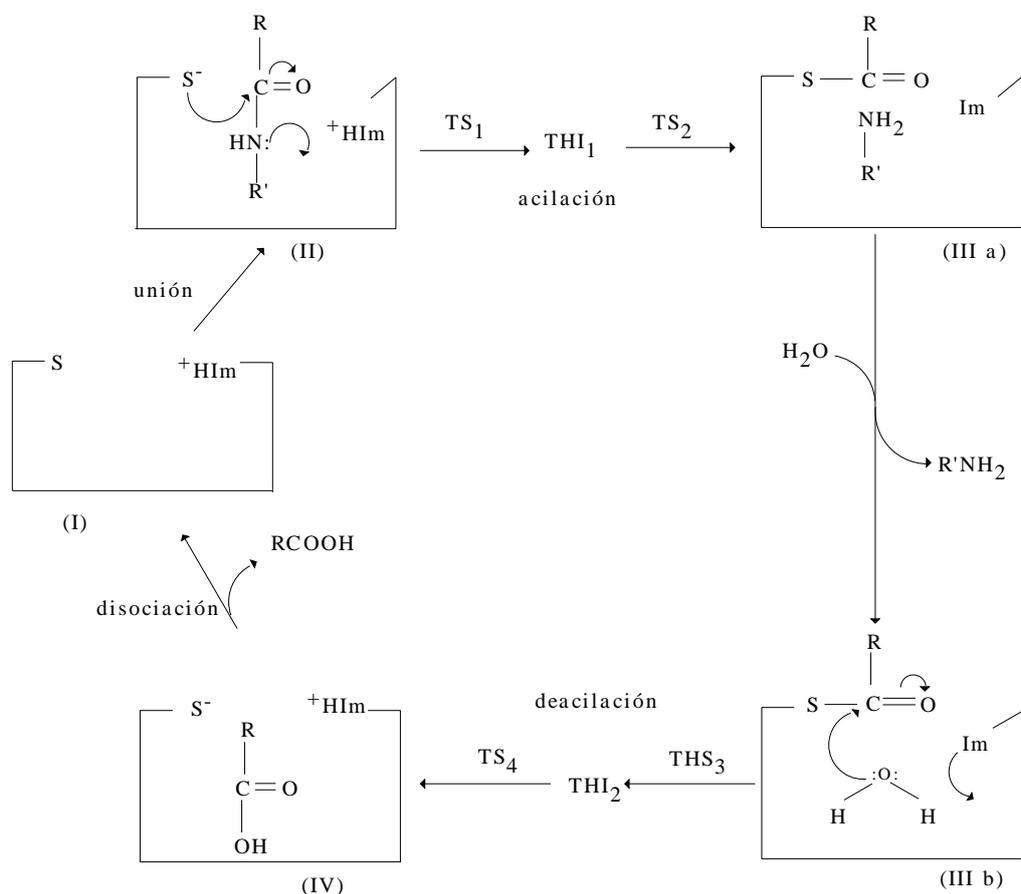


Fig. 1.1.. Representación esquemática de los diferentes pasos y de los intermediarios y estados de transición putativos involucrados en el mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de un sustrato amídico por una peptidasa cisteínica. S⁻: grupo sulfhidrilo disociado de la cisteína; +HIm: grupo imidazólico disociado de la histidina.

El primer paso corresponde a la asociación (unión no covalente) de la enzima libre (I) y del sustrato para formar el complejo de Michaelis (II). Este paso es seguido por la

acilación de la enzima (IIIa), con formación y liberación del primer producto de la enzima ($R'NH_2$), el polipéptido que contiene ahora un nuevo extremo amino terminal. En el paso siguiente, el complejo acil-enzima (IIIb) reacciona con una molécula de agua para formar el segundo producto (paso de deacilación). La liberación de este producto resulta en la regeneración de la enzima libre. Se cree que en este esquema existen varios intermediarios y/o estados de transición. Por analogía con las peptidasas serínicas y en base a un número limitado de datos experimentales se ha propuesto que los pasos de acilación y deacilación involucran la formación de intermediarios tetraédricos transitorios (THI_1 y THI_2), así como cuatro estados de transición (TS_1 , TS_2 , TS_3 y TS_4) que separan el complejo de Michaelis, la acilenzima y el complejo enzima-producto de los dos intermediarios tetraédricos.

1.4.2. Características Estructurales de las Peptidasas

Cisteínicas

Por definición, las peptidasas cisteínicas requieren la presencia del grupo tiol de un residuo cisteína para manifestar su actividad. La enzima está constituida por una única cadena polipeptídica plegada para formar dos dominios que delimitan un surco en el cual el sustrato puede unirse. Los residuos Cys-25 e His-159 del sitio activo (numeración de papaína) están ubicados en la interfase de este surco, en los dominios opuestos de la enzima. Se ha sugerido que otros residuos aminoacídicos cercanos al sitio activo pueden jugar diferentes roles en el mecanismo catalítico.

Probablemente el aspecto de principal importancia para la actividad catalítica de estas peptidasas sea la alta nucleofilicidad del grupo tiol que se encuentra en el sitio activo. Se acepta ahora que la forma activa de la papaína (y de las peptidasas cisteínicas en general) consiste en un par iónico tiolato-imidazolio. La existencia de dos grupos ionizables es consistente con la forma de campana del gráfico que expresa la dependencia de la actividad enzimática con el pH del medio: el componente ácido, con un pK_a de ~ 4 , es usualmente atribuido a la ionización del residuo Cys-25, en tanto que el componente básico, con un pK_a de $\sim 8,5$, reflejaría la ionización del residuo His-159. Los resultados de varias técnicas experimentales permiten estimar que el porcentaje de papaína presente en forma de par iónico (forma activa de la enzima) a pH neutro se encuentra en el rango del 50% al 100%.

Además de la ionización de los residuos Cys-25 e His-159 en el sitio activo, se conocen otros eventos pH-dependientes que afectan la actividad de esta familia de proteasas. Así, por ejemplo, el lado ácido de la curva pH-actividad estaría modulada por al menos dos grupos ionizables con pK_a cercanos a 4 y el lado básico también resultaría modulado por la acción de un segundo grupo ionizable además del ion imidazolio del residuo His-159; en algunos casos también se ha observado que un grupo con pK_a cercano a 5 podría modular la actividad peptidásica. La comprensión cabal del mecanismo catalítico de las peptidasas cisteínicas requerirá del conocimiento de todos los grupos ionizables que pueden modular la actividad enzimática, además de los mecanismos a través de los cuales tiene efecto dicha modulación.

A partir de los datos estructurales existentes se ha podido comprobar que el grupo catalítico tiol de las peptidasas cisteínicas está ubicado en el extremo de una α -hélice y que el campo de la hélice provee estabilidad suficiente para que el par iónico exista dentro de un amplio rango de pH. También se ha argumentado que la interacción electrostática entre los residuos catalíticos de cistidina e histidina resultaría suficiente para que el par iónico resulte estable a pH neutro y que el par sería extremadamente sensible a la geometría de la región del sitio activo.

De posible importancia en el mecanismo catalítico es un residuo de asparagina que se halla sugestivamente conservado en muchas peptidasas cisteínicas. El oxígeno amídico de la cadena lateral de Asn-175 está unido por un puente de hidrógeno a un nitrógeno imidazólico de la His-159, generando una tríada Cys-His-Asn que es considerada a menudo análoga al arreglo Ser-His-Asp de las peptidasas serínicas. Dicho puente de hidrógeno es aproximadamente colinear con la unión C_β — C_γ de la His-159, permitiendo que la cadena lateral imidazol rote alrededor de esta unión sin disrupción del puente de hidrógeno formado entre Asn-175 e His-159. El rol del residuo Asn-175 puede ser el de redireccionar al imidazol, de modo de colocarlo en posición óptima para cada una de las distintas etapas del mecanismo catalítico, además de ayudar en la estabilización del par tiolato-imidazolio, manteniendo al anillo imidazólico en una orientación relativa favorable con respecto al residuo cisteínico.

El puente de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos His-159 y Asn-175 se encuentra enterrado en una región hidrofóbica que, en el caso de papaína, está compuesta principalmente por las cadenas laterales de los residuos Phe-141, Trp-177 y Trp-181. De ellos, el Trp-177 se encuentra en una posición ideal para interactuar positivamente con la His-159 protonada y para proteger el puente de hidrógeno His-Asn

del efecto del solvente. Por otra parte, Asp-158 es el único residuo aminoacídico cargado en la vecindad (en un radio de 10 Å) del sitio activo, por lo que podría contribuir significativamente a la estabilidad del par iónico tiolato-imidazolio; sin embargo experiencias de mutagénesis dirigida (reemplazo del residuo Asp por Asn) demostraron que Asp-158 no es un residuo esencial para la actividad catalítica en papaína y que la carga negativa de la cadena lateral tampoco contribuye significativamente en la estabilidad del par iónico tiolato-imidazolio (Ménard *et al.*, 1990). El hecho de que Asp-158 no juegue un rol esencial en la actividad catalítica de papaína no es sorprendente, ya que este residuo no está conservado en todas las peptidasas cisteínicas.

1.4.3. Unión del Sustrato y Acilación

El acoplamiento de las interacciones entre la enzima y el sustrato al proceso hidrolítico que ocurre en el sitio activo es un aspecto importante de la catálisis que ha recibido escasa atención hasta el presente. Los resultados de ciertas experiencias utilizando sustratos derivados del disulfuro de piridilo (Patel *et al.*, 1992 a,b) han sido interpretadas como indicadoras de que la unión del sustrato en la región de los subsitios S1–S2 provoca un cambio conformacional en el estado de transición, permitiendo que el residuo His-159 protone al grupo saliente y facilitando en consecuencia la reacción de acilación. También se han identificado importantes interacciones de la unión amídica P1–P2 con el grupo carbonilo de la cadena lateral de Asp-158, de los grupos —NH— y —C=O de P2 con la Gly-66 y de una cadena lateral hidrofóbica en P2 con el subsitio S2, sugiriéndose que tales interacciones funcionan cooperativamente para señalar el sitio catalítico.

Luego de la unión del sustrato a una peptidasa cisteínica, el grupo carbonilo de la unión escindible sufre un ataque nucleofílico por el ion tiolato de la Cys-25. Esto es facilitado por la unión del oxígeno carbonílico al agujero oxianiónico definido por el grupo —NH— de la Cys-25 y la cadena amida lateral de la Gln-19. Como resultado de ello se formaría el primer intermediario tetraédrico (THI₁, Figura 1.1.). A continuación el grupo protonado de His-159 del sitio activo rota para donar su protón (catálisis ácida general) al nitrógeno amídico, promoviendo la ruptura del intermediario tetraédrico para liberar un producto con un grupo amino libre y un intermediario acil-enzima, que adoptaría una conformación en la que el átomo de nitrógeno de la glicina se encuentra cercano al átomo

de azufre tiólico, siendo la distancia interatómica menor que la suma de los radios de van der Waals de ambos átomos.

Concomitantemente con la formación del intermediario acil-enzima, el pK_a de la His-159 desciende de aproximadamente 8,5 en la enzima libre a alrededor de 4 en aquél. Esta caída del pK_a le permite a la histidina facilitar una catálisis básica general para el proceso de deacilación, habiéndose postulado que la His-159 extrae un protón de la molécula de agua interviniente durante la formación del presunto intermediario tetraédrico THI_2 , cuya posterior ruptura resultaría en la expulsión del anión tiolato, seguido por la disociación del producto ácido y la regeneración de la enzima.

1.4.4. Intermediarios Tetraédricos y Estados de Transición

Por analogía con las peptidasas serínicas se ha aceptado hasta ahora que los pasos de acilación y deacilación involucran la formación de intermediarios tetraédricos anónimos. El principal soporte experimental para ello descansa en la potente inhibición que sufren estas enzimas por aldehídos peptídicos del tipo de la leupeptina, que forman aductos tetraédricos covalentes (hemitioacetales) con el residuo cisteínico del sitio activo.

La prueba definitiva de la existencia de los intermediarios tetraédricos dependerá de la observación directa de la formación de los mismos. En ausencia de ello, el mecanismo de acilación ha sido analizado desde el punto de vista teórico, concluyéndose que la transferencia de un protón desde la histidina hacia el grupo amino saliente resulta concertado con el ataque del grupo nucleofílico de cisteína, sugiriendo que la formación de un intermediario tetraédrico aniónico no se formaría.

1.5. *Bromeliaceae*: Características Generales

La familia *Bromeliaceae* está constituida por alrededor de 2700 especies, incluidas en aproximadamente 56 géneros. La especie mejor conocida es el ananá (*Ananas comosus* L.). La familia contiene un amplio rango de plantas, algunas muy distintas del ananá, como el “musgo español”, *Tillandsia usneoides* (que no es obviamente un musgo ni tampoco es español), algunas cuyo aspecto recuerda a la yuca o al áloe y finalmente

otras que tienen aspecto de pastos foliosos (Bromeliad Society International, URL: <http://www.bsi.org/main.htm>).

La familia comienza a tener una historia registrada luego del segundo viaje de Colón al Nuevo Mundo en 1493, quien introduce en España el ananá, cultivado en el Caribe y en las Indias Occidentales. Pasó mucho tiempo antes que alguna otra especie de la familia comenzara a ser cultivada. Recién en 1776 fue llevada a Europa *Guzmania lingulata*; a ella la siguió *Aechmea fasciata* en 1828 y *Vriesea splendens* en 1840, todas ellas ornamentales.

Se trata de una familia neotropical, lo que significa que crece virtualmente en forma exclusiva en los trópicos (y subtropicos) del Nuevo Mundo. La mayoría proviene de Sudamérica, con el más grande número de especies halladas en Brasil, pero se extienden desde Chile y Argentina en Sudamérica a través de Centroamérica y el Caribe, alcanzando el límite norte en los alrededores de Virginia, en el sudeste de los EE.UU. Una única especie (*Pitcairnia feliciana*) ha sido encontrada en el oeste de África.

El rango de altitud en el que pueden encontrarse las *Bromeliaceae* va desde el nivel del mar hasta los 4.700 m y pueden ser halladas en una amplia variedad de hábitats, desde desiertos cálidos y secos hasta bosques lluviosos y frías regiones montañosas.

Son capaces de crecer en las más variadas condiciones. Hay especies terrestres que pueden prosperar tanto bajo el sol brillante en playas arenosas como en el umbroso y húmedo sotobosque. Las especies saxícolas que crecen en las rocas pueden introducir sus raíces en grietas y fisuras en búsqueda de humedad y de nutrientes minerales. Las especies epífitas crecen sobre otras plantas, usualmente árboles, arbustos o cactus, aunque también es frecuente hallarlas sobre postes telefónicos o aún en las mismas líneas telefónicas; esta habilidad para obtener nutrición y agua de la atmósfera les ha valido el apelativo de “plantas que viven del aire”.

Todas las *Bromeliaceae* están compuestas de un arreglo foliar espiralado denominado “roseta”, donde las bases foliares se superponen parcialmente y pueden funcionar como un reservorio hídrico, aunque las especies ancestrales carecen de esta capacidad y dependen esencialmente de su sistema radicular para la absorción de agua y de nutrientes. Por su parte las raíces de las especies epífitas se endurecen luego de su crecimiento para transformarse en zarcillos que le permiten asirse a su soporte (no se trata de plantas parásitas). En algunas especies terrestres las bases de las hojas forman pequeñas cámaras que sirven de refugio a las hormigas, cuyos desechos pueden ser utilizados por la planta como un fertilizante adicional.

Con pocas excepciones, el escapo floral se forma en el centro de la roseta foliar y puede prolongarse hacia arriba considerablemente, siendo erecto o más o menos péndulo. El escapo puede producir una única flor o una inflorescencia y habitualmente exhibe brácteas florales con color que atraen a los polinizadores. Por lo común la planta florece una sola vez, pero se reproduce vegetativamente por hijuelos que se alimentan de la planta madre hasta que forman sus propias raíces y sobreviven como plantas independientes; las plantas madres pueden sobrevivir una o dos generaciones, pero finalmente mueren. Algunas veces los hijuelos pueden ser producidos por largos estolones o por brotes en el tope de la inflorescencia de la planta madre (el extremo folioso del ananá es de hecho un hijuelo que puede dar origen a una nueva planta).

1.6. Taxonomía de *Bromeliaceae*

La familia *Bromeliaceae* pertenece a la Clase *Liliopsida* (Monocotiledóneas), que comprende una cuarta parte de las plantas con flores e incluyen algunos de los más grandes y mejor conocidos grupos de plantas: orquídeas, palmeras, cereales y pastos. La Familia *Bromeliaceae* se divide en tres subfamilias: *Pitcairnioideae*, *Bromelioideae* y *Tillandsioideae* (Luther & Sieff, 1991).

La subfamilia *Pitcairnioideae* contiene a las bromeliáceas más ancestrales y muchas recuerdan a la familia de las gramíneas, de la cual evolucionaron. Casi todas son terrestres y dependen de un extenso sistema radicular para obtener agua y nutrientes. Poseen hojas espinosas y sus frutos son cápsulas secas conteniendo semillas no aladas.

La subfamilia *Bromelioideae* es la más diversa y contiene el mayor número de géneros (pero el menor número de especies). La mayoría de las especies son epífitas y caracterizadas por presentar una roseta de hojas basal que puede funcionar como reservorio de agua. Generalmente tienen hojas espinosas y sus semillas son a menudo distribuidas por los pájaros y animales, que consumen sus frutos carnosos.

A diferencia de la anterior, la subfamilia *Tillandsioideae* contiene muy pocos géneros pero incluye el mayor número de especies. La mayoría de sus miembros son plantas epífitas. Ninguna tienen hojas espinosas y su fruto es una cápsula seca conteniendo semillas aladas que son habitualmente dispersadas por la brisa. Las características plumosas de las alas seminales favorece su adherencia a las superficies apropiadas para concretar su germinación. Esta subfamilia es probablemente la más

evolucionada de las tres, mostrando especiales adaptaciones para la supervivencia en condiciones muy secas (xerófilas).

La Tabla 1.5. muestra la distribución de los géneros de *Bromeliaceae* en las tres subfamilias que la integran.

Subfamilia	Género
<i>Pitcairnioideae</i>	<i>Ayensua, Brewcaria, Brocchinia, Connellia, Cottendorfia, Deuterocohnia, Dyckia, Encholirium, Fosterella, Hechtia, Lindmania, Navia, Pepinia, Pitcairnia, Puya, Steyerbromelia</i>
<i>Tillandsioideae</i>	<i>Alcantarea, Catopsis, Glomeropitcairnia, Guzmania, Mezobromelia, Racinaea, Tillandsia, Vriesea, Werauhia</i>
<i>Bromelioideae</i>	<i>Acanthostachys, Aechmea, Ananas, Androlepis, Araeococcus, Billbergia, Bromelia, Canistropsis, Canistrum, Cryptanthus, Deinacanthon, Disteganthus, Edmuntoa, Fascicularia, Fernseea, Greigia, Hohenbergia, Hohenbergiopsis, Lymania, Neoglaziovia, Neoregelia, Nidularium, Ochagavia, Orthophytum, Portea, Pseudaechmea, Pseudananas, Quesnelia, Ronnbergia, Ursulaea, Wittrockia</i>

Tabla 1.5.. *Subfamilias y géneros de Bromeliaceae* (Luther & Sieff, 1991)

La mayoría de los nombres dados a los géneros de bromeliáceas honran la memoria de científicos alemanes (*Dyckia, Hechtia, Hohenbergia*), franceses (*Chevaliera, Neoglaziovia, Pepinia*) y suecos (*Billbergia, Lindmania, Wittrockia*). Los nombres genéricos están dedicados a hombres, con dos recientes excepciones (*Racinaea* y *Ursulaea*). Si bien varios importantes monógrafos e investigadores de bromeliáceas han sido conmemorados a través de nombres genéricos (*Lymania, Mezobromelia, Neoregelia* y *Werauhia*), algunos de ellos no han sido honrados, tal el caso de Édouard Morren, Johann Georg Beer y Karl Koch. Por otra parte nombres genéricos destinados a reconocer las contribuciones significativas de algunos investigadores a la taxonomía de la familia, tales como *Andrea* (en memoria de Édouard François André), *Bakeria* y *Bakerantha* (en honor a John Gilbert Baker) y *Wittmackia* (por Max Carl Ludwig Wittmack) actualmente son considerados sinónimos y por lo tanto no utilizados (Grant, 1998).

1.7. Endopeptidasas de *Bromeliaceae*

Las enzimas proteolíticas se hallan ampliamente distribuidas en las plantas superiores y la importancia fisiológica de las mismas radica en que la degradación de las proteínas y la reutilización de sus aminoácidos resultan indispensables para el desarrollo de la planta, desde el momento mismo de la germinación de las semillas. Sin embargo, existen algunas familias en las que esta clase de enzimas son producidas en cantidades que exceden con creces el potencial necesario para tal recambio; a este tipo de proteasas se las ha denominado "proteasas no indispensables" o "proteasas secundarias" (Boller, 1986), en obvia analogía con los metabolitos secundarios de las plantas.

La mayoría de las fitoproteasas estudiadas pertenecen a familias caracterizadas por producir látex (Caricaceae, Moraceae, Asclepiadaceae, Euphorbiaceae). Entre las familias que carecen de laticíferos pero que producen proteasas en cantidades inusuales se destaca la de las Bromeliaceae, siendo *Ananas comosus* L. (el "ananá") la especie más estudiada en este sentido y la bromelina -la proteasa obtenida de tallos y frutos- una de las enzimas más comercializadas (Heinicke & Gortner, 1957), habiéndose descrito numerosas aplicaciones industriales y medicinales de la misma (Cooreman *et al.*, 1976).

1.7.1. Endopeptidasas de *Ananas comosus* L.

Durante un tiempo el nombre "bromelina" o "bromelaína" fue utilizado para denominar a las proteasas provenientes del jugo de frutos del ananá. Heinicke (1953) sugirió usar este término ("bromelain") para designar en forma genérica a todas las enzimas proteolíticas encontradas en los diversos tejidos de plantas de la familia *Bromeliaceae*, pero en la práctica este criterio nunca fue adoptado y en la actualidad el nombre de bromelaína está reservado a las principales proteasas obtenidas a partir de tallos y frutos de *Ananas comosus* L.

Siguiendo esta definición los nombres "bromelaína de tallo" y "bromelaína de fruto" han sido usados para describir a las enzimas responsables de la actividad proteolítica de los jugos de tallos y frutos de ananá, respectivamente. Estas enzimas fueron originalmente codificadas con diferentes números (EC 3.4.4.24 y EC 3.4.4.25), luego reunidas bajo el número EC 3.4.22.4 y nuevamente separadas en 1992 (EC 3.4.22.32 y EC 3.4.22.33, respectivamente).

El material utilizado en la mayor parte de los estudios, que tuvieron lugar principalmente en las décadas de 1960 y 1970, fue el polvo comercial obtenido del material de desecho de los tallos de ananá, utilizado en la industria bajo el nombre de “bromelaína”. Probablemente esa haya sido la causa de la existencia de informes contradictorios en relación al número de componentes proteolíticos, habiéndose citado la existencia de hasta seis fracciones activas (*cf.* las revisiones de Murachi, 1970 y Rowan & Buttle, 1994). La situación fue finalmente clarificada por Rowan *et al.* (1990), denominando “bromelaína de tallo” a la principal endopeptidasa del tallo de ananá y “bromelaína de fruto” a la principal endopeptidasa de fruto. Adicionalmente dos endopeptidasas menores (ananaína y comosaína) fueron separadas de tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988, 1990).

1.7.1.1. Bromelaína de Tallo

La bromelaína de tallo representa casi el 90% del material proteolíticamente activo presente en extractos de tallos de ananá (Rowan *et al.*, 1988). Sorprendentemente, y a pesar de su elevada actividad sobre distintos sustratos proteicos, sólo actúa eficientemente sobre sustratos sintéticos que contengan uniones Arg-Arg, como también lo hace comosaína (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994). También se ha comunicado una cierta preferencia de la enzima por aminoácidos polares en las posiciones P1 y P1' (Napper *et al.*, 1994). Para una completa actividad de la enzima se requiere la presencia de agentes reductores tales como DTT o cisteína. El pH óptimo, tanto con sustratos sintéticos como proteicos es amplio (Rowan & Buttle, 1994).

A diferencia de otras endopeptidasas de ananá, la bromelaína de tallo exhibe una inusual cinética de inhibición con E-64 (Rowan *et al.*, 1988, 1990; Napper *et al.*, 1994), y es también atípica en su resistencia a la inhibición con cistatina de pollo, una propiedad que comparte con la bromelaína de fruto (Rowan *et al.*, 1990).

La bromelaína de tallo es una única cadena polipeptídica glicosilada de 24,5 kDa (Harrach *et al.*, 1995), con un $pI = 9,55$ y una $A_{1\%,280} = 20,1$ (Murachi, 1970), conteniendo siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995) y por lo tanto probablemente tres puentes disulfuro. La secuencia aminoacídica completa ha sido deducida por Ritonja *et al.* (1989), demostrando que su N-terminal es diferente al de las otras endopeptidasas del ananá (Napper *et al.*, 1994).

Una característica distintiva de la bromelaína de tallo es su relativamente débil inhibición por E-64 y la carencia de inhibición por cistatina de pollo, lo que la diferencia de la mayoría de las peptidasas de la familia C1. Mas aún, la bromelaína de tallo demostró ser inmunológicamente distinta tanto de la bromelaína de fruto (Rowan *et al.*, 1990) como de la ananaína (Rowan *et al.*, 1988).

1.7.1.2. Bromelaína de Fruto

La primera referencia sobre la existencia de actividad proteolítica en el jugo del ananá data de 1891 (Marcano), separando las sustancias activas con sulfato de amonio. La bromelaína de fruto constituye el 30-40% de las proteínas totales del fruto y representa casi el 90% del material proteolíticamente activo (Murachi, 1970). Un sustrato sintético apropiado para bromelaína de fruto es Bz-Phe-Val-Arg-NHMec, que es pobremente hidrolizado por bromelaína de tallo (Rowan *et al.*, 1990). La bromelaína de fruto tiene mayor actividad proteolítica que bromelaína de tallo (Rowan *et al.*, 1990) y, al igual que ésta, tienen un amplio pH óptimo frente a sustratos proteicos y sintéticos (Rowan & Buttle, 1994).

La bromelaína de fruto es una cadena polipeptídica simple de aproximadamente 25 kDa (Rowan *et al.*, 1990), cuyo pI es 4,6 y una A_{1%,280} de 19.2 (Ota *et al.*, 1964). No está claro si se trata de una glicoproteína (Ota *et al.*, 1985; Yamada *et al.*, 1976). La secuencia N-terminal es idéntica a la de bromelaína de tallo (Yamada *et al.*, 1976), pero es inmunológicamente distinta de ésta y de ananaína. (Rowan *et al.*, 1990). A diferencia de lo que ocurre con bromelaína de tallo, Z-Arg-Arg-NHMec es un pobre sustrato para bromelaína de fruto (Rowan *et al.*, 1990).

1.7.1.3. Ananaína

Al analizar una preparación comercial cristalina de bromelaína, Gounaris *et al.* (1984) encontraron que sus componentes diferían grandemente en su susceptibilidad frente a la inhibición por quininógeno. Posteriormente se logró purificar una enzima distinta a la bromelaína de tallo, con actividad frente a Z-Phe-Arg-NHMec, a la que se denominó

ananaína (EC 3.4.22.31), que representa el 5% de las proteínas totales del extracto de tallo de ananá (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994).

La enzima logró ser detectada utilizando como sustrato Z-Phe-Arg-NHMec, que prácticamente no se hidroliza frente a bromelaína de tallo (Rowan *et al.*, 1988). Ananaína muestra mayor preferencia por aminoácidos polares en la posición P1', mientras que el requerimiento para el sitio P1 es mucho menos específico (Napper *et al.*, 1994), mientras que en el sitio P2 manifiesta preferencia por una cadena lateral hidrofóbica (Rowan *et al.*, 1990). El pH óptimo tanto con sustratos sintéticos como proteicos es cercano a la neutralidad (Rowan & Buttle, 1994)

Ananaína no es glicosilada y está formada por una cadena proteica simple de 23,5 kDa (Rowan *et al.*, 1988; Napper *et al.*, 1994; Harrach *et al.*, 1995), $pI > 10$ (Rowan *et al.*, 1988; Harrach *et al.*, 1995), y una $A_{1\%,280}$ de 16,5 (Rowan *et al.*, 1988). También contiene siete residuos Cys (Napper *et al.*, 1994) y la secuencia N-terminal demuestra claramente que es distinta a las otras endopeptidasas de ananá (Rowan & Buttle, 1994). El comportamiento de la enzima frente a los inhibidores es similar al de la papaína, ya que es eficientemente inhibida tanto por cistatina de pollo como por E-64 (Rowan *et al.*, 1988).

La secuencia completa de ananaína ha sido determinada recientemente y comparada con bromelaína de tallo y otras proteinasas cisteínicas (Lee *et al.*, 1997). Su secuencia primaria incluye un inserto entre los residuos 170 y 174 que no está presente en bromelaína de tallo ni en papaína y una serie de aminoácidos hidrofóbicos adyacentes a la His-157, a la que obedecería las diferencias de comportamiento de ananaína y de bromelaína de tallo frente a diferentes sustratos e inhibidores.

1.7.1.4. Comosaína

Al ensayar el extracto crudo de tallo de ananá sobre peptidil nitrofenil ésteres, Silverstein (1974) detectó dos componentes activos menores, a los que denominó glicinesterasas A y B. Una fracción de elevado pI de este extracto fue luego purificada y demostró contener dos componentes (Rowan *et al.*, 1990a; Napper *et al.*, 1994), uno de los cuales fue ananaína y el otro fue denominado comosaína (nombre derivado del epíteto específico del ananá), que podría ser una de las glicinesterasas primero descritas por Silverstein (1974).

Comosaína es la endopeptidasa menos abundante del extracto de tallo de ananá y representa menos del 1% de las proteínas totales (Napper *et al.*, 1994). Tiene actividad sobre Z-Arg-Arg-NHMec, que es un pobre sustrato para ananaína (Rowan *et al.*, 1990), muestra preferencia por residuos polares tanto en el sitio P1 como P1', es altamente proteolítica y es inhibida por E-64 (Napper *et al.*, 1994). Se trata de una glicoproteína de 24.5 kDa y $pI > 10$, conteniendo siete residuos Cys y tiene una composición similar en carbohidratos a la bromelaína de tallo, pero es marcadamente diferente en su composición aminoacídica (Napper *et al.*, 1994). Los datos de la secuencia N-terminal demuestran que comosaína es distinta de las otras endopeptidasas de ananá (Napper *et al.*, 1994; Rowan & Buttle, 1994).

1.7.1.5. Otras Proteasas de Frutos de *Bromeliaceae*

A partir de frutos de *Bromelia pinguin* L., una planta tropical muy abundante en las Antillas, donde se la conoce con el nombre vulgar de "maya" o "piña de ratón", Asenjo y Fernández (1942) separaron una proteasa cisteínica (pinguinaína). Algunos años más tarde Messing *et al.* (1960) mejoraron el procedimiento de extracción y obtuvieron una preparación con dos picos de pH óptimo (pH 5,5 y 7,6) y distintos puntos isoeléctricos, presumiendo la existencia de dos proteasas a las que denominaron pingüinaínas "A" y "B". En 1968 Toro Goyco *et al.* logran purificar la enzima, que tiene una temperatura óptima de 65 °C, es estable a la desnaturalización térmica, muestra un pH óptimo ácido (pH 3,8-4,3) y una $A_{1\%,280}$ de 24,6. Su peso molecular determinado por gel filtración fue de 18 kDa, pero por ultracentrifugación se obtuvieron valores de 19,2 kDa a pH 7,3 y de 25,4 a pH 4,6, lo que fue atribuido a una agregación parcial de la enzima. Más recientemente se ha determinado su naturaleza glicoproteica y la masa molecular (26 kDa) por SDS-PAGE (Rowan *et al.*, 1990). La especificidad frente a sustratos sintéticos mostró ser mayor con dipéptidos en los que el átomo de N es aportado por un aminoácido aromático. El contenido en hidratos de carbono es similar al de bromelaína de tallo (1,7 a 1,9% de su peso total), pero muestran propiedades distintas en cuanto a pI (6,5 para pingüinaína y 9,5 para bromelaína) y pH óptimo (3,8-4,3 y 6,0 respectivamente). Posee cinco grupos sulfhidrilo por molécula, cuatro de los cuales están involucrados en puentes disulfuro (Toro-Goyco *et al.*, 1980).

A partir del jugo obtenido por expresión de los frutos de cuatro plantas mexicanas pertenecientes al género *Bromelia* (*B. hemispherica* Lam., *B. karatas* L., *B. palmeri* Mez y

B. sylvestris Willd. ex Sims.), Cruz *et al.* (1974) aíslan cuatro proteinasas cisteínicas de características enzimáticas similares, a las que denominan "hemisfericina", "karatasina", "palmerina" y "silvestrisina", respectivamente, cuyos pesos moleculares (determinados en base a la concentración de grupos tiol) oscilan entre 22,5 y 24,8 kDa. La actividad proteolítica sobre caseína (que sería superior a la de pingüinaína y bromelaína) es similar, aunque la actividad esterolítica es mayor en hemisfericina y palmerina que en karatasina y silvestrisina. Por isoelectroenfoque se obtiene un número variable (7-11) de componentes activos cuyos puntos isoelectrónicos varían entre 3,1 y 8,9 (Garduño *et al.*, 1974).

En el caso de hemisfericina el pH óptimo es alrededor de 8 frente a caseína y de 7 frente al benzoil L-arginato de etilo (Inei-Shizukawa *et al.*, 1976). La enzima inmovilizada con Sepharosa 6B muestra igual perfil de pH que la enzima libre, siendo mayor su actividad esterolítica a pH 7,0 (Ríos-Mercadillo *et al.*, 1978).

Hernández Arana *et al.* (1983) realizaron un estudio de dicroísmo circular comparativo entre 5 proteasas de *Bromeliaceae* (bromelaína de tallo, hemisfericina, karatasina, silvestrisina y palmerina), 2 de *Caricaceae* (papaína y mexicanaína) y 1 de *Moraceae* (ficina), todas ellas cisteínicas y de similar peso molecular, comprobando que las proteinasas de *Bromeliaceae* se diferenciaban de las de las otras familias por su alto contenido en lámina- β antiparalela, lo que proporciona un soporte a la idea de que las proteinasas cisteínicas de plantas son el resultado de un proceso de evolución divergente.

León-Alcalá *et al.* (1989) determinaron la composición en aminoácidos para hemisfericina, karatasina, silvestrisina y palmerina, hallando una gran semejanza entre las dos primeras. Las cuatro enzimas mencionadas son glicoproteínas, con un porcentaje de carbohidratos que oscila entre el 5,6% (hemisfericina) y el 12% (palmerina), parte del cual se encuentra como glucosamina. Montes *et al.* (1990) demostraron que karatasina estaría formada por la asociación de 2 subunidades, que se mantendrían unidas por puentes disulfuro y fuerzas electrostáticas. Un comportamiento similar se había advertido previamente en hemisfericina (Agundis *et al.*, 1977; Ochoa *et al.*, 1987).

Sin considerar la especie objeto del presente trabajo de tesis doctoral, las únicas proteasas de bromeliáceas sudamericanas estudiadas son las que se encuentran en los frutos de las especies de *Bromelia* que crecen en Argentina: *B. balansae* Mez, *B. hieronymi* Mez, *B. laciniosa* Mart. y *B. serra* Griseb.

A partir de frutos maduros de *B. balansae*, Bongiorno de Pflinter & Buttazzoni de Cozzarin (1976) obtuvieron una preparación enzimática parcialmente purificada, compuesta de seis fracciones proteicas, con máxima actividad a pH 7,25 (caseína) y 7,46

(benzoil-argininamida), a la que denominaron “balansaína”. Utilizando frutos semimaduros, Natalucci *et al.* (1988) obtienen una preparación activa dentro de un mayor rango de pH (6,0 – 9,5), de baja estabilidad térmica, que se resuelve en tres fracciones proteolíticamente activas por cromatografía de intercambio iónico, una de ellas de $pI > 8$. Recientemente Pardo *et al.* (2000) aislaron una de las fracciones proteolíticas (balansaína I) de $pI = 5,45$ y una masa molecular de 23.192 (espectrometría de masas), con preferencia por los N- α -CBZ p-nitrofenil derivados de alanina y glutamina y cuyo N-terminal exhibe un alto grado de homología con otras proteasas de *Bromeliaceae*. La enzima es coagulante de la leche y muestra perfiles electroforéticos característicos frente a proteínas de leche y de soja (Pardo *et al.*, 2001).

Buttazzoni de Cozzarin y Bongiorno de Pfirter (1980) obtuvieron una preparación proteolíticamente activa a partir de bayas de *B. hieronymi*, con máxima actividad a pH 6,3 y 7,8 (caseína) y 6,6 (benzoil-argininamida). Posteriormente Natalucci *et al.* (1985) comparan la actividad del jugo de frutos inmaduros y de un polvo acetónico y separan tres fracciones activas por cromatografía de intercambio iónico. Priolo *et al.* (1991) obtienen una preparación que muestra un perfil de pH más alcalino (7,2 a 10,0) y una buena estabilidad térmica, consiguiendo separar cuatro componentes proteolíticamente activos, de masas moleculares entre 26,2 y 28,6. Más recientemente Bruno *et al.* (2002) comunican los valores de los puntos isoeléctricos de las fracciones de mayor actividad (pI 6,4, 8,3 y $>9,3$) y logran aislar la fracción principal ($pI >9,3$, peso molecular 25 kDa), a la que denominan “hieronymaína”.

Por expresión de frutos de *B. laciniosa* Mart. y posterior fraccionamiento con acetona Buttazzoni de Cozzarin y Bongiorno de Pfirter (1980) obtuvieron una preparación proteolíticamente activa con máxima actividad a pH 6,3 y 7,8 (caseína) y 6,6 (benzoil-argininamida). Buttazzoni *et al.* (1984) obtienen una preparación similar triturando frutos verdes y maduros en presencia de acetona, pero los últimos proveen preparaciones mucho más activas y separan una fracción activa por cromatografía de exclusión molecular. La fracción activa, que eluye en la zona correspondiente a 15-20 kDa, se resolvió en tres fracciones activas por intercambio iónico (Priolo *et al.*, 1986).

Por trituración de frutos semimaduros de *B. serra* Griseb. en presencia de acetona se obtuvo una preparación enzimática con máxima actividad en el rango de pH 6 a 7,8 y con moderada estabilidad térmica. Mediante cromatografía de exclusión molecular y de intercambio iónico se lograron separar dos fracciones activas, una de ellas de $pI > 8$ (Caffini *et al.*, 1988).

2. Objetivos

Si bien las enzimas proteolíticas se hallan presentes en todas las células, en los organismos multicelulares de mayor complejidad suelen no tener una distribución uniforme y con frecuencia algunos tejidos y órganos las contienen en elevada concentración. Dadas las múltiples aplicaciones industriales de este tipo de enzimas, la detección de nuevas fuentes de proteasas a partir de recursos naturales renovables sigue siendo un tema de gran atractivo dentro del campo de la Química de Productos Naturales.

En esta línea de razonamiento, la selección de nuevos materiales dentro de las plantas superiores tuvo que basarse necesariamente tanto en la información fitoquímica preexistente como en los aportes que la Fisiología y la Bioquímica Vegetales han realizado en cuanto a las funciones biológicas que desempeñan o se les atribuyen a las peptidasas en las células que las contienen y en los organismos de los que forman parte.

Aún cuando el número de especies estudiadas con el propósito antes mencionado sigue siendo muy reducido (bastante menos del 1% de las especies conocidas), los datos de los que se dispone brindan una razonable orientación en cuanto a materiales vegetales que pueden resultar fuente promisoría de nuevas peptidasas. Si bien no en todos los casos, el contenido de los tubos laticíferos suele ser rico en este tipo de sustancias, a tal punto que la mayoría de las fitopeptidasas conocidas provienen de especies pertenecientes a familias caracterizadas por producir látex: *Asclepiadaceae*, *Apocynaceae*, *Caricaceae*, *Euphorbiaceae* y *Moraceae*, entre otras. Por otra parte, así como la presencia de látex no garantiza la existencia de enzimas proteolíticas, su ausencia tampoco descarta la posibilidad de hallarlas en especies pertenecientes a familias "no laticíferas", como lo demuestra su hallazgo en *Asteraceae*, *Bromeliaceae*, *Cucurbitaceae* y *Fabaceae*, por citar los casos más conocidos.

Parece más allá de toda duda que el desarrollo de la capacidad de producción de peptidasas en alta concentración tiene claras implicancias evolutivas. En el caso de la familia *Bromeliaceae* dicha capacidad parece estar restringida a sólo una de las tres subfamilias que la componen: las *Bromelioideae*, hecho en el que basamos nuestra hipótesis de trabajo al seleccionar los frutos de *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (n.v. "ihvirá", "falso ananá") como material de estudio de nuevas fuentes de fitopeptidasas.

Una vez seleccionado el material y comprobada que fue la presencia de enzimas proteolíticas, resultó necesario establecer el procedimiento de extracción que permitiera obtener la mayor cantidad de proteína activa y al mismo tiempo preservar la integridad funcional de la misma, de modo de disponer de suficiente material de estudio y, además, que el mismo fuera representativo del estado en el que se encontraban las peptidasas en su localización original en la planta.

Dado que las enzimas proteolíticas son utilizadas en distintos procesos industriales y teniendo en cuenta que en estos casos se recurre a preparaciones prácticamente no purificadas, también se consideró esencial contar con información sobre el comportamiento de estas últimas. En función de ello se decidió verificar el efecto del pH y de la fuerza iónica sobre la actividad proteolítica, así como la estabilidad de la enzima parcialmente purificada en distintas condiciones de pH y de temperatura.

El paso siguiente consistió en diseñar una estrategia de purificación que permitiera separar las principales proteínas responsables de la actividad proteolítica de la muestra, necesaria para la posterior caracterización bioquímica y estructural de las mismas. En la elección de la metodología de purificación se procuró en lo posible que la misma resultara factible de ser escalada, teniendo en cuenta que las enzimas purificadas tienen alto valor agregado.

La etapa final en el conocimiento de este tipo de biomoléculas es su caracterización, que además de las condiciones óptimas de acción implican el conocimiento de su masa molecular y del punto isoeléctrico, de sus características cinéticas y de su secuencia aminoacídica, estableciendo en este último caso la pertinente comparación con las estructuras de otras proteasas, a efectos de determinar el grado de homología que presenta en relación con las mismas, tanto por las implicancias filogenéticas como por el aporte que puede ofrecer al esclarecimiento de la especificidad de sustrato.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material Vegetal

Pseudananas macrodontes (Morr.) Harms [= *Pseudananas sagenarius* (Arruda) L.A. Camargo], conocida en nuestro país como “ihvirá” o “falso ananá”, es una planta terrestre, estolonífera, que forma grandes matas, provista de numerosas hojas arrossetadas lineales, largas, con agujones en los márgenes y ápices (Figura 3.1.). Las flores, de unos 3 cm de largo, se presentan solitarias en la axila de una bráctea espinulosa y están dispuestas en inflorescencias capituliformes cilíndrico-ovoides de unos 10 cm de largo, colocadas en la extremidad de un largo escapo rojo protegido por brácteas foliáceas del mismo color (Dimitri, 1978).

Los frutos son bayas de ovario ínfero, con bractéola deltoidea de base amplia, que forman una espiga densa, de 20-25 mm x 1,5 cm de ancho, constituyendo un sincarpio ovoide. Esta infrutescencia, fibrosa y con el eje muy leñoso y de menor tamaño que el ananá (10 a 15 cm de largo x 7 cm de ancho y 350 g de peso promedio), es de color amarillento, con semillas castañas.

Los frutos son semejantes a los del ananá, pero de menor tamaño. Una vez que son desprovistos de las brácteas y de las cubiertas externas, quedan reducidos a poca cosa; sin embargo son aromáticos, dulces y comestibles, pero fibrosos y con el eje muy leñoso. Los indios de Formosa y Chaco suelen usar sogas y otras piezas tejidas con fibras de filodios o estolones de esta especie. El nombre indígena “ihvirá” significa, precisamente, “fibra” (Castellanos, 1945).

La especie se extiende desde Brasil (Minas Geraes, Rio de Janeiro, São Paulo), siguiendo por la cuenca entre los ríos Paraná y Paraguay hasta Argentina (Formosa, Chaco, Santa Fe, Misiones y Corrientes). Un estudio realizado recientemente en Bolivia (Fredericksen *et al.*, 1999) da cuenta de su presencia en varios bosques tropicales secos del Este de ese país y describe algunos aspectos de su ecología. Las plantas forman grupos densos uniespecíficos, que aparentemente inhiben el crecimiento de otras plantas, con una densidad promedio de una roseta por m² y una altura media de 1 m. A pesar de su rápida tasa de reproducción vegetativa (se multiplica por clones a través de rizomas y

estolones), la colonización de nuevas áreas por parte de la planta podría depender de la dispersión de semillas, que en su mayoría llevan a cabo mamíferos medianos y grandes, incluidos monos. Estos animales comen los frutos, cada uno de los cuales contiene entre 19 y 123 semillas pequeñas, muchas de las cuales probablemente son dañadas cuando los frugívoros las consumen. La variación genotípica es extremadamente baja, debido a la alta proporción de la reproducción vegetativa con respecto a la reproducción sexual.

El material utilizado, constituido por frutos bien desarrollados pero no totalmente maduros, proviene de Santa Ana, Departamento de Candelaria (Pcia. de Misiones), de un campo pedregoso, bajo monte sobrepastoreado, y fue recolectado por el Dr. Aníbal G. Amat en mayo de 1993, mayo de 1996 y abril de 1999.



Figura 3.1. *Pseudananas macrodontes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*). A: Planta. B: Detalle, incluyendo la inflorescencia.

3.2. Obtención del Extracto Crudo

Se procesaron 50 g de frutos congelados, desprovistos de semillas y bractéolas, que fueron cortados en pequeños trozos y triturados durante 1 min (en intervalos de 10 s con igual tiempo de espera) en Omni-mixer (Sorval) con 250 ml de buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,1 conteniendo EDTA y cisteína, ambas en concentración 5 mM. El agregado de EDTA obedece a la necesidad de evitar la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo (Anderson, 1968), en tanto que la cisteína contribuye a mantener el ambiente reductor. El valor de pH elegido es lo suficientemente alejado del pH óptimo como para minimizar la autodigestión durante el proceso. Durante la extracción, la temperatura se mantuvo a 0-4 °C.

La suspensión obtenida se filtró a través de gasa doble y luego se centrifugó a 6.000 *g* durante 30 min para eliminar restos vegetales y otros materiales insolubles.

3.3. Precipitación Acetónica Fraccionada

Dado que el extracto crudo fue obtenido a partir de frutos semimaduros, que presentan habitualmente un elevado contenido de hidratos de carbono, se decidió realizar una purificación preliminar por tratamiento de aquél con distintos volúmenes de acetona, lo que permite además enriquecer el extracto en proteína activa.

Para ello, al extracto crudo se le agregó un volumen de acetona fría (-20 °C) gota a gota y con agitación suave, manteniendo la temperatura de la mezcla a 0-4 °C, a los efectos de reducir al mínimo la desnaturalización, se dejó reposar durante 10 min y finalmente se centrifugó a 6.000 *g* durante 30 min. De esta manera se obtuvo un precipitado (P-1) y un sobrenadante, al que se le adicionó un nuevo volumen de acetona fría en las condiciones antes descriptas, con lo que se produjo un nuevo precipitado (P-2) y un nuevo sobrenadante, que fue tratado con otro volumen de acetona fría en las mismas condiciones para producir un tercer precipitado (P-3).

A los precipitados así obtenidos se les eliminaron los restos de acetona por aplicación de vacío y luego cada uno de ellos fue redissuelto en buffer Tris-HCl 50 mM de pH 8,0. A los precipitados redissueltos se les determinó la actividad caseinolítica y el contenido de proteínas y de hidratos de carbono, de acuerdo a las técnicas descriptas en 3.6.1.1., 3.4. y 3.5., respectivamente. En base a estos resultados se seleccionó la

preparación enzimática parcialmente purificada que se utilizó en los posteriores ensayos de caracterización de la enzima.

3.4. Determinación del Contenido de Proteínas

Se utilizó el método de Bradford (1976), basado en que la unión del 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 clásico método de Lowry (Peterson, 1979).

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 5-100 µg/ml para el microensayo.

En las experiencias cromatográficas el perfil de proteínas se estimó por medida de la absorbancia directa a 280 nm.

3.5 Determinación del Contenido de Carbohidratos

El contenido de hidratos de carbono se determinó por el método de Dubois *et al.* (1956), basado en la formación de un compuesto coloreado con máximo de absorbancia a 490 nm por reacción del fenol con los glúcidos (azúcares y sus metil derivados, oligosacáridos y polisacáridos solubles), en presencia de ácido sulfúrico concentrado. La curva de calibración se confeccionó utilizando glucosa (Mallinckrodt) en el rango de 10-100 µg/ml.

3.6. Determinación de la Actividad Proteolítica

3.6.1. Sustratos Proteicos

3.6.1.1. Caseína

La preparación del sustrato se realizó suspendiendo 1 g de caseína tipo Hammarsten (Research Organics) en 100 ml de solución buffer (habitualmente buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0); la suspensión se colocó en un baño de agua que se llevó a ebullición y se mantuvo durante 20 min en esas condiciones. La solución resultante se filtró en caliente y se utilizó el mismo día en que fue preparada.

De no indicarse lo contrario, la mezcla de reacción se preparó con 1,1 ml de solución de caseína al 1% conteniendo cisteína 12,5 mM y 0,1 ml de solución de la enzima, ambas en buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0. La reacción fue llevada a cabo a 37°C y detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético al 5%, luego de lo cual los tubos fueron centrifugados a 6.000 *g* durante 30 min, determinándose la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm, medida a través de una celda de 1 cm de paso. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco, agregando en primer término el ácido tricloroacético.

Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (1989) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió para este caso una unidad arbitraria (Unidad caseinolítica, U_{cas}), que corresponde a la cantidad de enzima requerida para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 280 nm al cabo de 1 min, en las condiciones de ensayo.

3.6.1.2. Azocaseína

El uso de este sustrato obedece a la necesidad de reemplazar a la caseína en los ensayos de inhibición enzimática con 1,10-fenantrolina, ya que dicho inhibidor exhibe un alto valor de absorbancia a 280 nm. El sustrato fue preparado por la técnica de Charney & Tomarelli (1947) modificada por López (1995).

La mezcla de reacción conteniendo 250 μ l de azocaseína al 2% en glicina-NaOH 0,1 M de pH 9,0 conteniendo cisteína 12,5 mM y 150 μ l del extracto enzimático se incubó a 37°C. La reacción se detuvo agregando 1,2 ml de ácido tricloroacético al 10%; la mezcla se mantuvo en reposo durante 15 min y luego se centrifugó durante 20 min a 4.000 g . Se vertieron 1,2 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo conteniendo 1,4 ml de NaOH 1M y se midió la absorbancia a 440 nm a través de una celda de 1 cm de paso. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco agregando en primer término el ácido tricloroacético.

La unidad de actividad enzimática (U_{azocas}) fue definida como la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento de una unidad de absorbancia a 440 nm por min en las condiciones de ensayo.

3.6.1.3. Proteínas de Soja

El objetivo de este experimento fue el de determinar el grado de hidrólisis de las proteínas presentes en concentrados de soja por acción de una cantidad definida de la enzima estudiada y analizar los productos generados a lo largo del tiempo, en comparación con la proteólisis producida por alcalasa (preparación comercial obtenida de *Bacillus licheniformis*, Novo Industri A/S, Denmark) en la misma relación enzima/sustrato.

El concentrado de soja fue preparado agitando 100 g de harina de soja desgrasada (origen Brasil) durante 12 h a 4 °C con 1000 ml de etanol de 70°; la dispersión se centrifugó, el sedimento se trató del mismo modo durante 1 h y se secó en estufa a 50°C durante 24 h.

El seguimiento de la hidrólisis se realizó con un "pH-stat" manual empleando una microbureta tipo Bahn, un pH-metro, un vaso de doble camisa para termostatar la mezcla de hidrólisis y un baño de temperatura graduable. El pH se mantuvo constante por adición de NaOH 2 N cada vez que el mismo descendió 0,1 unidad. La reacción se detuvo por disminución del pH a 4,2 mediante el agregado de ácido HCl 1 N y la inactivación de la enzima se obtuvo por calentamiento a 75°C durante 10 min. En todos los experimentos la temperatura fue fijada en 45°C y se utilizaron 100 ml de una dispersión de concentrado de soja al 8% en agua (5,6 % en proteínas) que fue llevada con NaOH al valor de pH elegido (8,0, 9,0 ó 10,0). En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco, reemplazando la solución de enzima por una cantidad equivalente de agua destilada.

El grado de hidrólisis (DH) se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula (Adler-Nissen, 1986):

$$DH = \frac{V_{\text{NaOH}} \cdot N_{\text{NaOH}} \cdot 100\%}{\alpha \cdot MP \cdot h_{\text{tot}}}$$

donde α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH-, MP es la masa de proteína en gramos (Kjeldahl) y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico (meq/g).

3.6.2. Sustratos Sintéticos

3.6.2.1. N- α -CBZ-*p*-Nitrofenil Ésteres de Aminoácidos

La actividad de las proteasas sobre *p*-nitrofenil ésteres de los siguientes N- α -carboboixi (CBZ) -L-aminoácidos fue ensayada sobre los siguientes derivados: N- α -CBZ-L-Ala, N- α -CBZ-L-Asn, N- α -CBZ- β -bencil-L-Asp, N- α -CBZ-L-Gln, N- α -CBZ-Gly, N- α -CBZ-L-Ile, N- α -CBZ-L-Leu, N- α -CBZ-L-Lys, N- α -CBZ-L-Phe, N- α -CBZ-L-Pro, N- α -CBZ-L-Trp, N- α -CBZ-L-Tyr y N- α -CBZ-L-Val.

La mezcla de reacción contuvo 2 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0, 50 μ l de solución de sustrato (1 mM en acetonitrilo) y 50 μ l de solución de enzima. La reacción se llevó a cabo a 37 °C y los cambios de absorbancia se midieron a 405 nm durante 3 min. En este caso una unidad enzimática (U_{CBZ}) fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por min a 37 °C y pH 8,0.

3.6.2.2. Sustratos Fluorogénicos

En la determinación de la constante de Michaelis de las enzimas en estudio se utilizaron los sustratos benzoil-fenil-valil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Bz-Phe-Val-Arg-NHMec) y benzoiloxycarbonil-arginil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Z-Arg-Arg-NHMec), ambos utilizados para diferenciar las endopeptidasas de ananá (Rowan *et al.*, 1990).

El volumen total de la mezcla de reacción fue de 2,5 ml, de los cuales 2,325 ml estuvieron representados por buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. Durante los ensayos se adicionaron 50 μ l de solución de enzima (2,5 nM) y 125 μ l de solución de sustrato (5 a 150 μ M en dimetilsulfóxido). El orden de agregado de los reactivos es el siguiente: dimetilsulfóxido, sustrato, buffer y enzima

La reacción se llevó a cabo a 37 °C y la velocidad de hidrólisis de los sustratos fue medida a una longitud de onda de excitación de 380 nm y a una longitud de onda de emisión de 460 nm en un fluorómetro Photon Technology International termostatzado y con sistema de agitación.

3.7. Efecto de Inhibidores

Con el objeto de determinar a qué grupo pertenece la proteasa en estudio, según los tipos mecanísticos propuestos por Barrett y Rawlings (1991), las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 30 min a 37°C con inhibidores específicos para peptidasas serínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas (Salvesen & Nagase, 2001): fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, 0,1 y 1 mM), E-64 (1 y 10 μ M), ácido iodoacético (10 y 100 μ M), cloruro mercúrico (0,1 y 1 mM), pepstatina A (1 y 10 μ M) y 1,10-fenantrolina (1 y 10 mM), respectivamente. Se realizaron controles negativos por preincubación de la preparación de proteasa con los solventes usados para disolver cada inhibidor.

Finalizada la incubación, en todos los casos se determinó la actividad caseinolítica residual sobre caseína (*cf.* 3.6.1.1.), con la excepción del ensayo con 1,10-fenantrolina, en el que se utilizó azocaseína como sustrato (*cf.* 3.6.1.2.). En ningún caso se añadió cisteína a la mezcla de reacción.

3.8. Determinación de la Concentración Óptima de Activador

Para establecer las condiciones del medio de reacción que permitan a la enzima manifestar la máxima actividad, se preincubó la misma durante media hora en baño de hielo con distintas concentraciones de cisteína (0 a 100 mM) y luego se la incorporó al sustrato (solución al 1% de caseína en buffer fosfatos 0,1 M de pH 8,0 conteniendo

cisteína en la misma concentración que en la preincubación). La actividad proteolítica fue determinada en las condiciones indicadas en 3.6.1.1.

3.9. Efecto del Congelamiento y de la Liofilización sobre la Actividad Proteolítica

Dado lo reducido del período en el que los frutos alcanzan el grado de madurez óptimo para la producción de proteasas, el almacenamiento del material en estudio es un aspecto crítico. La conservación de los frutos a temperaturas inferiores a 0 °C fue descartada porque el proceso de congelamiento y descongelamiento provoca la desorganización de algunas estructuras, con la consiguiente disminución de actividad proteolítica del material por dilución y/o inactivación de las proteasas. En consecuencia se almacenaron preparaciones crudas a -20 °C y se ensayó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad caseinolítica de las mismas, para lo cual se conservaron congeladas a -20 °C alícuotas de 5 ml. Luego de 5, 10, 20, 30, 60, 120 y 180 días fueron descongeladas dos muestras correspondientes a cada tiempo de conservación, determinándose la actividad residual.

Por otro lado se ensayó el efecto de la liofilización sobre la actividad caseinolítica de las mismas preparaciones. En este caso alícuotas de 2 ml de dichas preparaciones fueron congeladas en frascos-ampolla por rotación dentro de un recipiente conteniendo aire líquido, con lo que se obtiene una película delgada, reduciéndose así el tiempo de congelamiento y facilitándose el proceso de liofilización. La liofilización fue llevada a cabo en un equipo FIC, modelo L2. Algunas muestras no fueron liofilizadas, a efectos de ser utilizadas como control del experimento. A continuación se determinó la actividad caseinolítica tanto en las muestras liofilizadas como en los controles, como se indica en 3.6.1.1.

3.10. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica

Para obtener el perfil de pH se utilizó caseína en las condiciones indicadas en 3.6.1.1., preparada en soluciones 0,1 M de los siguientes buffers: MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (Good e Izawa, 1972) en un rango de pH 5,5 a 11,0 con intervalos de 0,5 unidades de pH, aproximadamente.

3.11. Estabilidad en el Rango de pH de Mayor Actividad Proteolítica

Teniendo en cuenta la posibilidad de utilización de la enzima en procesos industriales, se consideró ventajoso conocer el comportamiento de la preparación enzimática durante periodos más prolongados que los utilizados en las experiencias habituales de laboratorio, dentro del rango de pH de mayor actividad caseinolítica. El experimento se llevó a cabo manteniendo las preparaciones durante 20, 40, 80 y 120 min a 0-4 °C a pH 7, 8, 9 y 10, utilizando los buffers anteriormente mencionados. Luego de cada incubación se determinó la actividad residual sobre caseína de la manera indicada en 3.6.1.1.

3.12. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica

Si bien la actividad de la mayoría de las enzimas no se ve afectada a valores bajos de fuerza iónica, suele disminuir cuando la concentración de sal se incrementa por encima de 0,2 M (Scopes, 1984). En consecuencia se determinó la actividad proteolítica de las preparaciones enzimáticas sobre solución de caseína con el agregado de cantidades crecientes de NaCl, hasta llegar a una concentración máxima de NaCl 1,0 M.

3.13. Estabilidad Térmica

Con el objeto de determinar el comportamiento de la enzima luego de ser sometida a distintas temperaturas durante tiempos variables, las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 0, 5, 10, 20, 40, 60, 90 y 120 min a 20 °C, 37 °C, 45 °C, 65 °C y 75 °C, a pH 8,5. Finalizado el período de incubación, las muestras fueron mantenidas en un baño de hielo hasta que se midió la actividad caseinolítica residual de la forma indicada en 3.6.1.1.

3.14. Purificación Cromatográfica

3.14.1. Cromatoenfoque

Para resolver la mezcla de proteínas presentes en la preparación enzimática parcialmente purificada por precipitación acetónica fraccionada se recurrió a esta técnica, que permite resolver mezclas de fracciones proteicas con valores de pI cercanos. La preparación enzimática (5 ml) fue sembrada en una columna Pharmacia K9/15 (0,9 x 15 cm) rellena con el intercambiador polibuffer PBE94 (Pharmacia) equilibrada con buffer imidazol-ClH 25 mM (pH 6,9). El cromatoenfoque se desarrolló mediante el agregado de 100 ml de Polybuffer 74-HCl (Pharmacia) ajustado a pH 4,5, a una velocidad de flujo de 0,5 ml.min⁻¹, recogiendo fracciones de 1,5 ml.

3.14.2. Cromatografía de Intercambio Iónico

Más allá de su excelente capacidad de resolución, el cromatoenfoque es una técnica costosa (lo que constituye un serio problema para su escalado) y además los anfolitos que se utilizan en la misma deben ser cuidadosamente removidos antes del secuenciamiento o de la aplicación de técnicas tales como el isoelectroenfoque.

Por su parte, la cromatografía de intercambio iónico es una técnica que posee una alta capacidad, buena resolución y bajo costo y también concentra las soluciones proteicas, por lo que resulta de elección en el caso de programarse la purificación de la enzima a nivel industrial. Con un adecuado manejo de los gradientes salinos y de los valores de pH de los buffers de siembra y de elución pueden lograrse separaciones de muy buena calidad, por lo que se la ensayó como alternativa al cromatoenfoque.

En una primera etapa la cromatografía se desarrolló en forma no automática, contando con el auxilio de una bomba peristáltica, columnas Pharmacia K15/30 y un colector de fracciones Gilson Miniescargot. Las últimas experiencias fueron realizadas en un equipo FPLC Pharmacia, utilizando columnas XK/16, con adaptadores y camisa refrigerante.

En el primer caso las preparaciones enzimáticas liofilizadas fueron redisueltas en buffer Tris-ClH 50 mM (pH 8,0) y sembradas (20 ml de una solución conteniendo 200 µg.

ml⁻¹ de proteínas) en una columna Pharmacia K15/30 (1,5 cm x 30 cm) rellena con el intercambiador aniónico DEAE-Sepharose Fast Flow (Pharmacia, 1,5 cm x 30 cm). A continuación se lavó la columna con 55 ml de buffer Tris-ClH 50 mM (pH 8,0) y luego se comenzó la elución con un gradiente lineal de NaCl. En una primera etapa las proteínas retenidas fueron eluidas con 200 ml de un gradiente de cloruro de sodio (0,0-1,0 M) en el buffer de partida. Para lograr una mejor resolución el gradiente fue modificado sucesivamente hasta llegar a los valores de 0,05-0,10 M. La velocidad de flujo en todos los casos fue de 0,23 ml.min⁻¹ y se recolectaron fracciones de 1,5 ml. La actividad caseinolítica fue determinada luego de 10 min de incubación a 37 °C.

Cuando se recurrió al equipo de FPLC las condiciones utilizadas (buffer, gradiente salino) fueron equivalentes, aunque utilizando un intercambiador aniónico fuerte (Q-Sepharose Fast Flow) en la separación inicial y otro de mayor resolución (Q-Sepharose High Performance) en la recromatografía, trabajando con mayor velocidad de flujo (0,5 ml.min⁻¹) y recogiendo fracciones de 1,4 ml.

3.14.3. Cromatografía de Exclusión Molecular

El contenido de los tubos correspondiente a cada una de las principales fracciones con actividad proteolítica se reunió y precipitó con 3 volúmenes de acetona para incrementar la concentración de proteínas. Los precipitados redissueltos en buffer Tris-ClH 0,2 M (pH 8,0) se sembraron en una columna Pharmacia K15/30 rellena con Sephadex G-75 (Pharmacia), eluyendo con buffer Tris-ClH 0,2 M (pH 8,0) a una velocidad de flujo de 0,28 ml.min⁻¹, recogiendo fracciones de 1,5 ml.

3.15. Electroforesis en Gradiente de Polacrilamida

Esta técnica (Hames, 1990) fue utilizada con diversas finalidades: para estimar los pesos moleculares de las proteasas en estudio, dado su probable carácter glicoproteico (Lambin & Fine, 1979), para analizar la mezcla de péptidos producida luego de la hidrólisis enzimática de las proteínas de concentrados de soja y para realizar la primera dimensión de la electroforesis bidimensional.

3.15.1. Preparación de las Muestras

3.15.1.1. Muestras para la Estimación de Pesos Moleculares

Las muestras correspondientes al extracto crudo, a la enzima parcialmente purificada o a las fracciones proteolíticamente activas obtenidas luego de aplicación de cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular fueron concentradas por agregado de tres volúmenes de acetona. Los precipitados acetónicos así obtenidos fueron redisoluertos en el buffer de muestra cuya composición se indica a continuación, pero sin β -mercaptoetanol ni sometidos a ebullición cuando los geles fueron utilizados para obtener los respectivos zimogramas, y luego centrifugados a 16.000 *g*.

Buffer de muestra

Glicerol	10 ml
SDS	2 g
β -mercaptoetanol	5 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Buffer Tris-ClH 3M, pH 8,8 <i>c.s.p.</i>	100 ml

3.15.1.2. Muestras de Hidrolizados de Proteínas de Soja

El material proveniente de la hidrólisis parcial de las proteínas contenidas en los concentrados de soja fue sometido a un tratamiento previo de solubilización. Para ello se mezclaron 0,3 ml de cada una de las muestras con 2,7 ml de un buffer extractante (Tris-HCl 0,1 M de pH 8, conteniendo urea 9 M y 1,1% de SDS) y se agitaron mediante agitador magnético durante 1 h a temperatura ambiente. Las suspensiones se centrifugaron durante 5 min a 16.000 *g*, tomándose luego 0,5 ml de cada sobrenadante que se mezclaron con 0,5 ml de buffer de muestra (en doble concentración, para que luego se alcancen los valores indicados en 3.15.1.1.) y se llevaron a ebullición durante 3 min. Finalmente, las muestras fueron sometidas a una nueva centrifugación durante 5 min a 16.000 *g*.

3.15.2. Preparación de los Geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). Los gradientes de poliacrilamida se obtuvieron mezclando cantidades iguales (2,2 ml) de las dos soluciones de poliacrilamida que definen los extremos del gradiente, utilizando para ello un formador de gradientes (modelo 385, Bio-Rad) y una bomba peristáltica (modelo P-1, Pharmacia). En los geles resultantes (7,3 cm x 8 cm x 0,75 mm) la concentración de poliacrilamida se incrementa en forma lineal desde la zona de siembra hacia el fondo de la placa.

Las soluciones de poliacrilamida utilizadas para la obtención de los geles en gradiente se prepararon de acuerdo a las fórmulas que se indican a continuación (las cantidades consignadas son las necesarias para preparar dos placas).

Solución de poliacrilamida al 6,5%

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	1,3 ml
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	0,75 ml
TEMED*	5 µl
Persulfato de amonio al 5%	25 µl
SDS 10 %	60 µl
Agua	3,9 ml

Solución de poliacrilamida al 8%

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	1,6 ml
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	0,75ml
TEMED*	5 µl
Persulfato de amonio al 5%	25 µl
SDS 10 %	60 µl
Agua	3,6 ml

Solución de poliacrilamida al 20%

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	4 ml
Sacarosa	0,9 g
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	750 µl
TEMED*	5 µl
Persulfato de amonio al 5%	12 µl
SDS 10 %	60 µl
Agua	1 ml

* Debe agregarse inmediatamente antes de iniciar la preparación del gradiente

3.15.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 10-20 μ l). La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 80 min a corriente constante (50 mA), empleando el siguiente buffer de reservorio (Hashimoto *et al.*, 1983), de pH 8,5:

Buffer de reservorio

Tris	0,050 M
Glicina	0,384 M
SDS	0,1 %

3.15.4. Fijación y Coloración

Una vez completada la corrida, los geles fueron sumergidos durante 2 h en la solución colorante, la que actúa también como fijadora, y luego sometidos a sucesivos lavados con solución decolorante hasta la obtención de un fondo incoloro. A continuación se indica la composición de las soluciones mencionadas:

Solución colorante

Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie brilliant blue R-250	100 mg
Agua destilada <i>c.s.p.</i>	100 ml

(la solución se filtra antes de usar)

Solución decolorante

Acido acético glacial	10 ml
Metanol	25 ml
Agua destilada <i>c.s.p.</i>	100 ml

3.15.5. Estimación de los Pesos Moleculares

La estimación de los pesos moleculares se realizó por comparación con proteínas patrones de bajo peso molecular (MW-SDS-70L kit, Sigma). La determinación se realizó

en base a una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas estándar en función de la movilidad relativa de cada especie proteica.

Estándares de pesos moleculares

Proteína	Peso molecular aproximado (kDa)
Albúmina bovina	66,0
Albúmina de huevo	45,0
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (subunidad)	36,0
Anhidrasa carbónica	29,0
Tripsinógeno	24,0
Factor inhibidor de tripsina	20,1
α -lactoalbúmina	14,2

3.16. Electroforesis Discontinua Desnaturalizante

Se trata de una electroforesis en gel de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio como agente desnaturalizante (SDS-PAGE). Esta técnica (Laemmli, 1970) fue utilizada con el propósito de obtener la banda correspondiente a la proteasa en estudio, la que luego fue electrotransferida como paso previo a la determinación del péptido N-terminal, así como para realizar la segunda dimensión de la electroforesis bidimensional nativa-desnaturalizante.

3.16.1. Preparación de las Muestras

Las muestras correspondientes a las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico fueron llevadas a sequedad al vacío (Speed Vac), retomada con el mismo volumen de buffer de muestra, llevadas a ebullición (3 min) y centrifugadas a 12.000 *g* durante 2 min.

3.16.2. Preparación de los Geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) ya mencionado. En un primer paso se colocó la solución de

poliacrilamida para la preparación del gel de resolución (3,2 ml) y luego que ésta polimerizó se agregaron 1,2 ml de la solución con la que se prepara el gel de "stacking". Una vez colocada esta última se colocó el peine que genera diez cavidades, lo que permitió sembrar otras tantas muestras. La composición de las soluciones necesarias para la preparación de ambos geles se describe a continuación. Las cantidades indicadas alcanzan para la preparación de dos geles, empleando separadores de 0,75 mm de espesor.

Solución de poliacrilamida al 12,5 %

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	3,12 ml
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	0,95 ml
SDS 10%	75 μ l
TEMED	4 μ l
Persulfato de amonio al 1,5%	375 μ l
Agua	4,22 ml

Solución de "stacking"

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	580 μ l
Buffer Tris-ClH 0,5 M, pH 6,8	435 μ l
SDS 10%	35 μ l
TEMED	4 μ l
Persulfato de amonio al 1,5%	175 μ l
Agua	2,3 ml

3.16.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con jeringa Hamilton. Los volúmenes de siembra fueron de 5 μ l para los patrones de peso molecular y de 10 μ l en el caso de la muestra. La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 45 min a corriente constante (40 mA), empleando el siguiente buffer de reservorio:

Buffer de reservorio

Tris	3,0 g
Glicina	14,4 g
SDS	1 g
Agua <i>c.s.p.</i>	100 ml

(diluir 1:10 antes de usar)

3.16.4. Fijación y Coloración

Estas etapas se desarrollaron como fue indicado en 3.15.4

3.16.5. Electrotransferencia

La membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Pro-Blott, 9 x 7 cm) se activa por inmersión breve en metanol y luego se sumerge durante 20 min junto a seis hojas de papel Whatman 3 MM en buffer CAPS (ácido 3-ciclohexamido-1-propanosulfónico) 10 mM de pH 11.

Sobre el ánodo del equipo para electrotransferencia (Bio-Rad) se colocan tres hojas de papel Whatman, sobre las cuales se deposita la membrana de PVDF, luego el gel y finalmente las otras tres hojas de papel. La electrotransferencia se realiza a 80 mA durante 30 min. Finalmente la membrana se coloca durante 10 min en la solución colorante y luego se decolora hasta obtener un fondo claro. La composición de las soluciones colorante y decolorante se indica a continuación.

Solución colorante

Metanol	50 ml
Coomassie brilliant blue R-250	100 mg
Agua destilada c.s.p.	100 ml

(la solución se filtra antes de usar)

Solución decolorante

Metanol	50 ml
Agua destilada <i>c.s.p.</i>	100 ml

3.17. Isoelectroenfoque

Los valores de los puntos isoelectricos de las fracciones proteolíticamente activas se determinaron por isoelectroenfoque, utilizando para ello un equipo Mini IEF Cell (Modelo 111, Bio Rad).

3.17.1. Preparación de las Muestras

Las muestras purificadas por intercambio iónico se concentraron y desionizaron por precipitación con 3 volúmenes de acetona. El sobrenadante obtenido se eliminó luego de centrifugar y el precipitado fue redisolto con agua bidestilada, repitiendo dos veces dicho tratamiento.

3.17.2. Preparación de los Geles

Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneas. Para ello se adhiere firmemente la cara hidrofílica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invierte sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Acrilamida-bisacrilamida (25%T, 3%C)	2,0 ml
Glicerol (25% p/v)	2,0 ml
Anfolitos (Pharmalyte 3-10)	0,5 ml
Agua	5,5 ml

La solución se desgasificó durante 15 min empleando una bomba de vacío y luego se le adicionaron a la misma 3 μ l de TEMED y 60 μ l de persulfato de sodio al 10% para iniciar la polimerización.

La mezcla fue depositada con pipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo durante 12 h a temperatura ambiente para obtener la polimerización total. Los geles se removieron de la bandeja con ayuda de una espátula delgada.

3.17.3. Desarrollo del Isoelectroenfoque

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 1-5 μ l) y se permitió que difundieran dentro del gel durante 5 min. Los electrodos de la celda de isoelectroenfoque fueron humedecidos con agua bidestilada, los geles se apoyaron inmediatamente sobre los mismos y se colocó la tapa que permite que la celda quede

herméticamente cerrada. El isoelectroenfoque fue llevado a cabo en tres etapas sucesivas: 15 min a 100 V, otros 15 min a 200 V y 60 min a 450 V.

3.17.4. Fijación y Coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles unidos a su soporte (separados de la placa de vidrio) fueron sumergidos durante 30 min en la siguiente solución fijadora:

Acido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Acido tricloroacético	12,5 g
Agua <i>c.s.p.</i>	100 ml

Una vez fijados, los geles fueron tratados durante 2 h con la solución colorante y luego 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. La composición de las mencionadas soluciones se indica a continuación:

Solución colorante

Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
CuSO ₄	500 mg
Agua <i>c.s.p.</i>	100 ml

(la solución se filtra antes de usar)

Solución decolorante I

Ácido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO ₄	500 mg
Agua <i>c.s.p.</i>	100 ml

Solución decolorante II

Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
Agua <i>c.s.p.</i>	100 ml

3.17.5. Estimación de los Puntos Isoeléctricos

Para la determinación de los puntos isoelectrónicos (pI) por isoelectroenfoque de las distintas especies proteicas se utilizó como patrones una mezcla de proteínas de amplio rango de pI (Broad pI kit, Pharmacia).

Proteína	pI
Amilogucosidasa	3,50
Inhibidor de Tripsina	4,55
β -lactoglobulina A	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6,85
Mioglobina (banda básica)	7,35
Lentil lectina (ácida)	8,15
Lentil lectina (media)	8,45
Lentil lectina (básica)	8,65
Tripsinógeno	9,30

Para la determinación de los valores de pI se utilizó una curva de calibración obtenida al graficar los pI de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés, tomando como referencia la posición del cátodo.

3.18. Zimograma

3.18.1 Preparación de las Placas Agarosa-Caseína

Las placas de agarosa se prepararon sobre una película plástica (Agarose GelBond, Pharmacia) de un tamaño aproximadamente igual al del gel de poliacrilamida. Sobre el lado hidrofílico de la película se depositó una solución de agarosa al 1% en Tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 (0,15 ml/cm²). Una vez polimerizada la agarosa, la placa fue sumergida en una solución de caseína al 1% en el mismo buffer durante 20 min, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 min (Westergaar *et al.*, 1980).

3.18.2. Incubación

El gel de poliacrilamida fue dispuesto sobre la placa de agarosa-caseína evitando la formación de burbujas entre las superficies en contacto. El conjunto fue colocado dentro de una cámara húmeda y llevado a estufa a 50 °C durante 10 min.

3.18.3. Fijación y Coloración

Una vez finalizado el período de incubación, los geles fueron separados y la placa de agarosa-caseína sumergida durante 60 min en la solución fijadora cuya composición se indica a continuación:

Solución fijadora

Acido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
Agua destilada <i>c.s.p.</i>	100 ml

Una vez fijadas las proteínas, la placa de agarosa-caseína fue deshidratada entre papeles de filtro Whatman 3MM por aplicación de una presión de 7,5 g/cm² durante 20 min. Luego fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 min en la siguiente solución colorante:

Solución colorante

Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
Solución fijadora <i>c.s.p.</i>	100 ml

(la solución se filtra antes de usar)

La decoloración se realizó por inmersión de la placa de agarosa-caseína en la solución fijadora durante 10 min y luego se secó con pistola de aire.

3.19. Electroforesis Bidimensional

Se realizó una electroforesis nativa como primera dimensión y una electroforesis desnaturante en la segunda, con el objeto de determinar el carácter monomérico o polimérico de la enzima (Utsumi *et al.*, 1984).

3.19.1. Preparación de las Muestras

Las muestras fueron concentradas por el agregado de 3 volúmenes de acetona y los precipitados redissueltos con buffer de muestra.

Buffer de muestra

Glicerol	10 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Buffer Tris-ClH 62,5 mM de pH 8,8 <i>c.s.p.</i>	100 ml

3.19.2. Preparación de los Geles para Electroforesis Nativa

Los geles se prepararon como se indicó en 3.15.2. con las soluciones que se indican a continuación.

Solución de poliacrilamida al 5%

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	1ml
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	0,75 ml
TEMED	5 μ l
Persulfato de amonio al 5%	25 μ l
Agua	4,2 ml

Solución de poliacrilamida al 20%

Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8)	4 ml
Sacarosa	0,9 g
Buffer Tris-ClH 3 M, pH 8,8	750 μ l
TEMED	5 μ l
Persulfato de amonio al 5%	12 μ l
Agua <i>c.s.p.</i>	1 ml

3.19.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Se realizó de la misma manera que se indica en 3.15.3.

3.19.4. Segunda Dimensión (Desnaturalizante)

Luego de desarrollada la electroforesis nativa (primera dimensión), las calles se cortaron, se separaron y las tiras de gel se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sumergidas en glicerol al 10% en aquellos casos en que fue necesario conservarlas. Una de estas calles constituye la siembra de la segunda dimensión. Previo a la siembra la tira se cubrió con al menos 10 volúmenes de buffer Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8 conteniendo β -mercaptoetanol 0,2 M, SDS al 1%, y sacarosa al 20% y se calentó durante 30 min a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, realizando dos cambios de solución en ese período.

El gel para realizar la segunda dimensión se preparó según se indicó en 3.15.2., pero utilizando separadores de 1 mm y un peine especial que permite generar una calle ancha para colocar la tira de gel de la primera dimensión y una calle normal para los estándares de peso molecular. Luego de colocada la tira de gel el conjunto se cubrió con un buffer de muestra conteniendo Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8 conteniendo 1 % de SDS y 0,01 % de azul de bromofenol.

La electroforesis se llevó a cabo a corriente constante (40 mA por placa). Los geles se fijaron y colorearon de la forma descrita en 3.15.4.

3.20. Espectrometría de Masas

Durante mucho tiempo la espectrometría de masas ha sido conocida como el método más seguro y sensible para obtener la información sobre el peso molecular de pequeñas moléculas, pero la incorporación de procesos suaves de ionización como el de desorción/ionización por matriz asistida con láser (MALDI) permiten ahora la detección de proteínas y de otros biopolímeros (Thiede, 1997).

Para la determinación del grado de pureza y del peso molecular de las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico, las muestras fueron mezcladas con ácido sinapínico (la matriz) disuelto en ácido trifluoroacético al 1% y se procesaron en un equipo MALDI-MS TOF Bruker, modelo Biflex, usando carboxipeptidasa B como estándar.

3.21. Estructura Primaria de Macrodontáina

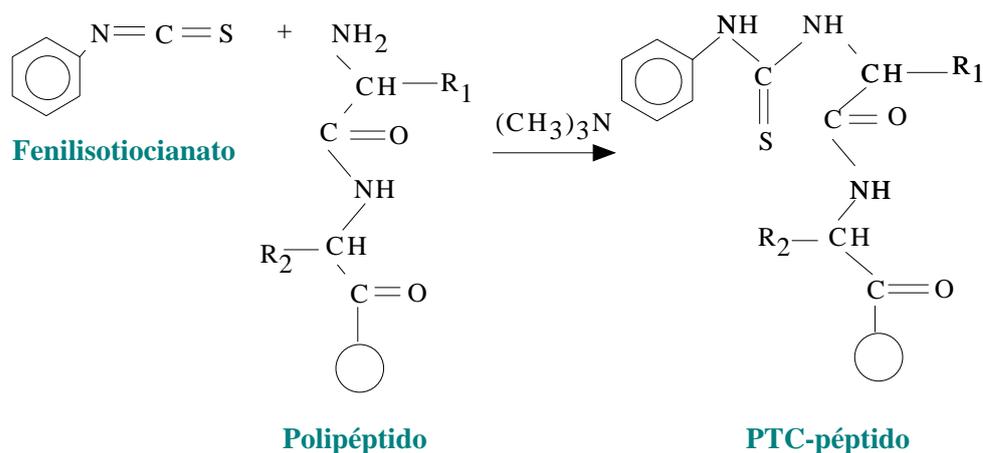
Los experimentos descritos en el presente ítem fueron desarrollados en los laboratorios del Dipartimento di Scienze Biochimiche dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza".

3.21.1. Determinación de la Secuencia Aminoacídica

Se llevó a cabo en un secuenciador en fase gaseosa (Applied Biosystems, mod. 476), en el que tiene lugar la degradación de Edman, basada en la formación de feniltiohidantoínas de los respectivos aminoácidos (Edman, 1950; Edman & Begg, 1967).

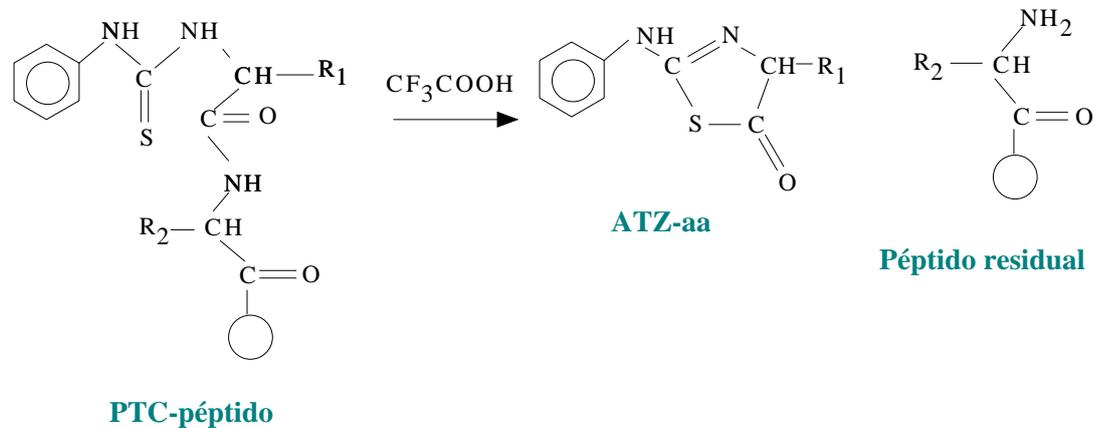
La reacción ocurre en tres etapas sucesivas, en ambiente de argón. Las dos primeras tienen lugar en el mismo lugar (la "cámara de reacción"), en tanto que la tercera ocurre en un recipiente independiente (la "cámara de conversión").

En la primera etapa, o etapa de condensación ("coupling"), tiene lugar la reacción entre el grupo amino terminal de la cadena polipeptídica con el fenilisotiocianato (solución al 5% en *n*-heptano), que debe realizarse a pH básico (trimetilamina al 12,5% en agua) pues los grupos amino no deben encontrarse protonados. El producto formado es un feniltiocarbamil-péptido (PTC-péptido).

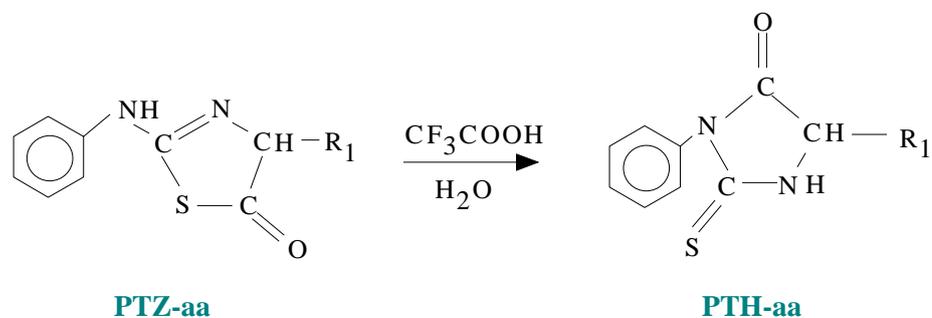


En la segunda etapa, denominada fase de ruptura ("cleavage"), el PTC-péptido se escinde en el 2-anilino-5-tioazolinona-aminoácido (ATZ-aa) y en un péptido residual por acción del ácido trifluoroacético (anhidro, para no provocar la hidrólisis de las otras uniones peptídicas). Dicho péptido queda disminuido en un residuo aminoacídico y está

disponible para el siguiente ciclo degradativo. El ATZ-aa es extraído por acción del 1-clorobutano y transferido desde la cámara de reacción a la cámara de conversión del secuenciador, quedando el péptido residual en la cámara de reacción.



La última etapa, llamada conversión (“conversion”) consiste en la isomerización del ATZ-aa en su isómero más estable, la 3-fenil-2-tiohidantoina (PTH-aa), en presencia de ácido trifluoroacético acuoso. El PTH-aa resultante se identifica por medio de cromatografía gaseosa. La repetición del ciclo permite la identificación secuencial de los aminoácidos que constituyen la estructura primaria de la proteína en estudio.



3.21.1.1. Péptido N-Terminal

Antes de determinar la secuencia N-terminal se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de las fitoproteasas, con el objeto de obtener las bandas de interés. El gel fue electrotransferido a una membrana de PVDF (Matsudaira, 1987) y cada proteasa se detectó por coloración con Coomassie Brilliant Blue R-250. Las bandas electrotransferidas se colocaron en la cámara de reacción del secuenciador para iniciar su secuenciamiento.

Una vez obtenida la información sobre la secuencia N-terminal de las proteasas purificadas, con cada una de ellas se realizó una búsqueda de homologías con proteasas vegetales, utilizando el servicio BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en internet¹.

3.21.1.2. Obtención de la Secuencia Completa

Para determinar la secuencia completa de aminoácidos de una proteína, una de las estrategias a utilizar es someterla a rupturas químicas y/o enzimáticas, purificar los péptidos generados y establecer la secuencia de cada uno de ellos. La compilación de los resultados obtenidos permite generalmente llegar al conocimiento de la estructura completa de la proteína en estudio.

3.21.1.2.1. Tratamiento Previo de la Muestra

La etapa previa al proceso de digestión enzimática consistió en el tratamiento de una reducida cantidad de la principal fracción purificada (4 mg) con una mezcla desnaturizante en base a guanidina que además contiene ditioneitol con el objeto de evitar la oxidación de los residuos sulfhidrúlicos cisteínicos.

Mezcla desnaturizante

guanidina	0,4 g
ditioneitol	2 mg
EDTA 25 mM	240 µl
agua	0,5 ml
buffer Tris-HCl 0,45 M de pH 9,0	0,4 ml

La enzima fue suspendida en la mezcla desnaturizante en un tubo de Kahn, sometida a una corriente de nitrógeno, sellada con film de parafina e incubada durante 3 h a 40 °C. Finalmente se procedió a carboximetilar los grupos tiol con una mezcla carboximetilante que contiene 11,8 mg de ácido iodoacético en 120 µl de NaOH 0,4 M.

La mezcla carboximetilante fue agregada a la solución de enzima desnaturizada y el conjunto se mantuvo durante 30 min en ambiente de nitrógeno, en la oscuridad y a

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

temperatura ambiente. La solución fue luego dializada contra agua deionizada (dos cambios) y posteriormente liofilizada.

3.21.1.2.2. Digestión Enzimática

Para la fragmentación de la cadena polipeptídica de macrodontaína I se utilizaron agentes proteolíticos con diferente especificidad: tripsina (TPCK, Worthington Biochemical Corp), pepsina (Sigma), quimotripsina (Sigma), Asp-N (endopeptidasa aislada de *Pseudomonas fragi*, Boehringer) y Lys-C (endopeptidasa aislada de *Lysobacter enzymogenes*, Boehringer). En la Tabla 3.1. se indican la especificidad de las enzimas mencionadas y las condiciones recomendadas para su uso.

Proteasa	Especificidad (X/Y)	pH Optimo	Buffer	Relación [E/S]	Tiempo	Temperatura
<i>Tripsina</i>	X= Lys, Arg	8-9	Tris-HCl 0,1 M	1/30 a	2-18 h	37°C
	Y≠ Pro		NH ₄ HCO ₃ 0,1 M	1/100		
<i>Pepsina</i>	X, Y = hidrofóbicos	2	HCOOH al 5%	1/100	10 min	25°C
<i>Quimotripsina</i>	X= aromáticos,	7-9	NH ₄ HCO ₃ 0,1 M	1/20 a	2-18 h	37°C
	Leu, Met; Y≠ Pro			1/100		
<i>Asp-N</i>	X ≠ Pro	7-8	Tris-HCl 0,01 M	1/20 a	2-18 h	37°C
	Y = Asp			1/200		
<i>Lys-C</i>	X = Lys	8-9	Tris-HCl 0,025 M	1/30 a	2-18 h	37°C
	Y ≠ Pro		EDTA 0,001 M	1/100		

Tabla 3.1. Características de las enzimas más utilizadas en la obtención de péptidos a ser secuenciados.

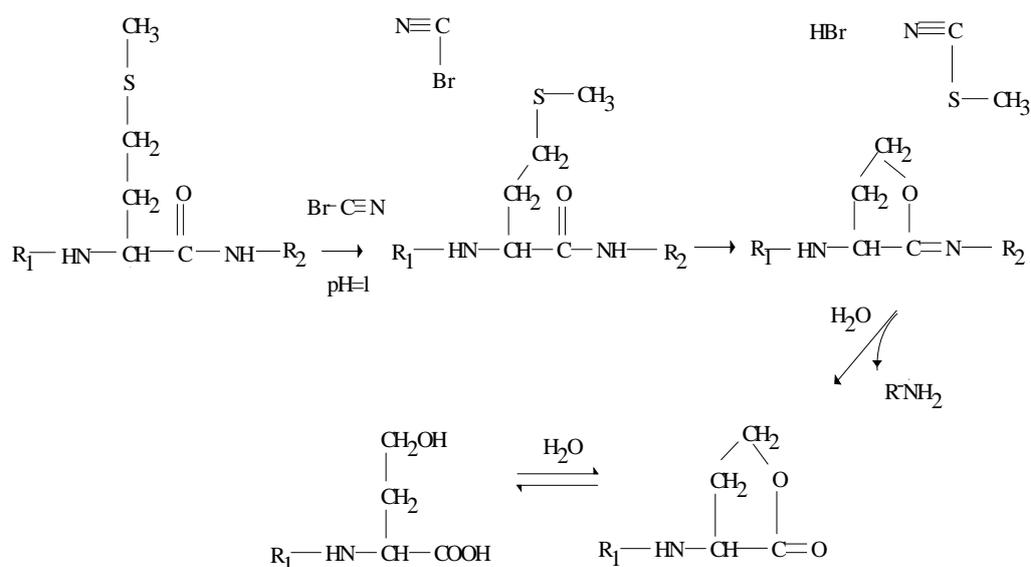
A continuación se indican los protocolos seguidos en cada caso. La cantidad de macrodontaína I carboximetilada utilizada varió entre 1 y 2,5 mg.

Proteasa	pH	Buffer	Relación [E/S]	Tiempo	Temperatura
Tripsina	8,2	NH ₄ HCO ₃ 100 mM	1/40	3 h	37°C
Pepsina	2,0	HCOOH al 5%	1/30	10 min	37°C
Quimotripsina	8,0	NH ₄ HCO ₃ 100 mM	1/40	18 h	37°C
Asp-N	7,5	Tris-HCl 10 mM	1/50	18 h	37°C
Lys-C	8,0	Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM	1/50	18 h	37°C

3.21.1.2.3. Tratamiento con Bromuro de Cianógeno

La ruptura específica de un polipéptido también puede ser llevada a cabo químicamente: el reactivo más ampliamente utilizado con este fin es el bromuro de cianógeno, que rompe el enlace en el que metionina aporta el grupo carboxilo. La metionina representa en promedio un 4% o menos de los residuos aminoacídicos de las proteínas, que de estar distribuidos homogéneamente a lo largo de la secuencia produciría péptidos de entre 20 y 25 residuos.

El bromuro de cianógeno reacciona con el grupo tioéter de la metionina alquilándolo con un grupo ciano. El ion sulfonio reactivo que se forma participa en una serie de reacciones que involucra simultáneamente la ciclación y el clivaje de la unión peptídica, generándose un nuevo grupo amino terminal, en tanto que el nuevo carboxilo terminal es una homoserina lactona (Conn *et al.*, 1987).



La mezcla que se indica a continuación fue incubada durante 20 h a temperatura ambiente y posteriormente diluida con un volumen de agua y liofilizada (Gross & Witkop, 1962).

enzima inhibida carboximetilada	1 mg
ácido fórmico al 70%	200 μ l
CNBr	5 mg

3.21.1.2.4. Purificación de los Péptidos Obtenidos

Los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática o ruptura química fueron purificados por cromatografía de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC). El sistema cromatográfico utilizado (System Gold, Beckman) está compuesto por 2 bombas (Beckman, mod. 126) comandadas eléctricamente por un microprocesador (Altex, mod. 420), una cámara de mezclado, un inyector de capacidad variable, un detector con arreglo de diodos (Beckman, modelo 168) y un registrador Perkin Elmer (mod. 561). Se utilizaron columnas RP-C₈ (Acquapore, Brownlee) de 4,6 x 250 mm (tamaño de partícula: 7 μ m; tamaño de poro: 0,03 μ m). Algunas fracciones fueron ulteriormente purificadas empleando una columna macro porosa C₁₈ (Supelco RP-100) de 4,6 x 150 mm (tamaño de partícula: 3 μ m; tamaño de poro: 0,01 μ m).

Sistema de solventes utilizados		
Sistema I	solvente A	ácido trifluoroacético-agua (1:500)
	solvente B	acetonitrilo-ácido trifluoroacético-agua (350:1:150)
Sistema II	solvente A	ácido trifluoroacético-agua (1:500)
	solvente B	acetonitrilo-ácido trifluoroacético- isopropanol (20:1:5)

El sistema de solventes a emplear fue elegido según la hidrofobicidad de los péptidos a ser eluidos, empleándose el sistema I para eluir los péptidos más hidrofílicos y el sistema II para los más hidrofóbicos. Las corridas se iniciaron en todos los casos a partir una mezcla conteniendo 99% de solvente A y 1% de solvente B e incrementando generalmente la proporción de solvente B hasta un máximo del 70% en un lapso de 60 min, seguido de una etapa en la que la proporción de solvente B se incrementa hasta el

95% en un lapso de 10 min, que permite separar los péptidos de mayor grado de hidrofobicidad. La velocidad de elución fue de 0,8 a 1 ml.min⁻¹, de acuerdo al tipo de columna utilizada. La detección de los péptidos fue realizada simultáneamente a 220 nm (unión peptídica) y a 280 nm (aminoácidos aromáticos). Las fracciones eluidas fueron recogidas y posteriormente liofilizadas.

3.21.1.2.5. Secuenciamiento de los Péptidos Obtenidos

Las fracciones liofilizadas fueron redisueltas en una mezcla de ácido trifluoroacético al 0,1% y acetonitrilo al 25-50%, dependiendo de la hidrofobicidad de las mismas. De acuerdo a la concentración del péptido eluido, se depositaron entre 10 y 50 µl de muestra (0,5 a 1 nmol) sobre una membrana de PVDF (un disco de 4 mm de diámetro) previamente embebida en metanol, que se encuentra sobre una plataforma a una temperatura de 55 °C (la siembra se realiza antes que se evapore totalmente el metanol). Al finalizar la siembra se agregaron 2,5 µl de sequa-brene (polybrene, polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundecametileno, Sigma), con el objeto de aumentar la retención de los péptidos durante los sucesivos ciclos de secuenciamiento. Posteriormente el disco fue colocado en la cámara de reacción del secuenciador.

3.21.1.3. Determinación del Carácter Glicoproteico

Dado que muchas fitoproteasas son de naturaleza glicoproteica, se efectuó una electrotransferencia de la principal fracción purificada desde un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) hacia una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, 0,45 µm), sobre la cual se efectuó una reacción específica para determinar la presencia de glicoproteínas. La técnica utilizada está basada en la capacidad de la Concanavalina A (Con A) de unirse a los residuos de α-D-manopiranosilo y α-D-glucopiranosilo que puedan estar presentes en una proteína glicosilada. La Con A unida a la glicoproteína puede asociarse a su vez a la peroxidasa, que es también una glicoproteína. El complejo glicoproteína-Con A-peroxidasa así formado unido a la membrana de nitrocelulosa puede ponerse en evidencia al reaccionar la peroxidasa con un cromógeno (4-cloro-1-naftol), que en presencia de agua oxigenada toma color azul (Hawkes, 1982).

Luego de la electrotransferencia se sumergió la membrana de nitrocelulosa en una solución saturada de albúmina sérica (Sigma) al 2-3% en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM de pH 7,5 que contiene NaCl 150 mM) durante 1 h con el objeto de saturar la superficie adsorbente presente todavía sobre la membrana. La membrana así tratada se incubó a continuación en una solución de Con A (Sigma) en TBS (50 μ g/ml) durante 30 min. Seguidamente se efectuaron 3 lavados sucesivos con TBS de 5 min cada uno y luego se incubó la membrana con una solución de peroxidasa (Sigma, 50 μ g/ml) durante 30 min, seguido de 3 lavados sucesivos con TBS de 5 min cada uno. Finalmente la membrana se sumergió durante 1-2 min en la solución cromógena indicada a continuación.

4-cloro-1-naftol (Merck)	15 mg
Metanol (Merck)	500 μ l
TBS	25 ml
<i>Filtrar y adicionar</i>	
Agua oxigenada 30%	5 μ l

4. Resultados y Discusión

4.1. Obtención y Purificación Parcial del Extracto Crudo

Los frutos de *Pseudananas macrodentes* destinados a la extracción de proteasas se seleccionaron en función del grado de madurez alcanzado (frutos bien desarrollados pero no totalmente maduros) y pesaron en promedio entre 350 y 400 g (peso fresco). Los extractos crudos obtenidos contuvieron alrededor de 0,02% de proteínas ($0,98 \pm 0,08$ mg/g de peso fresco de frutos) y casi un 0,2% de azúcares solubles ($9,83 \pm 1,03$ mg/g de peso fresco de frutos). La actividad proteolítica de los extractos fue de $10,7 \pm 1,9$ U_{CAS} por gramo de frutos.

En razón del elevado contenido de azúcares (diez veces superior a la cantidad de proteínas presentes), así como a la presencia de pigmentos y otros compuestos hidrosolubles de naturaleza fenólica, el extracto crudo fue sometido a una purificación inicial mediante precipitación acetónica fraccionada. Los azúcares incrementan la viscosidad de la solución, hecho que dificulta la purificación cromatográfica de las enzimas. Por su parte, la presencia de compuestos fenólicos perjudica el aislamiento de enzimas activas a partir de tejidos vegetales por técnicas convencionales. Los fenoles se combinan con las proteínas reversiblemente por puentes de hidrógeno e irreversiblemente por oxidación seguida de condensaciones covalentes, con pérdida de la actividad enzimática (Loomis & Battaile, 1966). El agregado de EDTA y cisteína al buffer de extracción (*cf.* 3.2.) impide que los fenoles se oxiden a quinonas, que son las responsables de la formación de uniones covalentes irreversibles con las enzimas, preservando su actividad.

El tratamiento del extracto crudo con acetona permite tanto la eliminación de los azúcares solubles como de los compuestos fenólicos, proveyendo un extracto parcialmente purificado que puede ser directamente aplicado en procesos industriales y que además constituye el punto de partida del proceso de purificación cromatográfico.

La Tabla 4.1 muestra los resultados del tratamiento del extracto crudo con distintos volúmenes de acetona.

Muestra	Glúcidos		Proteínas		Actividad		Actividad específica
	mg/ml	%	µg/ml	%	U _{cas} /ml	%	
Extracto crudo	1,97	100,0	196,0	100,0	2,140	100,0	10,92
P-1	0,35	17,8	68,2	34,9	0,083	3,9	1,22
P-2	0,14	6,8	20,2	10,3	0,865	40,4	42,82
P-3	0,01	0,6	31,8	16,2	0,606	28,3	19,06
P-2 + P-3	0,15	7,4	52,0	26,5	1,471	68,7	28,29

Tabla 4.1. Resultados de la precipitación acetónica fraccionada del extracto crudo

El agregado de un volumen de solvente orgánico dio lugar a la formación de un precipitado (P-1) conteniendo el 34,9 % de las proteínas presentes en el extracto crudo, pero casi desprovistas de actividad proteolítica (3,9 % de la actividad inicial) y un 17,8 % de glúcidos solubles. La adición de un nuevo volumen de acetona al sobrenadante obtenido al separar P-1 produce un segundo precipitado (P-2), menos rico en proteínas (10,3 %) pero con elevada actividad proteolítica (40,4 % de la actividad inicial) y con menor contenido de glúcidos (6,8 %). Al agregar un tercer volumen de acetona al sobrenadante obtenido luego de separar P-2 se generó un nuevo precipitado (P-3) con mayor contenido en proteínas que el anterior (16,2 %), con importante actividad proteolítica (28,3 % de la actividad inicial) e ínfimo contenido de azúcares (0,6 %).

El análisis de estos resultados definió el esquema inicial de purificación. El primer precipitado (P-1) contiene más de la tercera parte de las proteínas presentes en el extracto crudo pero su actividad caseinolítica es despreciable, por lo que el mismo fue desechado. El segundo precipitado (P-2) es el que posee la mayor actividad específica, en tanto que el tercero (P-3), si bien con menor actividad específica, retuvo más de la cuarta parte de la actividad del extracto crudo. En consecuencia, se descartó el precipitado obtenido al agregar un volumen de acetona y al sobrenadante obtenido se le incorporaron dos volúmenes adicionales de acetona, con lo que se obtuvo un precipitado equivalente a P-2 + P-3 (26,5 % de proteínas y 68,7 % de la actividad iniciales), correspondiendo a un grado de purificación de 2,6 veces. A esta preparación parcialmente purificada se la denominó *macrodontaina*.

4.2. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica

El perfil de pH de la enzima parcialmente purificada se muestra en la figura 4.1, donde puede comprobarse que la preparación es activa en un amplio rango de pH, con un máximo cercano a 9. Se observan valores superiores al 75% de la actividad máxima entre pH 7,0 y 10,5, propiedad que hace a la macrodontaína especialmente valiosa en procesos llevados a cabo en medio neutro a alcalino.

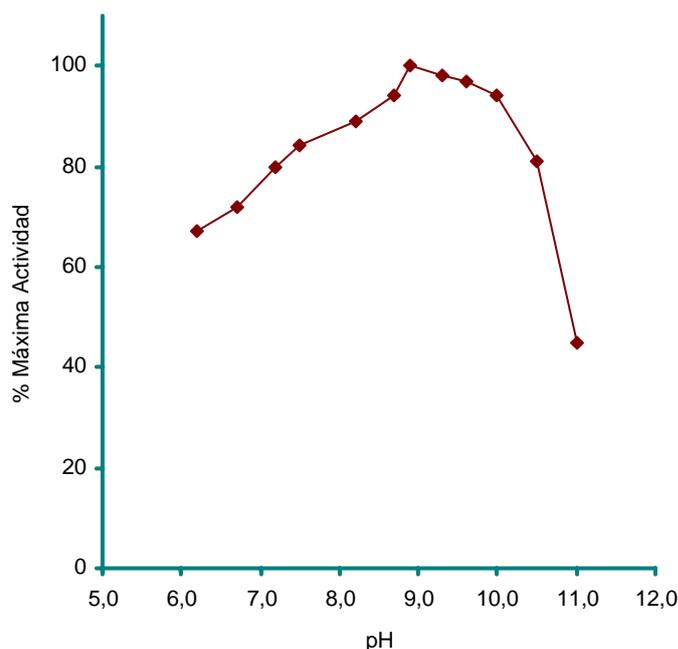


Figura 4.1. *Efecto del pH sobre la actividad de macrodontaína*. La actividad sobre caseína a pH 8,9 fue tomada como 100%. Los datos resultan de promediar tres ensayos independientes (n = 5).

4.3. Efecto de Inhibidores sobre la Actividad Enzimática

En la Figura 4.2 se muestran los resultados de la acción de inhibidores específicos de grupo sobre macrodontaína. Los datos numéricos se incluyen en la Tabla 4.2.

El efecto de pepstatina, PMSF y 1,10-fenantrolina (inhibidores específicos de peptidasas aspárticas, serínicas y metalopeptidasas) sobre la actividad proteolítica resultó prácticamente nula. Por el contrario, tanto el E-64 como el ácido iodoacético y el cloruro mercúrico produjeron la inhibición prácticamente total de la actividad caseinolítica, aportando una clara evidencia de que la preparación enzimática parcialmente purificada

contiene una o más endopeptidasas cisteínicas, tal como ocurre con todas las proteasas de otras especies de *Bromeliaceae* (cfr. 1.7) aisladas hasta la fecha.

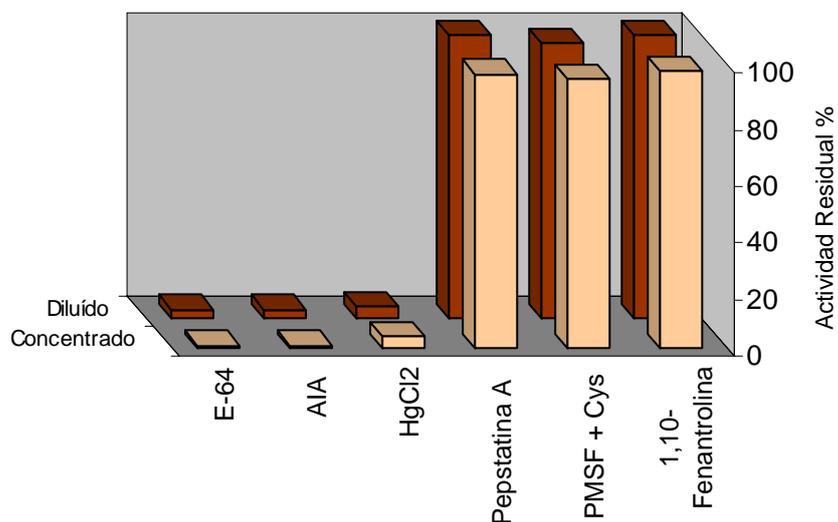


Figura 4.2. Efecto de inhibidores sobre la actividad proteolítica de macrodontaína.

Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

Inhibidor	Concentración	Actividad residual (%)
E-64	1 µM	3 ± 1
	10 µM	1 ± 1
Ácido iodoacético	10 µM	3 ± 1
	100 µM	1 ± 1
Cloruro mercúrico	0,1 mM	4 ± 2
	1 mM	4 ± 1
Pepstatina A	1 µM	97 ± 2
	10 µM	100 ± 1
PMSF	0,1 mM	95 ± 3
	1 mM	97 ± 3
1-10 Fenantrolina	1 mM	98 ± 3
	10 mM	100 ± 2

Tabla 4.2. Acción de inhibidores sobre la actividad de macrodontaína

4.4. Efecto del Agregado de Cisteína al Medio de Reacción

Para poder manifestar plenamente la actividad enzimática, las peptidasas cisteínicas requieren de la presencia de un medio reductor tal como el que proporciona la presencia de cisteína.

En la Figura 4.3 puede observarse el efecto de la presencia de cisteína en el medio de reacción. La actividad caseinolítica de la enzima es máxima cuando la concentración de cisteína es 12,5 mM, hecho que reafirma la naturaleza cisteínica de la preparación enzimática en ensayo.

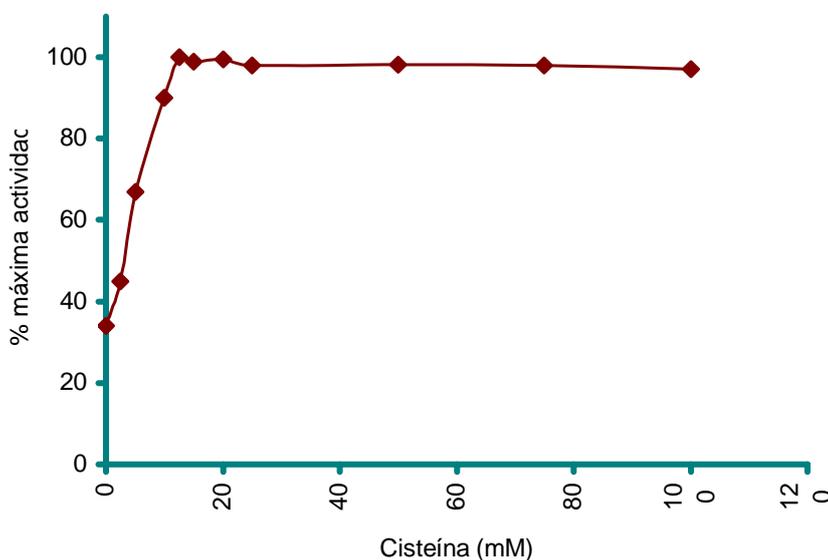


Figura 4.3. Efecto del agregado de cisteína sobre la actividad proteolítica de *macrodontaina*. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

4.5. Efecto del Congelamiento y de la Liofilización sobre la Actividad Proteolítica

El mantenimiento prolongado de las preparaciones crudas a bajas temperaturas (-20 °C) produce una ligera pérdida de actividad caseinolítica (fig. 4.4), efecto que se va incrementando con el tiempo, reduciéndose a un 92% de la actividad inicial luego de permanecer almacenada durante 6 meses en dichas condiciones.

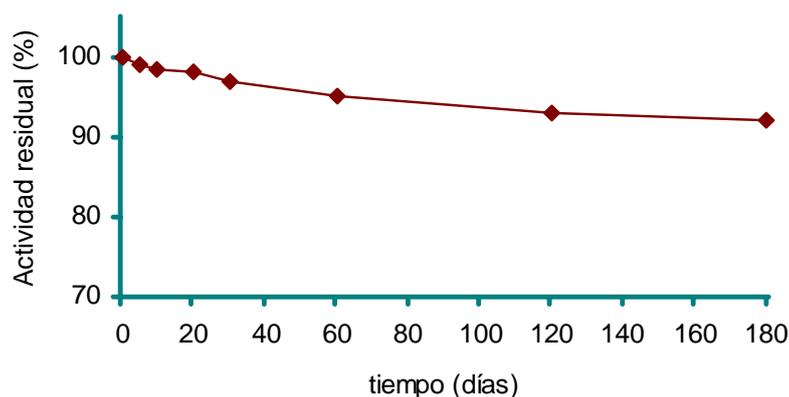


Figura 4.4. *Efecto de la baja temperatura (-20°C) sobre la actividad proteolítica de las preparaciones crudas.* Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

Como ocurrió con otras proteasas vegetales estudiadas en nuestro laboratorio (Priolo *et al.*, 1991), la liofilización resultó ser un procedimiento adecuado para conservar preparaciones crudas, ya que la pérdida de la actividad enzimática luego de redisueltas es mínima ($3 \pm 0,4\%$, luego de 24 meses de almacenamiento).

4.6. Estabilidad en el Rango de pH de Mayor Actividad Proteolítica

Macrodonataína es notablemente estable en el rango de pH de máxima actividad. El menor valor de actividad residual se registra a los valores de pH más alcalinos, no superando el 10% de pérdida luego de 2 h a pH 10 (Figura 4.5)

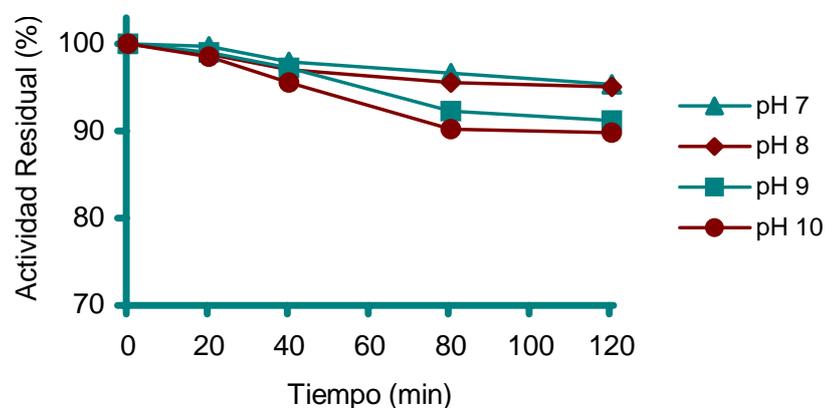


Figura 4.5. *Efecto del pH sobre la actividad residual de macrodonataína.* Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

4.7. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica

El efecto de la presencia de sales sobre la actividad de la preparación enzimática parcialmente purificada se muestra en la Figura 4.6, donde se puede comprobar que la enzima retiene un 90% de la actividad máxima cuando la concentración de cloruro de sodio es 0,4 M y que aún a concentraciones en las que muchas proteasas resultan inactivadas la preparación continúa exhibiendo una actividad muy elevada (85% y 75% de actividad residual cuando la concentración de cloruro de sodio es 0,75 y 1 M, respectivamente).

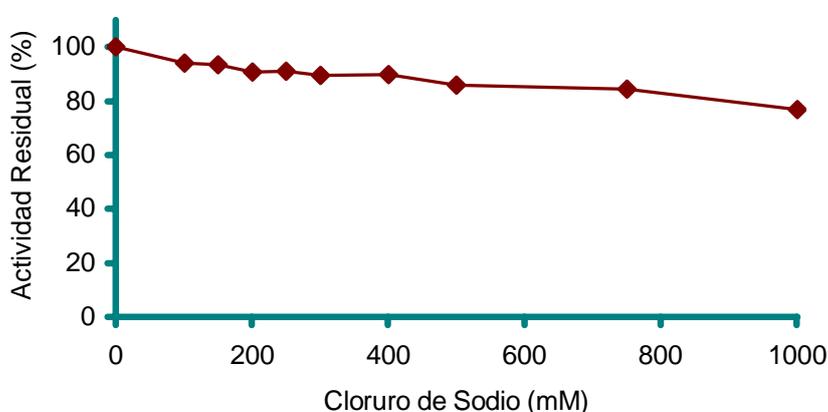


Figura 4.6. *Efecto de la fuerza iónica sobre la actividad residual de macrodontaina*. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes ($n = 5$).

4.8. Estabilidad Térmica

Como puede verse en la figura 4.7, no se observaron pérdidas de actividad cuando macrodontaina fue incubada a 20 °C durante 2 h, en tanto que a 45 °C la actividad residual se redujo al 50% al cabo de ese tiempo.

La enzima fue completamente inactivada por calentamiento a 75 °C durante 10 min. La inestabilidad térmica de esta preparación puede resultar útil en el caso de su uso en procesos industriales, ya que podría ser fácilmente inactivada una vez alcanzado el resultado deseado, un aspecto de especial importancia en el caso de la industria alimentaria.

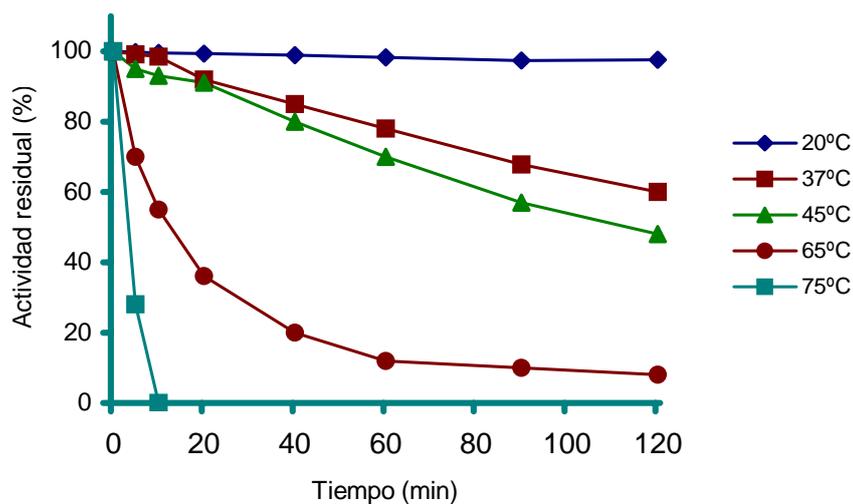


Figura 4.7. *Estabilidad térmica de macrodontaina*. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

4.9. Hidrólisis de Proteínas de Soja

La elección de este sustrato proteico obedeció al deseo de conocer el comportamiento de macrodontaina sobre proteínas de baja solubilidad, en comparación con el de una proteasa comercial de origen microbiano (alcalasa), para lo cual se monitoreó el grado de hidrólisis y el perfil electroforético de los péptidos obtenidos en el curso de la hidrólisis.

La hidrólisis parcial de las proteínas de soja de baja solubilidad conduce a la modificación de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, facilitando su incorporación a distintos tipos de productos alimenticios. Dada la importancia que tiene en nuestro país la producción de soja y el bajo aprovechamiento industrial que se hace de la misma, se consideró importante disponer de nuevas preparaciones enzimáticas que puedan ser utilizadas para obtener productos de mayor valor agregado.

4.9.1. Concentrado de Soja

La harina de soja desgrasada empleada para la preparación del concentrado contenía 54% de proteínas y 17% de azúcares solubles. Por su parte el concentrado de

soja utilizado en los ensayos de hidrólisis resultó más rico en proteínas (70%), con un bajo tenor de azúcares solubles (1%).

El procedimiento empleado para preparar el concentrado de soja (cfr. 3.6.1.3) permitió una excelente recuperación de las proteínas de la harina (99%), con la concomitante eliminación de la mayoría de los azúcares solubles (94%); fue seleccionado porque produce proteínas con baja solubilidad (< 15%), similares a las que se producen en algunos tratamientos industriales como consecuencia de la desnaturalización de las mismas.

4.9.2. Grado de Hidrólisis

Los valores del grado de hidrólisis (DH) obtenidos se muestran en la Figura 4.8, donde los mismos son comparados con los que exhibe una proteasa comercial bacteriana (alcalasa). La hidrólisis de concentrados de soja con alcalasa transcurrió a una velocidad elevada durante los 10 min iniciales y más lentamente a partir de entonces. La curva de progreso de reacción obtenida con macrodontaína mostró un perfil casi idéntico pero considerablemente más bajo. Después de 5 min de incubación los valores de DH obtenidos con macrodontaína fueron del orden del 38% de los obtenidos con alcalasa, valor que se mantiene prácticamente inalterado (40,9%, 39,0% y 38,5% al cabo de 1h, 2h y 3h, respectivamente).

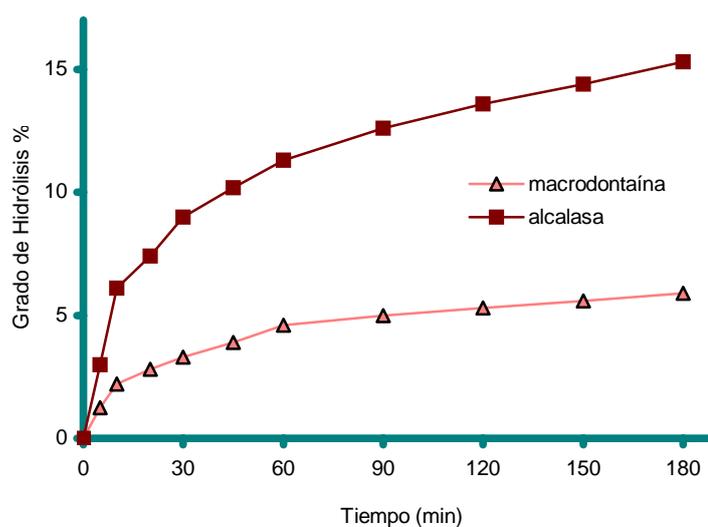


Figura 4.8. *Grado de hidrólisis de macrodontaína sobre concentrados de soja. Comparación con alcalasa (proteasa microbiana comercial).*

Después de 180 min de incubación los valores de DH finales difieren significativamente, alcanzando el 15 % para alcalasa y el 5,9% para macrodontaína. Corresponde señalar que la primera es una proteasa serínica, en tanto que macrodontaína es cisteínica.

4.9.3. Perfil Electroforético de los Hidrolizados

El perfil peptídico de los hidrolizados de soja obtenidos con alcalasa y macrodontaína se muestran en la Figura 4.9. A los 2 min de incubación macrodontaína produjo una degradación parcial de las subunidades α' , α y β (provenientes de la fracción 7S), así como de los polipéptidos A y B (provenientes de la fracción 11S), en tanto que alcalasa hidrolizó completamente las primeras y casi completamente los segundos.

Después de 180 min de incubación con macrodontaína, las bandas α' y α desaparecieron completamente. Sin embargo la subunidad β , que había sido parcialmente hidrolizada en los primeros instantes, permanece luego prácticamente inalterada a lo largo de las tres horas de incubación, comportamiento claramente diferencial con respecto a alcalasa.

El polipéptido A es degradado totalmente en el hidrolizado de macrodontaína ya a partir de los 5 min, aunque con menor velocidad que en alcalasa. En cuanto al polipéptido B, que es degradado progresivamente en alcalasa hasta que finalmente no resulta detectable a los 180 min, en macrodontaína sufre una rápida degradación inicial pero luego de los 30 min iniciales su concentración permanece prácticamente constante. En ambos casos se produjeron polipéptidos menores de 20 kDa. A diferencia de alcalasa, se pudo observar una tenue banda de alrededor de 60 kDa en el hidrolizado de macrodontaína, probablemente proveniente de la degradación de las subunidades α' o α de la fracción 7S.

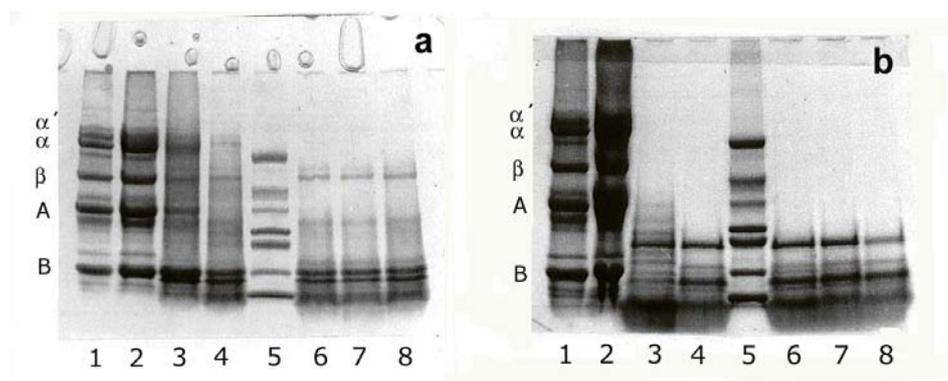


Figura 4.9. *SDS-PAGE de hidrolizados enzimáticos de concentrados de soja.* a) macrodontaína, b) alcalasa. Calle 1: concentrado de soja (7 µl); calle 2: concentrado de soja (15 µl); calle 3: 2 min (15 µl); calle 4: 5 min (15 µl); calle 5: marcadores de peso molecular (SDS-7 Sigma MLW); calle 6: 30 min (15 µl); calle 7: 60 min (15 µl); calle 8: 180 min (15 µl). Los polipéptidos α' , α y β derivan de la proteína 7S, mientras que los polipéptidos A y B provienen de la fracción 11S.

4.10. Estrategia de Purificación Cromatográfica

Casi sin excepción, los extractos vegetales a partir de los cuales se han aislado endopeptidasas cisteínicas contienen más de una entidad molecular de esa naturaleza y dentro del rango de 20 a 30 kDa, por lo que las técnicas de exclusión molecular o de afinidad suelen no ser adecuadas para purificarlas. En estos casos las técnicas cromatográficas basadas en la carga eléctrica de las proteínas, tales como el intercambio iónico y el cromatofoco resultan más apropiadas, para lo cual es necesario conocer previamente el punto isoeléctrico de las especies proteicas presentes en el extractivo y determinar cuáles de ellas son proteolíticamente activas.

4.10.1. Isoelectroenfoque y Zimograma de Macrodontaína

Como puede verse en la Figura 4.10, macrodontaína demostró contener cinco componentes proteicos principales en el rango de $pI = 9,0 - 5,7$, de los cuales solamente dos presentaron actividad proteolítica al incubar el isoelectroenfoque sobre geles de

agarosa embebidos en caseína, correspondiendo a los polipéptidos que enfocaron a pI cercano a 6.

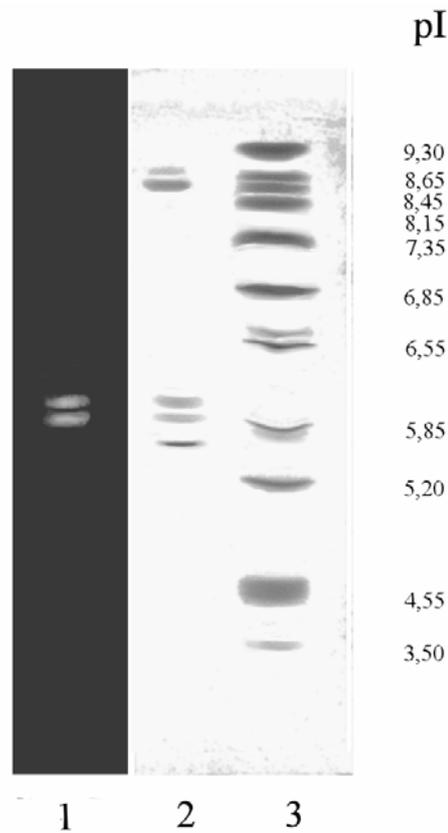


Figura 4.10. *Isoelectroenfoque y zimograma de macrodontaína*. Calle 1, zimograma; calle 2, macrodontaína; calle 3, marcadores de pI: tripsinógeno (pI = 9,30), lectinas de *Lens culinaris* (pI = 8,65, 8,45 y 8,15); mioglobina (pI = 7,35 y 6,85); anhidrasa carbónica I (pI = 6,55); anhidrasa carbónica II (pI = 5,85); β -lactoglobulina a (pI = 5,20); inhibidor de tripsina (pI = 4,55); amiloglucosidasa (pI = 3,50).

En razón de los valores de pI tan cercanos de los componentes activos, se decidió recurrir al cromatoenfoque como primera etapa de purificación cromatográfica.

4.10.2. Cromatoenfoque

En la Figura 4.11 se muestra la separación cromatográfica de macrodontaína por aplicación de cromatoenfoque utilizando un buffer de elución en el rango de pH 7,0 a 4,5.

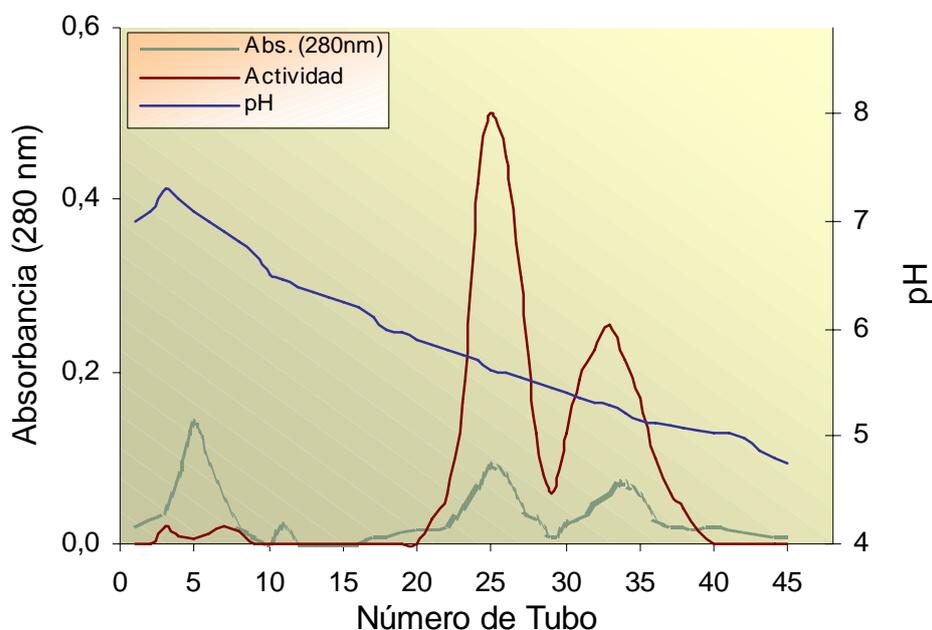


Figura 4.11. *Cromatoenfoque*. La preparación enzimática parcialmente purificada fue sembrada en una columna rellena con PBE94 (Pharmacia). El cromatoenfoque se desarrolló mediante el agregado de Polybuffer 74-HCl (Pharmacia) ajustado a pH 4,5, a una velocidad de flujo de 0,5 ml.min⁻¹, recogiendo fracciones de 1,5 ml.

Al iniciarse el gradiente de pH eluyen las proteínas de mayor pI no activas o con actividad despreciable. En el rango de pH 5,85 - 5,45 eluye la fracción de pI mayor (macrodongtaína I) y en el rango de pH 5,45 - 5,10 eluye la fracción de pI menor (macrodongtaína II); al descender el pH eluye la última fracción no activa. El rendimiento de macrodongtaína I y II fue de 17,9 % y 13,7 %, respectivamente.

4.10.3. Cromatografía de Intercambio Iónico

Aun cuando la resolución obtenida por cromatoenfoque es muy buena, dada la cercanía de los valores de pI de las dos fracciones activas, este método de purificación resulta muy costoso, aún a escala de laboratorio. Un problema adicional lo representa la

necesidad de remoción de los anfolitos que eluyen junto con las fracciones activas, dado que su presencia genera inconvenientes cuando las muestras deben ser sometidas a secuenciamiento o a isoelectroenfoque.

Por estas razones se recurrió a la cromatografía de intercambio iónico, tratando de optimizar la capacidad de resolución de la técnica por medio del manejo simultáneo de las dos principales variables: el pH de corrida y el rango del gradiente salino. Las Figuras 4.12 a 4.15 ejemplifican algunas de las etapas del proceso.

Finalmente, un gradiente salino muy estrecho (0,05 –0,10 M de cloruro de sodio) a pH 8,0 permitió una separación tan buena como la obtenida por cromatoenfoque (Figura 4.15).

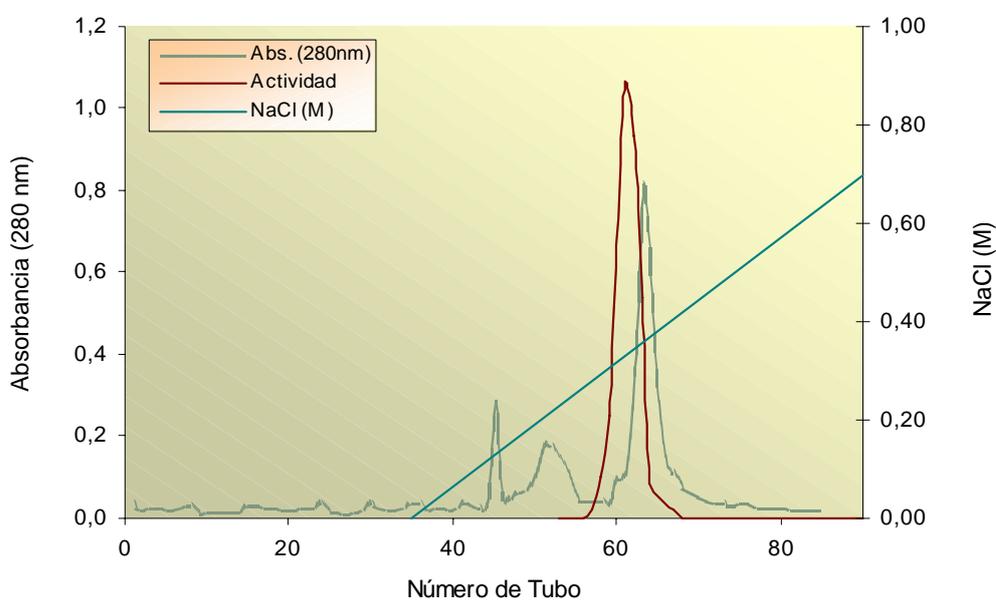


Figura 4.12. *Cromatografía de intercambio aniónico*. DEAE-Sepharose Fast Flow, pH 9,5, gradiente de cloruro de sodio 0,00-0,70M.

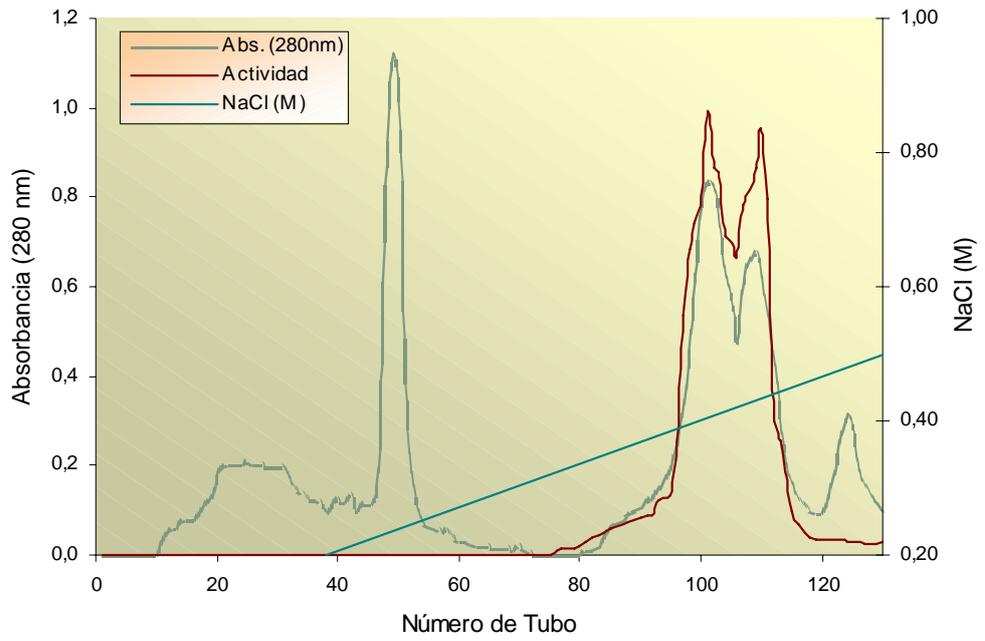


Figura 4.13. *Cromatografía de intercambio aniónico*. DEAE-Sepharose Fast Flow, pH 8,5, gradiente de cloruro de sodio 0,20-0,50M.

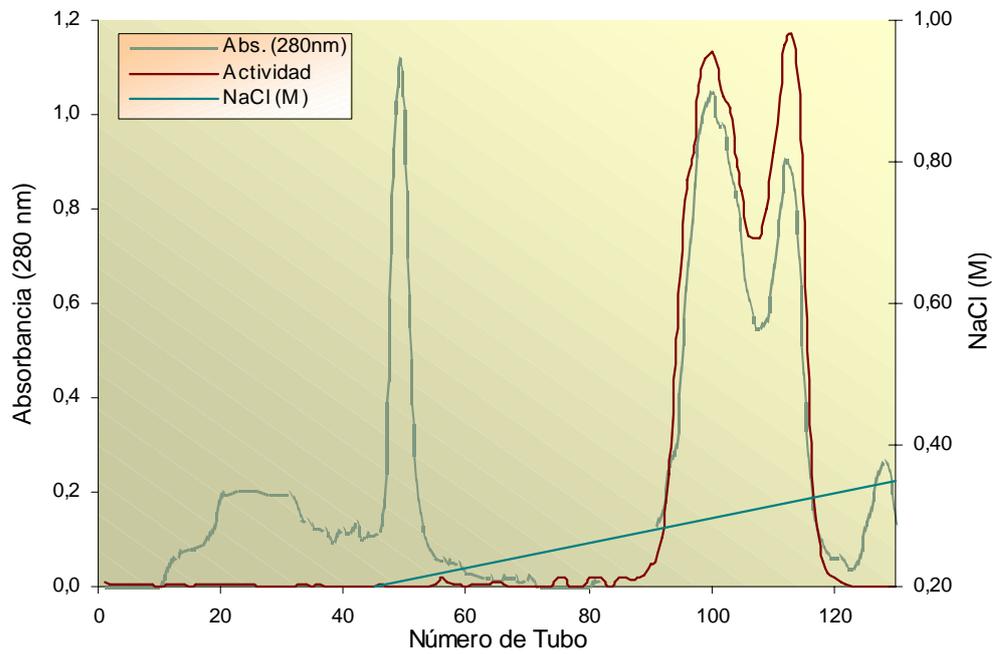


Figura 4.14. *Cromatografía de intercambio aniónico*. DEAE-Sepharose Fast Flow, pH 8,5, gradiente de cloruro de sodio 0,20-0,35M.

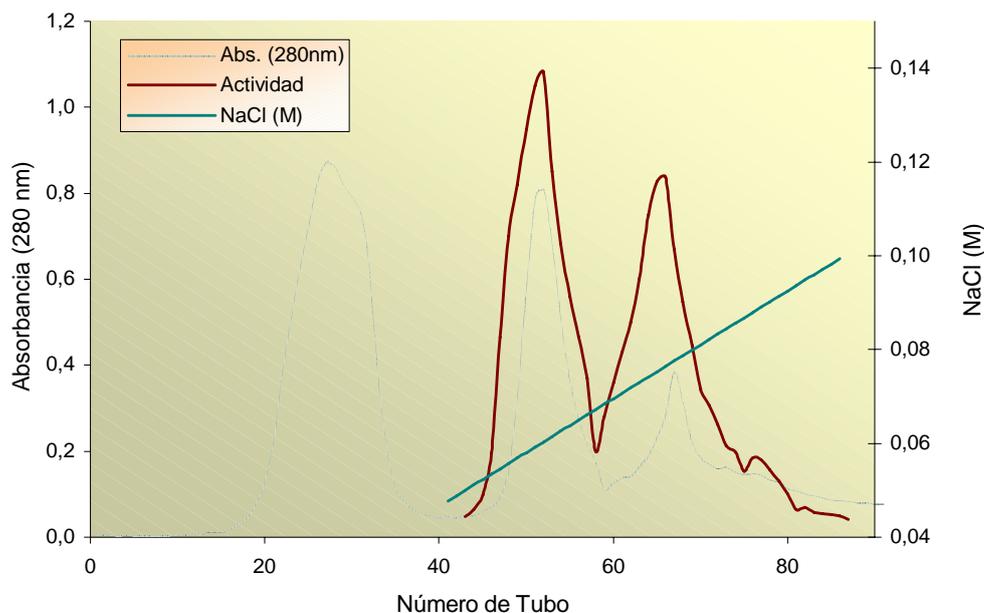


Figura 4.15. *Cromatografía de intercambio aniónico*. DEAE-Sepharose Fast Flow, pH 8,0, gradiente de cloruro de sodio 0,05-0,10 M.

El esquema de purificación presentado en la Tabla 4.3 resume los resultados del proceso. Macrodonatína, la preparación parcialmente purificada obtenida de frutos de *Pseudananas macrodontes*, retiene el 74% de la actividad del extracto crudo, contenida en poco más de la mitad de las proteínas iniciales, hecho que explica el bajo grado de purificación alcanzado (1,4 veces). Lo propio ocurre cuando macrodonatína se somete a cromatografía de intercambio iónico, donde la recuperación de las proteínas activas (macrodonatína I y II) asciende a 19,7% y 12,0% del total presente en el extracto crudo, con grados de purificación también bajos (2,0 y 2,9, respectivamente). Los bajos factores de purificación alcanzados constituyen un hecho habitual en órganos vegetales con elevada actividad proteolítica, donde las proteasas son las proteínas mayoritarias. Los resultados también muestran que macrodonatína II, aún cuando presente en menor cantidad, posee mayor actividad caseinolítica específica que macrodonatína I.

El protocolo cromatográfico adoptado es más sencillo que el usado por Rowan & Buttle (1994) en la purificación de la proteasas del ananá y permitió una eficiente separación de las dos principales fracciones activas presentes en macrodonatína, recuperándose el 42,8% de la actividad aplicada a la columna.

Etapa	Actividad (Ucas)	Proteínas (mg)	Actividad Específica (Ucas/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto Crudo	384,8	84,2	4,6	1,0	100,0
Macrodonatáina	284,8	43,2	6,6	1,4	74,0
Macrodonatáina I	75,7	8,2	9,3	2,0	19,7
Macrodonatáina II	46,0	3,5	13,2	2,9	12,0

Tabla 4.3. *Esquema de purificación de las proteasas presentes en frutos de Pseudananas macrodentes*

4.10.4. Cromatografía de Exclusión Molecular

Macrodonatáina I y II fueron sometidas separadamente a cromatografía de exclusión molecular con el objeto de eliminar eventuales impurezas (“clean up”) y como paso previo a su caracterización.

De este modo, macrodonatáina I pudo ser separada de algunos polipéptidos de menor peso molecular sin actividad proteolítica (Figura 4.16, izquierda), en tanto que macrodonatáina II demostró contener un contaminante activo muy minoritario (Figura 4.16, derecha), también de menor peso molecular, que fue eliminado por éste método.

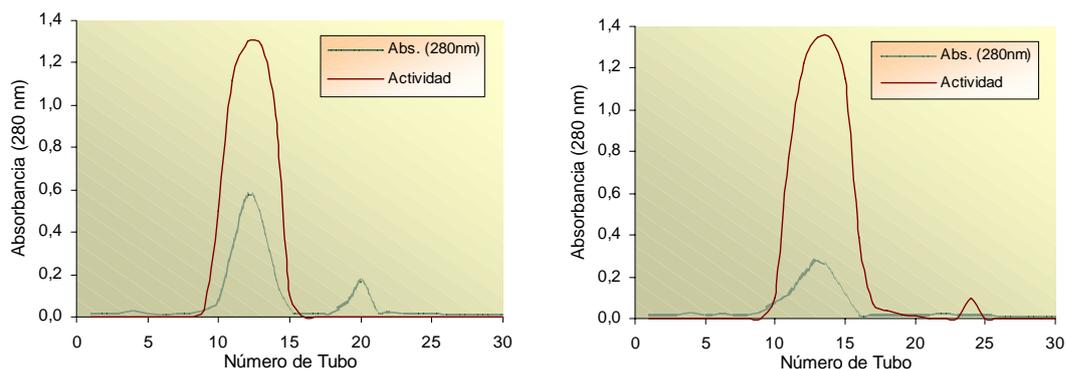


Figura 4.16. *Cromatografía de exclusión molecular (Sephadex G-75) de macrodonatáina I (izquierda) y macrodonatáina II (derecha).*

4.11. Caracterización de las Endopeptidasas Purificadas

4.11.1. SDS-PAGE

Con el propósito de confirmar la homogeneidad y determinar el peso molecular de las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular se realizó una electroforesis desnaturalizante y reductora en gradiente de poliacrilamida. A título comparativo se incluyó en el mismo gel el extracto crudo y la preparación parcialmente purificada (macrodonatína).

La Figura 4.18 permite comprobar que en el extracto crudo se hallan presentes cuatro fracciones bien definidas junto a una banda continua de péptidos de bajo peso molecular. En macrodonatína esta banda queda reducida a su mínima expresión. Las dos fracciones purificadas (macrodonatína I y II) aparecen homogéneas, con masas moleculares relativas de 25 kDa y 27 kDa, respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los consignados por Boller (1986) para otras proteasas de *Bromeliaceae* y algo mayores que los obtenidos al analizar las fracciones purificadas por cromatoenfoque, debido a que en aquel caso las muestras no fueron tratadas previamente con β -mercaptoetanol ni sometidas a ebullición, puesto que a continuación se realizó un zimograma para detectar la presencia de actividad proteolítica en las muestras.

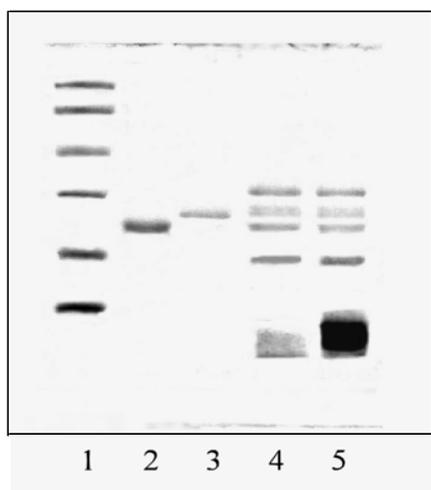


Figura 4.18. *Electroforesis en gradiente de poliacrilamida*. Calle 1, patrones de peso molecular (Bio-Rad): lisozima (14,4 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa) y fosforilasa b (97,4 kDa); calle 2, macrodonatína I; calle 3, macrodonatína II; calle 4, macrodonatína; calle 5, extracto crudo.

4.11.2. Isoelectroenfoque y Zimograma

Como segundo criterio de homogeneidad de las enzimas purificadas y para confirmar sus respectivos valores de pI, se efectuó un isoelectroenfoque seguido de zimograma de macrodontaína I y II (Figura 4.19).

Los valores de pI obtenidos fueron de 6,1 para macrodontaína I y de 5,9 para macrodontaína II, que son similares a los obtenidos para bromelaína de fruto (pI = 4,6, Yamada *et al*, 1976), aunque muy diferentes a los que exhiben las peptidasas presentes en tallo de ananá (bromelaína de tallo, ananaína y comosaína), que son muy alcalinos (Rowan & Buttle, 1994).

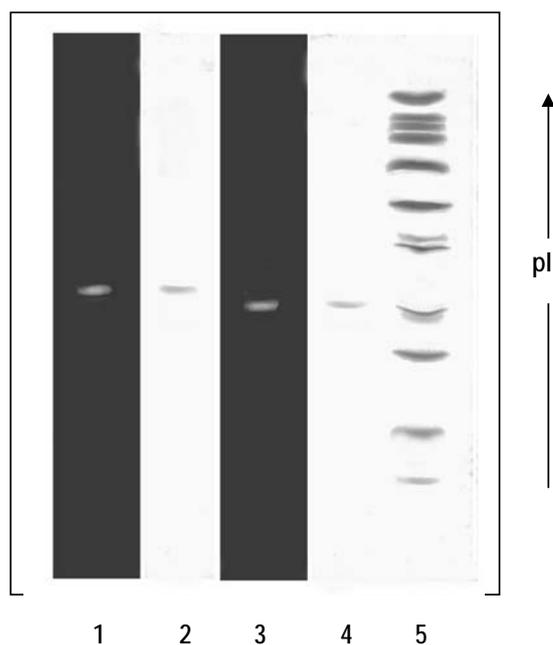


Figura 4.19. *Isoelectroenfoque y zimograma de macrodontaína I y II.* Calle 1, zimograma de macrodontaína I; calle 2, IEF de macrodontaína I; calle 3, zimograma de macrodontaína II; calle 4, IEF de macrodontaína II; calle 5, patrones de pI tripsinógeno (pI = 9,30), lectinas de *Lens culinaris* (pI = 8,65, 8,45 y 8,15); mioglobina (pI = 7,35 y 6,85); anhidrasa carbónica I (pI = 6,55); anhidrasa carbónica II (pI = 5,85); β -lactoglobulina a (pI = 5,20); inhibidor de tripsina (pI = 4,55); amiloglucosidasa (pI = 3,50).

4.11.3. Electroforesis Nativa y Zimograma

La electroforesis nativa seguida de zimograma (Figura 4.20) reveló que ambas enzimas aparecen como bandas únicas y que la movilidad electroforética de macrodontaína II fue ligeramente superior a la de macrodontaína I. El zimograma confirma la naturaleza proteolítica de ambas enzimas.

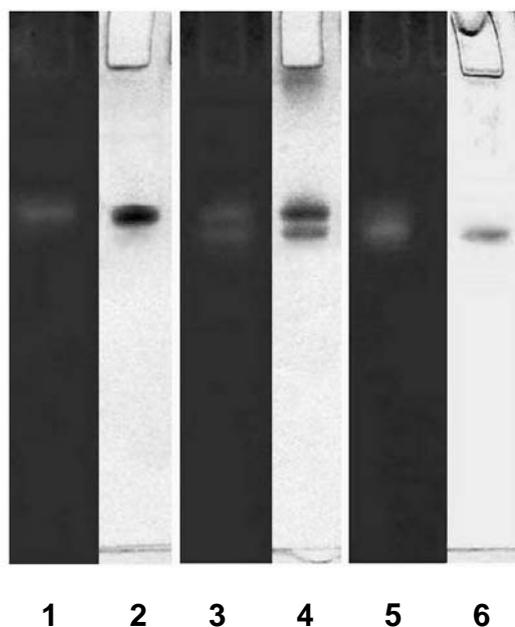


Figura 4.20. *Electroforesis nativa y zimograma de macrodontaína I y II.* Calles 1, 3 y 5, zimogramas de macrodontaína correspondientes a las calles 2, 4 y 6, respectivamente; calle 2, macrodontaína I; calle 4, macrodontaína; calle 6, macrodontaína II.

4.11.4. Electroforesis Bidimensional

Por su parte la electroforesis bidimensional (nativa-desnaturalizante) confirmó que ambas enzimas son de naturaleza monomérica (Figura 4.21), al igual que las otras proteasas de *Bromeliaceae* conocidas y como la mayoría de las endopeptidasas vegetales.

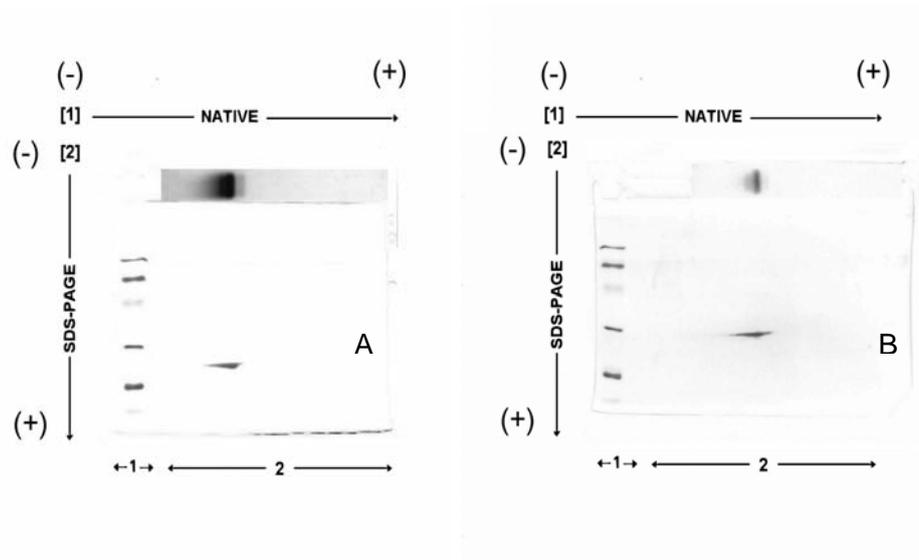


Figura 4.21. *Electroforesis bidimensional nativa-desnaturalizante de macrodontaína I y II.* Calle 1 (A y B), patrones de peso molecular (Bio-Rad): lisozima (14,4 kDa), inhibidor de tripsina de soja (21,5 kDa), anhidrasa carbónica bovina (31 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), seroalbúmina bovina (66,2 kDa) y fosforilasa b (97,4 kDa); calle 2 (A), macrodontaína I; calle 2 (B), macrodontaína II.

4.11.5. Perfil de pH

La Figura 4.22 muestra el perfil de pH de las enzimas purificadas. Macrodontaína I exhibió un rango de pH óptimo (más del 90% de la actividad máxima) entre pH 6,1 y 8,5, en tanto que en el caso de macrodontaína II el rango de pH óptimo fue más angosto (pH 7,5 – 8,5).

En este sentido el comportamiento es distinto al de la enzima parcialmente purificada (macrodontaína, *cf.* Figura 4.1), ya que en esta última el rango de pH óptimo está desplazado hacia la zona alcalina (pH 8,3 – 10,1), haciendo suponer una interacción de ambas proteasas entre sí o con otras sustancias presentes en la preparación enzimática.

Con la sola excepción de pingüinaína, la proteasa aislada de *Bromelia pinguin* L. (Toro Goyco *et al.*, 1968), cuyo pH óptimo es decididamente ácido (pH 3,8 – 4,3), la mayoría de las proteasas de *Bromeliaceae* muestran perfiles de pH con valores óptimos cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos (*cf.* 1.7).

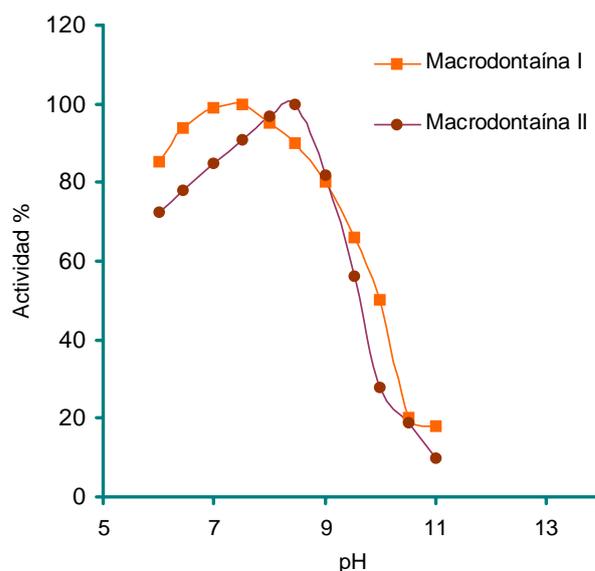


Figura 4.22. Efecto del pH sobre la actividad de macrodontaína I y II. La actividad sobre caseína a pH 7,5 y 8,45 fue tomada como 100% para macrodontaína I y II, respectivamente. Los datos resultan de promediar tres ensayos independientes ($n = 5$).

4.11.6. Actividad sobre Sustratos Sintéticos

La actividad de las proteasas purificadas sobre N- α -CBZ-*p*-nitrofenil ésteres de aminoácidos se muestra en la Figura 4.23. En ambos casos la mayor afinidad se manifiesta por el derivado de alanina, seguido por el de glutamina y tirosina, siendo los valores de actividad específica de macrodontaína I prácticamente el doble de los de macrodontaína II. Estos resultados guardan una notoria analogía con los obtenidos para balansaína I, la principal proteasa de *Bromelia balansae* Mez (Pardo *et al.*, 2000), donde la mayor actividad endoesterásica también se manifiesta con los derivados de alanina y glutamina, seguido por los de glicina, tirosina y leucina.

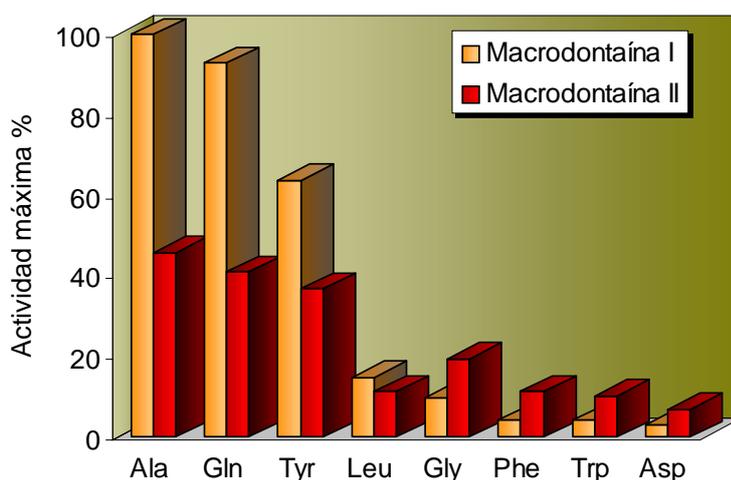


Figura 4.23. Actividad de macrodontaina I y II sobre *N- α -CBZ-p-nitrofenil derivados de aminoácidos*. Los datos representan el promedio de tres determinaciones y cada experiencia fue repetida dos veces.

4.11.7. Efecto de Inhibidores

Tal como ocurrió en el ensayo con la preparación parcialmente purificada (*cfr.* 4.3), el efecto de los inhibidores específicos de peptidasas aspárticas, serínicas y metalopeptidasas sobre la actividad proteolítica de macrodontaina I y II resultó prácticamente nula. Por el contrario, el ácido iodoacético y el cloruro mercúrico (inhibidores de proteasas cisteínicas) produjeron la inhibición prácticamente total de la actividad caseinolítica. El E-64, inhibidor específico del sitio activo (“active-site directed inhibitor”), exhibió un comportamiento diferencial frente a una y otra proteasa, ya que produjo inhibición prácticamente total en el caso de macrodontaina I, pero cuando se aplicó a macrodontaina II la preparación conservó un 15% de actividad residual (Figura 4.24), hecho que podría relacionarse con una diferente geometría del sitio activo, como sugieren Ritonja *et al.* (1989) para bromelaina de tallo.

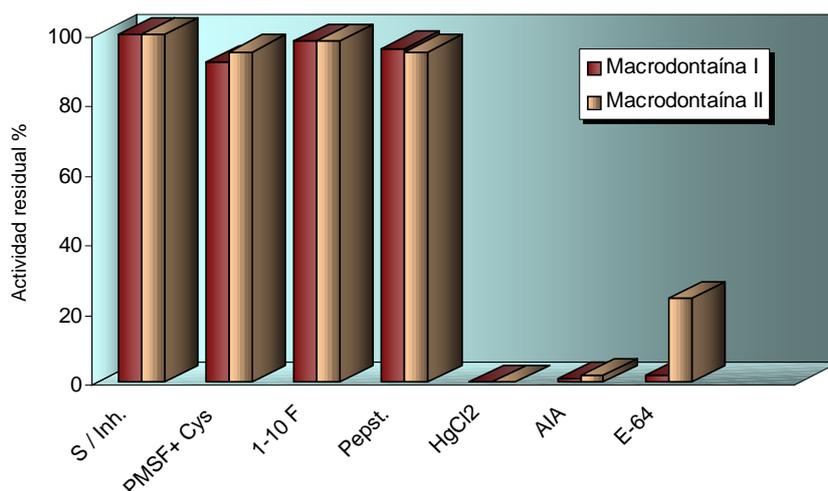


Figura 4.24. Efecto de inhibidores sobre la actividad de macrodontaína I y II. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes (n = 5).

4.11.8. Actividad sobre sustratos fluorogénicos

Dado que el sustrato benzoil-fenil-valil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Bz-Phe-Val-Arg-NHMec) fue utilizado para determinar las diferencias en la especificidad de algunas proteasas de *Bromeliaceae* (Rowan *et al.*, 1990), el mismo se usó para determinar las constantes de Michaelis de macrodontaína I y II, cuyos valores se muestran en la Tabla 4.4, conjuntamente con los de las proteasas citadas en el mencionado trabajo. No existen diferencias significativas entre las proteasas en estudio, observándose que el valor de Km de macrodontaína I es prácticamente idéntico al de ananaina y el de macrodontaína II es cercano al de bromelaína de tallo. Por su parte, ninguna de las dos enzimas resultó ser efectiva sobre el sustrato benzoiloxicarbonil-arginil-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Z-Arg-Arg-NHMec).

Enzima	Km (μ M)
macrodontaína I	13,4 \pm 0,8
macrodontaína II	8,9 \pm 1,2
bromelaína de tallo	9,7 \pm 1,5
bromelaína de fruto	4,0 \pm 0,9
ananaina	13,1 \pm 2,1
pingüinaína	2,7 \pm 0,3

Tabla 4.4. Comparación de los valores de Km sobre benzoil-fenil-valil-arginil-7-amido-4-metilcumarina para diferentes endopeptidasas de *Bromeliaceae*

4.11.9. Espectrometría de Masas

En la Figura 4.25 se exhiben los espectros de masa de macrodontaína I y II. Ambas enzimas aparecen totalmente homogéneas y presentan valores de masa molecular de 23.459 y 23.703, respectivamente, que son aceptablemente concordantes con los datos obtenidos previamente por SDS-PAGE (25 y 27 kDa, respectivamente).

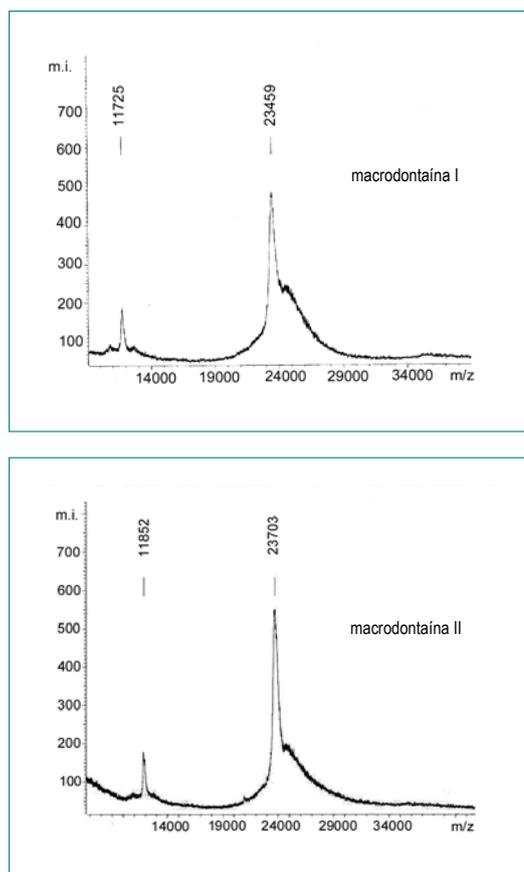


Figura 4.25. *Espectros de masas de macrodontaína I y II.*

Corresponde destacar la estrecha relación de los valores de las masas moleculares de ambas proteasas con las de otras endopeptidasas presentes en materiales taxonómicamente muy cercanos, como se muestra en la Tabla 4.5.

Enzima	Masa Molecular (daltons)	Referencia
macrodontáina I	23.459	
macrodontáina II	23.703	
bromelaína de tallo	22.831	Ritonja et al., 1989
bromelaína de fruto	23.363	Muta et al., 1997
ananaína	23.478	Lee et al., 1997
balansaína I	23.192	Pardo et al., 2001
hieronymaína I	24.066	Bruno et al., 2003

Tabla 4.5 Masas moleculares de proteasas de *Bromeliaceae*

4.11.10. Determinación de la secuencia del péptido N-terminal

Las secuencias N-terminales de macrodontaína I y II se muestran en la Tabla 4.6, comparadas con sesenta y seis proteasas de origen vegetal que exhiben más del 50% de identidad con ellas. La búsqueda de homologías se realizó en base al servicio BLAST (Altschul *et al.*, 1997) disponible en internet ¹.

Las secuencias de macrodontaína I y II revelan un 92,6% de identidad (aminoácidos iguales ubicados en posiciones equivalentes) entre sí. La homología es notoria con relación a las proteasas de *Bromeliaceae*, en especial con las de *Ananas comosus* ("ananá") y *Bromelia balansae* y en menor medida con las de *Bromelia hieronymi*. En el caso de bromelaína de fruto se evidencia un 100% de identidad con macrodontaína II y un 92,6% con macrodontaína I, siendo igualmente altas (72,6 – 88,9%) para las proteasas obtenidas de tallos de ananá (bromelaína de tallo, ananaína y comosaína). Las secuencias de los péptidos N-terminales de comosaína, balansaína I e hieronymaína I (20, 21 y 22 aminoácidos, respectivamente) son más cortas que las de macrodontaína I y II (27 aminoácidos), hecho que influye en el resultado obtenido, ya que la porción no comparada corresponde a la región que incluye la cisteína del sitio activo, que es altamente conservada.

Con respecto a la proteasa tipo del Clan CA y de la familia C1 (papaína), el grado de identidad no es demasiado elevado (59,3% para macrodontaína I y II), aunque es mayor en el caso de quimopapaína (70,4% y 66,7% para macrodontaína I y II, respectivamente), otra de las proteasas de *Carica papaya*.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>

Grado de Identidad de Secuencias N-terminales de proteasas de origen vegetal

Especie / proteasa	Secuencia N-terminal	Identidad (%)		Referencias
		M-I	M-II	
<i>Pseudananas macrodentes</i> (macrodentaina I)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQGPCGGCW	–	92.6	
<i>Pseudananas macrodentes</i> (macrodentaina II)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQNPCGSCW	92.6	–	
<i>Ananas comosus</i> (bromelaina de fruto)	AVPQSIDWRDYGAVNEVKNQNPCGSCW	92,6	100,0	Muta <i>et al.</i> , 1997
<i>Bromelia balansae</i> (balansaina I)	AVPESIDWRDYGAVTSVKNQG-----	85.7 ^a	81.0 ^a	Pardo <i>et al.</i> , 2000
<i>Ananas comosus</i> (comosaina)	VPQSIDWRNYGAVTSVKNQG-----	85.7 ^a	76.2 ^a	Napper <i>et al.</i> , 1994
<i>Ananas comosus</i> (bromelaina de tallo)	AVPQSIDWRDYGAVTSVKNQNPCGACW	85.2	88.9	Ritonja <i>et al.</i> , 1989
<i>Ananas comosus</i> (ananaina)	VPQSIDWRDSGAVTSVKNQGRGSCW	77.8	77.8	Lee <i>et al.</i> , 1997
<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	EVPRSIDWRVKGAVTPVKNQGRGCGCW	74,1	66,7	Firsthoefel <i>et al.</i> , 1998
<i>Carica papaya</i> (quimopapaina, papaya peptidasa II)	YPQSIDWRAKGAVTPVKNQGACGSCW	70.4	66.7	Watson <i>et al.</i> , 1990
<i>Pisum sativum</i>	VPSSIDWRKKGAVTDVKDQGQCGSCW	74,0	66,7	Cercos <i>et al.</i> , 1999
<i>Carica candamarcensis</i> (CC-III)	YPESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGSCW	66.7	66.7	Jaziri <i>et al.</i> , 1994
<i>Carica candamarcensis</i> (CC-IV)	YPESIDWRKKGAVTPVKNQGS CGSCW	66.7	66.7	Walreavens <i>et al.</i> , 1993
<i>Vicia sativa</i>	VPSSIDWRNKGAVTG VKDQGQCGSCW	66.7	66.7	Becker <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudotsuga mentziesii</i>	DLPESIDWREKGAVTAVKNQGS CGSCW	66.7	66.7	Tranbarger & Misra, 1996
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPESIDWRKKGAVAEVKDQG GCGSCW	66.7	66.7	Koizumi <i>et al.</i> , 1993
<i>Zingiber officinale</i>	VLPDSIDWREKGAVVPVKNQGGCGSCW	66,7	66,7	Choi & Laursen, 2000
<i>Bromelia hieronymi</i> (hieronymaina I)	ALPESIDWRAKGAVTEV KRQDG-----	63,6 ^a	63,6 ^a	Bruno <i>et al.</i> , 2003

<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPEDFDWRDHGAVTPVKNQGSCGSCW	63,0	63,0	Koizumi <i>et al.</i> , 1993
<i>Zinnia elegans</i>	DLPKSVDWRKKGAVSPVKNQGQCGSCW	63,0	63,0	Ye y Varner, 1996
<i>Nicotiana tabacum</i> (Clon CYP-7)	DLPADFDWRDHGAVTGVKNQGSCGSCW	63,0	63,0	Linthorst <i>et al.</i> , 1993
<i>Nicotiana tabacum</i> (Clon CYP-8)	DLPADYDWRDHGAVTGVKNQGSCGSCW	63,0	63,0	Linthorst <i>et al.</i> , 1993
<i>Zea mays</i>	PDDFDWRDHGAVGPVKNQGSCGSCW	63,0	63,0	Domoto <i>et al.</i> , 1995
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPEEFDWRDRGAVTPVKNQGSCGSCW	63,0	63,0	Williams <i>et al.</i> , 1994
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SVPPSVDWRKKGAVTDVKDQGQCGSCW	63,0	63,0	Tanaka <i>et al.</i> , 1991
<i>Oryza sativa</i> (oryzaína α)	ALPESVDWRTKGAVAEIKDQGCGSCW	63,0	63,0	Watanabe <i>et al.</i> , 1991
<i>Oryza sativa</i> (oryzaína β)	LPESVDWREKGAVAPVKNQGQCGSCW	63,0	63,0	Watanabe <i>et al.</i> , 1991
<i>Zea mays</i>	DLPDAIDWRQLGAVTEVKDQQQCGGCW	63,0	59,3	Pechan <i>et al.</i> , 1999
<i>Zea mays</i>	DLPE SVDWRAKGA VAEVKDQ GSCGTCW	63,0	59,3	Pechan <i>et al.</i> , 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	KVPDSVDWRKKGAVTNVKDQGSCGACW	63,0	59,3	Funk <i>et al.</i> , 2002
<i>Alnus glutinosa</i>	AVPSAMDWRMKGAVTPVKDQGQCGCCW	63,0	59,3	Goetting-Minesky & Mullin, 1994
<i>Ricinus communis</i>	VPASVDWRKKGAVTSVKDQGQCGSCW	63,0	63,0	Schmid <i>et al.</i> , 1998
<i>Solanum melongena</i>	DLPEFDWREKGAVTGVKNQGSCGSCW	59,3	59,3	Xu & Chye, 1999
<i>Carica papaya</i> (papaína)	IPEYVDWRQKGAVTPVKNQGSCGSCW	59,3	59,3	Cohen <i>et al.</i> , 1986
<i>Vigna mungo</i>	NLPKDFDWRDKGAVTNVKDQGACGSCW	59,3	59,3	Okamoto <i>et al.</i> , 2001
<i>Brassica napus</i>	ALPISVDWRKKGAVTPIKDQGSCGSCW	59,3	59,3	Wan <i>et al.</i> , 2002
<i>Lycopersicon pennellii</i>	DMPSNLDWRESGAVTQVKNQGQCGCCW	59,3	55,6	Kruger <i>et al.</i> , 2002
<i>Brassica napus</i>	ALPVSVDWRKKGAVTPIKDQGLCGSCW	59,3	59,3	Noh & Amasino, 1999
<i>Glycine max</i>	PLPENFDWREKGAVTEVKLQGRGSCW	59,3	59,3	Nong <i>et al.</i> , 1995

<i>Dianthus caryophyllus</i>	LPESVDWRKKGAVSHVKDQGQCGSCW	59,3	59,3	Jones <i>et al.</i> , 1995
<i>Hordeum vulgare</i>	DLPPSVDWRQKGAVTGVKDGKCGSCW	59,3	59,3	Mikkonen <i>et al.</i> , 1996
<i>Pisum sativum</i>	KLPE SVDWRKEGAVVGKDGSCGSCW	59,3	59,3	Granell <i>et al.</i> , 1992
<i>Carica candamarcensis</i> (CC-II)	YPGSVDWRQKGAVTPVKDQNPCGSCW	59,3	66,7	Walreavens <i>et al.</i> , 1993
<i>Astragalus sinicus</i>	TVPSNVDWRQKGAVTPVKDQGQCGCCW	59,3	55,6	Naito <i>et al.</i> , 2000
<i>Phytolacca americana</i> (phytolacaina R)	NLPSYIDWRNNYAVTPVKNQGECCGSCW	59,3	59,3	Kaneda <i>et al.</i> , 1995
<i>Vigna mungo</i>	VPASVDWRKKGAVTDVKDQGQCGSCW	55,6	63,0	Yamuchi <i>et al.</i> , 1992
<i>Vicia faba</i>	NLPEDFDWREKGA VTPVKDQSGCGSCW	55,6	55,6	Yu & Greenwood, 1994
<i>Nicotiana tabacum</i>	VLPETKDWREAGIVSPVKNQKCGSCW	55,6	55,6	Ueda <i>et al.</i> , 2000
<i>Vicia sativa</i>	NLPEDFDWREKGA VTPVKDQSGCGSCW	55,6	55,6	Becker <i>et al.</i> , 1994
<i>Pisum sativum</i>	NLPEDFDWREKGA VTPVKDQSGCGSCW	55,6	55,6	Guerrero <i>et al.</i> , 1990
<i>Lycopersicon pimpinellifolium</i>	YMPSNLDWRESGAVTQVKHQGRCGCCW	55,6	51,9	Kruger <i>et al.</i> , 2002
<i>Hordeum vulgare</i> (aleuraina)	ALPETKDWRE DGI VSPVKNQAHCGSCW	55,6	59,3	Rogers <i>et al.</i> , 1985
<i>Solanum tuberosum</i>	SLPESVDWRDKGVLVGKDGSCGSCW	55,6	55,6	Avrova <i>et al.</i> , 1999
<i>Lycopersicon esculentum</i>	YMPSNLDWRESGAVTQVKHQGRCGCCW	55,6	51,9	Kruger <i>et al.</i> , 2002
<i>Oryza sativa</i>	DLPRAVDWRRKGA VTPVKDQKCGSCW	55,6	55,6	Kato & Minamikawa, 1996
<i>Oryza sativa</i>	DLPRAVDWRRKGA VTPVKDQKCGSCW	55,6	55,6	Ho <i>et al.</i> , 2000
<i>Lycopersicon esculentum</i>	SLPESIDWREKGV L VGKDGSCGSCW	55,6	55,6	Harrak <i>et al.</i> , 2001
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALPETKDWRE DGI VSPVKNQGGCGSCW	55,6	55,6	Hensel <i>et al.</i> , 1993
<i>Actinidia deliciosa</i> (actinidaina)	VLPSYVDWRSAGAVVDIKSQGEGGCW	55,6	48,1	Snowden & Gardner, 1990
<i>Carica papaya</i> (glicilendopeptidasa)	LPESVDWRAKGA VTPVKHQGYCESCW	55,6	55,6	Buttle <i>et al.</i> , 1990

<i>Araujia hortorum</i> (araujaina h II)	VPDSIDWREKDAVLP IRNQGQ-----	54,5 ^a	50,0 ^a	Obregón <i>et al.</i> , 2001
<i>Thaumatococcus daniellii</i> (thaumatopaina)	NLPNSVDWKKGAVAAVKNQRXCSC-	51,9 ^a	55,6 ^a	Cusack <i>et al.</i> , 1991
<i>Carica papaya</i> (caricaina)	NLPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCGSCW	51,9	51,9	Revell <i>et al.</i> , 1993
<i>Lolium multiflorum</i>	ALPETKDWRETGIVSPVKDQASCSCW	51,9	55,6	Li <i>et al.</i> , 2000
<i>Oryza sativa</i> (oryzaina γ)	LPETKDWREDGIVSPVKDQGHCGSCW	51,9	55,6	Watanabe <i>et al.</i> , 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i>	L PENVDWRKKGAVTPVRHQGSCGSCW	51,9	51,9	Sato <i>et al.</i> , 2000
<i>Prunus armeniaca</i>	VLPE SKNWREEGIVTPVKDQGHCGSCW	51,9	51,9	Mbeguie-A-Mbeguie <i>et al.</i> , 1997
<i>Lycopersicon esculentum</i>	VLPETKDW RKDGIVSPVKAQ GKCGSCW	51,9	51,9	Drake <i>et al.</i> , 1996
<i>Pisum sativum</i>	NLPDEKDW RKEGIVSGVKDQ GSCGSCW	51,9	51,9	Pic <i>et al.</i> , 2002

Tabla 4.6. Comparación de las secuencias N-terminales de macrodontaína I y II con las de otras proteasas de origen vegetal. ^a Determinado por comparación con el número de aminoácidos informados

Un aspecto destacable es el elevado grado de conservación (Tabla 4.7) que presentan algunos motivos de los extremos N-terminales analizados. El motivo DWR (7-9, de acuerdo a la numeración de macrodontaína I) está presente en la casi totalidad de las cisteinilpeptidasas analizadas (66/68, ausente sólo en las proteasas de *Thaumatococcus daniellii* y de *Prunus armeniaca*). Por su parte el motivo CW, que incluye la Cys26 del sitio activo (correspondiente a la Cys25 de papaína) está presente en todas las proteasas cuyo N-terminal tiene suficiente extensión; en 51 casos el aminoácido anterior a la Cys del sitio activo es Ser (motivo SCW, posición 25-27 de la numeración de macrodontaína I). Algo similar ocurre con el motivo CG, únicamente ausente en la glicilendopeptidasa de *Carica papaya*. Otro motivo altamente conservado es VK (17-18), presente en 61/68 de los casos; sin embargo si se consideran las “positividades” (sustitución por un aminoácido de igual característica, en este caso Val por Ile y Lys por Arg) el resultado es 68/68. El motivo GAV (12-14) presenta 56/68 identidades, siendo digno de destacar que en la mayoría de los casos Ala es reemplazada por Ile. En muchos casos (42/56) Thr es el aminoácido que sigue a Val (motivo GAVT, posición 12-15 de la numeración de macrodontaína I). Otro hecho notorio es la conservación de un residuo de prolina en la posición 3 (2 de la numeración de papaína), presente en todas las proteasas analizadas (68/68), cuya función (*cf.* 1.3.5) sería la de prevenir la proteólisis del extremo amino por acción de aminopeptidasas, ya que las uniones Xaa-Pro son inaccesibles para este tipo de enzimas. En el caso de macrodontaína I y II Pro es precedida por Val y lo propio ocurre en las endopeptidasas que muestran mayor grado de identidad (VP, 17/68), si bien en la mayoría de los casos el aminoácido que precede a Pro es Leu, otro aminoácido no polar (LP, 42/68). Casi en la mitad de los casos (31/68) Pro es seguida de Glu, aunque en macrodontaína I y II y en muchas de las proteasas de mayor identidad con ellas Glu está reemplazado por su derivado aminado (Gln), lo que podría obedecer a una modificación post-traducciona.

Motivo	Frecuencia	Motivo	Frecuencia
P	68	LP	42
DWR	66	PE	31
CG	63	VKNQ	27
CW	63	VKNQG	22
VK	61	IDWR	21
GAV	56	SIDWR	19
SCW	51	VP	17
GAVT	42		

Tabla 4.7. Grado de conservación que presentan algunos motivos de los extremos N-terminales analizados en la Tabla 4.6.

4.11.11. Determinación de la secuencia de macrodontaína I

Eliminado: MATERIAL Y MÉTODO LTA
 Eliminado: S

En la Figura 4.26 se presenta la estructura primaria de macrodontaína I, construida en base a la información proporcionada por el análisis de la secuencia de los péptidos obtenidos luego del tratamiento de la proteasa carboximetilada con bromuro de cianógeno, de la digestión enzimática realizada con pepsina, tripsina y Asp-N y de la comparación con las secuencias de peptidasas cisteínicas conocidas. Sólo se consignan los péptidos necesarios para reconstruir la secuencia completa. Los péptidos trípticos se representan con la letra T, los pépticos con la letra P y los que provienen de la digestión con la endopeptidasa Asp-N con la letra A.



Figura 4.26. Secuencia propuesta de macrodontaína I

Las secuencias correspondientes a los péptidos producidos por tratamiento con bromuro de cianógeno se indican con la letra B. Dado que en la secuencia de

macrodomina I se detectaron tres residuos Met, debía esperarse la producción de cuatro péptidos (B1 a B4). Sin embargo dos de los residuos ocupan posiciones contiguas (121 y 122), por lo que el segundo péptido (B2) es inexistente, ya que se trata de una Met aislada (122), razón por la que no se consigna en la Figura 4.26. Dada su extensión, los péptidos B1 y B3 sólo pudieron ser secuenciados parcialmente, lo que permitió confirmar datos aportados por las digestiones enzimáticas.

La numeración dada a los péptidos corresponde a la posición que ocupan en la secuencia completa. La reconstrucción de la estructura primaria de macrodomina I en base al ordenamiento peptídico demuestra que la proteína está compuesta de 213 aminoácidos con un peso molecular calculado ² de 23.486 daltons, valor totalmente consistente con el dato aportado por la espectrometría de masas (23.459 daltons).

La Figura 4.27 muestra el alineamiento de la estructura primaria de macrodomina I con las secuencias completas de algunas proteasas cisteínicas con las que exhibe un mayor grado de identidad. Bromelaína de fruto (Muta *et al.*, 1997) es la que exhibe mayor similitud con macrodomina I (77,0% de identidad), seguida por ananaína (una de las proteasas presentes en el tallo de ananá) con 71,9% de identidad (Lee *et al.*, 1997) y bromelaína (Ritonja *et al.*, 1989), con 67,1% de identidad. En los tres casos se trata de proteasas de la misma fuente (*Ananas comosus* L.), una especie perteneciente a la familia Bromeliaceae, que también incluye a *Pseudananas macrodantes*, de cuyos frutos se obtuvo macrodomina I y que explica el elevado grado de identidad encontrado.

A efectos comparativos, en el alineamiento presentado en la Figura 4.27 también se ha incluido a la papaína (Cohen *et al.*, 1986), que es la proteasa tipo del Clan CA y a la quimopapaína (Watson *et al.*, 1990), ambas obtenidas de látex de *Carica papaya* L. y cuya similitud con macrodomina I es sensiblemente menor (45,1% y 48,8%, respectivamente).

Como era de esperar, hay un elevado grado de conservación de residuos aminoácidos, algunos de los cuales son esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas proteasas, representada por dos dominios principales que flanquean el sitio activo de la enzima.

² Peptide Property Calculator (<http://www.basic.nwu.edu/biotools/proteincalc.html>)

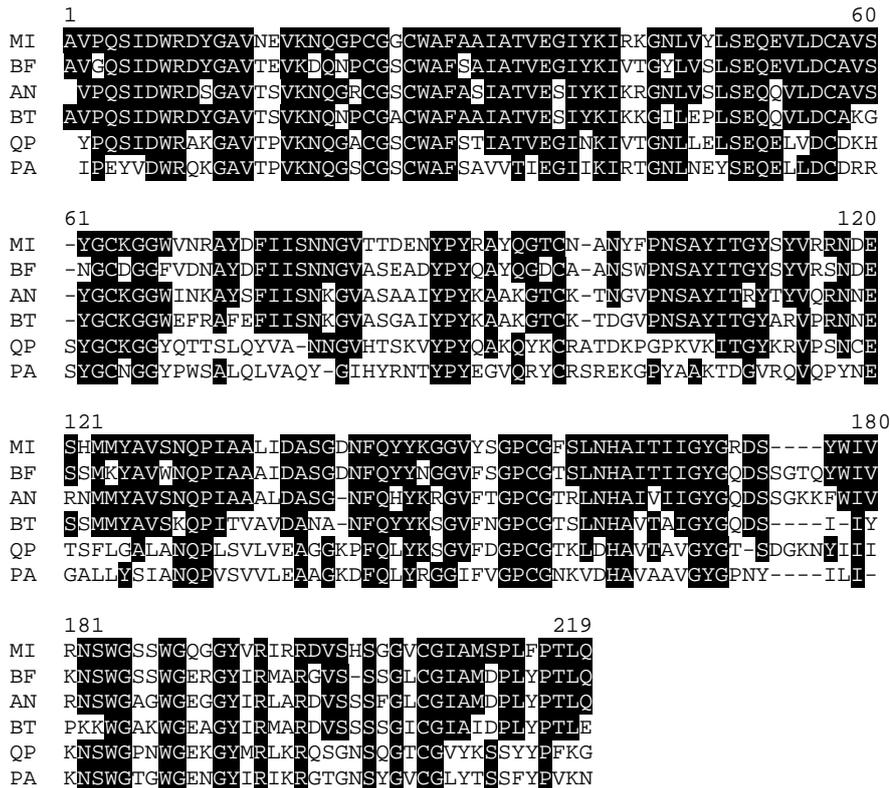


Figura 4.27. *Alineamiento de la estructura primaria de macrodontaina I con las secuencias completas de bromelaina de fruto (BF), ananaina (AN), bromelaina de tallo (BT), quimopapaina (QP) y papaina (PA).* En letras blancas sobre fondo negro se indican las secuencias conservadas, para lo cual se tuvo en cuenta que el aminoácido formara parte de macrodontaina I y se hallara presente al menos en otras dos secuencias.

Así, se encuentran conservados el residuo Cys26 (25)³ del sitio activo, que con el residuo His159 (159) conforman la díada catalítica presente en todas las cistein-endopeptidasas. Entre otros residuos a los que se les ha asignado distintos roles funcionales se encuentra la Gln20 (19), a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe141 (141), Trp178 (177) y Trp182 (181), que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn176 (175) y la His159 (159).

³ El número consignado entre paréntesis corresponde a la ubicación del residuo aminoácido en la secuencia de la papaina.

Al igual que en papaína, en macrodontaína existen 7 residuos Cys, de los cuales Cys26 (25) corresponde al sitio activo, en tanto que los otros seis residuos, representados por Cys23 (22), Cys57 (56) Cys63 (63) Cys96 (95) Cys153 (153) y Cys201 (200), participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas, que por homología correspondería a las uniones Cys23–Cys63, Cys57–Cys95 y Cys153–Cys201.

En las cuatro proteasas de *Bromeliaceae* se encuentran presentes tres residuos Met, en algunos casos en posiciones coincidentes o equivalentes: Met121, Met122 y Met 205 en macrodontaína I, Met121, Met194 y Met 208 en bromelaína de fruto, Met120, Met121 y Met 207 en ananaina y Met121, Met122 y Met 189 en bromelaína de tallo.

De los datos presentados se observa claramente una fuerte semejanza estructural entre todas las proteasas comparadas, confirmando que macrodontaína integra el Clan CA de las proteasas cisteínicas que lidera papaína.

4.11.12. Determinación del Carácter Glicoproteico

La técnica de la Con A-peroxidasa aplicada a macrodontaína I dio resultado negativo, evidenciando el carácter no glicoproteico de la enzima, lo que es consistente con la similitud de los valores de peso molecular obtenidos por cálculo de la secuencia y por espectrometría de masas. La glicosilación no es una característica constante en las fitoendopeptidasas, como lo demuestra el hecho de que bromelaína de tallo y comosaína son glicosiladas pero no ananaina, proviniendo las tres proteasas del mismo material (Barret *et al.*, 1998b).

Eliminado: MATERIAL Y
MÉTODO

Eliminado: S

LTA

5. Conclusiones

5.1. Obtención de Macrodonataína

En el presente trabajo se han estudiado las proteasas presentes en frutos bien desarrollados pero no totalmente maduros de *Pseudananas macrodotes* (Morr.) Harms (*Bromeliaceae*), especie conocida en nuestro país como “ihvirá” o “falso ananá”, provenientes de Santa Ana, Departamento de Candelaria (Pcia. de Misiones).

Los extractos crudos contuvieron alrededor de 0,02 % de proteínas y casi un 0,2 % de azúcares solubles y la actividad proteolítica de los extractos fue de $10,7 \pm 1,9$ Ucas por gramo de frutos. Dado el elevado contenido de azúcares, así como a la presencia de compuestos hidrosolubles de naturaleza fenólica, el extracto crudo fue sometido a una purificación inicial mediante precipitación acetónica fraccionada, hecho que permitió la eliminación de los azúcares solubles y de los compuestos fenólicos, proveyendo un extracto parcialmente purificado que retiene un 26,5 % de proteínas y el 68,7 % de la actividad inicial (grado de purificación alcanzado: 2,6 veces).

Esta preparación, a la que se denominó macrodonataína, puede ser directamente utilizada en procesos industriales, por lo que se decidió proceder a caracterizarla. Macrodonataína es activa en un amplio rango de pH, obteniéndose valores superiores al 75 % de la actividad máxima entre pH 7,0 y 10,5. La aplicación de inhibidores específicos de grupo demostró que la enzima es una cisteinilendopeptidasa, como todas las proteasas de *Bromeliaceae* aisladas hasta el momento, y en consecuencia requiere del agregado de cisteína o de otros tiol-reductores para manifestar su máxima actividad, situación que se alcanza cuando la concentración de cisteína es 12,5 mM.

Si bien el mantenimiento de la enzima a -20 °C es una alternativa válida para su conservación (retiene el 92 % de actividad luego de seis meses en esas condiciones), la liofilización es el método de elección, ya que un liofilizado rediseuelto luego de 24 meses de almacenamiento pierde tan sólo el 3 % de la actividad inicial.

Macrodonataína es notablemente estable en el rango de pH de máxima actividad y lo propio ocurre en condiciones de elevada fuerza iónica, aún a concentraciones en las que muchas proteasas resultan inactivadas. Por el contrario, a diferencia de otras fitoproteasas, macrodonataína no es demasiado termoestable, ya que la actividad residual se redujo al 50 % luego de ser incubada durante 2 h a 45 °C, siendo completamente inactivada por calentamiento a 75 °C durante 10 min. Sin embargo la inestabilidad térmica de esta preparación puede resultar útil en el caso de su uso en procesos industriales, ya que podría ser fácilmente inactivada una vez alcanzado el resultado deseado, un aspecto de especial importancia en el caso de la industria alimentaria.

Dada la importancia que tiene en nuestro país la producción de soja y teniendo en cuenta que la hidrólisis parcial de las proteínas conduce a la modificación de sus propiedades fisicoquímicas y funcionales, facilitando su incorporación a distintos tipos de productos alimenticios, se consideró de interés conocer el comportamiento de macrodonataína sobre proteínas de soja de baja solubilidad, en comparación con una proteasa comercial de origen microbiano (alcalasa), para lo cual se monitoreó el grado de hidrólisis y el perfil electroforético de los péptidos obtenidos en el curso de la hidrólisis.

La curva de progreso de reacción de macrodonataína sobre concentrado de soja mostró un perfil casi idéntico pero considerablemente más bajo (38 %) que el obtenido con alcalasa, con valores de grado de hidrólisis del 15 % para alcalasa y del 5,9 % para macrodonataína, al cabo de 3 h de reacción. Corresponde señalar que la primera es una proteasa serínica, en tanto que macrodonataína es cisteínica.

El perfil peptídico de los hidrolizados de soja obtenidos con alcalasa y macrodonataína muestra un comportamiento diferencial, en particular en relación a la subunidad β (proveniente de la fracción 7S), así como del polipéptido B (proveniente de la fracción 11S), que en ambos casos son degradados por macrodonataína hasta alcanzar una concentración límite, en tanto que alcalasa produce la hidrólisis total de ambos. Otra diferencia a consignar es que se pudo observar una tenue banda de alrededor de 60 kDa en el hidrolizado de macrodonataína, probablemente proveniente de la degradación de las subunidades α' o α de la fracción 7S.

5.2. Purificación de Macrodontaína

Casi sin excepción, los extractos vegetales a partir de los cuales se han aislado endopeptidasas cisteínicas contienen más de una entidad molecular de esa naturaleza y dentro del rango de 20 a 30 kDa, por lo que las técnicas de exclusión molecular o de afinidad suelen no ser adecuadas para purificarlas. En estos casos las técnicas cromatográficas basadas en la carga eléctrica de las proteínas, tales como el intercambio iónico y el cromatoenfoco resultan más apropiadas, para lo cual es necesario conocer previamente el punto isoelectrico de las especies proteicas presentes en el extractivo y determinar cuáles de ellas son proteolíticamente activas.

Macrodontaína demostró contener cinco componentes proteicos principales en el rango de $pI = 9,0 - 5,7$, de los cuales solamente dos presentaron actividad proteolítica, correspondiendo a los polipéptidos que enfocaron a pI cercano a 6. Por ello se decidió recurrir al cromatoenfoco como primera etapa de purificación cromatográfica. En el rango de $pH 5,85 - 5,45$ eluye la fracción de pI mayor (macrodontaína I) y en el rango de $pH 5,45 - 5,10$ eluye la fracción de pI menor (macrodontaína II); el rendimiento de macrodontaína I y II fue de 17,9 % y 13,7 %, respectivamente.

Aun cuando la resolución obtenida por cromatoenfoco es muy buena, este método de purificación resulta muy costoso, aún a escala de laboratorio, a lo que debe sumarse la necesidad de remover los anfolitos que eluyen junto con las fracciones activas. Por estas razones se recurrió a la cromatografía de intercambio iónico, tratando de optimizar la capacidad de resolución de la técnica por medio del manejo simultáneo de las dos principales variables: el pH de corrida y el rango del gradiente salino. Finalmente, un gradiente salino muy estrecho (0,05 – 0,10 M de cloruro de sodio) a $pH 8,0$ permitió una separación tan buena como la obtenida por cromatoenfoco, ya que la recuperación de las proteínas activas (macrodontaína I y II) asciende a 19,7 % y 12,0 % del total presente en el extracto crudo. Los bajos factores de purificación alcanzados constituyen un hecho habitual en órganos vegetales con elevada actividad proteolítica, donde las proteasas son las proteínas mayoritarias. Los resultados también muestran que macrodontaína II, aún cuando presente en menor cantidad, posee mayor actividad caseinolítica específica que macrodontaína I. El protocolo cromatográfico adoptado es más sencillo que el usado por Rowan & Buttle (1994) en la purificación de las proteasas del ananá y permitió una eficiente

separación de las dos principales fracciones activas presentes en macrodontaína, recuperándose el 42,8 % de la actividad aplicada a la columna.

5.3. Caracterización de Macrodontaína I y II

Con el propósito de confirmar la homogeneidad y determinar el peso molecular de las fracciones purificadas por cromatografía de intercambio iónico y exclusión molecular se realizó una electroforesis desnaturalizante y reductora en gradiente de poliacrilamida. Las dos fracciones purificadas (macrodontaína I y II) aparecen homogéneas, con masas moleculares relativas de 25 kDa y 27 kDa, respectivamente. Estos valores son del mismo orden que los consignados por Boller (1986) para otras proteasas de *Bromeliaceae*.

Como segundo criterio de homogeneidad y para confirmar los valores de los puntos isoelectricos de macrodontaína I y II se efectuó un isoelectroenfoco seguido de zimograma. Los valores de pI obtenidos fueron de 6,1 para macrodontaína I y de 5,9 para macrodontaína II, que son cercanos a los de bromelaína de fruto (pI = 4,6, Yamada *et al*, 1976), aunque muy diferentes a los que exhiben las peptidasas presentes en tallo de ananá (bromelaína de tallo, ananaína y comosaína), que son muy alcalinos (Rowan & Buttle, 1994).

La electroforesis nativa reveló que ambas enzimas aparecen como bandas únicas y que la movilidad electroforética de macrodontaína II fue ligeramente superior a la de macrodontaína I. Por su parte la electroforesis bidimensional (nativa-desnaturalizante) demostró que ambas enzimas son de naturaleza monomérica, al igual que las otras proteasas de *Bromeliaceae* conocidas y como la mayoría de las endopeptidasas vegetales.

Macroductaína I exhibió un rango de pH óptimo (más del 90 % de la actividad máxima) entre pH 6,1 y 8,5, en tanto que en el caso de macroductaína II el rango de pH óptimo fue más angosto (pH 7,5 – 8,5). En este sentido el comportamiento es distinto al de la enzima parcialmente purificada, ya que en esta última el rango de pH óptimo está desplazado hacia la zona alcalina (pH 8,3 – 10,1). Con la sola excepción de pingüinaína, la proteasa aislada de *Bromelia pinguin* L. (Toro Goyco *et al.*, 1968), cuyo pH óptimo es decididamente ácido (pH 3,8 – 4,3), la mayoría de las proteasas de *Bromeliaceae*

muestran perfiles de pH con valores óptimos cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos.

La actividad de las proteasas purificadas sobre N- α -CBZ-*p*-nitrofenil ésteres de aminoácidos demuestra que en ambos casos la mayor afinidad se manifiesta por el derivado de Ala, seguido por el de Glu y Tyr, siendo los valores de actividad específica de macrodontaína I prácticamente el doble de los de macrodontaína II.

El efecto de los inhibidores específicos de peptidasas aspárticas, serínicas y metalopeptidasas sobre la actividad proteolítica de macrodontaína I y II resultó prácticamente nula. Por el contrario, el ácido iodoacético y el cloruro mercúrico (inhibidores de proteasas cisteínicas) produjeron la inhibición prácticamente total de la actividad caseinolítica. El E-64, inhibidor específico del sitio activo (“active-site directed inhibitor”), exhibió un comportamiento diferencial frente a una y otra proteasa, ya que produjo inhibición prácticamente total en el caso de macrodontaína I, pero cuando se aplicó a macrodontaína II la preparación conservó un 15% de actividad residual, hecho que podría relacionarse con una diferente geometría del sitio activo, como sugieren Ritonja *et al.* (1989) para bromelaína de tallo.

Las constantes de Michaelis de macrodontaína I y II fueron determinadas sobre benzoil-fenil-valil-arginil-7-amido-4-metilcumarina. No existen diferencias significativas entre ambas proteasas, siendo el valor de Km de macrodontaína I prácticamente idéntico al de ananaína y el de macrodontaína II cercano al de bromelaína de tallo. Ninguna de las dos enzimas resultó ser efectiva sobre benzoiloxycarbonil-arginil-arginil-7-amido-4-metilcumarina.

Por espectrometría de masas macrodontaína I y II aparecen totalmente homogéneas y presentan valores de masa molecular de 23.459 y 23.703 Da, respectivamente, valores estrechamente relacionados con los de otras endopeptidasas presentes en materiales taxonómicamente muy cercanos: bromelaína de tallo, 22.831 Da (Ritonja *et al.*, 1989); bromelaína de fruto, 23.363 Da (Muta *et al.*, 1997); ananaína, 23.478 Da (Lee *et al.*, 1997); balansaína I, 23.192 Da (Pardo *et al.*, 2001); hieronymaína I, 24.066 Da (Bruno *et al.*, 2003).

Las secuencias N-terminales de macrodontaína I y II revelan un 92,6 % de identidad (aminoácidos iguales ubicados en posiciones equivalentes) entre sí. La homología es notoria con relación a las proteasas de *Bromeliaceae*, en especial con las de *Ananas comosus* (“ananá”) y *Bromelia balansae* y en menor medida con las de *Bromelia hieronymi*. En el caso de bromelaína de fruto se evidencia un 100% de identidad con

macrodomina II y un 92,6% con macrodomina I, siendo igualmente altas (72,6 – 88,9 %) para las proteasas obtenidas de tallos de ananá (bromelaína de tallo, ananaína y comosaína). Con respecto a la proteasa tipo del Clan CA y de la familia C1 (papaína), el grado de identidad no es demasiado elevado (59,3 % para macrodomina I y II), aunque es mayor en el caso de quimopapaína (70,4 % y 66,7 % para macrodomina I y II, respectivamente), otra de las proteasas de *Carica papaya*.

Un aspecto destacable es el elevado grado de conservación que presentan algunos motivos de los extremos N-terminales comparados, en especial el motivo CW, que incluye la Cys26 del sitio activo (correspondiente a la Cys25 de papaína), presente en todas las proteasas analizadas.

La estructura primaria de macrodomina I, principal componente proteolítico del fruto de *Pseudananas macrodotes*, fue deducida en base a la información proporcionada por el análisis de la secuencia de los péptidos obtenidos luego del tratamiento de la proteasa carboximetilada con bromuro de cianógeno y de la digestión enzimática realizada con pepsina, tripsina y Asp-N y de la comparación con las secuencias de peptidasas cisteínicas conocidas. La reconstrucción de la estructura primaria de macrodomina I en base al ordenamiento peptídico demuestra que la proteína está compuesta de 213 aminoácidos con un peso molecular calculado de 23.486 daltons, valor totalmente consistente con el dato aportado por la espectrometría de masas (23.459 daltons).

El alineamiento de la estructura primaria de macrodomina I con las secuencias completas de algunas proteasas cisteínicas demuestra que bromelaína de fruto (Muta *et al.*, 1997) es la que exhibe mayor similitud con macrodomina I (77,0 % de identidad), seguida por ananaína (una de las proteasas presentes en el tallo de ananá) con 71,9 % de identidad (Lee *et al.*, 1997) y bromelaína (Ritonja *et al.*, 1989), con 67,1 % de identidad. En los tres casos se trata de proteasas de la misma fuente (*Ananas comosus* L.), una especie perteneciente a la familia *Bromeliaceae*, que también incluye a *Pseudananas macrodotes*, de cuyos frutos se obtuvo macrodomina I y que explica la elevada homología encontrada. En el alineamiento también se ha incluido a la papaína (Cohen *et al.*, 1986), que es la proteasa tipo del Clan CA y cuya similitud con macrodomina I es sensiblemente menor (45,1 %).

Como era de esperar, hay un elevado grado de conservación de residuos aminoacídicos, algunos de los cuales son esenciales para la catálisis y para el mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas proteasas, representada por dos dominios principales que flanquean el sitio activo de la enzima. Así,

se encuentran conservados el residuo Cys26 (25)¹ del sitio activo, que con el residuo His159 (159) conforman la díada catalítica presente en todas las cisteín-endopeptidasas. Entre otros residuos a los que se les ha asignado distintos roles funcionales se encuentra la Gln20 (19), a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe141 (141), Trp178 (177) y Trp182 (181), que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn176 (175) y la His159 (159).

Al igual que en papaína, en macrodontaína existen 7 residuos Cys, de los cuales Cys26 (25) corresponde al sitio activo, en tanto que los otros seis residuos participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas.

En las cuatro proteasas de *Bromeliaceae* comparadas se encuentran 3 Met, en algunos casos en posiciones coincidentes o equivalentes: Met121, Met122 y Met 205 en macrodontaína I, Met121, Met194 y Met 208 en bromelaína de fruto, Met120, Met121 y Met 207 en ananaína y Met121, Met122 y Met 189 en bromelaína.

De los datos presentados se observa claramente una fuerte semejanza estructural entre todas las proteasas comparadas, confirmando que macrodontaína integra el Clan CA de las proteasas cisteínicas que lidera papaína.

La técnica de la Con A-peroxidasa aplicada a macrodontaína I dio resultado negativo, evidenciando el carácter no glicoproteico de la enzima, lo que es consistente con la similitud de los valores de peso molecular obtenidos por cálculo de la secuencia y por espectrometría de masas. La glicosilación no es una característica constante en las fitoendopeptidasas, como lo demuestra el hecho de que bromelaína y comosaína son glicosiladas pero no ananaína, proviniendo las tres proteasas del mismo material (Barret *et al.*, 1998b).

¹ El número consignado entre paréntesis corresponde a la ubicación del residuo aminoacídico en la secuencia de la papaína.

6. Referencias Bibliográficas

- Adler-Nissen, J. (1986) "Enzymic hydrolysis of food proteins", Elsevier, London & NY, pág. 122.
- Agundis, C., M. Reyes y F. Córdoba (1977) "Hemisphaericin-D, a dialyzable and polymerizable protease found in *Bromelia hemisphaerica*", *Experientia* 33: 867-9.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.
- Anderson, J.W. (1968) "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues" *Phytochemistry* 7: 1973-88.
- Asenjo, C.F. y M. del C. Fernández (1942) *Science* 95: 48 (citado por Toro-Goyco *et al.*, 1968)
- Avrova, A.O., H.E. Stewart, W.D. De Jong, J. Heilbronn, G.D. Lyon & P.R. Birch (1999) "A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*", *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:, 1114-9.
- Baker, E.N. (1980). "Structure of actinidin, after refinement at 1.7 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 141: 441-84.
- Barret, A.J. (2001) "Proteolytic enzymes: nomenclature and classification", en "Proteolytic Enzymes. A practical approach" 2nd. Edition (R. Beynon & J.S. Bond, eds.), Oxford University Press, Great Britain, págs. 1-21.
- Barret, A.J., N.D. Rawlings & J:F. Woessner, eds. (1998a) "Handbook of Proteolytic Enzymes". Academic Press, London, págs. 3-542.
- Barret, A.J., N.D. Rawlings & J:F. Woessner, eds. (1998b) "Handbook of Proteolytic Enzymes". Academic Press, London, págs. 545-797.
- Barrett, A.J. & N.D. Rawlings (1991) "Types and families of endopeptidases", *Biochem. Soc. Transact.* 19: 707-15.
- Barrett, A.J. & N.D. Rawlings (1995) "Families and clans of serine peptidases". *Arch. Biochem. Biophys.* 318, 247-250.

- Becker, C., J. Fischer, V.H. Nong & K. Munitz (1994) "PCR cloning and expression analysis of cDNAs encoding cysteine proteinases from germinating seeds of *Vicia sativa* L.", *Plant Mol. Biol.* 26: 1207-12.
- Becker, C., V.I. Senyuk, A.D. Shutov, V.H. Nong, J. Fischer, C. Horstmann & K. Muntz (1997) "Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage-protein mobilization", *Eur. J. Biochem.* 248: 304-12.
- Boller, T. (1986) "Roles of proteolytic enzymes in interactions of plant with other organisms", en "Plant proteolytic enzymes" (M.J. Dalling, ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol. I, págs. 68-96.
- Bongiorno de Pfirter, G.M. & M.S. Buttazzoni de Cozzarin (1976) "Balanseína", una nueva enzima proteolítica separada de los frutos de *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*", *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 118: 3-8.
- Bradford, M.B. (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Bromeliad Society International. "What are bromeliads?" <<http://www.bsi.org/main.htm>> [consulta: 9 de marzo de 2002].
- Bruno, M.A., M.F. Pardo, N.O. Caffini and L.M.I. López (2002) "Purification of a New Endopeptidase Isolated from fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)", *Acta Farm. Bonaerense* 21: 51-6.
- Bruno, M.A., M.F. Pardo, N. O. Caffini and L.M.I. López. (2003) "Hieronymain I, a new cysteine peptidase isolated from unripe fruits of *Bromelia hieronymi* Mez (*Bromeliaceae*)". *J. Protein Chem.* 22: 127-34.
- Buttazzoni de Cozzarin M.S & G.M. Bongiorno de Pfirter (1980) "Dos nuevas enzimas proteolíticas halladas en plantas del género *Bromelia*", *Rev. Farm. (Buenos Aires)* 123: 3-7.
- Buttazzoni, M.S., N.O. Caffini, C.L. Natalucci & N.S. Priolo (1984) "Proteasas de Bromeliaceae. I. Estudio preliminar de la fracción proteolíticamente activa presente en frutos de *Bromelia laciniosa* Mart.", *Acta Farm. Bonaerense* 3: 33-8
- Buttle, D.J, A. Ritonja, L.H. Pearl, V. Turk & A.J. Barrett (1990) "Selective cleavage of glycylic bonds by papaya proteinase IV", *FEBS Lett.* 260: 195-7

- Caffini, N.O., C.L. Natalucci, N.S. Priolo & M.S. Buttazzoni (1988) "Proteasas de Bromeliaceae. IV. Aislamiento de una fitoproteasa sulfhidrónica presente en frutos de *Bromelia serra* Griseb.", *Acta Farm. Bonaerense* 7: 9-14
- Castellanos, A. (1945) "Bromeliaceae", en "Genera et Species Plantarum Argentinarum" (H.R. Descolle, dir.) 3: 151
- Cercos, M., S. Santamaria & J. Carbonell (1999) "Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea", *Plant Physiol.* 119: 1341-8.
- Charney, J. & R.M. Tomarelli (1947) "A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice", *J. Biol. Chem.* 171: 501-5.
- Choi, K. H., R.A. Laursen & K.N. Allen (1999) "The 2.1 Angstrom Structure of a Cysteine Protease with Proline Specificity from Ginger Rhizome, *Zingiber officinale*" *Biochemistry* 38: 11624-33.
- Choi, K.H. & R.A. Laursen (2000) "Amino-acid sequence and glycan structures of cysteine proteases with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*", *Eur. J. Biochem.* 267: 1516-26.
- Cohen, L.W., V.M. Coghlan & L.C. Dihel (1986) "Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA", *Gene* 48: 219-27.
- Conn, E.E., P.K. Stumpf, G. Bruening & R.H. Doi (1987) "Outlines of Biochemistry", 5a. ed., John Wiley & Sons, Singapur, págs. 78-9
- Cooreman, W.M., S. Scharpé, J. Demeester & A. Lauwers (1976) "Bromelain, biochemical and pharmacological properties", *Pharm. Acta Helv.* 51: 73-97.
- Coulombe, R., P. Grochulski, J. Sivaraman, R. Menard, J.S. Mort & M. Cygler (1996) "Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment", *EMBO J.* 15: 5492-503
- Cruz, M.T., M. del C. Oliver, L.M. del Castillo & M. Castañeda-Agulló (1974) "Proteinasas de plantas mexicanas. I. Determinación de pesos moleculares de proteinasas cisteínicas por concentración de grupos tioles", *Rev. Latinoamer. Quím.* 5: 18-25.
- Cusack, M., A.G. Stephen, R. Powls & R.J. Beynon (1991) "Purification and characterization of thaumatopain, a cysteine protease from the arils of the plant *Thaumatococcus daniellii*" *Biochem. J.* 274 (Pt 1): 231-6.

- Delaria, K., L. Fiorentino, L. Wallace, P. Tamburini, E. Brownell & D. Muller (1994) Inhibition of cathepsin L-like cysteine proteases by cytotoxic T-lymphocyte antigen-2b. *J. Biol. Chem.* **269**: 25172-7.
- Dimitri, M.J. (1978) "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", Editorial Acme, Buenos Aires, Tomo I, pág. 215.
- Domoto, C., H. Watanabe, M. Abe, K. Abe & S. Arai (1995) "Isolation and characterization of two distinct cDNA clones encoding corn seed cystein proteinases", *Biochim. Biophys. Acta* **1263**, 241-2.
- Drake, R., I. John, A. Farrell, W. Cooper, W. Schuch & D. Grierson (1996) "Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence", *Plant Mol Biol* **30**: 755-67
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers & F. Smith (1956) "Colorometric method for determination of sugars and related substances", *Anal. Chem.* **28**: 350-6.
- Edman, P. & G. Begg (1967) "A protein sequenator", *Eur. J. Biochem.* **1**: 80 (citado por Wittmann-Liebold, 1997).
- Edman, P. (1950) *Acta Chem. Scand.* **4**: 283 (citado por Wittmann-Liebold, 1997).
- Firsthoefel, N.R., Cushman, M.A.F., Ostrem, J.A. and Cushman, J.C. (1998) "Induction of a cysteine protease cDNA from *Mesembryanthemum crystallinum* leaves by environmental stress and plant growth regulators", *Plant Sci.* **136**: 195-206
- Fredericksen, T.S., E. McDonald, K. Wright & B. Mostacedo C. (1999) "Ecología de la bromeliácea terrestre *Pseudananas sagenarius* (Bromeliaceae, Bromelioideae) en bosques secos de Bolivia", *Rev. Soc. Boliviana Bot.* **2**: 165-73.
- Funk, V., B. Kositsup, C. Zhao & E.P. Beers (2002) "The *Arabidopsis* xylem peptidase XCP1 is a tracheary element vacuolar protein that may be a papain ortholog", *Plant Physiol.* **128**: 84-94.
- Garduño, R., M. Soriano, E. Chávez, M.T. Cruz, L.M. del Castillo y & M. Castañeda-Agulló (1974) "Proteinasas de plantas mexicanas. II. Puntos isoeléctricos y caracterización de formas moleculares múltiples en enzimas de Bromeliáceas", *Rev. Latinoamer. Quím.* **5**: 243-8.
- Gillmor, S.A., C.S. Craik & R.J. Fletterick (1997) "Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain", *Protein Sci.* **6**: 1603-11

- Goetting-Minesky, M.P. & B.C. Mullin (1994) "Differential gene expression in an actinorhizal symbiosis: evidence for a nodule-specific cysteine proteinase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9891-5.
- Good, N.E. & S. Izawa (1972) "Hydrogen ion buffers", *Meth. Enzymol.* 24: 53-68.
- Gounaris, A.D., M.A. Brown & A.J. Barrett (1984) "Human plasma α -cysteine proteinase inhibitor", *Biochem. J.* 221: 445-52.
- Granell, A., N. Harris, A.G. Pisabarro & J. Carbonell (1992) "Temporal and spatial expression of a thiolprotease gene during pea ovary senescence, and its regulation by gibberellin", *Plant J.* 2: 907-15.
- Grant, J.R. (1998) "An annotated catalogue of the generic names of the Bromeliaceae", *Selbyana*, 19: 91-121.
- Gross, E. & B. Witkop (1962). "Nonenzymatic cleavage of peptide bonds: the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease", *J. Biol. Chem.* 237: 1856-60
- Guerrero, F.D., J.T. Jones & J.E. Mullet (1990) "Turgor-responsive gene transcription and RNA levels increase rapidly when pea shoots are wilted. Sequence and expression of three inducible genes." *Plant Mol. Biol.* 15: 11-26
- Guncar, G., M. Podobnik, J. Pungercar, B. Strukelj, V. Turk & D. Turk (1998) "Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function". *Structure* 6: 51-61
- Hames, B.D. (1990) "One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis", en "Gel electrophoresis of proteins. A practical approach" (B.D Hames & D. Rickwood, eds.) IRL Press at Oxford University Press, Oxford, págs. 1-144.
- Harrach, T., K. Eckert, K. Schulze-Forster, R. Nuck, D. Grunow & H.R. Maurer (1995) "Isolation and partial characterization of basic proteinases from stem bromelain", *J. Protein Chem.* 14: 41-52.
- Harrak, H., S. Azelmat, E.N. Baker & Z. Tabaeizadeh (2001) "Isolation and characterization of a gene encoding a drought-induced cysteine protease in tomato (*Lycopersicon esculentum*)" *Genome* 44: 368-74.
- Hartley, B.S. (1960) "Proteolytic enzymes", *Ann. Rev. Biochem.* 29: 45-72.
- Hawkes R. (1982) "Identification of concanavalin A-binding proteins after sodium dodecyl sulfate-gel electrophoresis and protein blotting", *Anal. Biochem.* 123:143-6.
- Hashimoto, F., T. Horigome, M. Kanbayashi, K. Yoshida & H. Sugano (1983), *Anal. Biochem.* 129: 192 (citado por Hames, 1990).

- Heinemann, U., G.P. Pal, R. Hilgenfeld & W. Saenger (1982). "Crystal and molecular structure of the sulfhydryl protease calotropin D I at 3.2 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 161: 591-606
- Heinicke, R.M. & W.A. Gortner (1957) "Stem bromelain. A new protease preparation from pineapple plants", *Econ. Bot.* 11: 225-34.
- Heinicke, R.M. (1953) Complementary enzyme actions in the clotting of milk. *Science* 118: 753-4.
- Hensel, L.L., V. Grbic, D.A. Baumgarten & A:B: Bleecker (1993) "Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*" *Plant Cell* 5:, 553-64.
- Hernández Arana, A., A. Rodríguez Romero, M. T. Cruz y Victoria & L.M. del Castillo (1983) "Proteinases of mexican plantas. IX. Structure, relationships and taxonomy", *Rev. Latinoamer. Quím.* 14: 95-8.
- Ho, S.L., W.F.Tong & S.M. Yu (2000) "Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice" *Plant Physiol.* 122: 57-66.
- Inei-Shizukawa, G., M. del C. Oliver, M.T. Cruz, L.M. del Castillo y M. Castañeda-Agulló (1976) "Poteinasas de plantas mexicanas. V. Investigacione acerca de la actividad de la mexicana y la hemisfericina", *Rev. Latinoamer. Quím.* 7: 131-6.
- Jaziri, M., T. Kleinschmidt, V. Walreavens, A:G: Schnek & Y. Looze (1994) "Primary structure of CC-III, the glycosilated cysteine proteinase from the latex of *Carica candamarcensis* Hook.", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 375: 379-85.
- Jones, M.L., P.B. Larsen & W.R. Woodson (1995) "Ethylene-regulated expression of a carnation cysteine proteinase during flower petal senescence", *Plant. Mol. Biol.* 28, 505-12.
- Joshua-Tor, L., H.E. Xu, S.A. Johnston & D.C. Rees (1995) "Crystal structure of a conserved protease that binds DNA: the bleomycin hydrolase, Gal6", *Science* 269: 945-50
- Kamphuis, I.G., K.H. Kalk, M.B.A. Swarte & J. Drenth (1984). "Structure of papain refined at 1.65 Å resolution". *J. Mol. Biol.* 179: 233-56.
- Kaneda, M., S. Nagatome & T Uchikoba (1995) "Comparison of phytolacain R, a cysteine protease from *Phytolacca americana*, with papain" *Phytochemistry* 39: 997-9.
- Katerelos, N.A., M.A. Taylor, M. Scott, P.W. Goodenough & R.W. Pickersgill (1996) "Crystal structure of a caricain D158E mutant in complex with E-64", *FEBS Lett.* 392: 35-9.

- Kato, H. & T. Minamikawa (1996) "Identification and characterization of a rice cysteine endopeptidase that digests glutelin", *Eur. J. Biochem.* 239: 310-6.
- Koizumi, M., K. Yamaguchi-Shinozaki, H. Tsuji & K. Shinozaki (1993) "Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*", *Gene* 129 175-82.
- Kruger, J., C.M. Thomas, C. Golstein, M.S. Dixon, M. Smoker, S. Tang, L. Mulder & J.D. Jones (2002) "A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis", *Science* 296: 744-7.
- Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* 227: 680-5.
- Lambin, F. & J.M. Fine (1979). "Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in linear polyacrylamide gradient gels in the absence of denaturing agents" *Anal.Biochem.*98: 160-8.
- Lee, K.L., K.L. Albee, R.J. Bernasconi & T. Edmunds (1997) "Complete amino acid sequence of ananain and a comparison with stem bromelain and other plant cysteine proteases", *Biochem. J.*, 327: 199-202.
- León-Alcalá, F., L.A. Rivas-Rueda, M.T. Cruz y Victoria, M. Castañeda-Agulló y M.L. del Castillo (1989) "Enzymes of mexican plants. XV. Separation of multiple molecular forms of hemisphaericin and palmerin", *Rev. Latinoamer. Quím.* 20: 133-6.
- Li, Q., A.J. Bettany, I. Donnison, C.M. Griffiths, H. Thomas & I.M. Scott, (2000) "Characterisation of a cysteine protease cDNA from *Lolium multiflorum* leaves and its expression during senescence and cytokinin treatment", *Biochim. Biophys. Acta* 1492: 233-6.
- Linthorst, H.G., C. van der Does, F.T. Brederode & J.F Bol (1993) "Circadian expression and induction by wounding of tobacco genes for cysteine proteinase", *Plant Mol. Biol.* 21, 685-94
- Loomis, W.D. & J. Battaile (1966) "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes", *Phytochemistry* 5: 423-38.
- López, L.M.I. (1995) "Aislamiento, purificación y caracterización de las proteasas presentes en el látex de frutos de *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. (*Moraceae*)". Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

- Luther, H.E. & E. Sieff (1991) "An alphabetical list of Bromeliad binomials. Revision 1", Bromeliad Society, Orlando, Fla.
- Maes, D., J. Bouckaert, F. Poortmans, L. Wyns & Y. Looze (1996) "Structure of chymopapain at 1.7 Å resolution". *Biochemistry* 35: 16292-8
- Marcano, V. (1891) *Apot. Ztg.* 5: 33 (citado por Cooreman *et al.*, 1976)
- Matsudaira, P. (1987) "Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes", *J. Biol. Chem.* 262: 10035-8.
- Mbeguie-A-Mbeguie, D., R.-M. Gomez & B. Fils-Lycaon (1997) "Sequence of AFTP1, a Cysteine Proteinase From Apricot Fruit (Accession No. U93166). Gene Expression During Fruit Ripening. (PGR97-179)" *Plant Physiol.* 115: 1730.
- Ménard, R., H.E. Khouri, C. Plouffe, R. Dupras, D. Ripoll, T. Vernet, D.C. Tessier, F. Laliberté, D.Y. Thomas & A.C. Storer (1990). "A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain". *Biochemistry* 29: 6706-13
- MEROPS, The Protease Database (Neil D. Rawlings, Dominic Tolle and Alan J. Barrett) Release 5.7: 17-Dec-2001 <<http://www.merops.co.uk>> [Consulta: 20 de mayo de 2002].
- Messing R.A., A.F. Santoro & A. Block (1960) "Preparation and purification of pinguinain", *Enzymologia*, 22: 110-6.
- Mikkonen, A., I. Porali, M. Cercos & T.H. Ho (1996) "A major cysteine proteinase, EPB, in germinating barley seeds: structure of two intronless genes and regulation of expression", *Plant Mol. Biol.* 31: 239-54.
- Montes, C., M. Amador, D. Cuevas & F. Córdoba (1990) "Subunit structure of karataasin, the proteinase isolated from *Bromelia plumieri* (karatas)", *Agric. Biol. Chem.* 54: 17-24.
- Murachi, T. (1970) "Bromelain enzymes". *Meth. Enzymol.* 19, 273-84.
- Muta, E., Y. Okamoto & S. Ota (1997) "Cloning and sequencing of cysteine proteinases in *Ananas comosus*"; RL Unpublished. Submitted (OCT-1997) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. <<http://www.expasy.ch/cgi-bin/niceprot.pl?O24641>> [Consulta: 25 de julio de 2002].
- Naito, Y., M. Fujie, S. Usami, Y. Murooka & T. Yamada (2000) "The involvement of a cysteine proteinase in the nodule development in Chinese milk vetch infected with *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengei*", *Plant Physiol.* 124: 1087-96.

- Napper, A.D., S.P. Bennett, M. Borowski, M.B. Holdridge, M.J.C. Leonard, E.E. Rogers, Y. Duan, R.A. Laursen, B. Reinhold. & S.L. Shames (1994) "Purification and characterization of the pineapple stem-derived cysteine proteinases ananain and comosain", *Biochem. J.* 301: 727-35.
- Natalucci, C.L., N.S. Priolo, M.S. Buttazzoni & N.O. Caffini (1985) "Proteasas de Bromeliaceae. II. Separación, caracterización y fraccionamiento de una proteasa aislada de frutos de *Bromelia hieronymi* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* 4: 93-8
- Natalucci, C.L., N.S. Priolo, N.O. Caffini & L.M.I. López (1988) "Proteasas de Bromeliaceae. V. Separación y purificación de sulfhidrilproteasas de frutos de *Bromelia balansae* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* 7: 179-85
- NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) (1984) *Enzyme Nomenclature 1984*, Academic Press, NY.
- Noh, Y.S. & R.M. Amasino (1999) "Regulation of developmental senescence is conserved between *Arabidopsis* and *Brassica napus*", *Plant Mol. Biol.* 41: 195-206.
- Nong, V.H., C. Becker, C. & K. Muntz (1995) "cDNA cloning for a putative cysteine proteinase from developing seeds of soybean", *Biochim. Biophys. Acta* 1261: 435-8.
- Obregón, W., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N. Caffini & N. Priolo (2001) "Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits", *J. Protein Chem.* 20 317-25.
- Ochoa, N., C. Agundis & F. Córdoba (1987) "Isolation and partial characterization of *Bromelia hemisphaerica* protease by affinity chromatography", *Prep. Biochem.*, 17: 337-47.
- O'Hara, B. P., A.M. Hemmings, D.J. Buttle & L.H. Pearl (1995) "Crystal structure of glycyI endopeptidase from *Carica papaya*: a cysteine endopeptidase of unusual substrate specificity. *Biochemistry* 34: 13190-5.
- Okamoto, T., K. Toyooka & T. Minamikawa (2001) "Identification of a membrane-associated cysteine protease with possible dual roles in the endoplasmic reticulum and protein storage vacuole", *J. Biol. Chem.* 276: 742-51.
- Ota, S., E. Muta, Y. Katanita & Y. Okamoto (1985) "Reinvestigation of the fractionation and some properties of the proteolytically active components of stem and fruit bromelains", *J. Biochem. (Tokyo)* 98: 219-28.

- Ota, S., S. Moore & W.H. Stein (1964) "Preparation and properties of purified stem and fruit bromelains". *Biochemistry* 3: 180-5.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, F. Canals, F.X. Avilés, C.L. Natalucci, & N.O. Caffini (2000). "Purification of Balansain I, an Endopeptidase from Unripe Fruits of *Bromelia balansae* Mez (*Bromeliaceae*)". *J. Agric. Food Chem.* 48: 3795-800.
- Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini and C.L. Natalucci (2001) "Properties of a milk clotting protease isolated from Fruits of *Bromelia balansae* Mez". *Biol. Chem. (Hoppe-Seyler)* 382: 871-874.
- Patel, M., I.S. Kayani, G.W. Mellor, S. Sreedharan, W. Templeton, E.W. Thomas, M. Thomas & K. Brocklehurst (1992a). "Variation in the P₂-S₂ stereochemical selectivity towards the enantiomeric N-acetylphenylalanylglycine 4-nitroanilides among the cysteine proteinases papain, ficin and actinidin" *Biochem. J.* 281: 553-9
- Patel, M., I.S. Kayani, W. Templeton, G.W. Mellor, E.W. Thomas & K. Brocklehurst (1992b). "Evaluation of hydrogen-bonding and enantiomeric P₂-S₂ hydrophobic contacts in dynamic aspects of molecular recognition by papain". *Biochem. J.* 287: 881-9.
- Pechan, T., B. Jiang, D. Steckler, L. Ye, L. Lin, D.S. Luthe & W.P. Williams (1999) "Characterization of three distinct cDNA clones encoding cysteine proteinases from maize (*Zea mays* L.) callus", *Plant Mol. Biol.* 40: 111-9.
- Peterson, G.L. (1979) "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall", *Anal. Biochem.* 100: 201-20.
- Pic, E., B.T. de La Serve, F. Tardieu & O. Turc (2002) "Leaf Senescence Induced by Mild Water Deficit Follows the Same Sequence of Macroscopic, Biochemical, and Molecular Events as Monocarpic Senescence in Pea", *Plant Physiol.* 128: 236-46.
- Priolo, N.S., L.M.I. López, M.C. Arribére, C.L. Natalucci and N.O. Caffini (1991) "New purified plant proteinases for the food industry", *Acta Alimentaria (Budapest)* 20: 189-96
- Priolo, N.S., M.S. Buttazzoni, N.O. Caffini & C.L. Natalucci (1986) "Proteasas de Bromeliaceae. III. Condiciones óptimas de acción, estabilidad y purificación de la proteasa aislada de frutos de *Bromelia laciniosa* Mez", *Acta Farm. Bonaerense* 5: 159-64

- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1993) "Evolutionary families of peptidases", *Biochem. J.* 290: 205-18
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1994a) "Families of serine peptidases" *Meth. Enzymol.* 244: 19-61
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1994b) "Families of cysteine peptidases", *Meth. Enzymol.* 244: 461-86
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1995a) "Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism", *Meth. Enzymol.* 248: 105-20
- Rawlings, N.D. & A.J. Barret (1995b) "Evolutionary families of metallopeptidases", *Meth. Enzymol.* 248: 183-228.
- Revell, D.F., N.J. Cummings, K.C. Baker, M.E. Collins, M.A. Taylor, I.G. Sumner, R.W. Pickersgill, I.F. Connerton & P.W. Goodenough (1993) "Nucleotide sequence and expression in *Escherichia coli* of cDNAs encoding papaya proteinase omega from *Carica papaya*", *Gene* 127: 221-5.
- Ríos-Mercadillo, V., M. Orozco, A. Rodríguez, A. Hernández M. del C. Oliver, M. Castañeda-Agulló & L.M. del Castillo (1978) "Proteinasas de plantas mexicanas. VIII. Actividad de la mexicaína y la hemisfericina inmovilizadas en geles de agarosa", *Rev. Latinoamer. Quím.* 9: 55-60.
- Ritonja, A., A.D. Rowan, D.J. Buttle, N.D. Rawlings, V. Turk & A.J. Barrett (1989) "Stem bromelain: amino acid sequence and implications for weak binding of cystatin", *FEBS Lett.* 247: 419-24
- Rogers, J.C., D. Dean & G.R. Heck (1985) "Aleurain: a barley thiol protease closely related to mammalian cathepsin H.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6512-6
- Rowan, A.D. & D.J. Buttle (1994) "Pineapple cysteine endopeptidases". *Meth. Enzymol.* 244: 555-68.
- Rowan, A.D., D.J. Buttle. & A.J. Barrett (1988) "Ananain: a novel cysteine proteinase found in pineapple stem", *Arch. Biochem. Biophys.* 267:262-70.
- Rowan, A.D., D.J. Buttle. & A.J. Barrett (1990) "The cysteine proteinases of the pineapple plant", *Biochem. J.* 266: 869-75.
- Salvesen, G. & H. Nagase (2001) "Inhibition of proteolytic enzymes", en "Proteolytic enzymes, a practical approach", 2ª. Ed., Oxford University Press, Oxford, págs. 105-30.

- Salvesen, G.S. & H.R. Stennicke (1999) "Caspases: cytokine activators and promoter of cell death", en "Proteases. New perspectives" (V. Turk, ed.), Birkhäuser Verlag, Basel, págs. 195-209.
- Sarath, G., R. S. de la Motte & F. Wagner (1989) "Protease assay methods", en "Proteolytic enzymes, a practical approach" (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), IRL Press, Oxford, pág. 27.
- Sato, S., Y. Nakamura, T. Kaneko, T. Katoh, E. Asamizu & S. Tabata (2000) "Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. I. Sequence features of the regions of 4,504,864 bp covered by sixty P1 and TAC clones", *DNA Res.* 7: 131-5.
- Schmid, M., D.Simpson, F. Kalousek & C. Gietl (1998) "A cysteine endopeptidase with C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosoma, a putative lytic compartment". *Planta* 206: 466-75.
- Scopes, R.K. (1984) "Protein purification. Principles and practice", Springer-Verlag, N.Y., pág. 219.
- Silverstein, R.M. (1974) "The assay of the bromelains using *N*-CBZ-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester as substrates" *Anal. Biochem.* 62: 478-84.
- Sivaraman, J., D.K. Nagler, R. Zhang, R. Menard & M. Cygler (2000) "Crystal Structure of Human Procathepsin X: A Cysteine Protease with the Proregion Covalently Linked to the Active Site Cysteine" *J. Mol. Biol.* 295: 939-51.
- Snowden, K.C. & R.C. Gardner, (1990) "Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone", *Nucleic Acids Res.* 18: 6684.
- Storer, A.C. & R. Ménard (1994) "Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases", en "Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases (A.J. Barrett, ed.), *Meth. Enzymol.* 244: 486-500.
- Tanaka, T., D. Yamauchi & T. Minamikawa (1991) "Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits", *Plant Mol. Biol.* 16: 1083-4.
- Thiede, B. (1997) "Mass spectrometry in peptide and protein sequence analysis", en "Protein structure analysis. Preparation, characterization, and microsequencing" (R.M. Kamp, T. Choull-Papadopoulou & B. Witmann-Liebold, eds.), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, págs. 279-93.

- Toro-Goyco E, A. Marezki & M.L. Matos ML. (1968) "Isolation, purification and partial characterization of pinguinain, the proteolytic enzyme from *Bromelia pinguin* L.", *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 91-104.
- Toro-Goyco E, I. Rodríguez-Costas & H. Ehrig (1980) "Structural studies on pinguinain. Changes induced by carboxamidomethylation". *Biochim. Biophys. Acta* 622: 151-9.
- Tranbarger, T.J. & S. Misra (1996) "Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir", *Gene* 172: 221-6.
- Turk, D., M. Podobnik, T. Popovic, N. Katunuma, W. Bode, R. Huber & V. Turk (1995) "Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: A basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors", *Biochemistry* 34: 4791-7.
- Ueda, T., S. Seo, Y. Ohashi & J. Hashimoto (2000) "Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteine protease gene", *Plant Mol. Biol.* 44: 649-57.
- Utsumi, S., S. Damodaran & J.E. Kinsella (1984) "Heat-induced interactions between soybean proteins: preferential association of 11S basic subunits and β -subunits of 7S", *J. Agric. Food Chem.* 32: 1406-12.
- Varughese, K.I., Y. Su, D. Cromwell, S., Hasnain & N.H. Xuong (1992) "Crystal structure of an actinidin-E-64 complex", *Biochemistry* 31: 5172-6.
- Walreavens, V., M. Jaziri, J. van Beeumen, A.G. Schnek, T. Kleinschmidt & Y. Looze (1993) "Isolation and preliminary characterization of the cysteine-proteinases from the latex of *Carica candamarcensis* Hook.", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374: 501-6.
- Wan, L., Q. Xia, X. Qiu & G. Selvaraj (2002) "Early stages of seed development in *Brassica napus*: a seed coat-specific cysteine proteinase associated with programmed cell death of the inner integument", *Plant J.* 30: 1-10.
- Watanabe, H., K. Abe, Y. Emori, H. Hosoyama & S. Arai (1991) "Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteinases of rice seeds (oryzains)", *J. Biol. Chem.* 266: 16897-902
- Watson, D.C., M. Yaguchi & K.R. Lynn (1990) "The amino acid sequence of chymopapain from *Carica papaya*", *Biochem. J.* 266: 75-81
- Westergaar, J.L., C. Hackbarth, M. W. Treuhaff & R. C. Roberts (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *J. Immunol. Meth.* 34: 167-75.

- Williams, J., M. Bulman, A. Huttly, A. Phillips & S. Neill (1994) "Characterization of a cDNA from *Arabidopsis thaliana* encoding a potential thiol-protease whose expression is induced independently by wilting and abscisic acid", *Plant Mol. Biol.* 25, 259-70.
- Xu, F.X. and M.L. Chye, M.L. (1999) "Expression of cysteine proteinase during developmental events associated with programmed cell death in brinjal", *Plant J.* 17: 321-7.
- Yamada, F., N. Takahashi & T. Murachi (1976) "Purification and characterization of a proteinase from pineapple fruit, fruit bromelain A2", *J. Biochem. (Tokyo)* 79: 1223-34.
- Yamamoto, D., K. Matsumoto, H. Ohishi, T. Ishida, M. Inoue, K. Kitamura & H. Mizuno (1991) "Refined X-ray structure of papain.E-64-C complex at 2.1-Å resolution. *J Biol Chem* 266: 14771-7
- Yamuchi, D., H. Akasofu & T. Minamikawa (1992) "Cysteine endopeptidase from *Vigna mungo*. Gene structure and expression". *Plant Cell Physiol.* 33, 789-97.
- Ye, Z.H. & J.E. Varner (1996) "Induction of cysteine and serine proteases during xylogenesis in *Zinnia elegans*", *Plant Mol. Biol.* 30: 1233-46.
- Yu, W.J. & J.S. Greenwood (1994) "Purification and characterization of a cysteine proteinase involved in globulin hydrolysis in germinated *Vicia faba* L", *J. Exp. Bot.* 45, 261-8 (1994).
- Zhao, B., C.A. Janson, B.Y. Amegadzie, K. D'Alessio, C. Griffin, C.R. Hanning, C. Jones, J. Kurdyla, M. McQueney, X. Qiu, W.W. Smith & S.S. Abdel-Meguid (1997) "Crystal structure of human osteoclast cathepsin K complex with E-64". *Nat. Struct. Biol.* 4: 109-11