

CONCLUSIONES

La presencia de enzimas hidrolíticas, incluidas las proteasas, es una característica frecuente en el látex de muchas especies vegetales que producen este tipo de secreción, donde aparentemente aquéllas estarían relacionadas con mecanismos de defensa aún no totalmente dilucidados.

En el presente trabajo de tesis se han analizado las propiedades hidrolíticas del látex de dos especies de *Asclepiadaceae* que crecen en la zona: *Araujia angustifolia* (Hook et Arn.) Decaisne y *A. hortorum* Fourn. Para ello el látex fue sometido a procesos de centrifugación y ultracentrifugación que permitieron eliminar gomas y otros componentes insolubles, rindiendo los correspondientes extractos crudos (EC). En los EC de ambas especies se detectaron las siguientes actividades hidrolíticas: proteásica, amidásica, esterolítica, poligalacturonidásica y pectinmetilesterásica. No se detectó actividad rhamnogalacturonidásica, xilanásica ni metilcelulásica. Estos resultados confirman que las enzimas presentes en el látex manifiestan actividad hidrolítica frente a sustratos de distinta naturaleza química (amidas y ésteres), reforzando la opinión que prevalece sobre el rol protector del látex como mecanismo de defensa en plantas.

Dado que ambos EC demostraron poseer una importante actividad proteolítica, se decidió caracterizar los mismos, teniendo en cuenta que para las aplicaciones industriales la pureza de las enzimas usualmente es de importancia secundaria.

El contenido de proteínas del EC obtenido a partir del látex de los frutos de *Araujia hortorum* fue considerablemente mayor (5,4 mg/ml) que el correspondiente a *A. angustifolia* (1,5 mg/ml). El agregado de cisteína aumenta la actividad proteolítica de los extractos, lográndose la máxima actividad en presencia de cisteína 12 mM, constituyendo un indicio de que las proteasas contenidas en los mismos deben ser del tipo cisteínico, ya que resultados similares fueron obtenidos en presencia de otros reductores como DTT y β mercaptoetanol. Por otra parte, la actividad proteolítica disminuyó en un 95%

para ambas muestras cuando se agregaron iodoacetato o E-64 (inhibidores irreversibles típicos de proteasas cisteínicas). La inactivación con HgCl_2 (inhibidor reversible) confirmó la naturaleza cisteínica de las proteasas presentes en los extractos crudos, ya que la inhibición pudo ser revertida por el agregado de cisteína.

Cuando se examinó la actividad peptidásica de ambas preparaciones crudas en función del pH, el EC *Araujia angustifolia* mostró máxima actividad (superior al 95%) entre pH 6,7 y 8,5, en tanto que la de *Araujia hortorum* lo hizo a valores de pH ligeramente mayores (7,5-8,5). Este comportamiento es característico de las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, que exhiben perfiles de actividad en función del pH relativamente amplios y un valor de pH óptimo cercano al pH neutro frente a sustratos sintéticos y proteicos.

Los dos extractivos mostraron una buena estabilidad térmica, manteniendo un 80% de la actividad inicial luego de 30 min de incubación a 45° C en ambos casos, pero el EC de *A. angustifolia* resulta más estable aún, manteniendo hasta un 50% de la actividad inicial luego de 30 min a 60°C. Cuando se utiliza caseína como sustrato, la actividad enzimática llega a un máximo en ambos extractos a los 60 °C. La elevada actividad a temperaturas relativamente altas es otra característica común a las endopeptidasas cisteínicas de la familia C1, lo que favorece el empleo de estos extractivos en procesos que necesitan realizarse a elevadas temperaturas.

La actividad de los EC también se ensayó sobre sustratos sintéticos: PFLNA y N- α -CBZ-*p*-nitrofenilésteres de los aminoácidos más comúnmente empleados para este tipo de peptidasas (Gln, Ala y Asp). Ambos extractos son activos frente a dichos sustratos, siendo el EC de *Araujia hortorum* ligeramente superior al de *A. angustifolia*.

Cuando los extractos fueron analizados por isoelectroenfoque-zimograma exhibieron varios componentes dentro del rango de pI alcalino, la mayoría de ellos proteolíticamente activos. Esta naturaleza básica también se observó en las

proteasas aisladas del látex de otras *Asclepiadaceae*. En base de estos resultados, en ambos casos se seleccionó la cromatografía de intercambio catiónico como estrategia de purificación para las proteasas presentes en los EC.

La purificación cromatográfica (FPLC) del EC de *A. angustifolia* permitió el aislamiento de tres fracciones activas, llamadas araujaína aI, aII y aIII, respectivamente, de acuerdo a la nomenclatura recomendada para nuevas proteasas vegetales.

El peso molecular de araujaína aI, aII y aIII se estimó en 23 kD (SDS-PAGE) valor del mismo orden que los obtenidos para otras proteasas de *Asclepiadaceae*. Las masas moleculares de las enzimas purificadas se determinaron utilizando espectrometría de masas (MALDI-TOF), que arrojó valores de 23465 D para araujaína aI; 23528 D para araujaína aII y 23489 D para araujaína aIII, confirmando los datos electroforéticos previos.

El rango de pH óptimo para araujaína aI y aII fue bastante estricto (9,0-9,5 y 8,0- 8,5, respectivamente), mientras que para araujaína aIII fue más amplio (7,0-9,5 (Fig. 4). Teniendo en cuenta el perfil de pH del extracto crudo (pH óptimo 6,7-8,5), puede inferirse que las araujaínas aII y aIII son las enzimas que prevalecen y que más aportan en la actividad proteolítica de la preparación enzimática cruda. La acción de diversos inhibidores de proteasas cisteínicas (iodoacetato de sodio, idoacetamida y E-64) produjo una inhibición total e irreversible de la actividad enzimática en todos los casos.

Frente a sustratos del tipo N-CBZ-aa-*p*-nitrofenil ésteres araujaína aI y aIII demostraron tener mayor afinidad por el derivado de Ala, pero el comportamiento de araujaína II fue significativamente diferente, ya que hidroliza al derivado de Gln con mayor preferencia que el de Ala. La notoria preferencia de araujaína aI por el derivado de Ala en relación al resto de los derivados de aminoácidos ensayados justificaría la baja actividad caseinolítica de esta enzima, hecho reafirmado por su casi nula actividad sobre PFLNA. El comportamiento de

araujaína aI podría constituir una ventaja para procesos biotecnológicos que requieran alta especificidad de clivaje.

La comparación de la secuencia N-terminal de araujaína aI, aII y aIII con la de otras fitoproteasas demostró que las tres enzimas muestran alta semejanza con proteasas cisteínicas de plantas en general y especialmente con las que pertenecen a especies del género *Asclepias*. Cabe destacar que papaína, considerada como la enzima arquetipo de las peptidasas cisteínicas, muestra un alto grado de identidad con araujaína a I, a aII y a aIII : 81%, 69% y 79%, respectivamente. La secuencia N-terminal de araujaína aI tiene un 69% de identidad con araujaína aII y un 79% de identidad con araujaína aIII, mientras que entre aII y aIII la identidad hallada es del orden del 74%. Cuando se comparan las secuencias N-terminales de las tres enzimas en estudio se observa que presentan un 50 % de secuencias de aminoácidos coincidentes, muchos de los cuales están conservados en la mayoría de las proteasas cisteínicas del tipo papaína y otros en la misma familia o género.

El análisis del mapa peptídico (peptide mass fingerprint) de araujaína aI, aII y aIII permitió observar que poseen algunos picos equivalentes, lo que demuestra que a pesar de ser diferentes comparten un alto grado de homología entre ellas. Este resultado, junto con los obtenidos mediante la metodología convencional sugieren con mayor certeza que se trataría de isoenzimas.

El EC de *Araujia hortorum* también fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico, lo que permitió separar otras tres fracciones activas, a las que se denominó araujaína hI, hII y hIII. Analizadas por electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE) las tres fracciones resultaron homogéneas y con masas moleculares del orden de los 23 kD. La masa molecular determinada por espectrometría de masas fue de 24031 D, 23718 D y 23545 D para araujaína hI, hII y hIII, respectivamente, características similares a las observadas para las proteasas presentes en el látex de *A. angustifolia*.

La mayor actividad se encuentra en el rango de pH alcalino: araujaína hI y hII muestran un mayor rango de pH óptimo (7,8-9,6 y 7,8-9,4, respectivamente), en

tanto que el de araujaína hIII es más estrecho (8,4 - 9,1). Cabe consignar que la actividad caseinolítica de araujaína hI es casi veinte veces mayor que la de las otras dos proteasas. Los inhibidores específicos de cisteín-proteinasas (iodoacetato y E-64) produjeron una inhibición enzimática total e irreversible en todos los casos. Usando los carbobenzoxi-*p*-nitrofenil ésteres de diversos aminoácidos como sustratos pudo determinarse que el derivado de Gln fue el mejor sustrato para las tres endopeptidasas estudiadas

A diferencia de lo que se encontró en el caso de las proteasas de *A. angustifolia*, las secuencias N-terminales de araujaína hII y de araujaína hIII demostraron tener entre ellas solamente un 53% de identidad, aunque tienen un alto porcentaje de identidad con proteasas aisladas de especies del género *Asclepias* y una considerable homología con las proteasas cisteínicas del género *Caricaceae*. La comparación con papaína revela también un alto grado de identidad (55% y 64% con araujaína hII y hIII, respectivamente). Al encontrarse bloqueado el N-terminal de araujaína hI se decidió analizar una secuencia interna obtenida por tratamiento con la proteasa V8, obteniéndose una notable semejanza con distintas fitoproteasas (casi no existen secuencias completas de proteasas de *Asclepiadaceae*) y también se observaron varios motivos muy conservados, sugiriendo que araujaína hI probablemente comparte un gen ancestral con proteasas cisteínicas obtenidas de especies taxonómicamente menos relacionadas.

Los PMF analizados de araujaína hI, hII y hIII confirmaron que se trata de enzimas distintas, a pesar de que poseen características biofísicoquímicas muy similares. Debido a su ubicación celular y a sus funciones se trataría de isoenzimas. En los espectros se observó que ninguna de las muestras posee picos iguales, lo que fortalece la idea de que no son las mismas enzimas. Por otro lado no se encontraron picos de igual peso molecular provenientes de secuencias conservadas.

Con el objeto de conocer la secuencia completa de alguna de las proteasas caracterizadas se intentó el clonado de las mismas empleando como material de partida el RNA total del látex de *Araujia angustifolia* y de *A. hortorum*. Dado que los primers utilizados no fueron lo suficientemente específicos para la obtención de los cDNA de proteasas de *A. hortorum* el trabajo debió continuarse solamente con las muestras de *A. angustifolia*, logrando clonarse finalmente araujaína aII.

Se determinó la secuencia de araujaína aII a partir del aminoácido 26 y hasta el aminoácido 213, donde aparece la señal de stop de la secuencia nucleotídica. Sólo se pudo establecer la secuencia a partir del aminoácido 26 porque los cebadores utilizados fueron diseñados en base a una secuencia perteneciente a una región altamente conservada (aminoácidos 19 al 25) del sitio activo de la enzima.

Al aplicar la metodología de Peptide Mass Fingerprint (PMF) tanto a la enzima pura como a la secuencia polipeptídica obtenida por clonado y secuenciamiento, la comparación de los péptidos generados en cada caso permitió identificar a la enzima secuenciada como araujaína aII. El N-terminal secuenciado por el método de Edman fue adicionado a la secuencia parcial y de esta manera se obtuvo la secuencia completa de la enzima, que consta de 213 aminoácidos.

La secuencia proteica obtenida de araujaína aII fue introducida en el programa GPMW para calcular algunas de las propiedades fisicoquímicas del polipéptido: masa molecular relativa (23390,66 Da), masa monoisotópica (23375,48Da), coeficiente de extinción molar a 280 nm ($48010 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) y absorptividad molar 2,053, pI con los -SH reducidos (9,36) y con -SH oxidados (10,05). El pI calculado es básico y cercano al valor experimental para araujaína aII (pI 8,5). Por su parte, el valor de masa iónica de la secuencia presenta una diferencia de 114 D en comparación al obtenido por MALDI-TOF MS (23489), lo que podría deberse a fosforilaciones, ya que en la secuencia de araujaína aII se observan motivos diana característicos para este tipo de modificaciones.

El uso del servicio BLAST permitió comprobar que la secuencia de araujiína aII presenta un grado de identidad entre el 47 y 53% con 43 proteasas cisteínicas de la subfamilia C1A, entre ellas las proteasas del látex de *Carica papaya*: caricaína (51%), glicilendopeptidasa (49%), quimopapaína (48%), y papaína (47%). El alineamiento también permitió elaborar diagramas cladísticos (cladogramas) en base a los cuales se pudo comprobar que la secuencia de araujiína aII revela un estrecho parentesco funcional con otras proteasas vegetales que integran la subfamilia C1A, así como una cercana ubicación taxonómica con las especies productoras, sugiriendo la existencia de ancestros comunes.

Con el propósito de obtener más información acerca de las relaciones filogenéticas de araujiína aII, así como de detectar la existencia de regiones altamente conservadas entre todas las proteínas homólogas y hacer una predicción de la estructura de la proteína y de la importancia de ciertas regiones en la conformación tridimensional, se recurrió al programa CLUSTAL W. Se comprobó que 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. Así, se encuentran conservados los residuos Cys25 e His159 (numeración de papaína) que 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 Gln19, a la que se atribuye la función de estabilizar el intermediario tetraédrico previsto en el mecanismo catalítico. También están conservados los residuos Phe141, Trp178 y Trp182, que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn176 y la His159. Al igual que papaína, araujiína aII contiene siete residuos de Cys, los cuales están altamente conservados: Cys25 corresponde al sitio activo, en tanto que las otras seis Cys conservadas participan de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas (Cys22-Cys56, Cys63-Cys95 y Cys150-Cys201).

Con la información existente se elaboró la estructura del modelo tridimensional de araujaína aII. A la izquierda (extremo N-terminal) se encuentra el dominio L, constituido por α hélices en cuyo extremo superior pueden observarse los residuos catalíticos Gln19 y Cys25. Este dominio está estabilizado por la presencia de dos puentes disulfuro, Cys22-Cys56 y Cys63-Cys95. En el dominio R que se presenta a la derecha se hallan los residuos catalíticos His159 y Asn176; el mismo está constituido principalmente por una estructura de barril- β y contiene un puente disulfuro entre la Cys150 y la Cys201, que le confiere estabilidad a la estructura. Al superponer las estructuras tridimensionales de araujaína aII y de papaína puede comprobarse el alto grado de solapamiento de ambas, esencialmente en las zonas correspondientes a las hélices α y a las hojas plegadas β (Fig. 13, A), hecho que aporta una visión estructural a las relaciones evolutivas ya evidenciadas por los estudios de alineamiento de secuencias previamente efectuados.

El extracto crudo de *Araujia hortorum* fue inmovilizado sobre tres tipos de soportes: poliacrilamida, poliamida y agarosa activada. La enzima inmovilizada resultó activa en los tres casos, decidiéndose utilizar los geles de agarosa activada en las reacciones de síntesis, dada la mayor estabilidad que brinda este tipo de inmovilización, lo que asegura su reutilización.

Del análisis comparativo de los resultados obtenidos en la síntesis de Z-Ala-Phe.OMe en acetato de etilo (50% v/v), se puede concluir que tanto la enzima libre como inmovilizada fueron buenos biocatalizadores bajo las condiciones de reacción establecidas. El mayor porcentaje de conversión en producto (62,25 %) se observó en la síntesis bajo control termodinámico, usando enzima libre como catalizador, en acetato de etilo al 50% (v/v), debido a la favorable partición del dipéptido en la fase orgánica, que desvía el equilibrio de la reacción hacia la formación del producto de interés. Cuando la síntesis fue llevada a cabo bajo control cinético se obtuvieron resultados similares, ya sea utilizando enzima libre o inmovilizada. Los porcentajes de conversión fueron 59,25 % y 57,5 %, respectivamente.