



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



“Búsqueda de proteasas en plantas de la Patagonia.
Purificación y caracterización de endopeptidasas
cisteínicas del látex de *Philibertia gilliesii* Hook et Arn.
(*Apocynaceae*)”



Cynthia Sequeiros

Tesis para optar al Doctorado de la Facultad de Ciencias Exactas

Dra. Claudia L. Natalucci
Directora

Año 2006

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos ellos que en mayor o en menor medida han contribuido al comienzo, desarrollo y culminación de este trabajo.

Gracias:

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET, por haberme otorgado las becas necesarias para realizar mis estudios de postgrado.

Al Centro Nacional Patagónico CENPAT-CONICET por brindarme un lugar de trabajo en mi adorada ciudad de Puerto Madryn.

Al Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE) por brindarme no sólo un lugar de trabajo sino un “ambiente” de trabajo, de discusión y de formación, ameno y solidario.

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

Al Laboratorio de Enzimología del Instituto de Biotecnología y Biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona y al Dr. F. X. Aviles por haberme recibido en su laboratorio.

Mi agradecimiento especial está dirigido a la Dra. Claudia L. Natalucci no sólo por ser mi Directora de tesis y haber cumplido su función extraordinariamente, sino por haberme levantado las tantas veces que me he caído en este transitar a la distancia, con obstáculos dificultosos de superar y muchas veces a punto de abandonar. Entonces, le digo Muchas Gracias!! a la “PERSONA” que está dentro de esa excelente DIRECTORA.

A mi Co-Directora de Tesis, la Dra. Laura M. I. López, a quien le estoy profundamente agradecida por haber invertido tanto tiempo, al estar constantemente atenta a mis reclamos a pesar de la distancia, participando de cada

una de las reuniones en las que se discutieron resultados y programaron tareas, por haber aportado su experiencia, conocimiento y críticas enriquecedoras para mi trabajo y formación. Lamento mucho que no se haya podido concretar formalmente su cargo de Co-Directora a pesar de los reiterados pedidos realizados ante esta Facultad. Vaya mi reconocimiento público y explícito a quien ha sido mi “CO-DIRECTORA” de tesis Doctoral.

Al Profesor Dr. Néstor Caffini por haberme insistido que siga en este camino y haberme brindado un desinteresado apoyo no sólo facilitándome el lugar de trabajo sino también, junto con mi Directora, duplicando la compra de equipamiento y reactivos para que pudiera desarrollar una gran parte del trabajo en Puerto Madryn. Quisiera destacar que su preocupación por nosotros “los becarios” es comparable como la de un padre por sus hijos.

A mi querida amiga, a quien extraño tanto!!, que a pesar de la distancia siempre está ahí!!!. A ella que me escucha y me entiende, porque somos muy parecidas. Gracias Pity (Silvina L. López García) por haber compartido conmigo esta etapa, así como lo hicimos mientras fuimos estudiantes de bioquímica.

A la Ing. Marina Nievas, mi amiga sureña, con quien hemos compartido muchos momentos en el CENPAT, lidiando por conseguir y resucitar equipos, poner en marcha otros, diseñar y construir celdas y equipamiento para poder realizar, a pesar de las dificultades por la lejanía y falta de recursos, nuestra tarea de becarias y llevar adelante nuestro trabajo de tesis doctoral. Sí que hemos aprendido!!!. Gracias por escucharme y tratar de entender el mundo de las proteasas!!!. Tus dudas y preguntas han disparado en mí ideas, conclusiones y detalles que seguramente no me hubieran surgido, gracias por tu PACIENCIA!!!!!!.

Al Dr. Sebastián Trejo por su tranquilidad, solidaridad, dedicación, carácter y su santa paciencia para contestarme las miles de preguntas con que lo he “bombardeado” durante el desarrollo de la tesis. Por haberme bancado en mi paso por Barcelona, gracias Sebas!!

A todos los integrantes del LIPROVE: el Profesor, Claudia, Nora, Laura, Ceci, Susana, Sandra, Julio, David, Mariela, Ma. José, Marina, Inés, Carlitos, Constanza, Santiago, Marcelo, Celeste y Sebas, con quienes he compartido

momentos que nunca olvidaré y llevaré siempre conmigo, gracias por incorporarme y hacerme sentir parte del grupo. Aunque tuvo su precio... unas cuantas tortas galesas.

...y entre la gente del CENPAT

Al Dr. José Luis Esteves por haber aceptado ser Co-Director de beca y haberme facilitado el equipamiento necesario para el desarrollo de este trabajo en el Centro Nacional Patagónico.

A la Lic. Norma De Vido de Matio por haberme cedido un espacio físico en su laboratorio y oficina para poder realizar mi trabajo cotidiano.

A la M. Sc. Lic. Any Beeskow, Lic. Vijna Mavrek y al Ing. Marcelo Quiroga quienes me ayudaron desinteresadamente en la búsqueda, recolección y clasificación del material vegetal utilizado en este trabajo de Tesis. Quiero agradecer a Any por su calidez humana tan escasa por aquellos pagos.

A la Dra. Hebe M. Dionisi por su ayuda en mis comienzos en la biología molecular, préstamo desinteresado de su equipamiento, reactivos y bibliografía tan útil para la finalización de este trabajo.

Al director del CENPAT, Dr. Néstor Ciocco, por darme la autorización para terminar de escribir parte de la tesis en mi casa.

Al grupo de Computación del CENPAT, en especial a Fernando quien ha luchado con mi computadora y que ha podido rescatar del disco rígido toda la información de mi tesis!!!.

A Enriqueta, Miriam y Carolina, integrantes de la Cátedra de Química Orgánica de la Fac. de Cs. Naturales de la Universidad Nacional de la Patagonia, quienes supieron comprenderme y brindarme su apoyo en esta etapa de escritura.

A Aurora y Normita por la compañía, los mates, las tiradas de oreja y por la sensibilidad y el afecto que me demostraron siempre, gracias por estar ahí!!.

A Lorni, con quien he compartido largas horas en el laboratorio mientras realizó su trabajo de seminario, por los cafés, almuerzos y charlas que originaron esta linda relación de amistad.

Al grupo del laboratorio de Oceanografía: Marina, Miriam, Marta, Mónica, Mauricio y Américo.

A Nelda Olivera por acercarse a mí y compartir trabajos de laboratorio desde mi llegada al Centro.

Al Ingeniero Electrónico Jorge Digniani, perteneciente al servicio de electrónica del CENPAT, quien me ha soportado pidiéndole ayuda en la restauración de viejos equipos, controladores, centrífugas, etc. para poder realizar varias de las tareas de esta tesis.

A la gente de mantenimiento, especialmente a Jorge López.

Al servicio de química del CENPAT: Jorge, Gonzalo y Nancy.

...y también Muchas Gracias a:

A Tati que con su profesionalidad y cariño me ha ayudado a organizar no sólo este trabajo sino también mi cabeza.

A todos mis amigos por la compañía y el apoyo recibido.

A toda mi Familia y en especial a mi hermana, mi cuñado y mis cariñosos sobrinitos que me han brindado un cálido y acogedor alojamiento a lo largo de estos años.

Y por sobre todo a la persona que con su paciencia, cariño, dulzura, amor, tranquilidad, inocencia y palabras justas me ha dado consejos, me ha entendido, me ha escuchado y brindado mucha fuerza. A él, a mi amigo, compañero y esposo al AMOR DE MI VIDA. Muchas gracias, Cris!!!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS	1
1.1. Importancia Biotecnológica de las Proteasas	1
1.2. Nomenclatura de las Peptidasas	3
1.3. Sistemas de Clasificación de Peptidasas	4
1.3.1. El Sistema EC de Clasificación de Peptidasas	5
1.3.2. El Sistema MEROPS de Clasificación de Peptidasas	7
1.3.2.1. Clanes y familias de peptidasas cisteínicas	9
1.3.2.1.1. <i>Clan CA</i>	11
1.3.2.1.2. <i>Familia C1</i>	13
1.3.2.1.2.1. <i>Subfamilia C1A</i>	13
1.3.2.1.2.2. <i>Subfamilia C1B</i>	14
1.4. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas	15
2. PROTEASAS VEGETALES	19
2.1. Rol de las Enzimas Proteolíticas en los Vegetales	19
2.2. Síntesis y Localización Intracelular de Proteasas Cisteínicas en Vegetales	21
2.3. Proteasas de Látex	22
2.3.1. Características del Látex	22
2.3.2. Características de los Tubos Laticíferos	23
2.3.3. Proteasas Obtenidas a Partir de Látex	25
3. REGIÓN FITOGEOGRÁFICA DE LA PATAGONIA	26
3.1. Flora Patagónica	26
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. BÚSQUEDA DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE PROTEASAS	30

2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	31
2.1. <i>Euphorbia collina</i>	31
2.2. <i>Euphorbia peplus</i>	32
2.3. <i>Colliguaja integerrima</i>	33
2.4. <i>Stillingia patagonica</i>	34
2.5. <i>Philibertia gilliesii</i>	35
2.6. <i>Grindelia chiloensis</i>	36
3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTIVOS EMPLEADOS EN LA SELECCIÓN INICIAL	37
4. EXTRACTIVOS OBTENIDOS A PARTIR DEL LÁTEX DE LA ESPECIE SELECCIONADA	38
4.1. Obtención de Extractos Crudos	38
4.2. Obtención de Extractos Clarificados	38
4.3. Obtención de Extractivos para la Determinación de Actividad Carboxipeptidásica e Inhibitoria de Carboxipeptidasa A	38
5. CONTENIDO DE PROTEÍNAS	39
5.1. Determinación por el Método de Bradford	39
5.2. Determinación por Medida Directa de la Absorbancia	39
6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	40
6.1. Caseína	40
6.1.1. Preparación del Sustrato	40
6.1.2. Desarrollo de las Hidrólisis	40
6.1.3. Cálculo de la Actividad Enzimática	40
6.2. Azocaseína	41
6.2.1. Preparación del Sustrato	41
6.2.2. Desarrollo de las Hidrólisis	41
6.2.3. Cálculo de la Actividad Enzimática	41
7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SOBRE SUSTRATOS SINTÉTICOS	42
7.1. Derivados N- α -carbобензохи-p-nitrofenil Ésteres de Aminoácidos (N-CBZ-aa)	42
7.2. L - piroglutamil - L - fenilalanil - L - leucina - p-	44

nitroanilida	
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARBOXIPEPTIDÁSICA	44
9. EFECTO DE LA CISTEÍNA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PHILIBERTAÍNA G	45
9.1. Preactivación del Extracto Enzimático	45
9.2. Efecto de la Cisteína en la Mezcla de Reacción	45
10. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE GRUPO	45
10.1. Efecto de Inhibidores Específicos Sobre la Actividad Endopeptidásica	46
10.2. Efecto de Inhibidores Específicos de la Actividad Amidásica	47
10.3. Efecto de la Preactivación del Extracto Enzimático sobre la Inhibición con AIA	47
11. EFECTO DE AGENTES QUÍMICOS	48
12. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA	49
12.1. Efecto de las Bajas Temperaturas Sobre la Actividad Proteolítica	49
12.2. Efecto de la Liofilización Sobre la Actividad Proteolítica	49
13. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	50
14. ESTABILIDAD EN EL RANGO DE PH DE MAYOR ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	50
15. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA	50
16. ESTABILIDAD TÉRMICA	51
17. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS	51

18. HIDROLISIS DE PROTEÍNAS DE PESCADO	52
18.1. Obtención del Agua de Cola	52
18.2. Obtención de la Fracción Soluble y de la Fracción Insoluble	53
18.3. Determinación de la Composición Química del Agua de Cola	53
18.3.1 Sólidos Totales	53
18.3.2 Cenizas	53
18.3.3 Nitógeno Total	54
18.4. Preparación de las Muestras Proteicas para el Posterior Análisis por Electroforesis	54
18.4.1 Solubilización de las Proteínas con Buffer de Muestra	54
18.4.2. Solubilización de las Proteínas en Presencia de Urea	54
18.5. Hidrólisis Controlada de Proteínas de Pescado	55
18.5.1. Determinación del Grado de Hidrólisis	56
18.5.2. Obtención de Muestras de los Hidrolizados para su Análisis Electroforético	56
19. HIDRÓLISIS CONTROLADA DE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA	57
19.1. Obtención del Sustrato	57
19.2. Desarrollo de las Hidrólisis	57
19.3. Obtención de Muestras de los Hidrolizados para su Análisis Electroforético	58
20. COAGULACIÓN DE LECHE BOVINA	58
21. PURIFICACION	59
21.1. Purificación Preliminar por Precipitación Acetónica Fraccionada	59
21.2. Purificación Cromatográfica de Intercambio Iónico	60
21.2.1. Selección de los Parámetros Cromatográficos	60
21.2.1.1. Cromatografía inicial	60
21.2.1.2. Variación del gradiente salino	60
21.2.1.3. Variación del pH	61
21.2.1.4. Variación del sistema buffer	61
21.2.1.5. Variaciones en el sistema de elución	61
21.3. Purificación Cromatográfica de Exclusión Molecular	63
21.3.1. Preparación de la Muestra y Condiciones de	63

Corrida en Baja Fuerza Iónica	
21.3.2. Preparación de la Muestra y Condiciones de Corrida en Alta Fuerza Iónica	63
22. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLI-ACRILAMIDA	64
22.1. Electroforesis Nativa	64
22.1.1. Preparación de las Muestras	64
22.1.2. Preparación de los Geles	64
22.1.2.1. Gel en gradiente	64
22.1.2.2. Gel homogéneo con gel de apilamiento	65
22.1.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	66
22.1.4. Fijación y Coloración	67
22.2. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente	67
22.2.1. En Condiciones Reductoras	67
22.2.1.1. Preparación de las muestras	67
22.2.1.2. Preparación de los geles	68
22.2.1.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida	69
22.2.1.4. Fijación y coloración	69
22.2.1.4.1. <i>Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	69
22.2.1.4.2. <i>Tinción con Plata</i>	69
22.2.1.4.2.1. <i>Fijación</i>	70
22.2.1.4.2.2. <i>Lavado y sensibilización de los geles</i>	70
22.2.1.4.2.3. <i>Tratamiento con solución de nitrato de plata</i>	70
22.2.1.4.2.4. <i>Desarrollo de la coloración</i>	71
22.2.2. En Condiciones No Reductoras	71
22.2.2.1. Preparación de las muestras	71
22.2.2.2. Preparación de los geles	72
22.2.2.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida	72
22.2.2.4. Acondicionamiento de los geles destinados a la detección de actividad	72
22.2.2.5. Fijación y coloración	72
22.3. Electroforesis Desnaturalizante Discontinua con Sistema Buffer Tris-Glicina (SDS-PAGE)	73
22.3.1. Preparación de las Muestras	73
22.3.2. Preparación de los Geles	73
22.3.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	74
22.3.4. Fijación y Coloración	74
22.4. Electroforesis Desnaturalizante Discontinua con Sistema Buffer Tris- Tricina (SDS-Tricina-PAGE)	74
22.4.1. Preparación de las Muestras	75

22.4.2. Preparación de los Geles	75
22.4.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	76
22.4.4. Fijación y Coloración	76
23. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA	76
23.1. Preparación de las Muestras	77
23.2. Preparación de los Geles	77
23.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida	78
23.4. Revelado	78
23.5. Estimación de los Tamaños Moleculares	78
24. ISOELECTROENFOQUE	79
24.1. Preparación de las Muestras	79
24.2. Preparación de los Geles	80
24.3. Aplicación de las Muestras	81
24.4. Desarrollo del Isoelectroenfoque	81
24.5. Fijación y Coloración	81
24.6. Estimación de los Puntos Isoeléctricos	82
25. REVELADO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA POR MEDIO DE ZIMOGRAMA	83
25.1. Preparación de las Placas de Agarosa-Caseína	83
25.2. Incubación	84
25.3. Fijación y Coloración	84
26. DIGITALIZACIÓN Y ANÁLISIS DENSITOGRAFICO DE LOS GELES	85
26.1. Captura de los Geles	85
26.2. Análisis de los Geles por Densitografía	85
27. DESALADO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO TUBOS DE ULTRAFILTRACIÓN PARA CENTRÍFUGA	85
28. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS	86
29. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	86
29.1. Preparación de las Muestras	86
29.2. Obtención de los Espectros de Masas	87

30. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS AMINO-ACÍDICAS	87
31. OBTENCIÓN DE ADNC A PARTIR DE ARNms QUE CODIFICAN PARA PROTEASAS CISTEÍNICAS DE <i>PHILIBERTIA GILLIESII</i>	88
31.1. Diseño de Cebadores Específicos	88
31.2. Obtención de ARN Total	90
31.3. Reacción de Retrotranscripción y Amplificación (RT-PCR)	91
32. REACCIÓN DE PCR	92
33. NESTED PCR A PARTIR DE ADNc	93
34. EXTRACCIÓN DE ADNC DESDE EL GEL DE AGAROSA	93
35. CLONADO DE LOS FRAGMENTOS DE ADNc	94
35.1. Ligación de los Fragmentos de Interés a un Vector	94
35.1.1. Características del Vector	94
35.1.2. Ligación Propiamente Dicha	95
35.2. Transformación en Células Competentes	96
35.2.1. Preparación de las Células Competentes (<i>Escherichia coli</i>)	96
35.2.1.1. Material para el cultivo de microorganismos	97
35.2.1.1.1. Medios de cultivo líquidos	97
35.2.1.1.2. Medios de Cultivo Sólidos	97
35.2.1.1.3. Reactivos adicionales	98
35.2.2. Procedimiento de Transformación y Cultivo Celular	99
35.2.3. Selección de las Colonias de Interés (Clones)	99
35.2.4. Glicerinado y Conservación de los Clones Seleccionados	100
36. SECUENCIAMIENTO DE LOS FRAGMENTOS DE INTERÉS	100
36.1. Obtención de Plásmidos Purificados	100
36.2. Digestión de los Plásmidos con Enzimas de Restricción	101
36.3. Secuenciación del ADN Clonado	101

37. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS	101
37.1. Cladograma	102
37.2. Búsqueda de Secuencias Homólogas	102
38. MODELADO POR HOMOLOGÍA	103
38.1. Superposición de Estructuras	104
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106
1. SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE PROTEASAS	106
1.1. Actividad Proteolítica de los Extractos Clarificados	106
1.2. Efecto de Inhibidores Específicos	107
1.3. Análisis del Perfil Electroforético	108
1.3.1. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente	108
1.3.2. Electroforesis Nativa y Zimograma	109
1.3.3. Isoelectroenfoque	110
1.3.4. Isoelectroenfoque con Zimograma	111
2. ESPECIE SELECCIONADA: <i>PHILIBERTIA GILLIESII</i>	113
2.1. Características de los Frutos	113
2.2. Obtención y Conservación de los Extractos Enzimáticos	114
2.2.1. Conservación de las Preparaciones Enzimáticas	114
2.2.1.1. Efecto del almacenamiento a bajas temperaturas	115
2.2.1.1.1. <i>Efecto de la conservación a 8 °C y – 20 °C.</i>	115
2.2.1.1.2. <i>Almacenamiento a – 20 °C por períodos más prolongados.</i>	116
2.2.1.2. Efecto de la liofilización	116
2.3. Caracterización de Philibertaína g	117
2.3.1. Preactivación de la Enzima por el Agregado de Cisteína	117
2.3.2. Efecto del Agregado de Cisteína en la Mezcla de Reacción	118
2.3.3. Actividad Endopeptidásica	120
2.3.4. Actividad Endoesterolítica	120
2.3.5. Actividad Carboxipeptidásica	121
2.3.6. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica	122
2.3.6.1. Perfil de pH	122

2.3.6.2. Estabilidad al pH	123
2.3.7. Estabilidad a la Temperatura	123
2.3.8. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la Actividad Proteolítica	125
2.3.9. Efecto de Agentes Químicos	126
2.3.10. Inhibición con Acido Iodoacético del Extractivo Enzimático	126
2.3.11. Caracterización Electroforética	128
2.3.11.1. Electroforesis nativa con polaridad invertida y zimograma	128
2.3.11.2. Comparación entre los perfiles obtenidos por electroforesis desnaturizante reductora y no reductora	129
2.3.11.3. Isoelectroenfoque con zimograma	131
3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS CON POSIBLE APLICACIÓN INDUSTRIAL	133
3.1. Hidrolizados de Agua de Cola	133
3.1.1. Caracterización Físicoquímica y Análisis Electroforético del Agua de Cola	133
3.1.2. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Agua de Cola y Análisis por SDS-PAGE de los Péptidos Obtenidos	135
3.2. Ensayos de Coagulación de Leche	139
3.3. Hidrolizados Parciales de Caseínas de Leche Vacuna	141
3.3.1. Análisis por SDS-Tricina-PAGE de los Péptidos Obtenidos	141
4. PURIFICACION DE ENDOPEPTIDASAS A PARTIR DE PHILIBERTAÍNA G	144
4.1. Precipitación Acetónica Fraccionada	144
4.2. Cromatografía de Intercambio Iónico	145
4.2.1. Selección de los Parámetros Cromatográficos	145
4.2.2. Condiciones Cromatográficas Seleccionadas para la Purificación	151
4.2.2.1. Análisis electroforético de las diferentes fracciones cromatográficas	152
4.2.2.2. Análisis por IEF de las diferentes fracciones	153
4.2.2.3. Esquema de Purificación de Philibertaína g I	154
4.3. Caracterización de Philibertaína g I	155
4.3.1. Determinación de la Masa Molecular	156

4.3.2. Determinación de la Secuencia del Péptido N-terminal	156
4.3.3. Efecto de la Concentración Salina sobre la Actividad Enzimática	158
4.3.4. Perfil de pH	158
4.3.4.1. Utilizando caseína como sustrato	158
4.3.4.2. Utilizando PFLNA como sustrato	159
4.3.4.3. Determinación de parámetros cinéticos sobre el sustrato sintético PFLNA	160
4.3.4.4. Efecto de inhibidores	161
4.4. Purificación de Philibertaína g II	162
4.4.1. Cromatografía de Exclusión Molecular a Baja Fuerza Iónica	163
4.4.1.1. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas	164
4.4.2. Cromatografía de Exclusión Molecular con NaCl 0,3 M	165
4.4.2.1. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas	166
4.4.3. Caracterización de Philibertaína g II	168
4.4.3.1. Isoelectroenfoque y zimograma	168
4.4.3.2. Secuencia N-terminal	169
4.4.3.3. Masa molecular	171
5. CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE <i>PHILIBERTIA GILLIESII</i>	172
5.1. Obtención de ADNc a Partir de ARN total	172
5.1.1. Diseño de Cebadores Específicos	172
5.1.2. Obtención de ADNc a Partir del ARN Total	173
5.2. Clonación de los Fragmentos Amplificados	175
5.3. Análisis de las Secuencias Obtenidas	177
5.3.1. Análisis de la Estructura Primaria	180
5.4. Estructura Terciaria, Modelo Tridimensional (3D)	184
5.4.1. Organización Global	184
5.4.2. Superposición Tridimensional de las Estructuras Obtenidas por Homología con Estructuras Conocidas Obtenidas por Cristalografía	186

CONCLUSIONES

188

1. SELECCIÓN DE ESPECIES DE LA REGIÓN PATAGÓNICA Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL

188

DE SUS PROTEASAS

2. ESPECIE SELECCIONADA: <i>PHILIBERTIA GILLIESII</i>	189
3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS CON POSIBLE APLICACIÓN INDUSTRIAL	189
4. PURIFICACION DE ENDOPEPTIDASAS A PARTIR DE PHILIBERTAÍNA G	190
4.1. Cromatografía de Intercambio Iónico	190
4.2. Caracterización de Philibertaína g I	191
4.3. Purificación de Philibertaína g II	191
5. CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE <i>PHILIBERTIA GILLIESII</i>	192
6. RESUMEN	194
7. PERSPECTIVAS FUTURAS DEL TRABAJO	196
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	197

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
ACN	Acetonitrilo
AD	Agua destilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIA	Ácido iodoacético
Amp ^r	Resistencia a ampicilina
AMPSO	Ácido 3-[(1,1-dimetil-2-hidroxietil)amino]-2-hidroxiopropanosulfónico
AOAC	Asociación de químicos analíticos oficiales (Association of Official Analytical Chemists)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARN _T	ARN total
BLAST	Herramienta de búsqueda de alineamientos básico local (Basic local alignment search tool)
BM	Buffer de muestra
<i>Buffer</i>	Solución amortiguadora
<i>Ca.</i>	del latín circa: aproximadamente, cerca de
CAPS	Ácido 3-(ciclohexilamino)-1-propanosulfónico
CENPAT	Centro Nacional Patagónico
<i>Cfr.</i>	del latín confere: compárese, confronte, véase, confróntese
CPA	Carboxipeptidasa A
<i>c.s.p.</i>	Cantidad suficiente para
CTLA-2	Antígeno citotóxico de linfocitos-T
CU	Unidades coagulantes
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
dominio L	Dominio izquierdo de la molécula
dominio R	Dominio derecho de la molécula
DTT	Ditiotreitol

E-64	N-[N ⁷ -(L-3-trans-carboxyoxiran-2-carbonil)-L-leucil] agmatina
EC	Comité de Enzimas del Comité de Nomenclatura de la IUBBM
EcoRI	Enzima de restricción
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético (sal disódica)
ERFNIN	Motivo conservado del propéptido
E/S	Relación enzima sustrato
<i>et al</i>	y otros, y colaboradores
ExPDB	Extensión de archivos de estructuras de proteínas utilizados por Swiss-Model
FI	Fracción insoluble
FPLC	Fast protein liquid chromatography
<i>Freezer</i>	Congelador de -20 °C
FS	Fracción soluble
<i>g</i>	Gravedad
GH	Grado de hidrólisis
Gi	Número de identificación de una versión de la secuencia de la molécula que ha sido depositada en la base de datos del NCBI
HABA	2-(4-hidroxifenilazo) benzoico
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
I	Introducción
ID	Número de identificación
IEF	Isoelectroenfoque
IgE	Inmunoglobulina E
<i>in vitro</i>	en vidrio, en tubo de ensayo
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactósido
IUBBM	Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
k_{cat}	Constante catalítica
K_m	Constante de Michaelis
<i>lac Z</i>	Operon lactosa
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LIPROVE	Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (UNLP)
MALDI-TOF MS	Espectrometría de masas con desorción /ionización con láser asistida por una matriz, analizador por tiempo de vuelo (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight MS)
MEROPS	Base de datos de proteasas e inhibidores (http://www.merops.co.uk)
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico

M.Sc.	Título de Master (Master Science)
MS	Espectrometría de masas
M&M	Materiales y métodos
m/z	Relación masa/carga
N	Nitrógeno total determinado por Kjeldhal
N-CBZ-aa	N-carbobenzoxi aminoácido
NC-IUBMB	Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular
NEWT	Base de datos taxonómica de SWISS-PROT (http://www.ebi.ac.uk/newt/)
NMWL	Límite nominal de peso molecular
n. v.	Nombre vulgar
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Extensión de archivos de estructuras de proteínas (Protein Data Bank)
PepC	peptidasa C
PEPP	Preparación enzimática parcialmente purificada
PFLNA	L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida
<i>pI</i>	Punto isoeléctrico
PM	Peso Molecular
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
<i>primers</i>	cebadores
<i>probes</i>	sondas
PSA	Persulfato de amonio
PVDF	Difluoruro de polivinilo
RE	Retículo endoplásmico
RID	Numero de identificación de ingreso en Blast
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMS	Valor medio de raíz cuadrada (Root Mean Square)
RNasa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción de retrotranscripción seguida de una PCR
R&D	Resultado y discusión
SA	Ácido sinapínico (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)
SDS	Dodecilsulfato de sodio

SIM	Programa de selección de moldes empleado por Swiss-Model
SP-Sepharose Fast Flow	Relleno de Sulfopropil sefarosa para flujo rápido (SP) para cromatografía de intercambio catiónico.
SWISS-MODEL	Servidor de modelado por homología de proteínas (http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html)
SWISS-PROT	Base de datos de secuencias de proteínas (http://www.ebi.ac.uk/swissprot/)
TAE	Buffer Tris-Ácido acético-EDTA
TAPS	Ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido trifluoroacético
TIFF	Extensión de archivos de imágenes
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
U _{azocas}	Unidades azocaseinolíticas
U _{cas}	Unidades caseinolíticas
U _{CBZ}	Unidades CBZ
UNLP	Universidad Nacional de La Plata
UV	Ultravioleta
V ₀	Velocidad inicial
V _m	Velocidad máxima
XK 16/40	Modelo de columna cromatográfica Pharmacia
X-Gal	5-Br-4-Cl-3-Indol-β-D-galactósido
2X	Solución o <i>buffer</i> de doble concentración
3D	Tridimensional
%T	Parámetro de Tjerten [(g acrilamida + g bisacrilamida) x 100/ volumen total]
%C	Parámetro de Tjerten [g bis-acrilamida x 100 / (g acrilamida + g bisacrilamida)]

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Las enzimas proteolíticas son hidrolasas que catalizan la ruptura de la unión peptídica, por lo que participan en todas las reacciones que impliquen la degradación de proteínas. Pueden producir modificaciones altamente específicas, tales como la conversión de prohormonas en hormonas (Green, 1984), el clivaje de péptidos señal de proteínas de secreción o asociadas a membranas (Lively & Ashwell, 1999) o la activación de zimógenos (Stennicke & Salvesen, 2000); en todas las células es fundamental su participación en el recambio proteico intracelular y la apoptosis. En animales intervienen en procesos tales como la coagulación de la sangre, la lisis o disolución del coágulo de fibrina y la digestión (donde actúan las enzimas pancreáticas tripsina y quimotripsina). En vegetales podemos mencionar su participación en la germinación -degradando las proteínas de reserva-, en la regulación de los procesos biológicos del desarrollo y el crecimiento de órganos vegetativos, en la defensa contra patógenos y en procesos de senescencia. (Gepstein *et al.*, 2003). En microorganismos participan en la esporulación, en la incorporación de nutrientes tales como aminoácidos o pequeños péptidos obtenidos por acción de proteasas extracelulares y en múltiples reacciones intracelulares (Rao *et al.*, 1998).

1.1. Importancia Biotecnológica de las Proteasas

Desde hace ya varios años, el mercado mundial de enzimas está casi monopolizado por las hidrolasas, que representan alrededor del 75 % de las enzimas que se comercializan con diferentes propósitos industriales. Dentro de ellas las proteasas representan uno de los tres grupos más importantes y

abarcan aproximadamente el 60 % del total de enzimas comercializadas (Rao *et al.*, 1998).

No existen dudas de que los resultados de la búsqueda y caracterización de enzimas proteolíticas han beneficiado a la humanidad de diferentes formas y todo hace prever que lo seguirá haciendo en el futuro. La enzimología ha experimentado grandes avances al igual que sus aplicaciones tecnológicas. Una de las más claras indicaciones al respecto la constituyen las enormes ventas anuales de la industria farmacéutica relacionada con diferentes aplicaciones de las peptidasas en el campo de la salud humana (Barret, 1999). Son bien conocidos los usos de la quimopapaína en el tratamiento de hernias de disco y de la bromelaína y ananaína en el tratamiento de heridas (Rawlings *et al.*, 2006). Por otra parte es necesario mencionar la importancia de su conocimiento por ser drogas "blanco" al participar en diferentes etapas de varias enfermedades; la familia C1 contiene muchas drogas "blanco" tales como la catepsina B en el cáncer (Podgorski & Sloane, 2003), la catepsina S en el control de presentación de antígenos (Driessen *et al.*, 1999) y, potencialmente, para la atenuación de la respuesta inmune, la catepsina K en la osteoporosis y la catepsina L por su rol en el procesamiento de antígenos y en el metabolismo de células tumorales.

Existen además variados ejemplos de procesos industriales en los que son utilizadas las enzimas proteolíticas. Los más frecuentes están relacionados a la industria alimentaria, entre los que se pueden mencionar la tiernización de carnes por hidrólisis parcial de las proteínas del tejido conectivo y las de las mismas fibras musculares; la panificación, donde las proteasas se adicionan para mejorar la manipulación de la masa, así como mejorar su elasticidad y la textura del gluten lográndose un incremento sustancial del volumen y la consiguiente reducción del tiempo de amasado; la producción de cerveza en la que las enzimas proteolíticas permiten mantener una adecuada proporción de proteína coloidal, logrando que la cerveza tenga "cuerpo" y produzca espuma abundante y duradera a bajas temperaturas; en la elaboración de quesos las proteasas se emplean para coagular la leche y, eventualmente, obtener sabores diferentes durante su maduración; además la hidrólisis parcial de diferentes

proteínas permite incrementar su solubilidad, capacidad emulgente y poder espumígeno u obtener hidrolizados proteicos adecuados para elaborar productos especiales para personas con dificultades alimentarias (Iizuka & Aishima, 1999 y 2000). Otra industria que emplea grandes cantidades de enzimas proteolíticas, habitualmente asociadas a lipasas y amilasas, es la de la fabricación de polvos detergentes. Por su parte, en la industria textil muchos tipos de fibras deben ser "encoladas" para aumentar la resistencia a la tracción y a la abrasión y el hilado requiere ser luego "desencolado" para lo que se utilizan proteasas. Además, en la industria del cuero las proteasas se emplean en la depilación de la piel y en el "batido", que permite la remoción de restos de pelos, glándulas, células epiteliales y tejidos superficiales (Bajza & Vreck, 2001). En el tratamiento de efluentes industriales el uso de proteasas permite reducir la viscosidad de líquidos con alto contenido proteico, facilitando su transporte a través de los conductos de desagote y proveyendo un material fácilmente biodegradable (Mantell *et al.*, 1986; Uhlig, 1998).

1.2. Nomenclatura de las Peptidasas

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

Las peptidasas comprenden dos grandes grupos de enzimas: las *endopeptidasas* y las *exopeptidasas*, que rompen uniones peptídicas en diferentes zonas del interior de la proteína o que remueven secuencialmente uno o más aminoácidos desde los extremos carboxilo o amino, respectivamente (Barrett, 2001).

1.3. Sistemas de Clasificación de Peptidasas

En la actualidad, se pueden reconocer algo más de 2000 peptidasas diferentes y su número aumenta día a día (Rawlings *et al.*, 2006). Esto ha llevado a la necesidad de contar con un sistema adecuado para su clasificación y nomenclatura.

A diferencia de casi todas las demás enzimas, la especificidad de sustrato de las peptidasas 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, de este modo se diferenciaron cuatro grupos: serínicas, cisteínicas, aspárticas (primeramente denominadas proteasas ácidas) y metalopeptidasas. En la actualidad se ha incluido el grupo de las proteasas treonínicas. Cada uno de los tipos de proteasas mencionadas posee un mecanismo catalítico distintivo, aunque pueden agruparse en dos grandes categorías: las que forman complejos covalentes entre la enzima y el sustrato (serínicas, cisteínicas y treonínicas) 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. Los grupos químicos específicos que participan en las distintas etapas de la proteólisis son diferentes en los cinco tipos de proteasas mencionadas, pero el resultado neto es el mismo.

Las peptidasas serínicas, cisteínicas y treonínicas son catalíticamente muy diferentes a las aspárticas y a las metalopeptidasas; el nucleófilo del sitio catalítico de las primeras es parte de un aminoácido (serina, cisteína o treonina, respectivamente), en tanto que en los dos últimos tipos 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.

1.3.1. 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 enzimas, agrupándolas en seis **clases**: Oxidorreductasas (EC 1), Transferasas (EC 2), Hidrolasas (EC 3), Liasas (EC 4), Isomerasas (EC 5) y Ligasas (EC 6).

Una de las clases más abundantes es la de las hidrolasas, que rompen uniones covalentes por incorporación de una molécula de agua. Dentro de ella se encuentra la **subclase** EC 3.4, que está constituida por las enzimas que hidrolizan específicamente las uniones peptídicas (peptidasas) y que a su vez contiene catorce diferentes **sub-subclases**, como se muestra en la Tabla 1.

Sub-subclase	Tipo de peptidasa
EC 3.4.11	Aminopeptidasas (20)
EC 3.4.13	Dipeptidasas (11)
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 (18)
EC 3.4.18	Carboxipeptidasas cisteínicas (1)
EC 3.4.19	Omega peptidasas (9)
EC 3.4.21	Endopeptidasas serínicas (84)
EC 3.4.22	Endopeptidasas cisteínicas (40)
EC 3.4.23	Endopeptidasas aspárticas (37)
EC 3.4.24	Metaloendopeptidasas (80)
EC 3.4.25	Endopeptidasas treonínicas (1)
EC 3.4.99	Endopeptidasas de mecanismo desconocido (0)

Tabla 1. Sistema EC de clasificación de peptidasas. El número entre paréntesis indica el número de entradas registradas hasta la fecha según el Comité de Nomenclatura Bioquímica (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC34/index.html>)

Según la localización de los enlaces, dentro de la molécula de proteína, que son hidrolizados se pueden reconocer dos grandes grupos de peptidasas: el primero de ellos incluye a las *exopeptidasas* (EC 3.4.11 a 3.4.19) y el segundo a las *endopeptidasas* (EC 3.4.21 a 3.4.25 y EC 3.4.99).

Las *exopeptidasas* actúan únicamente en los extremos de la cadena polipeptídica. Las que hidrolizan desde el N-terminal pueden liberar un único residuo aminoacídico (aminopeptidasas, EC 3.4.11) o un di- o un 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 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).

Las *endopeptidasas* hidrolizan uniones peptídicas internas de las cadenas proteicas. 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+}). Más recientemente se han encontrado peptidasas con un residuo treonina en lugar de serina en su sitio activo (Seemüller *et al.*, 1995) por lo que en el año 2000 fue creada la sub-subclase EC 3.4.25, que posee una única entrada asignada hasta la fecha.

Schechter & Berger (1967) han propuesto un modelo conceptual para referirse a la especificidad de una peptidasa. En este modelo se consideran los diferentes residuos de aminoácido del sustrato (P) que se unen a los correspondientes subsitios del sitio activo de la enzima (S). Estos residuos se

numeran a partir del enlace a ser escindido como P1, P2, P3, etc. hacia el N-terminal, en tanto que se denominan P1', P2', P3', etc. los que se encuentran hacia el C-terminal. Los subsitios de la peptidasa que “acomodan” los correspondientes residuos del sustrato se numeran como S1, S2, S3 y S1', S2', S3', respectivamente, (Figura 1).

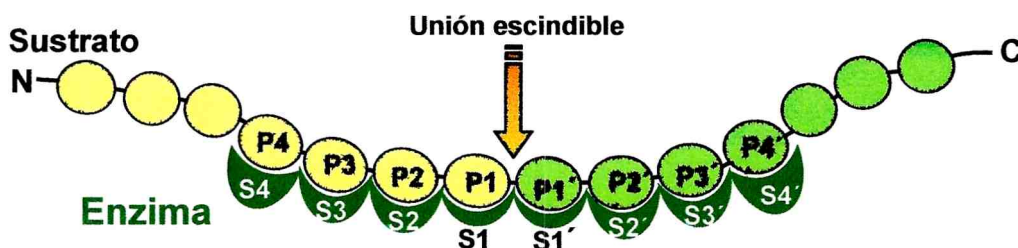


Figura 1. Esquema representativo del sistema de nomenclatura de Schechter y Berger para los subsitios del sitio activo de una peptidasa.

1.3.2. El Sistema MEROPS de Clasificación de Peptidasas

Este sistema de clasificación para peptidasas ha sido propuesto por Rawlings & Barrett en 1993 y fue enriquecido a través de sucesivas comunicaciones (Rawlings & Barrett, 1994 a,b y 1995 a,b), dando lugar finalmente a la base de datos MEROPS (<http://www.merops.co.uk>), un sistema de clasificación de peptidasas que se basa en una construcción jerárquica sobre los conceptos de tipo catalítico, clan, familia y peptidasa.

El tipo catalítico de una peptidasa está relacionado con la naturaleza química de los grupos que participan en la reacción de catálisis del mismo modo que fuera establecido por Hartley (1960). Los tipos catalíticos reconocidos en este sistema de clasificación son los ya nombrados en el ítem anterior: el cisteínico (C), el serínico (S), el treonínico (T), el aspático (A), el de las metalo proteasas (M) y el de aquellas peptidasas que aún no han sido clasificadas (U, unclassified). Desde el año 2004, a partir de la publicación de Fujinaga *et al.* (2004), MEROPS ha reconocido un nuevo tipo catalítico de peptidasas: las peptidasas glutámicas (G), aún no aceptado en el sistema EC.

La letra inicial en mayúscula de cada tipo catalítico es usada para dar nombre a las familias y clanes (Tabla 2). Los clanes y familias son grupos de

peptidasas homólogas. Un clan contiene una o más familias que parecen provenir de un único ancestro. La homología a nivel de **clan** está dada por la similitud en sus estructuras terciarias o, cuando sus estructuras no están disponibles, por el orden de los residuos del sitio catalítico en la cadena polipeptídica y a veces por los motivos (a nivel de estructura suprasecundaria) de secuencias comunes alrededor de los residuos catalíticos. Una **familia** está constituida por un grupo de peptidasas en el que la similitud está dada a nivel de secuencia aminoacídica, con prioridad en la zona de la molécula responsable de la actividad peptidásica (Barrett *et al.*, 2004).

Los nombres de los clanes están formados por la letra inicial y mayúscula correspondiente al tipo catalítico, seguida de una segunda letra mayúscula asignada en forma secuencial. Algunos clanes contienen familias de peptidasas de más de un tipo catalítico (cisteínicas, serínicas y treonínicas) y en ese caso la letra usada para identificar el clan es la “P”. Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico seguida de un número también asignado en forma secuencial. Algunas familias contienen dos o más grupos de peptidasas con cierto grado de diferencias tal que permiten agruparlas en subfamilias.

Cada peptidasa tiene asignado un único identificador dado por el nombre de la familia separado por un punto decimal del número arbitrario de tres dígitos.

Nivel	Descripción	Identificadores
Clan	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, G, M, P, S, T, U
Familia	Una familia incluye peptidasas que presentan homología en su secuencia aminoacídica	A, C, G, M, S, T, U
Peptidasa	Una peptidasa se distingue de las demás por diferencias en la actividad, estructura u origen genético	A, C, G, M, S, T, U

Tabla 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; G: glutámicas; 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 (Rawlings *et al.*, 2006).

1.3.2.1. Clanes y familias de peptidasas cisteínicas

Las peptidasas en las que el nucleófilo que ataca la unión peptídica escindible es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína (Cys) son conocidas como peptidasas de tipo cisteínico. El mecanismo catalítico es similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas, en las que se requieren un nucleófilo y un donador de protón; el donador de protones en todas las peptidasas cisteínicas en las que se lo ha identificado es un residuo de histidina (His), tal como ocurre en la mayoría de las peptidasas de tipo serínico y treonínico. En algunas familias sólo la díada Cys-His parece ser esencial para la catálisis, mientras que en otras hay evidencias de que se requiere un tercer residuo para orientar adecuadamente el anillo imidazol de la His (Barrett *et al.*, 2004). Las peptidasas cisteínicas actualmente se clasifican en siete clanes y tres subclanes, las familias que los constituyen, así como los residuos catalíticos y la estructura secundaria característicos se indican en la Tabla 3

Clan o Subclan	Familia o Subfamilia	Enzima representativa
CA <i>Residuos catalíticos:</i> Gln, Cys, His, Asn (ó Asp) <i>Plegamientos:</i> hélices y barril β	C1A	Papaína (<i>Carica papaya</i>)
	C1B	Bleomicina hidrolasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	C2	Calpaína 2 (<i>Homo sapiens</i>)
	C6	Proteinasa de potivirus (virus Y de papa)
	C7	Endopeptidasa p29 del virus del tizón del castaño (<i>Cryphonectria hypovirus</i>)
	C8	Endopeptidasa p48 del virus del tizón del castaño (<i>Cryphonectria hypovirus</i>)
	C9	Endopeptidasa nsP2 del virus Sindbis (<i>Sindbis virus</i>)
	C10	Streptopapaína (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
	C12	Ubiquitina C-terminal hidrolasa Uch-L1 (<i>Homo sapiens</i>)
	C16A	Endopeptidasa 1 del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C16B	Endopeptidasa 2 del coronavirus de la hepatitis de ratón
	C19	Proteasa 14 específica para ubiquitina (<i>Homo sapiens</i>)
	C21	Endopeptidasa de timovirus (virus del mosaico amarillo del nabo)
	C23	Endopeptidasa del carlavirus (virus que ataca el tallo de manzana)

C27	Endopeptidasa del virus de la rubéola
C28	L. proteinasa del virus de la aftosa
C31	α -Endopeptidasa del arterivirus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino
C32	Proteinasa cisteínica del virus de la arteritis equina
C33	Proteinasa cisteínica del arterivirus equino Nsp2
C36	Endopeptidasa del furovirus de la necrosis amarilla de las nervaduras de remolacha
C39	Peptidasa procesadora de bacteriocina (<i>Pediococcus acidilactisi</i>)
C40	dipeptidyl-peptidasa VI (<i>Bacillus sphaericus</i>)
C42	Endopeptidasa del virus de la remolacha amarilla
C47	Stafopaina (<i>Staphylococcus aureus</i>)
C51	D-Alanil-Glicil endopeptidasa (<i>Staphylococcus aureus</i>)
C54	Peptidasa Aut2 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
C58	Peptidasa Yop T (<i>Yersinia pestis</i>)
C64	Peptidasa deubiquitinadora de cezanne (<i>Homo sapiens</i>)
C65	Otubain-1 (<i>Homo sapiens</i>)
C66	Peptidasa IdeS (<i>Streptococcus pyogenes</i>)
C67	Proteína CylD (<i>Homo sapiens</i>)
C71	Endoisopeptidasa pseudomureína Pei (<i>Methanobacterium phage psiM2</i>)
C72	HopPtoN g.p. (<i>Pseudomonas syringae</i>)
C76	Peptidasa deubiquitinadora de UL36 (<i>Human herpesvirus 1</i>)
Subclan PA (C)	
<i>Residuos catalíticos:</i> His, Cys	
<i>Plegamientos:</i> dos barriles β	
C3A	Picornaina 3C del virus de la poliomielitis tipo 1
C3B	Picornaina 2A del virus de la poliomielitis tipo 1
C3C	Picornaina 3C del virus de la aftosa
C3D	Picornaina 3C del comovirus del mosaico de garbanzo
C3E	Picornaina 3C del virus de la hepatitis A
C3F	Picornaina 3C del paracovirus 1 humano
C3G	Endopeptidasa del virus del tungro del arroz
C4	Endopeptidasa de potyvirus de la lesión de ciruela
C24	Endopeptidasa 3C del virus virus de la enfermedad hemorrágica del conejo
C30	Endopeptidasa tipo picornaina 3C del coronavirus de la hepatitis de ratón
C37	Peptidasa procesadora del virus Southampton
C62	Peptidasa del tipo 3C de virus (<i>gill-associated virus</i>)
C74	Peptidasa del pestivirus NS2 (bovine viral diarrhea virus 1)
Subclan PB (C)	
<i>Residuos catalíticos:</i> Cys N-terminal de la proteína madura	
<i>Plegamientos:</i> 4 capas α , β , β , α	
CD	
<i>Residuos catalíticos:</i> His, Cys	
<i>Plegamientos:</i> β , α , β sandwich	
CE	
C11	Clostripaina (<i>Clostridium histolyticum</i>)
C13	Legumaina (<i>Canavalia ensiformis</i>)
C14	Caspasa 1 (<i>Rattus norvegicus</i>)
C25	Gingipaina R (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
C50	Separasa (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
C5	Adenaina (adenovirus humano tipo 2)
C48	Endopeptidasa Ulp1 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

<i>Residuos catalíticos:</i> His, Asp (ó Asn), Gln, Cys <i>Plegamientos:</i> Barril β , hélices	C55	Proteasa YopJ (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
	C57	Peptidasas procesadora del virus 17 de vaccinia
CF <i>Residuos catalíticos:</i> Glu, His, Cys <i>Plegamientos:</i> α , β , α sandwich	C63	Peptidasas procesadora del virus (<i>African swine fever virus</i>)
	C15	Piroglutamil-peptidasa I (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)
CH <i>Residuos catalíticos:</i> Cys, Thr, His <i>Plegamiento:</i> β	C46	Proteína de Hedgehog (<i>Drosophila melanogaster</i>)
	Subclan PC (C) <i>Residuos catalíticos:</i> Cys, His <i>Plegamientos:</i> α , β , α sandwich	C26
C56		PfpI endopeptidasa (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
CL <i>Residuos catalíticos:</i> His, Cys <i>Plegamiento:</i> Barril β , hélices α	C60A	Sortasa A (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	C60B	Sortasa B (<i>Staphylococcus aureus</i>)
C- <i>Residuos catalíticos:</i> no aplicable <i>Plegamientos:</i> no aplicable	C18	Peptidasa 2 del virus de la hepatitis C
	C53	Endopeptidasa Npro de pestivirus (virus de la fiebre clásica de cerdo)
	C70	AvrRpt2 g.p. (<i>Pseudomonas syringae</i>)

Tabla 3. Clanes y familias de peptidasas cisteínicas (basado en Barrett *et al.*, 2004 y actualizado de la base de datos MEROPS (Rawlings *et al.*, 2006).

1.3.2.1.1. Clan CA

La papaína fue la primer peptidasa cisteínica claramente reconocida como tal, asimismo fue elegida como enzima representativa de la familia C1 y del clan CA. La estructura cristalina de esta enzima muestra dos dominios estructurales separados por una hendidura donde se encuentra el sitio activo. El dominio R, denominado de este modo por su posición a la derecha en la vista estándar mostrada en la Figura 2, contiene un motivo barril β formado por hojas β antiparalelas y consta mayoritariamente de aminoácidos cercanos al extremo C-terminal –por lo cual Barret *et al.* (2004) lo denominan dominio C-terminal- aunque el propio C-terminal y los aminoácidos más cercanos a él cruzan hacia el otro dominio. Por su parte, el dominio L -ubicado a la izquierda- consta de un conjunto de hélices α y está constituido mayoritariamente de aminoácidos cercanos al extremo N-terminal –por lo cual Barret *et al.* (2004) lo denominan dominio N-terminal- aunque el propio N-terminal y los aminoácidos más cercanos a él cruzan hacia el dominio R. Una larga hélice α , perteneciente al dominio N-terminal, se encuentra situada en el

medio de la molécula ubicada sobre el borde de la hendidura catalítica y contiene el residuo de cisteína del sitio activo (Cys²⁵, numeración de papaína, no mostrada) que se ubica al comienzo de dicha hélice.

El clan CA contiene, hasta el momento, 32 familias de acuerdo a la información hallada en la base de datos MEROPS (Rawlings *et al.*, 2006). Muchas de ellas han sido introducidas en este clan sobre la base de su estructura dilucidada a través de estudios cristalográficos como la familia C2 (calpaína), la familia C10 (estreptopapaína), la familia C12 (ubiquitina C-terminal hidrolasa), la familia C19 (hidrolasa específica para ubiquitina), la familia C28 (L-proteinasa del virus de la aftosa) y la familia C47 (estafopapaína). Otras familias son asignadas al clan CA porque contienen motivos de secuencia muy similares alrededor de los residuos catalíticos (Gln¹⁹, Cys²⁵, His¹⁵⁹ y Asn/Asp¹⁷⁵, numeración de papaína). La cisteína catalítica normalmente es seguida de un residuo aromático, aunque a veces la glicina ocupa dicho lugar como en el caso de todas las peptidasas pertenecientes a la familia C12 y algunas de la familia C2 (Barret *et al.*, 2004).

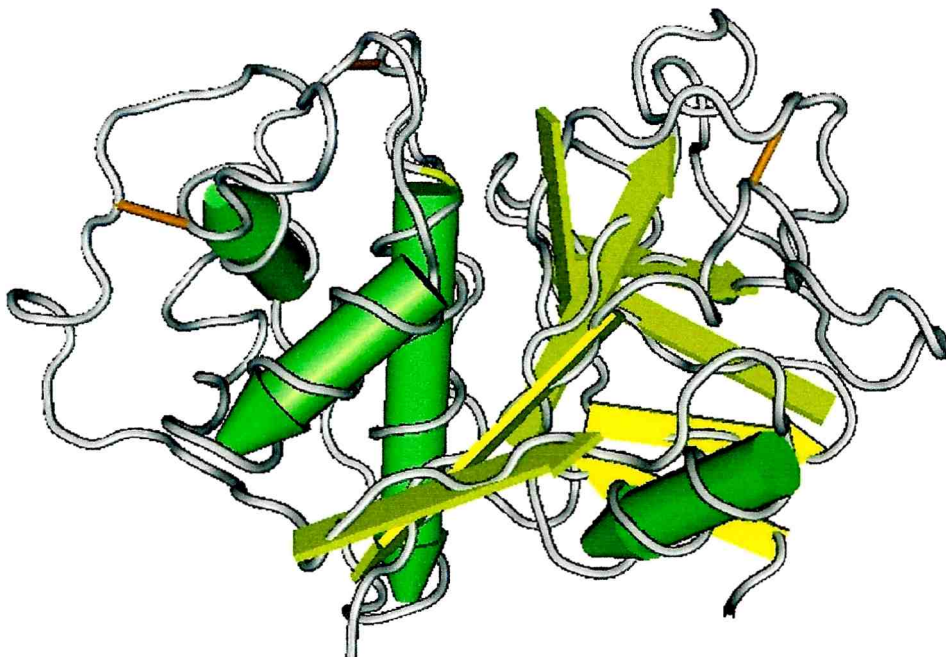


Figura 2. Diagrama de la papaína (estructura tomada de la base de datos: Protein Data Bank (9PAP) y visualizada con el programa Cn3D 4.1 del NCBI). Se muestran los dominios R (derecha) con estructura secundaria de hojas β (amarillo) y L (izquierda) con las características hélices α (verde), respectivamente.

1.3.2.1.2. Familia C1

Como se mencionó anteriormente, la peptidasa modelo o tipo de esta familia es la papaína. Esta familia contiene muchas endopeptidasas y algunas exopeptidasas.

Los residuos catalíticos identificados para la familia C1 han sido Cys e His, formando una díada catalítica. Otros dos residuos catalíticos encontrados son un residuo de Gln que precede a la Cys catalítica y un residuo de Asn que sigue a la His catalítica. Se cree que la Gln ayuda en la formación del hueco oxianiónico y que el residuo de Asn orienta el anillo imidazólico de la His. Existen varias proteínas homólogas sin actividad proteolítica en las que se encuentran reemplazados los residuos involucrados en la catálisis. Los residuos catalíticos difieren en las distintas subfamilias, tal como veremos más adelante.

El árbol evolutivo (no mostrado) para la familia C1 muestra que ella se divide en dos subfamilias: C1A, perteneciente a la subfamilia de la papaína y C1B, perteneciente a la subfamilia de la bleomicina hidrolasa. Se plantea la hipótesis de que una peptidasa de la familia C1 fue un ancestro universal en todos los organismos y que ésta evolucionó produciendo una proteína de la subfamilia del tipo C1A en arqueas tempranas y una proteína de la subfamilia del tipo C1B en las bacterias. Posteriormente habría ocurrido una divergencia en los grupos de organismos y las transferencias horizontales podrían explicar la presencia de un homólogo de C1A en *Clostridium* y de bleomicina hidrolasa en eucariotas (Barret *et al.*, 2004).

1.3.2.1.2.1. Subfamilia C1A

Las peptidasas pertenecientes a esta subfamilia son enzimas de secreción y lisosomales y, como todas las proteínas que entran en la ruta de secreción, son sintetizadas como precursores con propéptidos N-terminal y péptido señal. El propéptido se encuentran unido al sitio activo bloqueando la actividad proteolítica. Asimismo, estos propéptidos presentan motivos altamente conservados con ciertas proteínas como CTLA-2 a y CTLA-2 b de las células T activadas que actúan como inhibidores de endopeptidasas cisteínicas (Delaria *et al.*, 1994).

Los residuos involucrados en el sitio activo de las peptidasas pertenecientes a la subfamilia de la papaína, nombre con que también se conoce a esta subfamilia, son Gln/His¹⁹, Cys²⁵, His¹⁵⁹ y Asn/Gln¹⁷⁵, siguiendo la numeración de la papaína madura. La mayoría de los miembros de la subfamilia C1A son proteínas monoméricas, aunque la dipeptidil-peptidasa I es un homotetrámero en el cual cada monómero consiste en tres cadenas producidas por una proteólisis postranscripcional. Algunas peptidasas de la subfamilia tienen extensiones C-terminales respecto a la papaína. Otras poseen inserciones dentro del dominio catalítico: la catepsina B posee un lazo entre los residuos catalíticos de Cys e His que lleva dos residuos de His muy importantes para su actividad peptidil-dipeptidásica.

El subsitio de especificidad dominante en la mayoría de las peptidasas de la subfamilia C1A es S2 (Figura 1). Este subsitio muestra preferencia por una cadena lateral voluminosa e hidrofóbica y no por una con carga. En las catepsinas B esta preferencia se ve alterada por un residuo de Arg (con carga positiva) debido a que el residuo que se ubica en el fondo del bolsillo S2 es un ácido glutámico en vez de ser un residuo de serina (Ser²⁰⁵, numeración de papaína) como sucede en papaína. La dipeptidil-peptidasa I es una exopeptidasa, como su nombre lo indica, y las catepsinas B y H también exhiben fuerte actividad exopeptidásica (Aroson & Barret *et al.*, 1978 y Kirschke *et al.*, 1977, respectivamente). La catepsina X es casi exclusivamente una carboxipeptidasa (Devanathan *et al.*, 2005).

Existe una clara división dentro de esta subfamilia entre las enzimas del tipo papaína y las enzimas del tipo catepsina B (Rawlings *et al.*, 2006).

1.3.2.1.2.2. Subfamilia C1B

La subfamilia C1B de peptidasas, también llamada subfamilia de la bleomicina hidrolasa, tiene como peptidasa modelo a la bleomicina hidrolasa producida por la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Hasta el momento hay solamente 6 proteínas -entre peptidasas y homólogas- ingresadas a esta subfamilia, a diferencia de los 120 ingresos reconocidos en la subfamilia C1A

(Rawlings *et al.*, 2006). Los residuos involucrados en la catálisis son Gln⁶⁷, Cys⁷³, His³⁶⁹ y Asn³⁹² (numeración correspondiente a la bleomicina hidrolasa).

Esta subfamilia, a diferencia de la C1A, contiene peptidasas intracelulares y solubles que presentan función aminopeptidásica y comúnmente muestran selectividad para liberar residuos de arginina N-terminal. Se incluyen en este grupo la peptidasa C (PepC) de bacterias y la bleomicina hidrolasa de eucariotas. Estas enzimas del tipo aminopeptidasa C son oligoméricas. La bleomicina hidrolasa, representante de esta subfamilia, es un homohexámero con el sitio activo sobre la cara interna de un canal central en un arreglo que recuerda al proteasoma. A diferencia de las peptidasas del tipo papaína y catepsina B éstas aminopeptidasas no presentan puentes disulfuro y son sintetizadas sin el propéptido (Barret *et al.*, 2004).

1.4. Mecanismo Catalítico de las Peptidasas Cisteínicas

La mayoría de los estudios sobre el mecanismo catalítico han sido realizados con papaína y con otras enzimas pertenecientes al clan CA. El mecanismo catalítico es esencialmente similar al de las peptidasas serínicas y treonínicas, siendo también un ejemplo de la catálisis covalente -con la formación de la acil-enzima- y de catálisis ácido-base -que requiere un nucleófilo y un donador de protones, que es un residuo His-. En las peptidasas cisteínicas el nucleófilo es el azufre del grupo sulfhidrilo de un residuo cisteína (Cys). Aunque en algunas familias se requiere un tercer residuo para orientar el anillo imidazol de la His (un rol análogo al que cumple el aspartato en algunas peptidasas serínicas), en otras sólo es necesaria una díada catalítica.

Una diferencia mecanística destacable con respecto a las proteasas serínicas es que en las proteasas cisteínicas el residuo nucleofílico Cys del sitio activo se encuentra ionizado como ion tiolato ($-S^-$), en tanto que el residuo His presenta una carga positiva produciendo el ion imidazolio. Este estado de ionización es independiente de la unión con el sustrato (Polgar & Halasz, 1982). En las proteasas serínicas, por el contrario, el oxihidrilo nucleofílico del residuo de Ser comienza a ionizarse sólo luego de producida la interacción con el sustrato.

Un esquema del mecanismo completo de la reacción (adaptado de Nelson & Cox, 2004) se muestra en la Figura 3. La numeración empleada para los residuos aminoacídicos corresponde a la papaína madura.

Se incluyen el nitrógeno amida de la unión peptídica del residuo Cys²⁵ perteneciente al esqueleto de la papaína y el nitrógeno amida de la cadena lateral del residuo Gln¹⁹ de la enzima, los que actúan estabilizando al intermediario tetraédrico formando parte del “hueco oxianiónico” (Barret *et al.*, 2004), de forma similar a los residuos Ser¹²⁵ y Gly¹²³ de la quimopapaína, ejemplo de las endopeptidasas serínicas (Dunn *et al.*, 1994). También se representa el residuo de Asn¹⁷⁵, cuyo oxígeno amidico de la cadena lateral está formando un puente de hidrógeno con un nitrógeno imidazólico de la His¹⁵⁹, creando de esta forma una tríada Cys-His-Asn análoga al sistema Ser-His-Asp en las serinpeptidasas. La contribución del residuo Asn¹⁷⁵ a la catálisis es varios órdenes de magnitud menor que el residuo de Asp¹⁰² en las serínicas (Barret *et al.*, 2004), lo que explicaría que en algunas familias se observa únicamente la díada catalítica Cys-His.

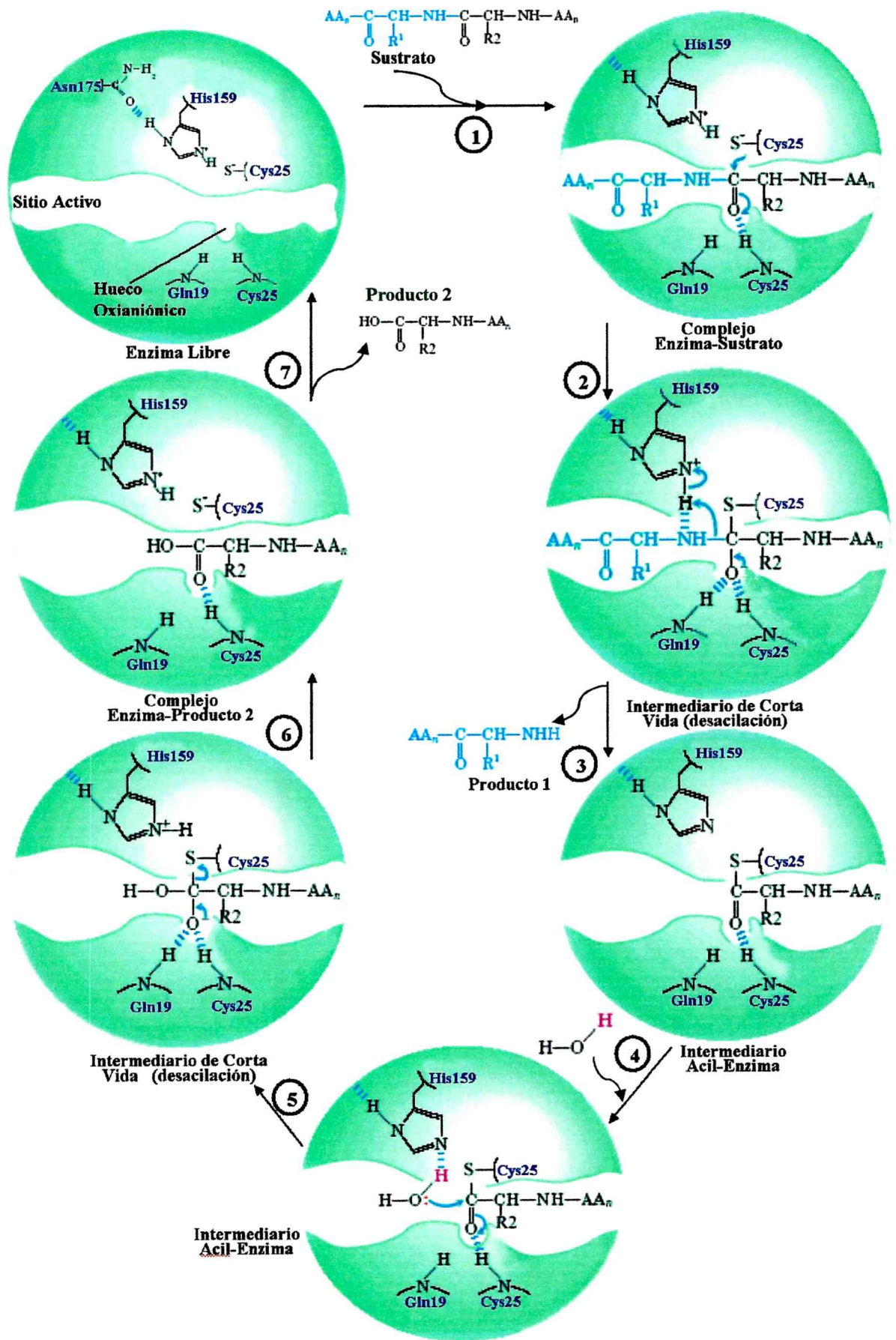


Figura 3: Representación esquemática del mecanismo catalítico (adaptado de Nelson & Cox, 2004)

El puente de hidrógeno entre las cadenas laterales de los residuos His¹⁵⁹ y Asn¹⁷⁵ se encuentra enterrado en una región hidrofóbica que, en el caso de papaína, está compuesta principalmente por las cadenas laterales de los residuos Phe¹⁴¹, Trp¹⁷⁷ y Trp¹⁸¹. De ellos, el Trp¹⁷⁷ se encuentra en una posición ideal para interactuar con la His¹⁵⁹ protonada y para proteger el puente de hidrógeno His-Asn del efecto del solvente.

Cada círculo incluye los eventos más importantes entre la enzima y el sustrato; en blanco se esquematiza el sitio activo de la enzima.

La reacción puede considerarse dividida en dos fases. La fase de acilación (pasos 1 a 3) donde la formación del intermediario acil-enzima covalente está acoplado al clivaje del enlace peptídico y la fase de desacilación (pasos 4 a 7) en la que se regenera la enzima libre. La desacilación es esencialmente un proceso inverso a la acilación, con una molécula de H₂O en reemplazo del componente amino del sustrato (Nelson & Cox, 2004).

En el paso 1, el sustrato (un polipéptido) se posiciona en el sitio activo de la enzima. En el paso 2 el tiolato de la Cys²⁵ provoca un ataque nucleofílico sobre el carbono carbonílico del polipéptido, mientras que la carga generada en el oxígeno del carbonilo es estabilizada en el hueco oxianiónico por medio de puentes de hidrógeno establecidos con -NH amida de los residuos de Cys²⁵ y de la Gln¹⁹; queda formado de este modo un intermediario tetrahédrico de corta vida. En el paso 3, la inestabilidad de la carga sobre el carbonilo del sustrato produce la ruptura del intermediario y se vuelve a formar el doble enlace del carbonilo, con la consiguiente ruptura de la unión C-N de la unión peptídica. Es entonces liberado el producto peptídico 1 (correspondiente al extremo carboxilo del sustrato) y queda formado el intermediario acil-enzima, compuesto relativamente estable, ya que ha podido ser detectado y estudiado. En el paso 4 una molécula de agua que ingresa es desprotonada por catálisis básica, generando un ion hidróxido que es un nucleófilo fuerte y ataca el C del enlace tioéster de la acil-enzima. Nuevamente, la carga generada en el oxígeno del carbonilo se estabiliza en el hueco oxianiónico y queda formado un segundo intermediario tetrahédrico de corta vida (paso 5). En el paso 6, el colapso del intermediario tetrahédrico produce la desacilación, formándose el

complejo enzima-producto 2, que en el paso 7 regenera la enzima libre luego de la liberación del producto peptídico 2 (correspondiente al extremo amínico del sustrato).

La necesidad de la presencia del sulfhidrilo de la Cys²⁵ ha quedado plenamente demostrada, pues su modificación química hace desaparecer por completo la actividad enzimática.

Es de destacar que las interacciones entre la enzima y el sustrato durante el proceso hidrolítico que ocurren en el sitio activo es un aspecto importante de la catálisis. 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 y S2 (Figura 1) provoca un cambio conformacional en el estado de transición, permitiendo que el residuo His¹⁵⁹ protone al grupo saliente, facilitando en consecuencia la reacción de acilación (Barrett *et al.*, 1998).

2. PROTEASAS VEGETALES

2.1. Rol de las Enzimas Proteolíticas en los Vegetales

El genoma vegetal codifica para cientos de proteasas, pero poco se conoce acerca de los roles que juegan en la vida de una planta. Las funciones de sólo unas pocas de las más de 550 proteasas de *Arabidopsis* han sido genéticamente determinadas (Adam & Clarke, 2002; Beers *et al.*, 2004). En general, se ha pensado que las proteasas están involucradas en una serie de procesos, incluyendo la senescencia y las respuestas defensivas (van der Hoorn & Jones, 2004), tal como indican los estudios con inhibidores de proteasas (Solomon *et al.*, 1999; Chichkova *et al.*, 2004). En muchos casos las funciones propuestas para las proteasas han sido inferidas de la expresión diferencial de sus ARNm (Zhao *et al.*, 2000; Gepstein *et al.*, 2003). Los progresos en la asignación de roles para las proteasas, sin embargo, están significativamente impedidos por su redundancia y por la regulación postraducciona (van der Hoorn *et al.*, 2004).

La proteólisis en plantas es un proceso complejo que involucra muchas enzimas y rutas metabólicas variadas en diferentes compartimientos celulares. Las endopeptidasas cisteínicas juegan un rol esencial en el proceso de degradación de las proteínas y representan hasta un 30 % de la actividad proteolítica total en órganos maduros no senescentes, dependiendo de la clase de planta y del órgano. Sin embargo, la actividad de las proteasas cisteínicas responde dramáticamente a diferentes estímulos externos e internos, alcanzando en algunos casos hasta el 90 % de la actividad proteolítica total (Wiśniewski & Zagdańska, 2001). Están involucradas en la maduración y degradación de las proteínas en respuesta a diferentes estímulos externos y también juegan un rol importante en la remoción de proteínas anormales o mal plegadas (“housekeeping”). En cualquier caso, la proteólisis mediada por proteinasas cisteínicas es un proceso altamente regulado.

Muchas plantas contienen látex que exuda cuando las hojas son dañadas, donde suele estar presente una considerable cantidad de proteínas y enzimas, aunque su rol es aún pobremente conocido. Sin embargo recientemente se ha podido comprobar que la papaína, una de las proteasas cisteínicas presentes en el látex de *Carica papaya* L., es un elemento crucial en la defensa del árbol de mamón o papaya frente al ataque de insectos lepidópteros, actuando esencialmente sobre las larvas de los mismos e impidiendo su crecimiento. En el mismo sentido se han comportado las proteasas cisteínicas presentes en el látex de los higos (*Ficus* spp.). Estos resultados sugieren que el látex, y en especial las proteasas cisteínicas presentes en ellos, proveerían a las plantas de un mecanismo de defensa contra insectos herbívoros (Konno *et al.*, 2004).

Los diversos roles de las proteasas vegetales en respuestas defensivas que son disparadas por la presencia de patógenos comienza a aclararse. Como se acaba de mencionar en el caso de papaína y ficina en el látex de papaya e higos, las proteasas actúan directamente atacando el organismo invasor, pero actualmente se han propuesto otros mecanismos para explicar la función de las proteasas en la defensa, actuando tanto a nivel de percepción, como de señalamiento y de ejecución. En el primer caso, las proteasas podrían liberar

elicitores al actuar sobre las proteínas del invasor, los cuales podrían ser posteriormente reconocidos en algún otro lugar disparando el mecanismo de defensa. Por otra parte podrían activar o inhibir a las proteasas quienes desencadenarían la respuesta defensiva. En el segundo caso las proteasas podrían actuar liberando reguladores positivos o degradando reguladores negativos. Finalmente, las proteasas también pueden ejecutar la respuesta defensiva, ya sea degradando las proteínas del invasor, liberando toxinas peptídicas o activando enzimas defensivas a partir de sus precursores (van der Hoorn & Jones, 2004).

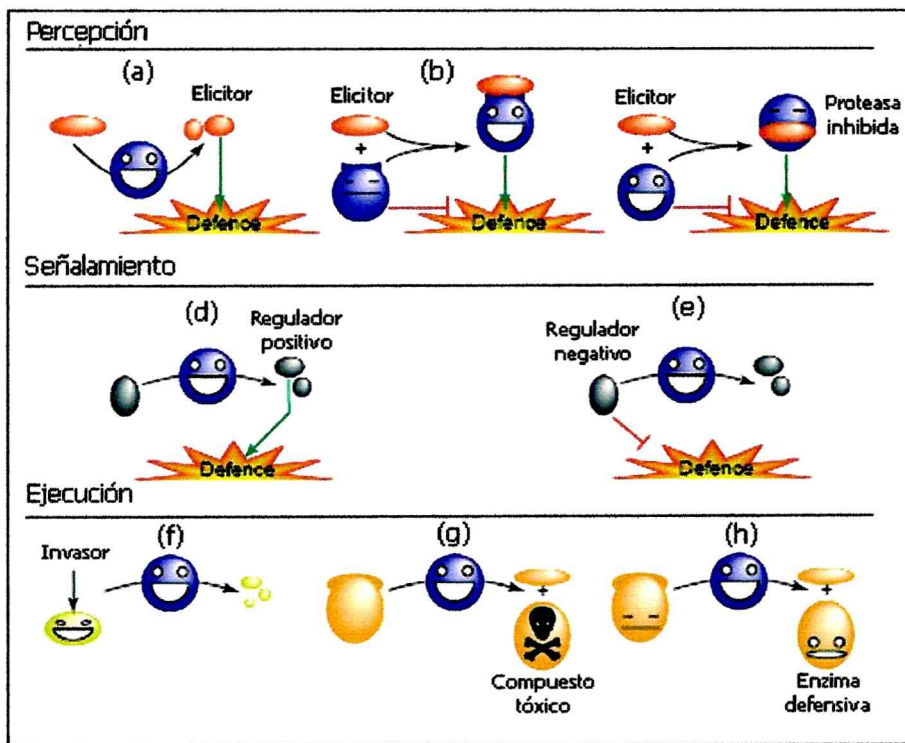


Figura 1. Modelos para varios roles de las proteasas en la defensa de plantas. Proteasas (en azul) que pueden actuar en la percepción (a-c), en el señalamiento (d,e) o en la ejecución (f-h). Las flechas verdes indican señalamiento positivo y las barras rojas señalamiento negativo a respuestas defensivas (tomado de van der Hoorn & Jones, 2004).

2.2. Síntesis y Localización Intracelular de Proteasas Cisteínicas en Vegetales

Las proteasas cisteínicas son sintetizadas en los polisomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico (RE) e incorporadas al mismo en forma de precursores con propéptidos N- y C-terminales. El propéptido N-terminal

contiene el motivo ERFNIN (un motivo altamente conservado de función autoinhibitoria), en tanto que en el C-terminal se han detectado dos motivos diferentes pero de función aún incierta. Las proteasas del tipo papaína (“papain-like”) salen del RE en grandes vesículas que se fusionan directamente con las vacuolas o son dirigidas a la pared celular, evitando el pasaje por el aparato de Golgi. La posterior remoción secuencial de los propéptidos N- y C-terminales genera la proteasa madura (Grudkowska & Zagdańska, 2004).

2.3. Proteasas de Látex

Como hemos mencionado en el ítem anterior, los laticíferos son un ejemplo de tejido vegetal que suele presentar una gran concentración de endopeptidasas en el látex que contienen y que pueden superar el 50 % de las proteínas totales. En estos casos la actividad proteolítica es por lo menos superior en dos órdenes de magnitud a la encontrada en otros tejidos. La abundancia de estas proteasas muy por encima de las necesidades para el crecimiento y para el desarrollo celular indican que podrían actuar como "aleloquímicos" (Dalling, 1986; Konno *et al.*, 2004).

2.3.1. Características del Látex

El látex es una suspensión y, en algunos casos una emulsión viscosa, a menudo blanca, que fluye de los tejidos heridos de ciertas especies vegetales. Puede contener granos de almidón, alcaloides, proteínas, gomas y resinas, además de componentes subcelulares.

Los estudios de McMullen (1959, 1962) demostraron la presencia de ARN en el látex de *Hevea brasiliensis*. Más adelante se obtuvo la misma evidencia en otras 16 especies (Meissner, 1966). Estudios más detallados en *Hevea brasiliensis* (Tupý, 1969; Coupé & d’Auzac, 1972 y 1974) detectaron la presencia de los diferentes tipos de ARN y de polisomas y en 1986 se pudo realizar una síntesis proteica *in vitro* empleando el látex completo de la misma especie (Kekwick, 1986).

2.3.2. Características de los Tubos Laticíferos

Encontramos dos tipos de tubos laticíferos en las plantas: los laticíferos articulados, que son estructuras policelulares que pierden los tabiques intercelulares para formar un tubo continuo y los laticíferos no articulados, los que se originan a partir de una única célula que sufre sucesivas mitosis sin citocinesis. En *Caricaceae* se han descrito laticíferos articulados, en tanto que en *Apocynaceae* y *Moraceae* se encuentran laticíferos no articulados. En la familia *Euphorbiaceae* hay géneros como *Hevea* con laticíferos articulados, mientras que hay otros como *Euphorbia* que presentan laticíferos no articulados (Esau, 1985).

Los laticíferos no articulados son un tipo celular notable, potencialmente capaz de presentar un crecimiento ilimitado y que pueden ser observados en las diferentes partes del eje de la planta. El origen de los mismos son células embrionarias conocidas como células laticíferas iniciales que pueden observarse en la etapa globular del embrión, diferenciándose algo antes o simultáneamente que las células iniciales del procambium (Mahlberg, 1961 y 1963; Mahlberg & Sabharwal, 1968; Fineran, 1983). Estas células se disponen formando círculos en la etapa temprana de corazón (Mahlberg & Sabharwal, 1968, Buvat, 1989). Durante la formación del primordio de los cotiledones se presenta como un anillo irregular, debajo del ápice del tallo, en el plano nodal de los cotiledones y cuando el embrión desarrolla para dar una plántula se alargan y sufren cariocinesis sin citocinesis transformándose en células gigantes, cenocíticas (Mahlberg, 1959; Inamdar *et al.*, 1988; Mahlberg, 1993). Estos procesos continúan en las regiones de la planta en crecimiento. En estas regiones, los laticíferos no articulados se alargan y crecen intrusivamente entre las otras células del ápice (Fineran, 1983; Mahlberg, 1993). Los laticíferos se van ramificando en los órganos jóvenes como las hojas y las yemas laterales (Wilson *et al.*, 1976; Lee & Mahlberg, 1999).

El crecimiento del extremo de los laticíferos se produce entre las paredes de las células meristemáticas que se encuentran inicialmente unidas fuertemente unas con otras (Wilson *et al.*, 1976; Wilson & Mahlberg, 1978; Inamdar *et al.*, 1988; Serpe *et al.*, 2001). Este modo de crecimiento indica que

se requiere desensamblar componentes de la pared celular así como romper las conexiones plasmodésmicas existentes entre las células meristemáticas (Serpe *et al.*, 2002), aunque existe aún un conocimiento insuficiente de los efectos de la penetración del laticífero sobre la estructura de la pared de las células meristemáticas (Mahlberg, 1993; Lee & Mahlberg, 1999). Las observaciones mediante microscopía electrónica muestra que las paredes en contacto con los laticíferos no se hallan dañadas y que hay una lámina media entre las células meristemáticas y los laticíferos (Wilson & Mahlberg, 1978; Da Cunha *et al.*, 1998; Lee & Mahlberg, 1999). Estas observaciones podrían explicarse por un balance entre procesos de desensamble y síntesis de pared celular. El desensamble favorecería la penetración del extremo del laticífero entre las células meristemáticas, mientras que la síntesis permitiría la elongación del laticífero y la formación de nuevas uniones entre el laticífero y las células que lo rodean. Un aporte al conocimiento de los mecanismos bioquímicos de este tipo de crecimiento lo brindaría el análisis de la variación de la composición de las paredes involucradas, así como también el conocimiento de su estructura.

Mediante microscopía electrónica empleando técnicas de inmunofluorescencia en combinación con marcadores coloidales de oro, el uso de anticuerpos y "probes" enzimas Serpe *et al.* (2002) demostraron que la penetración de los laticíferos producen cambios en las paredes de las células meristemáticas y que hay diferencias en la composición de la pared de los laticíferos y entre los laticíferos y las células que los rodean.

Con respecto a la ultraestructura del desarrollo y maduración de los laticíferos no articulados, ésta se ha investigado completamente en *Ficus* (Rachmilewitz & Fahn, 1982), *Euphorbia* (Marty, 1970; Marty, 1973) y *Asclepias* (Giordani, 1978; Wilson. & Mahlberg, 1980). En *Ficus carica* los laticíferos contienen inicialmente un citoplasma denso con muchas vacuolas pequeñas y vesículas, así como dictiosomas muy activos (Rachmilewitz & Fahn, 1982). Más adelante el espacio vacuolar se amplía por la unión de las pequeñas vacuolas.

En 1970 Matile *et al.* han aislado pequeñas vacuolas del látex de *Chelidonium majus* y determinaron que contienen enzimas lisosomales típicas,

incluyendo una proteasa con un pH-óptimo ácido. Del látex de *Hevea* se obtuvo una fracción constituida por organoides que contiene un grupo de enzimas lisosomales, incluyendo proteasas. Estos organoides pueden ser considerados homólogos a la vacuola (Pujarnisclé, S., 1968) y podrían corresponder a las vesículas observadas en el látex de *Ficus* (Rachmilewitz & Fahn, 1982).

2.3.3. Proteasas Obtenidas a Partir de Látex

Las fitoproteasas provenientes de látex más conocidas comercialmente son papaína y ficina, provenientes de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y de *Ficus glabrata* (*Moraceae*), respectivamente. Por otra parte pueden citarse aquellas pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*: euphorbaína l, de *Euphorbia lathyris* (Lennox & Ellis, 1945), euphorbaína p, de *Euphorbia pulcherrima* (Lynn & Clevette-Radford, 1984a), hevaína b y hevaína l, de *Hevea brasiliensis* (Lynn & Clevette-Radford, 1984b), euphorbaínas y-1, y-2 e y-3, de *Euphorbia cyparissias* (Lynn & Clevette-Radford, 1985), chayaina, encontrada en el látex de *Cnidoscolus chayamansa*, *E.supina* protease B de *Euphorbia supina* (Arima *et al.*, 2000) y las encontradas en el látex de *Synadenium grantii* (Menon *et al.*, 2002); sin dejar de mencionar aquellas que han sido aisladas y caracterizadas en nuestro país por el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE) pertenecientes a las familias *Asclepiadaceae* (Arribére *et al.*, 1998; Arribére *et al.*, 1999; Priolo *et al.*, 2000; Trejo *et al.*, 2001; Obregón *et al.*, 2001; Vairo Cavalli *et al.*, 2001 y 2003; Morcelle *et al.*, 2004a y 2004b y Liggieri *et al.*, 2004), *Apocynaceae* (Sequeiros *et al.*, 2005), *Moraceae* (López *et al.*, 1993) y *Caricaceae* (Torres *et al.*, comunicación personal).

3. REGIÓN FITOGEOGRÁFICA DE LA PATAGONIA

La Región Fitogeográfica de la Patagonia (que constituye el extremo sudeste de la región política de la Patagonia) cubre una extensión superior a los 500.000 kilómetros cuadrados en el extremo sudeste de Sudamérica (Ragonese, 1967; Vila & Bertonatti, 1993). Esta Región está constituida por una estrecha franja en el Norte, entre la Cordillera de los Andes y la Región del Monte, que se amplía hacia el Sur en una vasta llanura desde los Andes hasta el Océano Atlántico (Cabrera & Willink, 1973). El límite hacia el Oeste es el bosque tropical templado (Dimitri, 1972) y la Región Altoandina (Cabrera, 1972), y hacia el Norte la Región del Monte (Ruiz Leal, 1972). La mayor parte de la Patagonia pertenece a la República Argentina, con una pequeña porción que penetra en el territorio de Chile en el lejano Sur, a ambos lados del Estrecho de Magallanes.

Desde el punto de vista geológico, la región está formada por un núcleo precámbrico –el Macizo Patagónico– con depósitos de roca eruptiva (basalto) y sedimentos terrestres y marinos del Pérmico temprano al Terciario. El terreno es una secuencia de planicies que descienden hacia el Atlántico, desde las variadas elevaciones del piedemonte (2.000 m en el Norte a 700 m en el Sud). En la Provincia de Chubut la precordillera patagónica alcanza 1300 a 1500 m de altitud, como en el Cerro Putrachoique (1700 m); más hacia el Este transcurren las Sierras Centrales Patagónicas, con elevaciones de más de 1600 m, como los Cerros Boquete y Negro, entre otras (Soriano, 1983).

3.1. Flora Patagónica

La Flora de la Región Patagónica muestra claras afinidades con la Flora Andina (Cabrera, 1972; Cabrera & Willink, 1973) y es el producto de un único juego de condiciones climáticas extremas de baja temperatura y aridez. Se ha estimado que en la zona se encuentran 1.200 especies de plantas vasculares, casi exclusivamente angiospermas (*Ephedra* es el único género de gimnospermas, muy importante en algunas áreas). *Asteraceae* es la familia

mejor representada (200 spp., 33 % endémicas), seguida por *Poaceae* (190 spp., 13 % endémicas) y *Fabaceae* (120 spp., 60 % endémicas). Otras familias con un buen número de especies son *Cruciferae* (80 spp., 30 % endémicas), *Cyperaceae* (40 spp., 7 % endémicas) and *Umbelliferae* (40 spp., 33 % endémicas). Las familias *Asclepiadaceae* y *Euphorbiaceae*, cuyos miembros generalmente son productores de látex, están representados por siete géneros con doce especies en la primera de las familias mencionadas y seis géneros con catorce especies en la segunda de ellas (Correa, 1988 y 1999). Cabe aclarar que en el año 2000 Endress & Bruyns transfirieron las dos subfamilias de *Asclepiadaceae* a la familia *Apocynaceae*, debido a que existen algunos géneros con características de las dos familias que hacen de puente. Aunque esta propuesta sigue siendo objeto de debate taxonómico, nosotros hemos aceptado esta clasificación para ubicar las especies recolectadas pues hemos seguido el criterio empleado en el servidor NEWT (Phan *et al.*, 2003) cuyo sitio en Internet es <http://www.ebi.ac.uk/newt>, que consiste en una base de datos que vincula información taxonómica provista por el Centro Nacional de Información Biotecnológica –NCBI– (Wheeler *et al.*, 2000) con información de proteínas suministrado por SWISS-PROT (Bairoch & Apweiler, 2000), el que ha incorporado el mencionado cambio (Endress & Bruyns, 2000).

La vegetación es xerofítica, con amplio predominio de adaptaciones a las bajas temperaturas y al efecto desecante de los fuertes vientos de la zona, que soplan constantemente. La cubierta vegetal generalmente varía del 20 al 40 %, con extremos desde el 0 % en las áreas desérticas (huayuerías o tierras bajas) a un 100 % en los prados húmedos, denominados vegas y mallines.

El conocimiento que se posee acerca de las plantas útiles de la Patagonia es muy fragmentario. De acuerdo a la información recogida por viajeros en distintas épocas, numerosas especies nativas son (o han sido) utilizadas como alimentos o medicinas. Los esfuerzos recientes que se están realizando para coleccionar información están lejos de ser suficientes como para cubrir todo el conocimiento de la cultura folklórica, que se está perdiendo rápidamente. Algunas especies (*Festuca pallescens*, *F. gracillima*) constituyen un forraje importante en áreas que son naturalmente dedicadas al pastoreo,

mientras que otras son tóxicas para las ovejas (*Astragalus* spp., *Festuca argentina*, *Poa huecu*). Sólo recientemente se han implementado algunos programas para recoger germoplasma de especies nativas (Oliva *et al.*, 1993).

No existen informes sobre la presencia de actividad proteolítica en plantas de la Patagonia a excepción de la que hemos publicado en el año 2003 (Sequeiros *et al.*, 2003). Las aplicaciones farmacológicas tradicionales de las enzimas proteolíticas han sido como coadyuvantes digestivos o como agentes antiinflamatorios. Una de las más claras indicaciones del reconocimiento general de esta premisa es la vasta inversión que hace la industria farmacéutica en la investigación del grado de compromiso de las peptidasas –de cualquier origen– en aspectos de la salud y enfermedades humanas.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue hallar una planta de la flora de la Patagonia que resultara una fuente promisoría de endopeptidasas cisteínicas, lograr el aislamiento, purificación y caracterización de las fracciones activas de interés y clonar y secuenciar los ADNc correspondientes a endopeptidasas cisteínicas a partir de ARNm presentes en el látex de dicha especie.

A partir de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Seleccionar y recolectar plantas de la Patagonia extraandina -en particular de las familias *Apocynaceae* y *Euphorbiaceae*- para evaluar y caracterizar parcialmente la capacidad proteolítica de sus extractivos.
- Caracterizar la preparación con mayor actividad endopeptidásica.
- Obtener hidrolizados proteicos parciales con posible aplicación industrial empleando la preparación enzimática seleccionada.
- Purificar las fracciones enzimáticas de mayor interés.
- Caracterizar bioquímica y estructuralmente las peptidasas purificadas.
- Clonar y secuenciar ADNc correspondiente a proteasas cisteínicas a partir del ARN total del látex de la especie seleccionada para obtener su secuencia polipeptídica.
- Obtener por homología un modelo para la estructura tridimensional (3-D) de las enzimas cuya estructura primaria ha sido determinada.

MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. BÚSQUEDA DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE PROTEASAS

La flora de la Región Patagónica presenta especies capaces de sobrevivir en condiciones climáticas extremas de baja temperatura y aridez, razón que explica la existencia de especies que no se encuentran en otras zonas de nuestro país, tal como hemos mencionado en la Introducción (I). El criterio empleado para iniciar la búsqueda de especies productoras de proteasas en la flora de esta región (*cfr.* 3.1, I) fue seleccionar plantas con látex, dado que se conocen muchas especies en las cuales este tipo de secreción presenta un elevado rendimiento en enzimas proteolíticas.

En las familias *Asclepiadaceae* y *Euphorbiaceae* se encuentran muchas especies productoras de látex, tal como se ha comentado en los ítems 2.3.3 y 3.1 de la Introducción. Mediante el asesoramiento del grupo de investigadores y técnicos intervinientes en el Proyecto Jardín Botánico dependiente del Centro Nacional Patagónico (CENPAT) de la ciudad de Puerto Madryn, se logró la ubicación, recolección e identificación de cinco especies que contienen látex: *Colliguaja integerrima* Gill. et Hook., *Euphorbia collina* Philippi, *Euphorbia peplus* L. y *Stillingia patagonica* (Speg.) Pax et Hoffmann, todas ellas pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, así como *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*) y de una especie -*Grindelia chiloensis* (Corn.) Cabrera (*Asteraceae*)- sin sistema de laticíferos pero con la presencia de una sustancia resinosa en su inflorescencia. La especie *P. gilliesii* es citada como *Apocynaceae* en base al criterio de Endress & Bruyns (2000) discutido en el ítem 3.1 de la Introducción.

Para la recolección del material perteneciente a las especies *Colliguaja integerrima* y *Stillingia patagonica* se realizaron dos campañas a la zona de

Telsen y a la Meseta de Telsen (Ruta Provincial N°4, 200 Km al Oeste de la Ruta Nacional N° 3 a la altura del cruce con el ingreso a la Ciudad de Puerto Madryn), en la Provincia de Chubut. Ambos viajes de campaña se realizaron junto al personal participante en el Proyecto Jardín Botánico del CENPAT.

Las especies *Grindelia chilensis* y *Euphorbia collina* fueron identificadas por la Ingeniera Forestal Visnja Mavrek y la especie *Philibertia gilliesii* por la Coordinadora del Proyecto Jardín Botánico CENPAT M.Sc. Ana María Beeskow. El material correspondiente a estas tres últimas especies ha sido recolectado en la zona costera de Pto. Madryn y sus alrededores. En cuanto al material de *Euphorbia peplus*, fue suministrado y clasificado por la M.Sc. Ana María Beeskow.

2. DESCRIPCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

2.1. *Euphorbia collina*

Euphorbia collina Phil. (Figura 1) es una planta perenne, herbácea, generalmente glabra. Su raíz es cilíndrica, profunda y en general no ramificada. Las hojas miden entre 5 y 25 x 5 y 8 mm, ovadas, obovadas o elípticas, glabras y enteras.



Figura 1. *Euphorbia collina* Philippi (*Euphorbiaceae*). Planta con flores.

Las inflorescencias son ciatios en suedopleocacios, con involucreo cilíndrico o subcilíndrico. Posee cinco nectarios, generalmente verdes aunque a veces son rojos. El involucreo posee cinco lóbulos. Las flores estaminadas (20-30) presentan bractéolas anchas, laciniadas. Las flores pistiladas poseen perianto trímero corto; estilos generalmente cortos, bifidos y estigmas capitados.

Los frutos son cápsulas de aproximadamente 3 a 5 x 4 a 5,5 mm, globosas, subcónicas u ovoides y glabras. Las semillas son lisas, blancas a pardo-claras. Vive en la Patagonia desde Neuquén hasta Tierra del Fuego, creciendo en suelos pedregosos, arenosos, áridos. (Correa, 1988).

2.2. *Euphorbia peplus*

Euphorbia peplus L. (Figura 2) es una hierba anual de 20 a 40 cm de altura con raíces filiformes. El tallo es amarillento, ramificado. Las hojas caulinares miden de 5 a 15 x 5 a 10 mm, son alternas, pecioladas, desde orbiculares hasta anchamente elípticas, membranáceas; las de la inflorescencia son opuestas, anchamente ovadas.

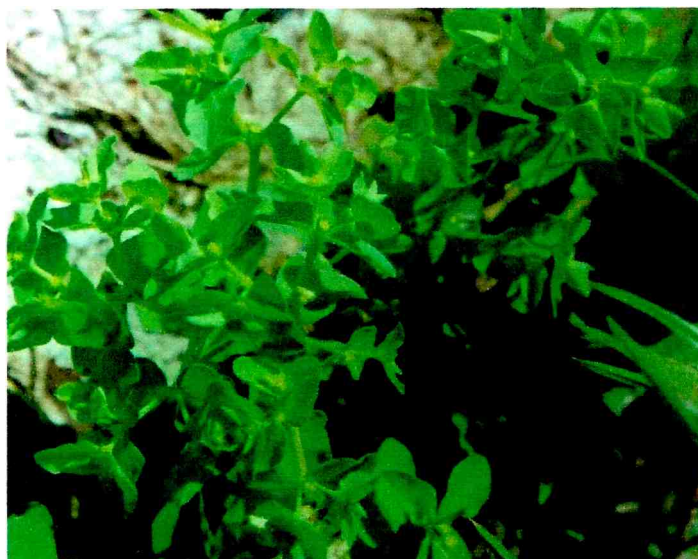


Figura 2. *Euphorbia peplus* Linne (*Euphorbiaceae*). Planta con flores.

Los ciatios se disponen en pseudopleocasios; el involucro mide entre 1,2 y 1,4 mm x 1,2 mm, es globoso, y glabro; los nectarios son 4, planos, terminados en dos apéndices corniformes agudos, con lóbulos triangulares bordeados de pelos. Presenta entre 5 y 20 flores estaminadas y la flor pistilada es aperiantada pero con un rodete calicular de 2,5 mm.

El fruto es una cápsula glabra, globosa, tricoca, con los nervios dorsales entre 2 carinas. La semilla es prismática, ovoide, con 4 caras foveoladas y las 2 proximales surcadas, blanquecinas a grisáceas; presenta carúncula pequeña, blanca. La especie es adventicia, originaria de Europa, común en el norte y centro del país, llegando en la Patagonia hasta Chubut. (Correa, 1988).

2.3. *Colliguaja integerrima*

Colliguaja integerrima Gillies et Hook. (n.v.: duraznillo, colliguay), es un arbusto de 0,5 a 2 m de alto, glabro, ramoso, con ramas pardo-rojizas y nudos marcados (Figura 3). Las hojas miden entre 5 a 10 cm x 4 a 8 mm, son lanceoladas, coriáceas, con el nervio bien destacado y casi blanco, mucronadas, en posición ascendente y generalmente amontonadas hacia el ápice de las ramas.



Figura 3. *Colliguaja integerrima* Gill. et Hook (*Euphorbiaceae*).
Planta con flores.

Las inflorescencias son espigas axilares, rojizas, más cortas que las hojas. Las flores estaminadas son aperiantadas. La flor pistilada presenta 2 brácteas, 2 a 3 sépalos, 2 a 3 estilos encorvados, con la cara adaxial papilosa y la abaxial lisa, libres; el ovario es 2- a 3- locular. El fruto es una cápsula 2- a 3- coca, con endocarpo leñoso. La semilla es subglobosa, glabra y pardusca.

Es un arbusto típico de la estepa patagónica, a la que caracteriza, donde se lo encuentra en lugares arenosos, en suelos pobres, rocosos, de conchilla, en una faja que se extiende desde Santa Cruz hasta la provincia de San Juan (Correa, 1988).

2.4. *Stillingia patagonica*

Stillingia patagonica (Speg.) Pax et Hoffmann (Figura 4) es un arbusto de 30 cm a 1 m de altura, muy ramoso. Las ramas son verdes, alternas, flexuosas y espinescentes. Las hojas son subsésiles y caedizas, con 2 glándulas conspicuas, marginales, en la base de la lámina. La inflorescencia está constituida por espigas axilares, andróginas, densifloras.



Figura 4. *Stillingia patagonica* (Speg.) Pax et Hoffmann (*Euphorbiaceae*). Planta con flores.

Las flores estaminadas se encuentran sostenidas por una bráctea anchamente ovada con 2 glándulas grandes de posición lateral basal; el cáliz es entero, suavemente bilobado con borde inflexo menudamente dentado. La flor pistilada es solitaria, sostenida por una bráctea ovada provista de 2 glándulas auriculadas en su margen basal; el cáliz es partido, con 2 a 3 sépalos; los estigmas son papilosos y recurvados. El fruto es una cápsula 2 a 3 locular, glabra. La semilla es subglobosa, carunculada. Vive desde el sur de Mendoza hasta Santa Cruz. Florece y fructifica en verano temprano. (Correa, 1988).

2.5. *Philibertia gilliesii*

Philibertia gilliesii Hook. et Arn. (Figura 5) es un sufrútice leñoso en la base, con ramas generalmente mayores a 50 cm, volubles cuando jóvenes y levemente pubérulas. Las hojas poseen un pecíolo de 0,5 a 2 cm de largo, pubérulo y la lámina es lanceolada a triangular-ovada, de 1,5 a 3 cm de largo por 0,5 a 1,5 cm de ancho, aguda y acuminada y auriculado-cordada en la base, leve a densamente pubérula. La inflorescencia es lateral, extraaxilar, pauciflora, umbeliforme, con pedúnculo de hasta de 5 cm, pubérulo; presenta 2 a 7 flores con pedicelos de menos de 1,5 mm. Las flores son color crema o



Figura 5. *Philibertia gilliesii* Hooker et Arnott, (*Apocynaceae*). Planta con flores y frutos.

verdosas, con estrías o tintes morados y aroma a chocolate, de 1 a 2 cm de diámetro. El cáliz presenta lóbulos lanceolados hasta de 4 mm, agudos y pubérulos. La corola es subrotáceo-campanulada, de contorno circular-estrellado, exteriormente pubérula, interiormente glabra. La corona está compuesta por cinco vesículas ovoides y apiculadas, libres entre sí, una en la base de cada estambre, iguales o algo más cortas que el ginostegio. Los estambres miden aproximadamente 3 mm. Los frutos son folículos fusiformes, obtusos y algo rugosos. Las semillas son numerosas, de contorno ovado, con penacho de pelos blancos (Correa, 1999).

2.6. *Grindelia chiloensis*

Grindelia chiloensis (Corn.) Cabrera (Figura 6) es un sufrútice de 30 cm a 1 m de altura, ramoso en la base, con tallos ascendentes, glabros, densamente hojosos en la parte inferior y paucifoliados en la superior. Las hojas son oblanceoladas u obovadas, agudas, atenuadas en la base en corto pseudopecíolo, enteras, aserradas o runcinadas en el margen, glabras.



Figura 6. *Grindelia chiloensis* (Corn.) Cabrera (*Astereaceae*).
Planta con flores.

Los capítulos son solitarios, radiados, con involucre hemisférico; las brácteas involucrales son glabras y se presentan en 3 a 4 series. Las flores son

doradas, dimorfas: las marginales femeninas, liguladas, con lígula de unos 17 por 4,5 mm; las del disco hermafroditas y tubulosas. Los aquenios son oblongos, algo comprimidos, glabros, de unos 6 mm de longitud. El papus está formado por 8 a 10 aristas planas, desiguales, fácilmente caedizas.

Esta especie es característica de las regiones secas, rocosas o arenosas, del sur de la Provincia del Monte y de toda la Patagonia. (Correa, 1971).

3. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTIVOS EMPLEADOS EN LA SELECCIÓN INICIAL

El látex de las especies *Colliguaja integerrima*, *Euphorbia peplus*, *Euphorbia collina* y *Stillingia patagonica* se obtuvo realizando incisiones en los tallos y ramas y fue recolectado sobre buffer Tris-HCl 0,1M de pH 7,5 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM.

El látex de *Philibertia gilliesii* se obtuvo de los frutos, realizando incisiones en el extremo apical y fue recogido en el buffer arriba mencionado.

El suero presente junto a la resina producida en las inflorescencias de la especie *Grindelia chilensis* fue recolectado con pipeta Pasteur de cada inflorescencia luego de quitarle cuidadosamente la capa gomosa y luego fue diluido en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM.

El agregado de EDTA al buffer de recolección obedece a la necesidad de evitar la acción de las fenoloxidasas, que poseen Cu^{2+} en su centro activo. Si se permite que las fenoloxidasas actúen sobre los compuestos fenólicos, normalmente presentes en los extractivos vegetales, se producen derivados que al unirse covalentemente a las enzimas hacen que éstas pierdan su actividad biológica. La cisteína, por su parte, contribuye a mantener el ambiente reductor e impide la oxidación de los compuestos fenólicos.

Todas las muestras fueron centrifugadas a 19000 rpm durante 1 hora y a 4 °C para eliminar restos vegetales y otros materiales insolubles, utilizando una centrífuga refrigerada Sorvall RC 5C con el rotor modelo SM-24. El sobrenadante de la preparación de *E. collina* presentó un aspecto blanco lechoso, por lo que fue centrifugado nuevamente a 19000 rpm durante 90

minutos, al cabo de los cuales presentó un supernadante que se eliminó por filtración. A pesar del tratamiento realizado no pudo obtenerse una preparación transparente a partir del látex de esta especie. Los sobrenadantes del resto de las muestras fueron prácticamente transparentes, aunque algunos con una ligera opalescencia. La temperatura se mantuvo a 4 °C durante la obtención y tratamiento de las muestras para evitar la autodigestión de las proteinasas. Todas las preparaciones, denominadas extractos clarificados, fueron fraccionadas y almacenadas en *freezer* a -20 °C.

4. EXTRACTIVOS OBTENIDOS A PARTIR DEL LÁTEX DE LA ESPECIE SELECCIONADA

4.1. Obtención de Extractos Crudos

Los extractos crudos de *Philibertia gilliesii* se obtuvieron tal como se ha indicado anteriormente (*cfr.* 3), recolectando el látex de los frutos sobre buffer Tris-HCl 0,1M de pH 7,5 conteniendo EDTA 5 mM y cisteína 5 mM, pero sin la etapa de centrifugación.

4.2. Obtención de Extractos Clarificados

La clarificación de los extractos crudos se realizó por centrifugación a 19000 rpm durante 1 hora, obteniéndose una preparación enzimática libre de restos vegetales y otros materiales insolubles a la que denominamos *philibertaina g.*

4.3. Obtención de Extractivos para la Determinación de Actividad Carboxipeptidásica e Inhibitoria de Carboxipeptidasa A

En este caso el látex exudado de *P. gilliesii* fue recolectado en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 7,5 conteniendo $ZnSO_4$ 10^{-5} M, ácido iodo acético (AIA) 100 μ M y PMSF 1 mM. Los iones Zn^{2+} son necesarios para asegurar la actividad carboxipeptidásica pues estas enzimas pertenecen al tipo catalítico de las metalopeptidasas. El AIA -inhibidor de endopeptidasas cisteínicas- y el

PMSF -inhibidor de endopeptidasas serínicas- se agregaron con el fin de evitar la posible degradación de la enzima carboxipeptidasa por acción de las mencionadas endopeptidasas.

El buffer de recolección utilizado para detectar inhibidores de carboxipeptidasa A contuvo la siguiente composición: cítrico-citrato 0,1 M de pH 4, AIA 100 μ M y PMSF 1 mM, los inhibidores de proteasas se agregaron con el fin de evitar la posible degradación polipeptídica.

5. CONTENIDO DE PROTEÍNAS

5.1. Determinación por el Método de Bradford

Se utilizó el método de Bradford (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 e interfieren con el clásico método de Lowry (Peterson, 1979).

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,1 a 1,0 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 10-100 μ g/ml para el microensayo.

5.2. Determinación por Medida Directa de la Absorbancia

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

6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

6.1. Caseína

6.1.1. Preparación del Sustrato

Se suspendió 1 g de caseína tipo Hammarsten (Research Organics) en 100 ml de solución buffer 0,1 M de pH adecuado al ensayo. La suspensión se colocó en un baño de agua que se llevó a ebullición y se mantuvo durante 20 minutos en esas condiciones. La solución resultante se filtró por papel en caliente y una vez fría se le agregó cisteína para obtener una concentración final 10 mM, ajustándose el pH de ser necesario. El sustrato se utilizó el mismo día en que fue preparado.

6.1.2. Desarrollo de las Hidrólisis

De no indicarse lo contrario, la mezcla de reacción contuvo 1,1 ml de solución de caseína al 1 % conteniendo cisteína 10 mM y 0,1 ml de la preparación enzimática. La reacción fue llevada a cabo a 37 °C y detenida por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Los tubos fueron enfriados a 4 °C, mantenidos en heladera durante 30 minutos y luego centrifugados a 6.000 g durante 20 minutos. La absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm fue leída en una celda de 1 cm. En todos los casos fueron realizados ensayos en blanco inactivando la enzima con TCA al 5 % previo al agregado del sustrato. Los ensayos se realizaron por quintuplicado y a diferentes tiempos.

6.1.3. Cálculo de la Actividad Enzimática

La absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm es una medida de la actividad enzimática. Siguiendo el criterio de Sarath *et al.* (2001) para expresar la actividad enzimática cuando se utilizan sustratos proteicos, se definió 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 un minuto, en las condiciones de ensayo.

6.2. 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. Además, la preparación enzimática de *Euphorbia peplus* presentó un blanco muy elevado, a los dos valores de pH elegidos, sugiriendo la presencia de alguna sustancia interferente a esa longitud de onda, por lo que su actividad debió ser analizada en todos los casos empleando azocaseína como sustrato.

6.2.1. Preparación del Sustrato

El sustrato (azocaseína al 2 %) fue preparado por la técnica de Charney & Tomarelli (1947) modificada por López (1995).

6.2.2. Desarrollo de las Hidrólisis

La mezcla de reacción contuvo 250 µl de azocaseína al 2 % en buffer 0,1 M de pH adecuado al ensayo, conteniendo cisteína 10 mM y 150 µl del extracto enzimático. La mezcla se incubó a 37 °C y la reacción se detuvo agregando 1,2 ml de ácido tricloroacético al 10 %; los tubos se mantuvieron en reposo durante 15 minutos y luego se centrifugaron durante 20 minutos a 4.000 g. Se vertieron 1,2 ml del sobrenadante en un tubo de ensayo conteniendo 1,4 ml de NaOH 1 M 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. Los ensayos se realizaron por quintuplicado y a diferentes tiempos.

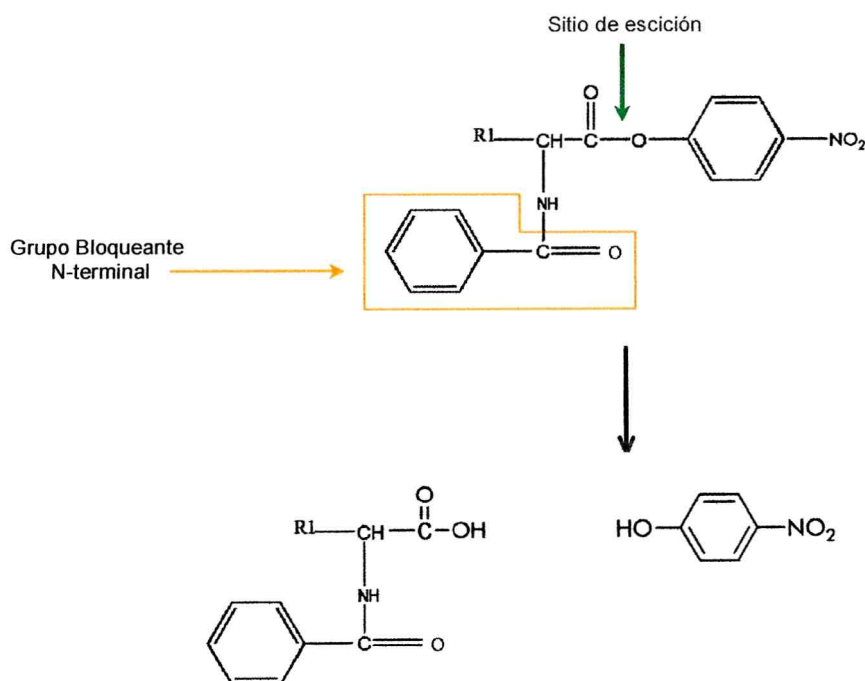
6.2.3. Cálculo de la Actividad Enzimática

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 minuto en las condiciones de ensayo.

7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SOBRE SUSTRATOS SINTÉTICOS

7.1. Derivados N- α -carbобензохи-p-nitrofenil Ésteres de Aminoácidos (N-CBZ-aa)

El uso de este tipo de sustratos permite determinar la actividad endoesterásica relativa respecto al aminoácido que aporta el grupo carboxilo. En ellos están bloqueados tanto el grupo α -NH₂ como el α -COOH del aminoácido, éste último con un grupo cromóforo que al liberarse produce color.



Esquema de hidrólisis de un N-CBZ-aa, liberando p-nitrofenol.

La actividad de la preparación enzimática sobre N-CBZ-aa fue ensayada sobre los derivados de los siguientes aminoácidos: Ala, Asn, Asp, Gln, Gly, Ile, Leu, Phe, Pro, Trp, Tyr y Val.

Se prepararon tres diluciones independientes de cada derivado de aminoácido partiendo de una solución stock de concentración 10 mM en acetonitrilo y llevando, con el mismo solvente, a una dilución 0,5 mM.

La solución de philibertaína g fue preactivada realizando una dilución al medio en buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 conteniendo EDTA 2 mM y cisteína 20 mM. Antes de iniciar la reacción, el extractivo enzimático fue diluido hasta llegar a una dilución final 1:500 en el mismo buffer sin cisteína. El mismo procedimiento de sucesivas diluciones se realizó sobre una alícuota del buffer con cisteína 10 mM con el fin de ser empleada en reemplazo del extracto enzimático en las hidrólisis no enzimáticas (blanco de reacción). Cabe mencionar que cuando se utiliza cisteína como activador de proteasas cisteínicas es esencial utilizar los blancos correctos debido a que la cisteína actúa catalizando la hidrólisis del sustrato.

Cada ensayo se realizó por triplicado conservando el siguiente orden:

Hidrólisis Enzimática de N-CBZ-aa

Extracto enzimático (1:500)	100 ul
Buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 y EDTA 2 mM	1,8 ml
Sustrato 0,5 mM (en acetonitrilo)	100 ul
<i>Se mezcla por inversión 3 veces y se coloca en el espectrofotómetro</i>	
Tiempo de lectura a 405 nm	Cada 7 s hasta 3 min

Hidrólisis No Enzimática (Blanco)

Buffer preparado como se ha indicado previamente	100 ul
Buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0 y EDTA 2 mM	1,8 ml
Sustrato 0,5 mM (en acetonitrilo)	100 ul
<i>Se mezcla por inversión 3 veces y se coloca en el espectrofotómetro</i>	
Tiempo de lectura a 405 nm	Cada 7 s hasta 3 min

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 minuto a 37 °C y pH 8,0.

7.2. L - piroglutamil - L - fenilalanil - L - leucina - p-nitroanilida

En las determinaciones de pH óptimo, efecto de inhibidores y constante de Michaelis de la enzima purificada se utilizó el sustrato sintético L-piroglutamil-L-fenilalanil-L-leucina-p-nitroanilida (PFLNA). La mezcla de reacción contuvo 1,5 ml de buffers de Good (Good e Izawa, 1972) 0,025 M de valores de pH entre 5,0 y 9,0, conteniendo KCl 300 mM, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM, 180 μ l de PFLNA 1 mM en dimetilsulfóxido (DMSO) y 120 μ l de la solución enzimática a ensayar. La actividad amidásica fue medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 410 nm, con lo que se evaluó la cantidad de p-nitroanilina liberada por la hidrólisis del sustrato. La reacción se llevó a cabo a 39 °C durante 3 minutos; los valores de absorbancia se registraron en forma continua (Filippova *et al.*, 1984). Los blancos de reacción se realizaron agregando el buffer correspondiente en lugar de la preparación enzimática.

Los ensayos enzimáticos y blancos fueron realizados por triplicado.

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CARBOXIPEPTIDÁSICA

Para el ensayo de actividad carboxipeptidásica se añadieron a una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico 2 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 0,05 M de pH 7,5 conteniendo NaCl 0,1 M), 10 μ l de solución de sustrato N-(4-Metoxifenilazofornil)-Phe-OH (color naranja), disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) en una concentración 10 mM. El contenido fue mezclado por inversión y luego se agregaron 10 μ l del extractivo enzimático obtenido como se indicó en 4.3. Inmediatamente luego de una nueva mezcla por inversión se registró el descenso de absorbancia a 350 nm durante 3 min. Como control positivo se utilizó carboxipeptidasa A bovina (CPA) de SIGMA (Carboxipeptidasa A, Bovine pancreas) y en el ensayo utilizado como blanco de reacción se reemplazó el extracto enzimático por el mismo volumen de buffer.

9. EFECTO DE LA CISTEÍNA SOBRE LA ACTIVIDAD DE PHILIBERTAÍNA G

9.1. Preactivación del Extracto Enzimático

Con el fin de establecer las condiciones óptimas de activación de la preparación enzimática se realizaron ensayos incubando el extracto enzimático clarificado con diferentes concentraciones de cisteína a distintos tiempos.

Se adicionaron 0, 5, 10, 20 y 30 mM de cisteína a distintas alícuotas del extracto enzimático, los que fueron incubados durante 0, 5, 15, 30 y 60 minutos en baño de hielo. Finalizado dicho tiempo se determinó la actividad caseinolítica en buffer Tris-HCl 0,1 M a pH 8 (*cf.* 6.1) conteniendo 10 mM de cisteína en la mezcla de reacción.

9.2. Efecto de la Cisteína en la Mezcla de Reacción

Para establecer las condiciones del medio de reacción que permitan a la preparación enzimática manifestar la máxima actividad, se incorporó al sustrato (caseína) 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM de cisteína y luego se determinó la actividad proteolítica como se indica en el ítem 6.1. en buffer Tris-HCl 0,1 M a pH 8. Este ensayo se realizó con extracto enzimático clarificado sin preactivar y previamente activado con 5 mM de cisteína.

10. EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE GRUPO

El método más adecuado y sencillo para determinar el grupo catalítico al que pertenece una peptidasa se basa en determinar su susceptibilidad frente a inhibidores específicos de grupo. A continuación se detallan los inhibidores utilizados.

- N-[N'-(L-3-trans-carboxyxiran-2-carbonil)-L-leucil] agmatina (E64): inhibidor irreversible específico de proteasas cisteínicas que no afecta residuos de cisteína en otras enzimas o reactivos con bajo peso molecular tales como β -mercaptoetanol (Salvesen & Nagase, 2001).

- Ácido iodo acético (AIA): inhibidor no específico de proteasas cisteínicas, también puede inhibir otras enzimas e interaccionar con compuestos de bajo peso molecular como β -mercaptoetanol (Salvesen & Nagase, 2001).
- 1,10-Fenantrolina: inhibidor de metaloproteasas o proteasas activadas por metales, actúa como quelante y su efecto es reversible. Dado que posee una constante para iones zinc ($2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) mucho mayor que para iones calcio ($3,2 \text{ M}^{-1}$) este quelante es usualmente empleado para metaloproteasas dependientes de zinc (Salvesen & Nagase, 2001).
- Fenilsulfonilmetilfluoruro (PMSF): inhibidor irreversible de proteasas serínicas, también inhibe proteasas cisteínicas reversiblemente por reducción de tioles (Salvesen & Nagase, 2001).
- Pepstatina A: es un compuesto de tipo pentapeptídico secretado por el género *Streptomyces* que contiene aminoácidos inusuales [Ácido (3S,4S)-4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico] y se comporta como inhibidor específico de proteasas aspárticas (Salvesen & Nagase, 2001).

10.1. Efecto de Inhibidores Específicos Sobre la Actividad Endopeptidásica

Para determinar la pertenencia a los tipos mecanísticos propuestos por Barrett y Rawlings (1991), las preparaciones enzimáticas sin preactivar con cisteína fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C empleando inhibidores específicos. Se utilizaron PMSF en concentración 1 mM para peptidasas serínicas, E-64 en concentración 100 μM y AIA en concentración 100 μM para cisteínicas, pepstatina A en concentración 10 μM para aspárticas y 1,10-fenantrolina en concentración 10 mM para metalopeptidasas (Salvesen & Nagase, 2001). En todos los casos se realizaron controles donde se reemplazó el inhibidor por un volumen igual de agua o de metanol (solventes usados para disolver cada inhibidor) bajo las mismas condiciones; estos valores se tomaron como 100 % de actividad.

Finalizada la incubación se determinó la actividad residual sobre caseína en todos los casos (*cf.* 6.1), con la excepción del ensayo con 1,10-fenantrolina en el que se utilizó en su lugar azocaseína como sustrato (*cf.* 6.2).

10.2. Efecto de Inhibidores Específicos de la Actividad Amidásica

Para determinar el mecanismo catalítico de philibertaina g I, la proteasa purificada de *pl* más alcalino, se utilizaron inhibidores específicos de grupo como el E-64 (100 μ M), pepstatina A (1 μ M), PMSF (1 mM) y 1,10-fenantrolina (10 mM), midiendo la actividad amidásica residual utilizando el sustrato sintético PFLNA.

Se incubaron 1760 μ l de buffer fosfato 0,1 M de pH 6,5 conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM con 40 μ l de enzima purificada, durante 5 minutos a 30 °C con el fin de activar la enzima. Luego se agregaron 200 μ l del correspondiente inhibidor y se incubó la mezcla por 30 minutos a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo de incubación la actividad enzimática residual fue medida por la adición de 100 μ l de sustrato (PFLNA 1mM en DMSO) leyendo la absorbancia a 410 nm en forma continua durante 5 minutos. En todos los casos se realizaron controles sin inhibidor bajo las mismas condiciones, pero con el agregado del correspondiente volumen de agua o de metanol (solventes usados para disolver cada inhibidor), los cuales se tomaron como 100 % de actividad.

10.3. Efecto de la Preactivación del Extracto Enzimático sobre la Inhibición con AIA

Diferentes alícuotas de la preparación enzimática sin preactivar y preactivada (*cf.* 9.1) con 5 mM de cisteína fueron incubadas con distintas concentraciones de AIA 0, 1, 10 y 15 mM durante 30 minutos a 37 °C. Pasado el período de incubación se determinó la actividad proteolítica de las diferentes preparaciones enzimáticas, utilizando caseína como sustrato como fue indicado en el ítem 6.1.

11. EFECTO DE AGENTES QUÍMICOS

Se evaluó el comportamiento de philibertina g en presencia de distintos agentes químicos y desnaturalizantes comúnmente utilizados en la industria y en diferentes etapas durante el aislamiento, purificación y caracterización de las enzimas presentes en dicho extracto.

El ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) actúa como quelante de iones bivalentes, inhibiendo metaloproteasas o proteasas dependientes de iones metálicos como proteasas serínicas dependientes de calcio (Salvesen & Nagase, 2001). El dodecil sulfato de sodio (SDS) es un detergente aniónico y el tritón X-100 uno no iónico, ambos se emplean como agentes desnaturalizantes. La urea es usada como agente disociante causando la ruptura de los puentes de hidrógeno. Por su parte el CaCl_2 es agregado a la leche en los ensayos de coagulación, debido a que los iones Ca^{+2} son necesarios para la precipitación de la para-caseína durante el proceso de coagulación (Fox, 1989 y Visser, 1993).

En todos los casos se determinó la actividad caseinolítica del extracto enzimático con el agente químico presente en la mezcla de reacción. Los ensayos con SDS se realizaron de dos formas, una como fue mencionada anteriormente y otra preincubando la enzima con el SDS al 1 % durante 30 minutos a 20°C. Finalizada la incubación se determinó la actividad proteolítica residual sobre caseína de la forma indicada en 6.1.

En todos los casos se realizaron controles sin el agente químico bajo las mismas condiciones, aunque con el agregado del correspondiente volumen de buffer; los valores obtenidos se tomaron como 100 % de actividad. Las concentraciones efectivas de los diferentes agentes químicos se muestran en la siguiente tabla

Agente Químico	Concentración en la mezcla de reacción
SDS	1 %
Tritón X-100	1 %
Urea	4 M
NaCl	0,3 M
EDTA	10 mM
CaCl₂	10 mM

12. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE LA PREPARACIÓN ENZIMÁTICA

12.1. Efecto de las Bajas Temperaturas Sobre la Actividad Proteolítica

Se almacenaron preparaciones enzimáticas (extracto crudo y philibertaína g) a dos diferentes temperaturas y se ensayó el efecto del tiempo de almacenamiento sobre la actividad caseinolítica de las preparaciones. Alícuotas de 1 ml de cada extractivo se conservaron en heladera (8 °C) y congeladas a -20 °C. Luego de 8, 30, 60 y 180 días fueron descongeladas dos muestras correspondientes a cada tiempo de conservación, determinándose la actividad residual de la forma indicada en 6.1. Los datos de philibertaína g conservada a -20 °C por tiempos más prolongados fueron obtenidos de la misma manera.

12.2. Efecto de la Liofilización Sobre la Actividad Proteolítica

Se ensayó el efecto de la liofilización sobre la actividad caseinolítica de philibertaína g. 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 el ítem 6.1.

13. EFECTO DEL PH SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para obtener el perfil de pH de philibertaina g y de philibertaina g I (enzima purificada) se utilizó caseína preparada en los siguientes buffers (25 mM): MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (Good e Izawa, 1972) en un rango de pH 6,0 a 11,0 con intervalos de 1 unidad de pH. El ensayo fue realizado como se indicó en 6.1 incubando la mezcla de reacción a 37 °C.

14. 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 la estabilidad de la preparación enzimática dentro del rango de pH de mayor actividad caseinolítica durante períodos más prolongados que los utilizados en las experiencias habituales de laboratorio. El experimento se llevó a cabo incubando las preparaciones enzimáticas durante 0, 15, 30, 60 y 120 minutos en baño de hielo a pH 7, 8, 9 y 10, utilizando los buffers (25 mM) MES, MOPS, TAPS, AMPSO y CAPS (Good e Izawa, 1972). Luego de cada incubación se determinó la actividad residual sobre caseína de la manera indicada en 6.1.

15. EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA

Para estudiar el efecto de la fuerza iónica sobre la actividad enzimática de philibertaina g, se determinó la actividad proteolítica de la manera habitual (*cfr.* 6.1) pero con el agregado de cantidades crecientes de NaCl a la preparación del sustrato. Las diferentes soluciones de caseína empleadas en

este ensayo se prepararon al 1 % y a pH 8 conteniendo 0,00; 0,25; 0,50; 1,00; 1,50 y 2,00 M de NaCl.

16. ESTABILIDAD TÉRMICA

Con el objeto de determinar el comportamiento de philibertaína g luego de ser sometida durante tiempos variables a distintas temperaturas. Las preparaciones enzimáticas fueron incubadas durante 0, 5, 10, 30, 60, 90 y 120 minutos a 25 °C, 37 °C, 45 °C, 55 °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 6.1.

17. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS

Para detectar la presencia de actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (CPA) se utilizó el extractivo de *Philibertia gilliesii* obtenido como se indicó en el ítem 4.3. La actividad inhibitoria se manifiesta por un descenso en la velocidad de desaparición del color naranja (Abs. 350 nm), propio del sustrato utilizado (N-(4-Metoxifenilazoformil)-Phe-OH) en la determinación de la actividad de Carboxipeptidasa A (*cf.* 8).

El ensayo de inhibición se realizó siguiendo dos protocolos diferentes.

Sin Preincubación del Extracto y la Enzima	
Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5	2000 µl
Solución de CPA bovina (Sigma) 10 µg/ml	10 µl
Solución de sustrato 10 mM	10 µl
<i>Luego de 40 segundos de iniciada la reacción</i>	
Muestra (extractivo conteniendo inhibidores)	10 µl

Con Preincubación del Extracto y la Enzima	
Muestra (extractivo conteniendo inhibidores)	10 μ l
Solución de CPA bovina (Sigma) 10 μg/ml	10 μ l
<i>Incubar durante 5 minutos a 37 °C</i>	
Buffer Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,1 M, pH 7,5	2000 μ l
Solución de sustrato 10 mM	10 μ l

La reacción fue monitoreada por medidas continuas de absorbancia durante 3 minutos (*cfr.* 8). En los ensayos utilizados como blancos la muestra fue reemplazada por buffer.

18. HIDROLISIS DE PROTEÍNAS DE PESCADO

El objetivo del experimento fue determinar el grado de hidrólisis de las proteínas presentes en el agua de cola por acción de philibertaína g y analizar los productos generados durante la proteólisis, en comparación con la hidrólisis producida por alcalasa (preparación enzimática comercial obtenida de *Bacillus licheniformis*, Novo Industri A/S, Denmark) empleando la misma relación enzima/sustrato.

18.1. Obtención del Agua de Cola

La fuente de proteínas de pescado fue agua de cola, nombre con que se designa al efluente líquido de las fábricas de harina de pescado. Este líquido residual contiene principalmente agua, sólidos suspendidos y proteínas solubles. Este líquido fue obtenido del procesado de merluza (*Merluccius hubbsi* y *Macruronus magellanicus*), savorín (*Seriolella porosa*) y langostino (*Pleoticus muelleri*) y transportado al laboratorio, donde se dejó enfriar. Una vez frío se sacó la capa de aceite supernadante mediante aspirado y el aceite emulsionado remanente se separó por centrifugación a 6000 rpm y temperatura ambiente (centrífuga Sorvall RC C5). La capa de aceite se retiró mediante un aspirado final. Al agua de cola así obtenida se le agregó tetraciclina al 0,002 %

como preservante (del Valle & Aguilera, 1991), se homogeneizó, fraccionó y almacenó a -20°C para posteriores análisis.

18.2. Obtención de la Fracción Soluble y de la Fracción Insoluble

Para la obtención de estas dos diferentes fracciones se tomó una alícuota de agua de cola y se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fue denominado fracción soluble del agua de cola “FS” y el precipitado (pellet), fracción insoluble del agua de cola “FI”. La fracción insoluble fue secada en estufa a 40°C .

18.3. Determinación de la Composición Química del Agua de Cola

Con el fin de analizar las características físico químicas del agua de cola, se realizaron las siguientes determinaciones que se indican a continuación.

18.3.1 Sólidos Totales

Se tomaron fracciones de 100 ml de agua de cola y se colocaron sobre cápsulas de porcelana previamente calcinadas y taradas. Dichas cápsulas fueron colocadas en estufa a 105°C hasta peso constante. Luego de enfriadas en desecador se realizaron las correspondientes pesadas. La determinación se realizó por quintuplicado.

18.3.2 Cenizas

Las cápsulas provenientes de la determinación de sólidos totales fueron calcinadas en mufla a 550°C por 24 horas sin ningún tratamiento posterior. Luego de enfriadas en desecador se realizaron las correspondientes pesadas. Cada determinación se realizó por quintuplicado.

18.3.3 Nitógeno Total

Los valores de nitrógeno total (N) fueron determinados por el método de Kjeldhal (micro-Kjeldhal) de acuerdo a la AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1995). La concentración de proteínas fue estimada como $N \times 6,25$. Las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado. Los análisis fueron realizados en el Servicio de Química del CENPAT-CONICET.

18.4. Preparación de las Muestras Proteicas para el Posterior Análisis por Electroforesis

El objetivo del experimento fue comparar las diferencias en el perfil proteico de las muestras de agua de cola, de la fracción soluble y de la fracción insoluble, solubilizando las proteínas de dos maneras diferentes y analizar dichas muestras utilizando Tricina-SDS-Page, un sistema electroforético de alta resolución optimizado para la separación de péptidos en el rango de 5 a 20 kDa (*cfr.* 22.4).

18.4.1 Solubilización de las Proteínas con Buffer de Muestra

Las muestras analizadas con este método de solubilización fueron de agua de cola completa, de la fracción soluble y de la fracción insoluble. Las dos primeras muestras fueron tratadas previamente con 3 volúmenes de acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el fin de precipitar las proteínas solubles, luego fueron centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos. Los precipitados de cada una de las tres muestras fueron redissueltos en buffer de muestra (BM) constituido por Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8, conteniendo SDS al 2 %, β -mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0,001 %. Cada mezcla fue hervida por 3 minutos, centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos y el sobrenadante así obtenido fue utilizado para sembrar en el gel de poliacrilamida.

18.4.2. Solubilización de las Proteínas en Presencia de Urea

Las muestras solubilizadas con este método fueron de agua de cola completa y de la fracción insoluble con el fin de evaluar si con urea se

solubilizaban otras proteínas respecto al tratamiento anterior. Dichas muestras se agitaron constantemente por el término de 1 hora a temperatura ambiente con una solución de urea 9 M y SDS al 10 % en la proporción que se indica a continuación:

Mezcla de Solubilización		
Agua de cola	1 ml	-
Fracción Insoluble	-	143 mg
Urea 9 M	8 ml	2,7 ml
SDS 10 %	1 ml	300 μ l

Luego de transcurrido el tiempo de homogeneización, cada mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 20 minutos a temperatura ambiente. Una alícuota de cada sobrenadante fue mezclada con el mismo volumen de buffer de muestra (BM), mencionado en el ítem anterior, preparado con al doble de concentración (2X). Cada mezcla fue hervida por 3 minutos y luego centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos. El sobrenadante obtenido fue utilizado para sembrar el gel de poliacrilamida.

18.5. Hidrólisis Controlada de Proteínas de Pescado

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo utilizando agua de cola conteniendo un 6,86 % p/v de proteínas (*cfr.* 18.3.3) y una relación enzima/sustrato igual a 8,9 U_{cas}/g de proteína. La reacción se llevó a cabo a 45 °C, con el agregado de cisteína 25 mM en la mezcla reacción y pH 9, que fue ajustado con NaOH 1 N. Una vez acondicionado el sustrato -agua de cola- a las condiciones de temperatura, pH y concentración de Cys arriba mencionadas se agregó el volumen necesario de la preparación enzimática y se procedió a determinar el grado de hidrólisis. En todos los casos se realizaron ensayos en blanco, reemplazando la solución de enzima por una cantidad equivalente de buffer.

18.5.1. Determinación del Grado de Hidrólisis

El seguimiento de la hidrólisis se realizó con un "pH-stat" manual para valorar los protones liberados durante la proteólisis, 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 solución de NaOH 0,25 N cada vez que el mismo descendió 0,1 unidad. Luego de tres horas se detuvo la reacción por disminución del pH a 4,2 mediante el agregado de HCl 2 N.

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

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

donde α es el grado de disociación promedio de los grupos α -NH- y depende del pH y la temperatura. A pH 9 y 45 °C el valor de $1/\alpha$ es igual a 1,015. MP es la masa de proteína en gramos (Kjeldahl) y h_{tot} el número total de uniones peptídicas en el sustrato proteico (meq/g) que en el caso de proteínas de pescado se utilizaba el valor 8,6.

18.5.2. Obtención de Muestras de los Hidrolizados para su Análisis Electroforético

A diferentes tiempos (0, 2, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 minutos) se tomaron alícuotas de 200 μ l de la mezcla de la reacción de hidrólisis y se mezclaron con 1 ml de acetona a -20°C en un tubo de microcentrífuga. Se almacenaron a -20 °C para favorecer la precipitación de proteínas, luego las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm y solubilizadas como se indica en el ítem 18.4.1. El sobrenadante obtenido fue utilizado para sembrar en un gel de SDS-Tricina-PAGE de alta resolución (*cf.* 22.4).

El análisis de los geles obtenidos fue realizado por densitometría (*cf.* 26)

19. HIDRÓLISIS CONTROLADA DE PROTEÍNAS DE LECHE BOVINA

El objetivo del experimento fue determinar la acción del extracto enzimático de *Philibertia gilliesii* sobre caseínas bovinas y analizar los productos de hidrólisis generados durante la proteólisis.

19.1. Obtención del Sustrato

Las dispersiones del sustrato se prepararon al 1,25 % p/v por disolución de caseína tipo Hammarsten en buffer glicina-NaOH 0,1M de pH 9. La preparación del sustrato se realizó suspendiendo 1,25 g de caseína en 50 ml de solución buffer glicina-NaOH 0,2 M de pH 9. La suspensión se colocó en un baño de agua fría que luego fue llevada a ebullición y se mantuvo en esas condiciones durante 20 min. La solución resultante se filtró en caliente por papel, agregando luego 40 ml de agua destilada y se la dejó enfriar. A la solución obtenida se le agregó cisteína para obtener una concentración final 25 mM, ajustándose el pH a 9 con NaOH 0,2 M y agregando luego agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. La solución se conservó a 4 °C y fue utilizada el mismo día en que fue preparada.

19.2. Desarrollo de las Hidrólisis

Los ensayos se realizaron a 45 °C con una relación enzima/sustrato de 8,9 U_{cas}/g proteína. A 450 µl de sustrato se le adicionaron 50 µl de extracto enzimático, deteniéndose la reacción a distintos tiempos (0, 5, 10, 30, 60, 90 y 180 minutos) por precipitación con 500 µl de TCA al 5 %. Los blancos fueron preparados reemplazando los 50 µl de enzima por buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8,0. Los tubos se dejaron reposar durante 30 minutos a 4 °C.

19.3. Obtención de Muestras de los Hidrolizados para su Análisis Electroforético

Las muestras obtenidas según la técnica descrita en el ítem 19.2 se centrifugaron a 9.500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante. Los precipitados conteniendo las proteínas y los péptidos insolubles en TCA se redisolviéron en 450 µl de buffer de muestra 2X (BM: Tris-HCl 62,5 mM de pH 6,8 conteniendo SDS al 2 %, β-mercaptoetanol al 5 %, glicerol al 10 % y azul de bromofenol al 0,001 %.) y se alcalinizaron con 50 µl de NaOH 1N. Se llevaron a ebullición durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 9.000 rpm, el sobrenadante obtenido fue utilizado para sembrar el gel de SDS-Tricina-PAGE de alta resolución (*cfr.* 22.4). El análisis de los geles obtenidos fue realizado por densitometría (*cfr.* 26)

20. COAGULACIÓN DE LECHE BOVINA

A causa de consideraciones éticas relacionadas al uso del cuajo bovino como coagulante de leche, al creciente número de personas que siguen una dieta vegetariana y a la posibilidad de obtener quesos con nuevos sabores se ha incrementado el interés por la obtención de coagulantes de origen vegetal (Tavaria *et al.*, 1997). En base a estas circunstancias se ha realizado la comparación del poder coagulante de extractos parcialmente purificados de *Philibertia gilliesii* Hook. *et* Arn. (*philibertiaina* g) con los de otros tres obtenidos en el LIPROVE a partir del látex de *Asclepias fruticosa* L. (*asclepaína* f) y de frutos de *Bromelia balansae* Mez (*balansaína*) y *Bromelia hieronymi* Mez (*hieronymaína*).

La actividad coagulante de leche fue medida disolviendo leche descremada en polvo (100 g/l) en 10 mM de CaCl₂. Cada extracto enzimático (0,1 ml) fue mezclado con 0,5 ml de este sustrato. Los blancos fueron preparados reemplazando el extracto enzimático por solución buffer. Una unidad de actividad coagulante (CU) fue definida como la recíproca del tiempo (min) necesario para iniciar la coagulación de la leche (Pardo *et al.*, 2001).

21. PURIFICACION

21.1. Purificación Preliminar por Precipitación Acetónica Fraccionada

Aunque el extracto crudo obtenido a partir de látex de frutos -que presenta habitualmente un elevado contenido de componentes de diversas densidades- ha sido clarificado (*cfr.* 4.2) obteniéndose un producto útil para aplicaciones biotecnológicas, esta preparación no es adecuada para ser sembrada en columnas cromatográficas. Por lo antes expresado se decidió realizar una purificación preliminar por precipitación acetónica fraccionada, lo que permite además enriquecer el extracto en proteína activa. Para ello se tomaron diferentes alícuotas de philibertaína g, cada una con un volumen de 2 ml. A cada alícuota se le agregaron 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00; 4,00 y 5,00 volúmenes de acetona a -20 °C, gota a gota y con agitación suave, manteniendo la temperatura de la mezcla entre 0 y 4 °C a los efectos de reducir al mínimo la desnaturalización. Las suspensiones obtenidas se dejaron reposar durante 1 hora a -20 °C y finalmente se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 minutos. Se descartaron cuidadosamente los sobrenadantes y los precipitados fueron sometidos a vacío durante 15 minutos para eliminar restos de acetona. Cada precipitado se disolvió en 2 ml de buffer Tris-HCl 0,1 M de pH 8, manteniendo de esta manera el volumen original. A los precipitados redissueltos y a una muestra sin precipitar, que se la utilizó como control, se les determinó actividad caseinolítica y el contenido de proteínas de acuerdo a las técnicas descriptas en los ítems 6.1 y 5.1, respectivamente.

En base a los resultados obtenidos, mostrados en el ítem 4.1 de Resultados y Discusión (R&D), fue seleccionado el modo de obtención de una preparación enzimática parcialmente purificada (PEPP). La técnica consistió en una primera precipitación de philibertaína g con medio volumen de acetona a -20 °C y una segunda precipitación del sobrenadante obtenido, con 3 volúmenes de acetona fría. El “pellet” correspondiente a esta segunda precipitación fue redissuelto en buffer Tris-HCl 0,1 M pH 8 y la solución obtenida (PEPP) fue utilizada para realizar las diferentes cromatografías.

21.2. Purificación Cromatográfica de Intercambio Iónico

Para resolver la mezcla de proteínas presentes en la preparación enzimática parcialmente purificada se recurrió a la cromatografía de intercambio iónico, la que permite resolver mezclas de proteínas con valores de *pI* cercanos. La optimización de la purificación fue compleja y requirió variar el pH de corrida, las condiciones de elución y los sistemas buffer.

21.2.1. Selección de los Parámetros Cromatográficos

En todos los casos se empleó un equipo FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia) y una columna XK 16/40 rellena con un intercambiador catiónico (SP-Sepharose Fast Flow, Amersham). La muestra sembrada fue la preparación enzimática parcialmente purificada, PEPP (*cf.* 21.1). Los sistemas buffer empleados, volumen de muestra, gradientes salinos y velocidad de corrida variaron en las diferentes separaciones cromatográficas y los cambios más significativos se detallan a continuación. Los eluatos se recolectaron automáticamente y el volumen de cada fracción fue de 1,5 ml. En base a los valores de *pI* obtenidos por IEF de la PEPP, se comenzó realizando una cromatografía de intercambio catiónico a pH 7,95.

21.2.1.1. Cromatografía inicial

La columna fue equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,95 (buffer de partida). Se sembraron 3 ml de la PEPP y se realizó un lavado a una velocidad de flujo de 1 ml/min con un volumen de columna del buffer de partida. Las proteínas retenidas fueron eluidas a la misma velocidad de flujo (1 ml/min) con cinco volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,0-1,0 M preparado en el buffer de partida.

21.2.1.2. Variación del gradiente salino

Con el fin de mejorar la resolución se realizaron modificaciones de los gradientes salinos (0,0 a 0,8 M y 0,0 a 0,7 M) de NaCl. En estos dos casos el

volumen sembrado fue de 500 μ l, manteniéndose constante el resto de los parámetros.

21.2.1.3. Variación del pH

Con el objeto de que las proteínas alcalinas activas eluyan más fácilmente se incrementó el pH de trabajo en una unidad utilizando el mismo sistema buffer (Tris-HCl 50 mM) de pH 8,95. El volumen de siembra fue de 3 ml de la PEPP, se realizó una elución isocrática con un volumen de columna de una solución de NaCl 0,1 M en buffer de partida. Durante esta etapa la velocidad de flujo fue de 1 ml/min, la que se redujo a 0,5 ml/min desde la aplicación de cuatro volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl (0,1 a 0,4 M).

21.2.1.4. Variación del sistema buffer

Dado que el sistema Tris-HCl posee baja capacidad amortiguadora a valores de pH cercanos a 9, la demora en lograr el equilibrio de la columna resultó excesiva lo mismo que el consumo de reactivos. A causa de este inconveniente se seleccionó el sistema Glicina-NaOH 50 mM para las sucesivas cromatografías.

Con el fin de comprobar si al variar las especies químicas que componen el buffer se producía alguna variación en la forma de elución de la muestra la siguiente cromatografía se realizó en las mismas condiciones de pH, gradiente y velocidad indicadas en el ítem anterior, pero empleando un volumen de muestra de 500 μ l.

21.2.1.5. Variaciones en el sistema de elución

La última etapa de optimización consistió en aplicar gradientes variables a lo largo de la cromatografía. Se utilizaron tres programas diferentes:

a) Buffer de partida: Glicina-NaOH 50 mM de pH 8,95. Elución 1: un volumen de columna del buffer de partida conteniendo NaCl 0,1 M a una velocidad de 2 ml/min. Elución 2: medio volumen de columna de un gradiente lineal de NaCl

0,1 a 0,2 M a una velocidad de 1 ml/min. Elución 3: 4,5 volúmenes de columna de un gradiente 0,2 a 0,4 M de NaCl a una velocidad de 1 ml/min.

b) Buffer de partida: Glicina-NaOH 50 mM de pH 8,64. Lavado: un volumen de columna del buffer de equilibrio a una velocidad de 2 ml/min. Elución 1: 1,8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,0-0,1 M en el mismo buffer. Elución 2: 0,2 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,1 a 0,12 M a la misma velocidad. Elución 3: elución isocrática con 0,5 volúmenes de columna de NaCl 0,12 M. Elución 4: 2,7 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,12 a 0,3 M. Elución 5: 1 volumen de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,3 a 0,4 M. En todos los casos de elución se realizó a una velocidad de flujo de 1 ml/min.

c) Buffer de partida: Glicina-NaOH 50 mM de pH 8,64. Lavado: un volumen de columna del buffer de equilibrio, a una velocidad de 2 ml/min. Elución 1: un volumen de columna de buffer conteniendo 0,035 M de NaCl a 2 ml/min. Elución 2: 4,8 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,035-0,1 M, a una velocidad de 1,5 ml/min. Elución 3: 1 volumen de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,1-0,17 M. Elución 4: elución isocrática con 2 volúmenes de columna con NaCl 0,17 M, a una velocidad de 1,5 ml/min. Elución 5: 2 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,17-0,2 M, a una velocidad de 1,5 ml/min. Elución 6: 5,4 volúmenes de columna de un gradiente lineal de NaCl 0,2-0,35 M, a una velocidad de 1,5 ml/min. En todos los casos el NaCl fue disuelto en el buffer de partida.

En todos los cromatogramas el contenido de proteínas fue monitoreado por absorbancia a 280 nm (*cfr.* 5.2) y la actividad caseinolítica determinada como se indicó en el ítem 6.1.

21.3. Purificación Cromatográfica de Exclusión Molecular

Para tratar de resolver la mezcla de proteínas presentes en la preparación enzimática parcialmente purificada por precipitación acetónica fraccionada se recurrió a esta técnica, que permite separar proteínas por tamaño molecular.

21.3.1. Preparación de la Muestra y Condiciones de Corrida en Baja Fuerza Iónica

A la preparación enzimática parcialmente purificada se le realizó un cambio de buffer del siguiente modo: la muestra (PEPP) fue precipitada con acetona fría (-20 °C), centrifugada a 10.000 rpm y redisuelta en buffer Gly-NaOH 50 mM pH 8,6 conteniendo tetrionato de sodio 5 mM. El tetrionato de sodio se utiliza como inhibidor reversible de cisteínproteasas (Patel & Jagannadham, 2003), efecto que se revierte en presencia de cisteína. La PEPP así obtenida fue filtrada a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa (con tratamiento para minimizar la unión de proteínas) con un diámetro de poro de 0,22 µm (Sartorius), de este modo se sembraron 1,4 ml de muestra en una columna rellena con Sephacryl S-100. La elución se realizó con el mismo buffer a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, recogiendo fracciones de 1,5 ml.

21.3.2. Preparación de la Muestra y Condiciones de Corrida en Alta Fuerza Iónica

La muestra fue preparada como se indicó en el ítem 21.3.1 utilizando el mismo buffer aunque conteniendo 0,3 M de NaCl con el fin de disminuir la interacción inespecífica existente entre las proteínas presentes en la preparación enzimática parcialmente purificada. El mismo volumen de muestra fue filtrado y sembrado sobre la columna rellena con Sephacryl S-100. La elución se realizó con el mencionado buffer manteniendo la fuerza iónica constante en 0,3 M de NaCl durante todo el desarrollo de la cromatografía, a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min, recogiendo fracciones de 1,5 ml.

22. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

22.1. Electroforesis Nativa

22.1.1. Preparación de las Muestras

Las muestras correspondientes a los extractivos clarificados de cada especie vegetal fueron concentradas por agregado de tres volúmenes de acetona. Los precipitados acetónicos así obtenidos fueron redissueltos en el buffer de muestra cuya composición se indica a continuación. Las muestras fueron centrifugadas a 16.000 g. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron en freezer a -20 °C hasta su posterior uso.

Buffer de Muestra	
Glicerol	10 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Buffer Tris-HCl 62,5 mM de pH 8,8 c.s.p.	100 ml

c.s.p.: cantidad suficiente para

22.1.2. Preparación de los Geles

22.1.2.1. Gel en gradiente

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). Los gradientes de poliacrilamida (Hames, 1990) se obtuvieron mezclando cantidades iguales de las dos soluciones de poliacrilamida que definen los extremos del gradiente, utilizando para ello un formador de gradientes (modelo 385, Bio-Rad) colocado sobre un agitador y adosado al mismo 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).

Buffer de Resolución		Solución A	
Tris	36,3 g	Sacarosa	0,90 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 8,8	Buffer de resolución	0,75 ml
Agua destilada (AD), c.s.p.	100 ml	Agua destilada (AD)	1,00 ml

Gel de Resolución	5 %	20 %
Acril-Bis (30:0,8)	1,00 ml	4,00 ml
Buffer de resolución	0,75 ml	----
Solución A	-----	2,00 ml
Agua destilada (AD)	4,25 ml	-----
<i>Tomar 2,7 ml y agregar:</i>		
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	5 µl	5 µl
Persulfato de amonio (PSA) 5%	12 µl	12 µl

22.1.2.2. Gel homogéneo con gel de apilamiento

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean II (Bio-Rad). La composición de los sistemas buffer y la de los geles empleados se indican a continuación en forma de tablas:

Buffer del Gel de Resolución	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 8,8
AD, c.s.p.	100 ml

Buffer del Gel de Apilamiento	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 6,8
AD, c.s.p.	100 ml

Gel de Resolución (12,5%)		Gel de Apilamiento (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml	Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer de resolución	1,25 ml	Buffer de apilamiento	0,87 ml
Agua destilada	4,49 ml	Agua destilada	4,86 ml
PSA 5%	105 µl	PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl	TEMED	5 µl
Volumen final	10,0 ml	Volumen final	7,00 ml

En primer lugar se colocaron 5 ml de la mezcla del gel de resolución en cada placa y se dejaron polimerizar sin mover el formador de geles. Sobre la mezcla del gel de resolución se colocaron 100 µl de *n*-butanol para alinear la interfase en contacto con el aire y facilitar la visualización de la polimerización. Luego de la polimerización se retiró el alcohol, se lavó la superficie con agua y se eliminó el exceso de agua con papel de filtro. A continuación se colocó la mezcla del gel de apilamiento y de inmediato los peines.

Es importante destacar que este tipo de gel se corrió con los electrodos del equipo invertidos dada la naturaleza muy básica de las proteínas de interés.

22.1.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 10-20 µl). La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 80 minutos 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

22.1.4. Fijación y Coloración

Finalizada la electroforesis, los geles se fijaron y tiñeron por inmersión en solución colorante de Coomassie Brilliant Blue R-250 durante 2 hs. Posteriormente se hicieron sucesivos lavados con solución decolorante para eliminar la coloración de fondo. Esta coloración tiene una sensibilidad de 0,2 a 0,5 µg por banda.

Solución Fijadora y Colorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	40 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	100 mg
AD, c.s.p.	100 ml
<i>(la solución se filtra antes de usar)</i>	
Solución Decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	25 ml
AD, c.s.p.	100 ml

22.2. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente

22.2.1. En Condiciones Reductoras

22.2.1.1. Preparación de las muestras

Las muestras correspondientes al extracto clarificado de cada especie

Buffer de Muestra	
Tris	1,57 g
SDS	2,00 g
Mercaptoetanol	5 ml
Glicerol	8 ml
Azul de bromofenol	2 mg
<i>Llevar a pH 6,8 con HCl 1 N</i>	
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

vegetal fueron concentradas por agregado de tres volúmenes de acetona fría (-20 °C). Los precipitados acetónicos así obtenidos fueron redissueltos en el buffer de muestra cuya composición se indica en la tabla anterior, de modo tal que la concentración final de proteínas fuese de 1-10 µg/µl.

Las muestras así dispuestas fueron llevadas a ebullición durante 5 minutos y centrifugadas a 16.000 g. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron en freezer a -20 °C hasta su posterior uso.

22.2.1.2. Preparación de los geles

Los geles se prepararon como se indicó en 22.1.2.1 con las soluciones que se indican a continuación (las cantidades consignadas son las necesarias para preparar dos placas).

Buffer de Resolución	
Tris	36,3 g
HCl 1M, c.s.p.	pH final 8,8
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

Solución A	
Sacarosa	0,90 g
Buffer de resolución	0,75 ml
SDS 10 %	0,06 ml
Agua destilada	0,94 ml

Gel de Resolución	5 %	20 %
Acril-Bis (30:0,8)	1,00 ml	4,00 ml
Buffer de resolución	0,75 ml	-----
Solución A	-----	2,00 ml
SDS 10 %	0,06 ml	-----
Agua destilada (AD)	4,19 ml	-----
<i>Tomar 2,7 ml y agregar:</i>		
N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED)	5 µl	5 µl
Persulfato de amonio (PSA) al 5%	12 µl	12 µl

22.2.1.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton de 25 μ l de capacidad. Los volúmenes de siembra fueron de 5 μ l para los patrones de peso molecular. En el caso de las muestras se calculó el volumen necesario para sembrar de 10 a 20 μ g de proteína por calle (volumen máximo 20 μ l). Los patrones de PM (Bio-Rad) utilizados fueron: fosforilasa b (97,4 kDa), seroalbúmina (66,2 kDa), ovalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (31 kDa), inhibidor de tripsina (21,5 kDa) y lisozima (14,4 kDa).

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean II Dual Slab Cell (Bio Rad) durante 60 minutos a corriente constante (30 mA por placa), empleando el siguiente buffer de reservorio (Hashimoto *et al.*, 1983), de pH 8,5:

Buffer de Reservorio	
Tris	0,05 M
Glicina	0,384 M
SDS	1 %

22.2.1.4. Fijación y coloración

22.2.1.4.1. Tinción con Coomassie Brilliant Blue R-250

Los geles de poliacrilamida fueron fijados, coloreados y decolorados como se indicó en el ítem 22.1.4.

22.2.1.4.2. Tinción con Plata

Para realizar esta coloración se siguió la técnica de tinción con plata, mejorada para proteínas vegetales, de Blum *et al.*, (1987) basada en la unión de los iones plata a las proteínas y su posterior reducción. Esta técnica emplea al tiosulfato como uno de sus reactivos por lo que presenta la ventaja que al formar complejos de plata permite eliminar la coloración inespecífica de fondo (*background*) producido por la precipitación de sales insolubles.

Este método alcanza una sensibilidad del orden de los nanogramos de proteína.

22.2.1.4.2.1. Fijación

Las proteínas fueron fijadas por inmersión de los geles en solución fijadora durante 1 hora o toda la noche, este procedimiento previene la difusión de las proteínas y remueve sustancias interferentes.

Solución Fijadora	
Acido acético glacial	12 ml
Metanol	50 ml
Formaldehído 37 %	0,05 ml
AD, c.s.p.	100 ml

22.2.1.4.2.2. Lavado y sensibilización de los geles

Luego de la fijación, los geles fueron lavados con etanol al 30 % tres veces de 20 minutos cada vez con el fin de remover el ácido acético cuya acidez interferiría en la siguiente etapa. Posteriormente, y con el fin de sensibilizarlos, fueron sumergidos en una solución de tiosulfato de sodio (0,2 g/l) durante un minuto. El exceso de tiosulfato es removido mediante tres lavados sucesivos con agua destilada, para remover el exceso de tiosulfato, el que podría formar una capa de sulfuro de plata sobre la superficie del gel.

22.2.1.4.2.3. Tratamiento con solución de nitrato de plata

Los geles previamente sensibilizados fueron sumergidos en una solución de plata y se mantuvieron en la oscuridad durante 20 minutos. El formaldehído de esta solución aumenta la sensibilidad y el contraste sin aumentar del *background*.

Solución de Plata	
AgNO₃	0,2 g
Formaldehído 37 %	0,075 ml
AD, c.s.p.	100 ml

Luego los geles fueron lavados dos veces con agua bidestilada (20 segundos por vez) para remover el AgNO_3 en exceso.

22.2.1.4.2.4 Desarrollo de la coloración

Los geles se sumergieron en la solución de desarrollo hasta que no se observó la aparición de más bandas, evitando la sobrecoloración del gel por depósito de precipitados de Ag_2S . La velocidad de revelado depende del tipo y concentración de las proteínas y del grado de entrecruzamiento del gel, entre 30 segundos para bandas con un contenido proteico total de 500 ng y 2 minutos para bandas con contenidos menores a 50 ng.

Finalizado el desarrollo, la reacción se detuvo sumergiendo los geles en solución de stopping durante 10 min.

Solución Desarrolladora		Solución de Stopping	
Na_2CO_3 anhidro	6,0 g	Acido acético glacial	10 ml
Solución de pretratamiento	1 ml	Metanol	12 ml
Formaldehído 37 %	0,05 ml	AD, c.s.p.	100 ml
AD, c.s.p.	100 ml		

22.2.2. En Condiciones No Reductoras

22.2.2.1. Preparación de las muestras

Las muestras correspondientes al extracto enzimático fueron concentradas por agregado de tres volúmenes de acetona. Los precipitados acetónicos así obtenidos fueron redissueltos en el buffer de muestra, de modo tal que la concentración final fuese de 1-10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, cuya composición se indica en la tabla.

Las muestras así dispuestas fueron centrifugadas a 16.000 g y los sobrenadantes obtenidos se conservaron en freezer a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su posterior uso.

Buffer de Muestra	
Tris	1,57 g
SDS	24 g
Glicerol al 10%	16 ml
Azul de bromofenol	4 mg
<i>Llevar a pH 6,8 con HCl 1 N</i>	
Agua destilada, c.s.p.	100 ml

c.s.p.: cantidad suficiente para

22.2.2.2. Preparación de los geles

Los geles fueron preparados según el protocolo desarrollado en el ítem 22.1.2.1.

22.2.2.3. Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras fueron aplicadas y corridas en las mismas condiciones que se explicaron en el ítem 22.2.1.3, habiéndose realizado una corrida de dos horas de duración.

22.2.2.4. Acondicionamiento de los geles destinados a la detección de actividad

Una vez removido el gel del equipo de electroforesis, se coloca en una solución de Tritón X-100 al 2,5 % en agua destilada, se incuba por una hora con suave agitación a temperatura ambiente, con el objeto de remover el SDS. Por último el gel es lavado con buffer Tris-HCl 0.1 M pH 8 conteniendo activadores como cisteína 10 mM, de esta forma queda listo para ser utilizado en la técnica de zimograma explicada en el ítem 25.

22.2.2.5. Fijación y coloración

Los geles fueron fijados y coloreados en las mismas condiciones que se explicaron en el ítem 22.1.4.

22.3. Electroforesis Desnaturalizante Discontinua con Sistema Buffer Tris-Glicina (SDS-PAGE)

22.3.1. Preparación de las Muestras

Las muestras fueron preparadas según el protocolo desarrollado en el ítem 22.2.1.1.

22.3.2. Preparación de los Geles

Los geles se moldearon como se explicó en el ítem 22.1.2.1, empleando los sistemas buffer empleados en dicho ítem, aunque variando la composición de los geles como se indican a continuación en forma de tablas:

Gel de Resolución (12,5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	4,15 ml
Buffer de resolución	1,25 ml
SDS al 10%	0,10 ml
AD	4,39 ml
PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	10 ml

Gel de Apilamiento (5%)	
Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
Buffer stock de stacking	0,87 ml
SDS 10%	70 µl
AD	4,79 ml
PSA 5%	105 µl
TEMED	5 µl
Volumen final	7 ml

22.3.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Las muestras fueron aplicadas según el protocolo desarrollado en 22.1.3.

La electroforesis se desarrolló en una celda Miniprotean II (Bio-Rad), a una intensidad de corriente constante de 30 mA durante el apilado (stacking) y de 60 mA hasta la finalización de la corrida, llegando el colorante al borde inferior del gel. El buffer de reservorio, cuya composición se indica en la siguiente tabla, se diluyó y colocó en los reservorios catódico (hasta cubrir la parte superior del gel) y anódico (hasta cubrir la mitad del gel).

Buffer de Reservorio (10 X)	
Tris	3,0 g
Glicina	14,4 g
SDS	1,0 g
AD, c.s.p.	100 ml

22.3.4. Fijación y Coloración

La fijación y decoloración de los geles se realizaron según el protocolo desarrollado en el ítem 22.1.4.

22.4. Electroforesis Desnaturalizante Discontinua con Sistema Buffer Tris- Tricina (SDS-Tricina-PAGE)

Esta técnica de electroforesis permite una mejor resolución de péptidos de bajo peso molecular, en particular en el caso de geles con Tricina de Alta Resolución (Pardo & Natalucci, 2002). Es un sistema muy adecuado para la separación de polipéptidos y proteínas en el rango de 5 a 100 kDa. La tricina es utilizada como ión de arrastre en el buffer catódico, permitiendo una mayor resolución de proteínas pequeñas a menores concentraciones de acrilamida que en el caso del clásico buffer Tris-glicina (Laemmli, 1970). Una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango entre 5 y 20 kDa, se logra sin la necesidad del uso de urea (Schägger & von Jagow, 1987). Las proteínas mayores a 30 kDa son desapiladas dentro del gel. Así se garantiza un pasaje

suave de estas proteínas al gel de separación y los efectos de carga excesiva están reducidos. Esto es de especial importancia cuando grandes cantidades de alguna proteína se siembran en los geles preparativos. Otra ventaja, si se desea emplear el sistema como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina y urea previene interferencias que ocurrirían en el curso del mencionado procedimiento.

22.4.1. Preparación de las Muestras

Las muestras fueron preparadas según los protocolos desarrollados en los ítems 18.4 y 18.5.2.

22.4.2. Preparación de los Geles

Para la resolución de muestras en el rango 5-100 kDa, se utilizó el sistema que utiliza los siguientes valores de los parámetros de Tjerten %T¹ y %C²: 10 % T y 3 % C para los geles de resolución y 4 % T y 3 % C para los geles de apilamiento. Este tipo de gel fue utilizado para las muestras de agua de cola completa, fracción soluble y fracción insoluble indicadas en el ítem 18.4.

Buffer del Gel	
Tris	36,3 g
SDS	0,3 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,45
AD c.s.p.	100 ml

Reactivos	Gel de Apilamiento (4%T, 3%C)	Gel Espaciador (10%T, 3%C)	Gel de Resolución (16%T, 6%C)
Acril-Bis (48 : 1,5)	0,4 ml	2 ml	-
Acril-Bis (46,5 : 3)	-	-	3,3 ml
Buffer del gel	1,25 ml	3,3 ml	3,3 ml
AD	3,4 ml	4,7 ml	3,4 ml
PSA 10%	40 µl	40 µl	40 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

¹ %T = (g acrilamida + g bisacrilamida) x 100/ volumen total

Para optimizar la separación de péptidos en el rango de 5 a 20 kDa, como es el caso del análisis de los hidrolizados de proteínas de pescado y de caseínas bovinas (*cfr.* 18.5.2 y 19.3) se emplearon geles de tricina de alta resolución compuestos por un gel de apilamiento (4% T y 3% C), un gel espaciador (10% T y 3% C) y un gel de resolución (16,5% T y 6% C).

22.4.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

Las muestras se aplicaron bajo buffer con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 10-20 μ l). En los reservorios anódico y catódico de la celda Miniprotean II, Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Todas las corridas se realizaron a voltaje constante de (30 V/ 70 mA) durante el apilado, aumentando progresivamente el voltaje cada 10 s al ingresar las proteínas al gel de separación hasta llegar a 100 V (90 mA), valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Buffer Anódico		Buffer Catódico	
Tris	2,42 g	Tris 0,1M	1,21 g
HCl 1 M, c.s.p.	pH 8,9	Tricina 0,1M	1,79 g
AD, c.s.p	100 ml	SDS	0,10 g
		AD, c.s.p.	100 ml

22.4.4. Fijación y Coloración

La fijación y coloración de los geles se realizaron según el protocolo desarrollado en 22.1.4.

23. ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Los geles de agarosa fueron utilizados para el análisis de las muestras conteniendo ADN. La agarosa tiene menos poder de resolución que la poliacrilamida pero mayor rango de separación: 50 pb (pares de bases) hasta algunos megabases de longitud. Pequeños fragmentos (20pb - 20.000pb) son

$$2 \%C = \text{g bis-acrilamida} \times 100 / (\text{g acrilamida} + \text{g bisacrilamida})$$

mejor resueltos en geles horizontales de agarosa con un campo eléctrico de fuerza y dirección constante.

Se utiliza diferente concentración de agarosa de acuerdo al tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Para fragmentos entre 500-600 pb se utilizan geles de agarosa al 2 %, para aquellos con tamaño cercano a 800 pb geles al 1,5 % y para los mayores de 1 Kpb se utilizan geles al 1 %.

Se utilizaron dos equipos diferentes de la casa comercial Serva, BlueMarine 100 para geles de 7x10 cm y BlueMarine 200 para geles de 15x15 cm o 15x20 cm. La fuente utilizada fue Biotech EPS 200 de Amersham.

23.1. Preparación de las Muestras

Las muestras de ADN, amplificadas por PCR, fueron analizadas por medio de electroforesis en gel de agarosa. Previamente a ser sembradas en el gel se les añadió, a las muestras de ADN, una décima parte en volumen de buffer de muestra 10X con la siguiente composición:

Buffer Tris-acético-EDTA (TAE) 50X	
Tris base	242 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	100 ml
Ácido acético glacial	57,1 ml
Agua MilliQ c.s.p.	500 ml

Buffer de Muestra 10X	
Buffer TAE 50X	1 ml
Glicerol	5 ml
Orange G	15 mg
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml

23.2. Preparación de los Geles

Los geles fueron preparados empleando el bastidor plástico correspondiente al equipo utilizado en cada caso (BlueMarine 100 y BlueMarine 200). La solución fue preparada de la siguiente manera:

Solución de Agarosa	2 %	1,5 %	1 %
Agarosa	2 g	1,5 g	1 g
Buffer TAE	100 ml	100 ml	100 ml
<i>Calentar a ebullición hasta transparencia</i>			
Bromuro de Etidio (10 mg/ml)	2 ul	2 ul	2 ul

Luego de verter la mezcla en la placa se dejó enfriar hasta su gelificación. Se utilizaron peines de 1 mm de espesor con 8 calles para los geles de 7 cm de longitud, mientras que para los geles de 15 cm de longitud se utilizaron peines de 1 mm y 2 mm de espesor con 16 calles.

23.3. Aplicación de las Muestras y Condiciones de Corrida

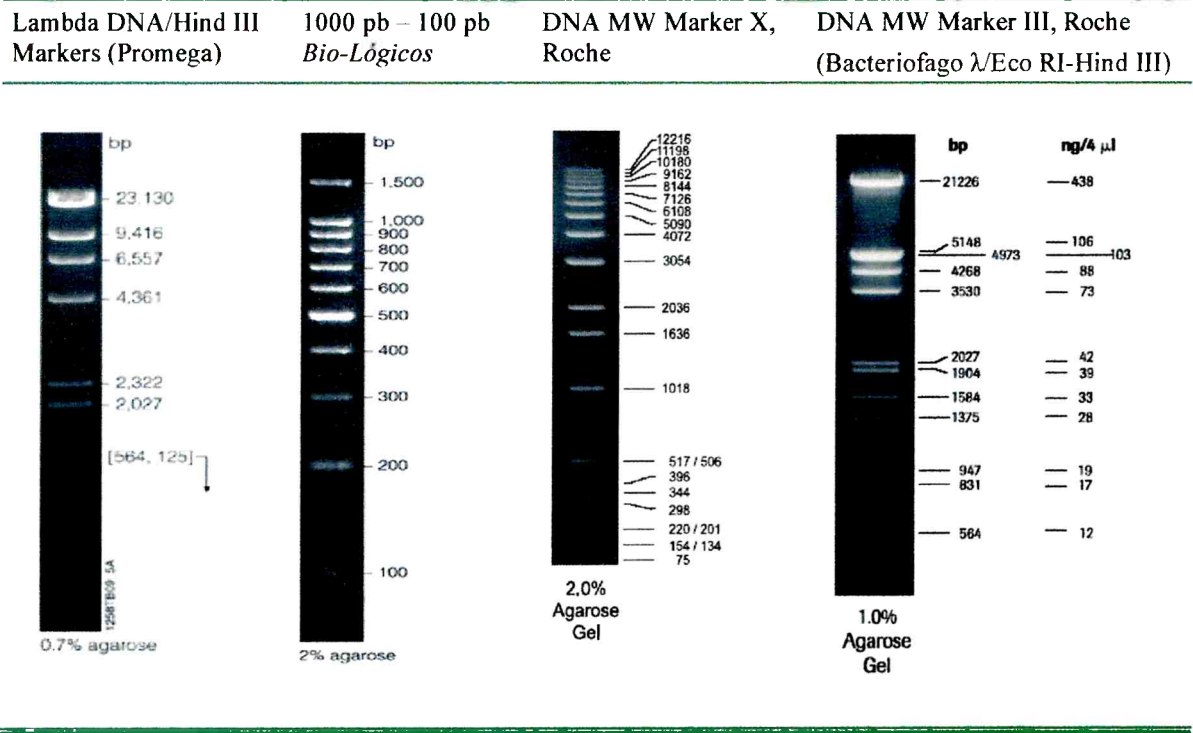
Las muestras se aplicaron bajo buffer con pipeta automática de 20 µl. Los volúmenes de siembra fueron de 5 µl para los patrones de peso molecular y de 18 µl en el caso de la muestra. La electroforesis se desarrolló durante 45 minutos a corriente constante (68 mA), empleando buffer de corrida TAE (*cfr.* 23.1).

23.4. Revelado

El revelado de las bandas de ADN se realizó por medio de un transiluminador de luz UV. El bromuro de etidio se une a los fragmentos de ADN, el cual fluoresce con luz ultravioleta.

23.5. Estimación de los Tamaños Moleculares

La estimación de los tamaños moleculares se realizó por comparación con patrones de tamaño molecular conocido. Los patrones utilizados según el caso fueron: “Lambda DNA/Hind III Markers” de Promega (23.130pb, 9.416pb, 6.557pb, 4.36pb, 2.322pb, 2.027pb, 564pb y 125pb), *PB-L Productos Bio-Lógicos* de 1000 pb – 100 pb, “DNA MW Marker X” (12,2 Kpb – 0,07 Kpb) de Roche y “DNA MW Marker III” (Roche).



24. ISOELECTROENFOQUE

El isoelectroenfoque (IEF) es un método de alta resolución en el cual las proteínas son separadas en un gradiente continuo de pH cuando se aplica un campo eléctrico. En este gradiente las proteínas migran hasta llegar al pH correspondiente a su punto isoelectrico (*pI*). Permite resolver muestras muy complejas y determinar varios *pI* en una misma corrida, permitiendo tanto trabajos analíticos como preparativos. Otra ventaja de esta técnica es que las proteínas se separan en estado nativo, pudiendo, posteriormente identificar las bandas proteicas por su actividad biológica.

24.1. Preparación de las Muestras

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 μg/μl y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a precipitarlas con 3 volúmenes de acetona fría (-20 °C), dejándolas reposar durante 1 hora a -20 °C, para luego centrifugarlas a 10.000 rpm durante 15

minutos, redisolviendo el precipitado en agua bidestilada (en el caso de muestras con bajo contenido proteico el volumen final se redujo respecto al inicial de modo de lograr una concentración adecuada). Este procedimiento se repitió dos veces para disminuir al mínimo la presencia de iones en las muestras, dado que éstos producen distorsiones en las corridas.

Las muestras listas para usar fueron conservadas en freezer a -20 °C hasta el momento de ser sometidas a IEF.

24.2. Preparación de los Geles

Se utilizó un equipo Mini IEF Cell, modelo 111 (Bio-Rad). Los geles fueron preparados empleando la bandeja formadora de geles del mencionado equipo, pudiendo prepararse dos placas simultáneamente. Para ello se adhirió firmemente la cara hidrofóbica de la película plástica (Polyacrylamide Gel Support Film, Bio-Rad) sobre el vidrio y el conjunto se invirtió sobre la bandeja. Para obtener dos geles es necesario contar con una solución preparada de la siguiente manera:

Solución de Poliacrilamida al 5%	
Acrilamida-bisacrilamida (25% T, 3% C)	2,0 ml
Agua bidestilada	5,5 ml
Anfolitos *	0,5 ml
Glicerol (25% p/v)	2,0 ml

*Los anfolitos fueron Pharmalyte 3-10 u 8-10,5 para determinar *pI* de amplio rango o de rango alcalino, respectivamente.

La solución de poliacrilamida se desgasificó en un kitasato conectado a una bomba de vacío durante 20 minutos y luego se le adicionaron los siguientes reactivos para iniciar la polimerización:

Reactivos de Polimerización	
Riboflavina (sol. saturada)	200 μ l
TEMED	3 μ l
PSA al 10%	60 μ l

La mezcla fue depositada con pipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo inmóvil durante 2 hs a temperatura ambiente y en presencia de luz para obtener la polimerización total. Al cabo de ese tiempo, los geles se removieron cuidadosamente con ayuda de una espátula delgada.

24.3. Aplicación de las Muestras

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 1-5 μ l y 7 siembras por placa como máximo) permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 minutos antes de iniciar la corrida.

24.4. Desarrollo del Isoelectroenfoco

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con agua destilada) de la celda de IEF, con la cara del gel sembrado hacia abajo. La celda se cerró herméticamente y se conectó a la fuente de poder.

El enfoque se llevó a cabo en tres etapas, a voltaje constante: 100 V durante los primeros 15 minutos, 200 V durante los siguientes 15 minutos y 450 V durante los 60 minutos finales.

24.5. Fijación y Coloración

Una vez finalizada la corrida, los geles se separaron de las placas de vidrio y fueron sumergidos durante 30 minutos en la siguiente solución fijadora:

Solución Fijadora	
Acido sulfosalicílico	4 g
Metanol	30 ml
Acido tricloroacético	12,5 g
AD, c.s.p.	100 ml

Finalizada la etapa anterior, los geles se trataron durante 2 h con la solución colorante y luego fueron decolorados por tres lavados sucesivos con solución decolorante I, seguidos de un último lavado con solución decolorante II hasta la obtención de un fondo incoloro.

Solución Colorante	
CuSO₄ (disolver primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie Brilliant Blue R-250	40 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución Decolorante I	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CuSO₄	500 mg
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante II	
Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
AD, c.s.p.	100 ml

24.6. Estimación de los Puntos Isoeléctricos

Para la determinación de los puntos isoelectricos (*pI*) de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas de amplio rango de *pI* y de *pI* alcalino.

Proteína	Patrones de amplio rango de <i>pI</i>	Patrones de <i>pI</i> alcalino
Amiloglucosidasa	3,50	-
Inhibidor de Tripsina	4,55	-
β-Lactoglobulina A	5,20	5,20
Anhidrasa carbónica B (bovina)	5,85	5,85
Anhidrasa carbónica B (humana)	6,55	6,55
Mioglobina (banda ácida)	6,85	6,85
Mioglobina (banda básica)	7,35	7,35
Lentil lectina (ácida)	8,15	8,15
Lentil lectina (media)	8,45	8,45
Lentil lectina (básica)	8,65	8,65
Tripsinógeno	9,30	9,30
Citocromo C	-	10,25

La determinación de los valores de *pI* se realizó mediante 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.

25. REVELADO DE ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA POR MEDIO DE ZIMOGRAMA

Para la realización del zimograma se utilizó la técnica de Westergaar *et al.* (1980).

25.1. Preparación de las Placas de 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 0,1 M de pH 8,5 (0,15 ml/cm²). Una vez gelificada la agarosa, la placa fue sumergida durante 20 minutos en una solución de caseína al 1 % conteniendo cisteína 10 mM en el mismo buffer, enjuagada con agua destilada y escurrida durante 10 minutos.

25.2. 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 60 °C durante 15 minutos.

25.3. Fijación y Coloración

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

Solución Fijadora	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	45 ml
AD, c.s.p.	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 minutos. Luego fue secada con pistola de aire y sumergida durante 10-30 minutos en la siguiente solución colorante:

Solución Colorante	
Coomassie Brilliant Blue R-250	250 mg
Solución fijadora, c.s.p.	100 ml
<i>(filtrar la solución antes de usar)</i>	

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

26. DIGITALIZACIÓN Y ANÁLISIS DENSITOGRAFICO DE LOS GELES

26.1. Captura de los Geles

Para la digitalización de los geles provenientes de las electroforesis, isoelectroenfoques y zimogramas, se utilizó un escáner UMAX con una velocidad de escaneo de 20 x 20 cm en 40 segundos a 300 dpi, una resolución máxima de 2400 x 1200 dpi y un rango de densidad óptica de 0,01 a 3,4 DO (para imágenes de geles no mayor a 1,5 DO).

Las imágenes obtenidas fueron guardadas en formato TIFF no comprimido y las imágenes reducidas luego a un tamaño y resolución adecuados en un programa de procesamiento de imágenes (Adobe Photoshop y Aldus Photostyler). Estos programas fueron utilizados también para ajustes de brillo, contraste e intensidad de color, efectos de perfilado (sharpening) y suavizado (smoothing) y remoción de defectos de fondo (background).

26.2. Análisis de los Geles por Densitografía

Las imágenes escaneadas fueron procesadas utilizando el software Scion Image for Windows beta 4.0.2, (<http://www.scioncorp.com>) para la obtención de los correspondientes densitogramas. Dicho programa, también, fue utilizado para el cálculo del punto isoelectroenfoque y del peso molecular (electroforesis) de cada banda, el procedimiento requiere de la medida de estándares o patrones y se utiliza para determinar la posición de cada banda en un gel.

27. DESALADO DE PROTEÍNAS UTILIZANDO TUBOS DE ULTRAFILTRACIÓN PARA CENTRÍFUGA

Con el fin de desalar la fracción enzimática purificada por cromatografía de intercambio iónico se utilizaron unidades de filtración para centrífuga MICROCON YM-10 (Millipore), conteniendo una membrana filtrante de celulosa regenerada con un límite nominal de peso molecular

(NMWL) de 10.000 daltons. Se utilizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

28. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CINÉTICOS

El cálculo de las constantes cinéticas para la fracción purificada, philibertaína g I, se realizó empleando el ensayo de PFLNA, sustrato específico para proteasas del tipo de la papaína (Filippova *et al.*, 1984). El ensayo se realizó como fue descrito en el ítem 7.2 usando en este caso buffer fosfatos 0,1 M de pH 6,5 conteniendo KCl 0,3 M, EDTA 0,1 mM y DTT 3 mM a una temperatura de 45 °C. Las diferentes concentraciones de sustrato en la mezcla de reacción fueron 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400, 500 y 600 μ M.

Los parámetros cinéticos V_{max} y K_m se calcularon mediante ajuste no lineal utilizando el módulo de cinética del programa Sigma Plot versión 8.02 para Windows (SPSS Inc.).

Los ensayos enzimáticos y los respectivos blancos fueron realizados por triplicado.

29. 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). Se ha utilizado esta técnica para la determinación del grado de pureza y del peso molecular de las fracciones purificadas por cromatografía.

29.1. Preparación de las Muestras

Las muestras fueron preparadas mezclando 1 μ l de la muestra proteica con 1-2 μ l de solución de cristalización en un tubo plástico de 200 μ l de capacidad. En este caso se utilizó ácido sinapínico como matriz cristalizadora.

Se depositaron 0,5 a 1 μ l de la mezcla sobre la placa (MP 384 Polished Steel y MP 384 Ground Steel, Bruker) para MALDI-TOF MS y se dejaron cristalizar. Para la calibración se utilizó tripsinógeno como patrón (M+1 23981, M+2 11990,5).

Solución Cristalizadora de Ácido Sinapínico (SA, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico)	
SA (Sigma)	10 mg
Acetonitrilo (ACN)	600 μ l
Ácido trifluoroacético (TFA)	1 μ l
Agua MilliQ, c.s.p.	1000 μ l
<i>Agitar y centrifugar a 10.000 rpm durante 3 min</i>	

29.2. Obtención de los Espectros de Masas

Se utilizó un espectrómetro de masas MALDI-TOF Bruker modelo Ultraflex TOF-TOF equipado con un láser de N₂ (337 nm con pulsos de 1-5 ns) y una fuente de aceleración de iones de 25 kV. Los parámetros utilizados para la adquisición de los espectros fueron ajustados para cada caso en particular.

30. DETERMINACIÓN DE SECUENCIAS AMINO-ACÍDICAS

Esta técnica 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).

Con el objeto de desalar la muestra se inmovilizaron 10-100 pg de proteína pura sobre filtros de PVDF. Para ello se utilizó un tubo Ultrafree-Probind Filtres, Millipore. La membrana se activó tras realizar un lavado con 500 μ l de metanol y posteriormente con 500 μ l de agua MilliQ. Se cargó el tubo con la solución de la muestra y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 min, procediendo luego a despegar el filtro de PVDF y a lavarlo varias veces con

agua MilliQ. Finalmente se introdujo el filtro de PVDF con la proteína en la cámara de reacción del secuenciador.

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

31. OBTENCIÓN DE ADNc A PARTIR DE ARNm QUE CODIFICAN PARA PROTEASAS CISTEÍNICAS DE *PHILIBERTIA GILLIESII*

31.1. Diseño de Cebadores Específicos

El diseño de cebadores específicos (*primers*) se realizó en base a la secuencia N-terminal de philibertaína g I, proteasa purificada de la especie vegetal *Philibertia gilliesii* (*Apocynaceae*).

Para comenzar con el diseño de los cebadores fue necesario conocer la frecuencia de uso de codones de la especie vegetal involucrada, debido a que el código genético es degenerado para la mayoría de los aminoácidos. A tal efecto, se recopiló información de proteínas y sus secuencias nucleotídicas provenientes de especies relacionadas con *Philibertia gilliesii*, además se buscaron secuencias de proteasas cisteínicas provenientes de otras especies que contienen látex (*Caricaceae* y *Euphorbiaceae*). Para ello se empleó la base de datos NEWT (Phan *et al.*, 2003) que, como se indicó en el ítem 3.1 de la Introducción, vincula simultáneamente información taxonómica con información de proteínas del SWISS-PROT (Bairoch & Apweiler, 2000). Con las secuencias de ADNc y de las proteínas encontradas se realizó la entrada al programa Countcodon v4. (<http://www.kazusa.or.jp/codon/countcodon.html>) y se obtuvo una tabla con las frecuencia de uso de codon para cada proteína. En la siguiente tabla figuran las proteínas utilizadas.

	Nº de acceso ³	Gi ⁴
	AAF08127	6424792
	AAF08128	6424793
	AAA19751	348046
Secuencias de proteínas pertenecientes a la familia <i>Apocynaceae</i>	BAB39474	13383247
	CAB10877	3451127
	CAB10878	3451129
	CAB10879	4539017
	CAB10880	3451133
	CAB10881	3451135
	CAB10882	3451099
	CAB10884	3451139
	CAA62889	1552249
	CAA62895	1552394
	Secuencias de cisteinproteasas pertenecientes a especies con látex (<i>Caricaceae</i> y <i>Euphorbiaceae</i>)	AAB02650
AAC62396		2944446
CAA46862		18098
CAA54974		953176
CAA66378		1332461

Teniendo en cuenta la frecuencia de uso de codon de cada proteína se diseñaron los siguientes oligonucleótidos como cebadores directos:

Cebadores para *Philibertia gilliesii*

Nombre	Secuencia
N-terminal	L P A S V D W R K E G
Phili-F 2-7	5` CCw GCy TCw GTh GAT TGG 3`
Phili-F 5-11	5` GTh GAT TGG mGw AAA GAR GG 3`

³ Es el número de acceso de una molécula a la base de datos del NCBI. Este número es único y no cambia

⁴ Es el número de identificación de una versión de la secuencia de la molécula que ha sido depositada en la base de datos del NCBI.

También se utilizó un cebador diseñado por Trejo (2005) para la proteasa asclepaína f, purificada de la especie vegetal *Asclepias fruticosa* perteneciente a la familia *Apocynaceae*.

Cebador para *Asclepias fruticosa*

Nombre	Secuencia
N-terminal	L P D S V D W R E K G
5'Nt 3-11	5' GAT TCn GTw GAT TGG mGr GAA AAA GG 3'

Además fue necesario diseñar los cebadores reversos como el cebador oligo d(T)₂₀ que fue utilizado en la reacción de retrotranscripción (*cfr.* 31.3), el oligonucleótido R₀R₁polid(T) utilizado en algunas de las reacciones de PCR (*cfr.* 32), en tanto que el *primer* R₁ fue utilizado en la técnica de Nested-PCR (*cfr.* 33). Dichos cebadores se muestran a continuación:

Cebadores reversos:

Nombre	Secuencia
oligo d(T) ₂₀	5' TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3'
R ₀ R ₁ polid(T)	5' -CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
R ₁	5' - GGTACCCAATACGACTCACTATAGGGC-3'

31.2. Obtención de ARN Total

El material vegetal de partida utilizado para la extracción del ARN fueron hojas y látex proveniente de frutos de la especie vegetal *Philibertia gilliesii*. Para la extracción del ARN se utilizó el reactivo “Cytoplasmic RNA Reagent” (INVITROGEN). Las hojas fueron trituradas en presencia de N₂ líquido dentro de un mortero, el polvo obtenido se mezcló con el reactivo siguiendo las instrucciones del fabricante. El látex exudado del fruto fue inmediatamente recogido sobre el reactivo y procesado de la misma forma. Finalmente el ARN se disolvió en 20 µl de agua libre de ARNasas e inmediatamente se almacenó en N₂ líquido hasta el momento de ser utilizado.

31.3. Reacción de Retrotranscripción y Amplificación (RT⁵-PCR⁶)

Se utilizó el kit “SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq*”, de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la síntesis de la primera cadena se utilizó el siguiente cebador: **Oligod(T)₂₀** 5´ TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3´ de manera de transcribir únicamente los ARN mensajeros. El ADNc producto de la reacción de retrotranscripción (RT) fue utilizado como molde para la reacción de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para lo cual se utilizó Phili-F 2-7 como cebador directo, uno de los oligonucleótidos específicos diseñados como se indicó en el ítem 31.1. Con el kit empleado ambas reacciones ocurrieron en una sola etapa.

Como paso previo a la reacción de RT, el ARN fue sometido a un tratamiento térmico (15 minutos a 66 °C y 5 minutos en baño de hielo) con el fin de provocar la ruptura de su estructura secundaria.

Mezcla de reacción de RT-PCR	
Agua libre de RNasas	5,37 µl
Buffer de reacción 2x (Invitrogen)	12,50 µl
MgCl ₂ 50 mM	0,65 µl
Cebador Oligo d(T) ₂₀ 10 µM	0,48 µl
Cebador Phili F 2-7 10 µM	0,50 µl
RT/Platinum <i>Taq</i> Mix (Invitrogen)	0,50 µl
Templado (ARN desnaturalizado)	5,00 µl
Volumen final	25,00 µl

La reacción se realizó en un termociclador Mastercycler Personal de Eppendorf con el siguiente programa: 30 minutos a 45 °C (retrotranscripción); luego 2 minutos a 94 °C (se inhibe la enzima retrotranscriptasa); luego 39 ciclos de: 15 s a 94 °C; 30 s a 45 °C y 1 minuto a 72 °C (amplificación propiamente dicha) y por último 15 minutos a 72 °C.

⁵ RT = **R**etro**T**ranscription (reacción de retrotranscripción)

⁶ PCR = **P**olimerase **C**hain **R**eaction (reacción en cadena de la polimerasa)

Se realizaron tres controles negativos, uno de ellos agregando agua (libre de ARNnasas) en lugar del templado (hebra molde, en este caso ARNm) con el fin de controlar que ningún reactivo esté contaminado con ADN o ARN que pueda servir de molde, los otros dos controles se realizaron agregando *Taq* polimerasa en lugar de la mezcla RT/Platinum *Taq* Mix, tanto para la muestra proveniente de hoja como la de látex con el fin de comprobar que la fracción amplificada provenga de un ADNc.

32. REACCIÓN DE PCR

El ADNc producto de la reacción de RT-PCR (*cf.* 31.3) fue extraído del gel de agarosa (*cf.* 34) y diluido 10 veces con agua MilliQ estéril. Una alícuota de esta solución fue utilizada como molde (ADNc molde) para la reacción de PCR. En la siguiente tabla se describe la composición de la mezcla de reacción.

Mezcla de Reacción de PCR	
Agua MilliQ	33 μ l
Buffer EcoTaq 10X, Ecogen	5 μ l
MgCl₂ 50 mM	2 μ l
dNTP 10 mM (dATP, dTTP, dGTP, dCTP; 2,5 mM c/u)	2 μ l
Cebador R₀R₁polid(T) 25 μM	1 μ l
Cebador Phili F 2-7 25 μM	1 μ l
EcoTaq 5U/ μl, Ecogen (Polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>)	1 μ l
ADNc molde	5 μ l
<i>Volumen final</i>	50 μ l

El control negativo se realizó reemplazando el mismo volumen de ADNc molde por agua MilliQ.

La reacción se llevó a cabo utilizando un termociclador EZ Cycler, Ericomp, utilizando el siguiente programa:

1 x Ciclo 1: 1 minuto a 94 °C; 15 minutos a 72 °C
40 x Ciclo 2: 1 minuto a 94 °C; 1 minuto a 50 °C; 2 minutos a 72 °C
1 x Ciclo 3: 15 minutos a 72 °C
1 x Ciclo 4: 16 h a 10 °C

Los productos de reacción fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % (*cfr.* 23).

33. NESTED PCR A PARTIR DE ADN_c

Con el objeto de confirmar que las bandas de los productos de PCR observadas en la electroforesis de agarosa corresponden a la secuencia del gen buscado, se realizó una reacción de Nested PCR.

Esta técnica comprende dos reacciones de PCR sucesivas con dos pares de cebadores específicos distintos, de tal modo que cada uno de los cebadores utilizados en la segunda PCR (internal o nested PCR) contengan parte de la secuencia de los cebadores utilizados en la primera PCR y la porción contigua amplificada en la PCR inicial (external PCR). El método de Nested PCR se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas (si el resultado de la primera PCR da productos inespecíficos, el segundo par de cebadores internos no hallará secuencia complementaria y, por consiguiente, no habrá amplificación).

Las condiciones de reacción fueron las mismas que se indicaron en el ítem 32. En este caso los cebadores internos utilizados fueron Phili-F 5-11, 5'Nt 3-11 y R₁ (*cfr.* 31.1).

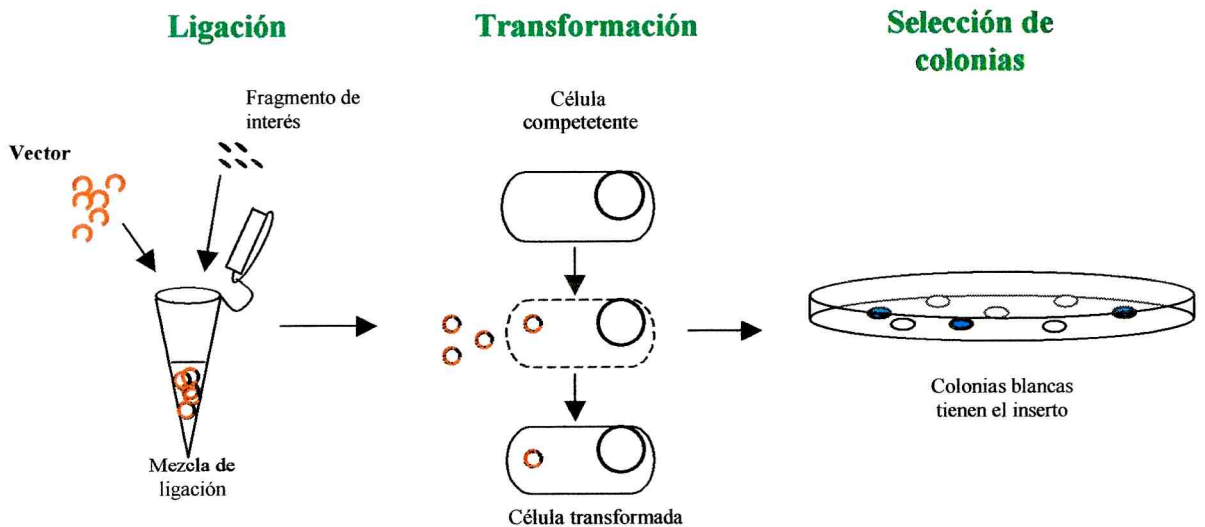
34. EXTRACCIÓN DE ADN_c DESDE EL GEL DE AGAROSA

La extracción y purificación del ADN_c de las bandas obtenidas en los distintos geles de agarosa, se realizó cortando las bandas del gel bajo luz ultravioleta (UV). Las bandas obtenidas fueron tratadas con el kit de extracción de ADN "UltraClean Gel Spin DNA Purification Kit", MO BIO Laboratories para el caso del gel de agarosa al 1,5 % y con el kit de extracción de DNA "IAEX II

Agarose Gel Extraction”, QIAGEN en el caso de las bandas recogidas del gel de agarosa al 2 %. Finalmente se eluyó el ADNc con 50 µl de agua libre de ARNasas y ADNasas y se almacenó a -20°C.

35. CLONADO DE LOS FRAGMENTOS DE ADNc

El clonado consta de 3 etapas: la ligación de los fragmentos a un vector, la transformación de dicho vector a células bacterianas competentes y, finalmente, el cultivo y selección de la colonia que posee el fragmento de interés.

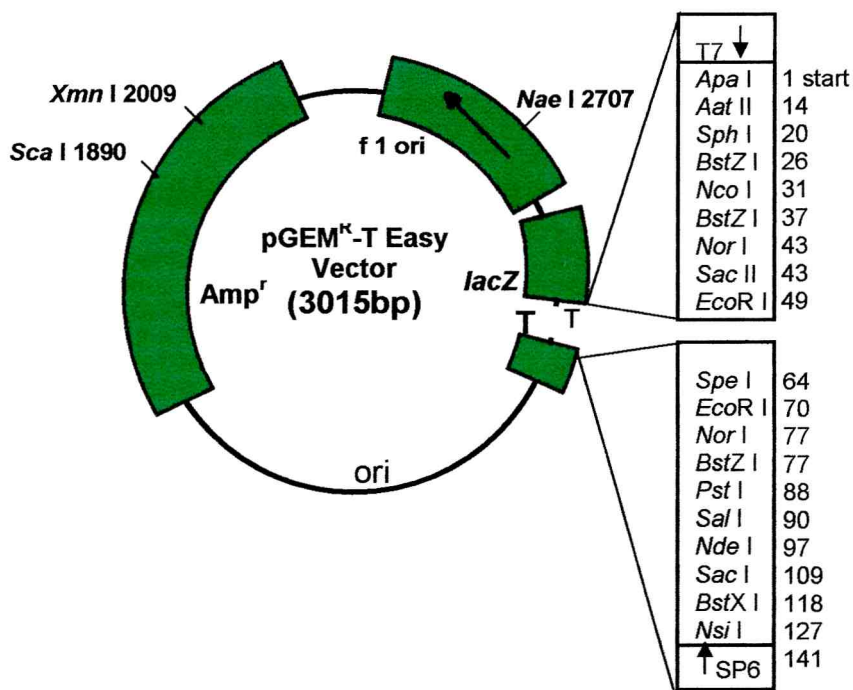


35.1. Ligación de los Fragmentos de Interés a un Vector

35.1.1. Características del Vector

El vector pGEM-T Easy contiene los promotores de las ARN polimerasas T7 y SP6, flanqueando una zona de clonado múltiple dentro de la región codificante de la enzima β-galactosidasa (*lac Z*), lo que permite secuenciar el inserto introducido en el vector empleando los *primers* correspondientes. La zona de clonado múltiple incluye sitios de restricción, lo que permite la liberación del inserto por digestión con una enzima de restricción. Además, en cada uno de sus extremos, lleva una timidina 3'

terminal lo que aumenta la eficiencia de ligación con productos de PCR obtenidos con ADN polimerasas sin actividad de 3'→5' exonucleasa, las que



suelen añadir una adenosina 3' terminal. El vector posee además una región que codifica para la β-lactamasa (Amp^r), con lo que las bacterias sensibles a ampicilina se vuelven resistentes al ser transformadas con el vector pGEM-T Easy.

Cuando se liga un inserto al vector se produce una disrupción en el marco de lectura de la región que codifica para la β-galactosidasa, lo que impide la expresión de esta enzima. Dado que la acción de la β-galactosidasa sobre el X-Gal hace que se libere un compuesto de color azul, la inserción de un fragmento de ADN en el vector se evidencia por la ausencia de color azul.

35.1.2. Ligación Propiamente Dicha

Los fragmentos de ADNc seleccionados y purificados (*cf.* 34) fueron ligados al vector pGEM-T Easy. La mezcla de ligación se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante en las proporciones que se indican en la siguiente tabla:

Mezcla de Ligación

Buffer de ligación 2X, Promega	5 μ l
Vector pGEM-T Easy 50 ng/μl	1 μ l
DNA (cfr. 34)	3 μ l
DNA ligasa T4 3 U/μl, Promega	1 μ l

Incubar a 4 °C toda la noche

35.2. Transformación en Células Competentes

35.2.1. Preparación de las Células Competentes (*Escherichia coli*)

Se procedió según el protocolo descrito en *Molecular Biology: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 1989). Se partió de un cultivo puro de *Escherichia coli* XL1-Blue en etapa de crecimiento exponencial, para lo cual se inocularon las células de una colonia aislada de un cultivo en placa LB (cfr. 35.2.1.1.2.) en 5 ml de medio de cultivo 2YT (cfr. 35.2.1.1.1.) y se incubaron a 37 °C durante toda una noche con agitación a 250 rpm. Una alícuota de 100 μ l de este cultivo fue inoculada en 10 ml de medio fresco y se hizo crecer en las mismas condiciones hasta una densidad óptica de 0,6 (DO₅₅₀).

El cultivo obtenido en estas condiciones se mantuvo en baño de hielo durante 10 minutos y luego se centrifugó a 4 °C durante 10 minutos a 3000 rpm. Trabajando bajo campana de flujo laminar se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 5 ml de CaCl₂ 0,05 M estéril. Nuevamente se dejó en baño de hielo durante 10 min, se centrifugó como se indicó anteriormente y luego de descartar el sobrenadante asépticamente las células fueron cuidadosamente resuspendidas en 1 ml de CaCl₂ estéril 0,05 M preenfriado a 4 °C.

La suspensión de células fue almacenada en heladera a 4 °C durante toda la noche, luego se tomaron alícuotas de 100 μ l y a cada una de ellas se le adicionó 23 μ l de glicerol 80 % (v/v) estéril. Cada alícuota de suspensión de células competentes fue almacenada a -80 °C hasta el momento de ser utilizada.

35.2.1.1. Material para el cultivo de microorganismos

35.2.1.1.1. Medios de cultivo líquidos

Medio 2YT	
Bacto-Triptona	16 g
Bacto-Extracto de levadura	10 g
NaCl	5 g
<i>Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M</i>	
AD, c.s.p.	1 l
<i>Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a temp ambiente</i>	

Medio Luria-Bertani (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
<i>Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M</i>	
AD, c.s.p.	1 l
<i>Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Conservar a temp ambiente.</i>	

35.2.1.1.2. Medios de Cultivo Sólidos

Para preparar placas de cultivo se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Cuando la temperatura del medio de cultivo alcanzó los 60 °C se cargaron las placas de Petri (9 cm de diámetro) con aproximadamente 20 ml de medio cada una y se dejaron solidificar bajo campana de flujo. Las cajas fueron luego tapadas, colocadas durante 30 minutos en estufa a 37 °C y conservadas a 4 °C.

Medio Luria-Bertani (LB)	
Bacto-Triptona	10 g
Bacto-Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	15 g
<i>Disolver en 900 ml de AD y ajustar a pH 7 con NaOH 10 M</i>	
AD, c.s.p.	1 l
<i>Esterilizar en autoclave a 121 °C 15 min. Enfriar a 60 °C en estufa antes de plaquear.</i>	

35.2.1.1.3. Reactivos adicionales

Solución de ampicilina (100 mg/ml)	
Ampicilina (Sigma)	1 g
Agua MilliQ c.s.p.	10 ml
<i>Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml</i>	

Solución de Isopropil-β-D-tiogalactósido 0,1 M (IPTG⁷)	
IPTG, Roche	1,19 g
Agua MilliQ c.s.p.	50 ml
<i>Esterilizar por filtración y conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.</i>	

Solución de 5-Br-4-Cl-3-Indol-β-D-galactósido 20 mg/ml (X-Gal)	
X-Gal, Roche	400 mg
N,N'-dimetilformamida, Sigma c.s.p.	20 ml
<i>Conservar a -20 °C en alícuotas de 1 ml.</i>	

⁷ IPTG es un análogo no fermentable de la lactosa que inactiva al represor del operón *Lac Z*

35.2.2. Procedimiento de Transformación y Cultivo Celular

La transformación se realizó agregando 10 µl de la mezcla de ligación (*cfr.* 35.1.2) a una alícuota de 100 µl de *E. coli* (XL1-Blue) competentes (*cfr.* 35.2.1) siguiendo el protocolo de shock térmico descrito a continuación: 30 minutos en hielo, 90 s a 42 °C y finalmente 5 minutos en hielo.

A la suspensión de células proveniente de la mezcla de transformación se le añadió 300 µl de medio LB (*cfr.* 35.2.1.1.1) y se incubó durante 15 minutos a 37 °C en estufa de cultivo y luego se centrifugó 2 minutos a 2000 rpm. A partir de aquí se trabajó en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar. Se desecharon 200 µl de sobrenadante, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en el sobrenadante restante y trasvasadas con pipeta automática a una placa de Petri con medio LB (*cfr.* 35.2.1.1.2) conteniendo ampicilina (100 µg/ml), IPTG (50 µg/ml) y X-Gal (50 µg/ml). Utilizando una espátula de Digrafsky se extendió homogéneamente la suspensión de células y luego de secar los restos de humedad bajo campana se incubó durante toda la noche en estufa a 37 °C.

35.2.3. Selección de las Colonias de Interés (Clones)

La selección de los clones se basa en las observaciones que se describen en la siguiente tabla:

Células sin vector	No crecen
Células con vector sin inserto	Colonias azules
Células con vector con inserto	Colonias blancas

Las colonias blancas fueron seleccionadas para verificar por PCR que contuvieran el inserto buscado. Cada una de ellas fue aislada con un palillo de madera estéril y colocada en un tubo eppendorf para realizar la reacción de PCR (*cfr.* 32) utilizando *primers* específicos. En este caso los *primers* directos utilizados fueron Phili F 5-11 y 5'Nt 3-11, y como *primer* reverso R₀R₁polid(T) (*cfr.* 31.1). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2 % (*cfr.* 23).

Por otra parte, se prepararon inóculos con el fin de obtener cultivos que permitan inmortalizar los clones. A tal efecto cada uno de los palillos utilizados anteriormente, conteniendo remanentes de la colonia aislada, fue introducido en un tubo conteniendo 3 ml de medio de cultivo LB (*cf.* 35.2.1.1.1) con 50 µg/ml de ampicilina (*cf.* 35.2.1.1.3.) Los inóculos de cada uno de los clones fueron incubados a 37 °C con agitación (200 rpm) durante toda la noche.

35.2.4. Glicerinado y Conservación de los Clones Seleccionados

Se tomó una alícuota de 400 µl de cada cultivo (*cf.* 35.2.3) a la que se le añadió 92 µl de glicerol 80 % (v/v) estéril; cada suspensión fue rápidamente homogeneizada y congelada a -80 °C. El glicerol entre el 15 – 20 % se utiliza como crioprotector para evitar que las células se rompan al congelar y descongelar la muestra. Los clones así tratados pueden ser conservados por largos períodos.

36. Secuenciamiento de los Fragmentos de Interés

36.1. Obtención de Plásmidos Purificados

La purificación de los plásmidos se realizó a partir de cultivos líquidos de cada clon. Se utilizó un kit de extracción, GFX Micro Plasmid Prep Kit, Amersham Biosciences. La técnica consiste en lisar las células y eliminar restos celulares y proteínas. Luego el ADN plasmídico queda retenido en pequeñas columnas cromatográficas y es eluido con 100 µl de buffer Tris-EDTA pH 8. Posteriormente es mezclado con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y precipitado con 2,5 volúmenes de etanol absoluto -20 °C. El pellet fue centrifugado por 10 minutos a 4 °C y 15000 rpm, lavado dos veces con etanol frío (-20 °C) al 70 % (v/v) y disuelto en 15 µl de H₂O MilliQ esteril.

36.2. Digestión de los Plásmidos con Enzimas de Restricción

Se realizó la digestión de los plásmidos con la enzima de restricción EcoRI para cuantificar el inserto a secuenciar. Cada mezcla de reacción se preparó de la siguiente manera:

Digestión de ADN con Enzimas de Restricción	
Buffer de reacción 10X (específico para EcoRI)	1,0 µl
Enzima de restricción	0,5 µl
Muestra de ADN plasmídico	1,0 µl
Agua MilliQ	7,5 µl

Se incubó por 90 minutos a 37 °C. Los productos de la digestión fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (*cfr.* 23) y se comparó la intensidad de las bandas con las de un patrón de concentración conocida (*cfr.* 23.5).

36.3. Secuenciación del ADN Clonado

Las muestras fueron secuenciadas a través de los servicios de secuenciación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona (Barcelona, España) o de la empresa Sistemas Genómicos (Valencia, España). Los cromatogramas fueron analizados con el programa Chromas v2.0 (Copyright©) 1988-2001 Technelysium Pty. Ltd.

37. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS OBTENIDAS

Con el objetivo de obtener una secuencia consenso las secuencias de ADN obtenidas de los clones seleccionados fueron analizadas con el software de alineamiento Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997). Para poder identificar la presencia de elementos conservados de cisteínendopeptidasas dichas secuencias fueron traducidas en los seis marcos de lectura con el software disponible en la Web perteneciente a la Universidad de Colorado

<http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/translate/index.html> (Molecular Toolkit, Translate). Se analizaron tanto las secuencias nucleotídicas como las aminoacídicas por BLAST (Altschul *et al.*, 1997), con el fin de compararlas con las secuencias depositadas en los bancos de datos. Al mismo tiempo se hizo una búsqueda por PSI-BLAST (NCBI) ajustando el perfil a proteínas pertenecientes al reino *Viridiplanteae*.

37.1. Cladograma

Con el fin de establecer el porcentaje de identidad y evaluar la similitud entre las secuencias encontradas denominadas Phili-A y Phili-B fueron comparadas entre ellas y con las secuencias de otras proteasas cisteínicas vegetales. Ellas fueron: asclepaína f proteasas presente en la especie vegetal *Asclepias fruticosa* perteneciente a la familia *Apocynaceae* (Trejo, 2005), papaína (1PPN) y proteinasa omega (1PPO) presentes en el látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y una cisteínproteasa perteneciente a *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*) (AAR25797).

Se utilizó el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) para alinear las secuencias y calcular el porcentaje de identidad; en tanto que el programa TreeView (Page, 1996) se utilizó para obtener el cladograma. La proteasa cisteínica perteneciente a *Solanum tuberosum* se la utilizó como "outgroup" ya que pertenece al tipo de las catepsinas B, las cuales se diferencian de las del tipo papaína por presentar, además de la actividad endopeptidasa, actividad carboxipeptidasa (liberando dipeptidos C-terminal). Esta actividad dipeptidilpeptidasa es atribuida a la existencia de un loop extendido que forma una especie de tapa sobre la hendidura del sitio activo.r

37.2. Búsqueda de Secuencias Homólogas

Para la identificación de las secuencias con mayor porcentaje de identidad respecto a las de Phili-A y Phili-B cada una de ellas fue insertada en el programa utilitario "Swiss-Model Blast", que busca en la base de datos "ExNRL-3D". Esta base deriva del banco de datos de proteínas "PDB" donde

se encuentran depositadas solamente aquéllas cuya estructura fue determinada por métodos físicos (difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear).

38. MODELADO POR HOMOLOGÍA

La modelización teórica proporciona la posibilidad de obtener modelos “de baja resolución” que permiten sugerir pero no confirmar información acerca de la disposición espacial de determinados residuos. Los resultados permiten tener una idea de la distribución espacial global de la proteína y obtener información para el diseño de futuros experimentos.

El modelado por homología o "threading" se puede realizar cuando se conocen experimentalmente (obtenidas por cristalografía de rayos X y/o RMN) las estructuras de proteínas que están evolutivamente relacionadas (es decir que sean homólogas) con la proteína a modelar. Para poder aplicar este método de predicción es necesario que la proteína a modelar posea un grado mínimo de identidad (35 %) con las proteínas de referencia y que la probabilidad de que sea diferente, evaluada mediante el parámetro $P(N)$, sea menor a $1e^{-12}$.

Para la obtención de los modelos tridimensionales (3D) de las secuencias aminoacídicas denominadas Phili-A y Phili-B se empleó el programa “Swiss-Model” Version 36.0003 (Schwede *et al.*, 2003; Guex & Peitsch, 1997 y Peitch, 1995) que es un programa de modelado automático por homología disponible en Internet <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>.

Este programa, Swiss-Model, incluye la etapa de búsqueda de los moldes adecuados, la obtención de los porcentajes de identidad con la secuencia problema empleando el algoritmo SIM, la generación del alineamiento estructural con el algoritmo de modelización ProModII, la generación del modelo y por último la etapa de refinamiento del modelo empleando el algoritmo de minimización energética Gromos96. Este programa tiene un modo que permite que los moldes sean definidos por el usuario, de esta manera se introdujo una mejora en el modelado incorporando como moldes las estructuras cuyas secuencias tuvieron un mayor porcentaje de

identidad y un menor valor de P(N) con la secuencia a modelar. En la siguiente tabla se presentan los moldes utilizados para cada secuencia a modelar.

Estructuras de proteasas cisteínicas vegetales empleadas como moldes para la secuencia Phili-A				
Enzima	Identificador	%	P(N)	Referencia
	ExPDB	Identidad		
Actinidaína	1aec_	51,96	1e ⁻⁵⁰	Varughese <i>et al.</i> , 1992
Actinidaína	2act_	51,34	8e ⁻⁵⁰	Baker & Dodson, 1980
Caricaína	1ppo_	51,05	5e ⁻⁵⁵	Pickersgill <i>et al.</i> , 1991
Caricaína	1meg_	50,60	2e ⁻⁵⁴	Katerelos <i>et al.</i> , 1996
Procaricaína	1pciA	50,60	8e ⁻⁵⁴	Groves <i>et al.</i> , 1996

Estructuras de proteasas cisteínicas vegetales empleadas como moldes para la secuencia Phili-B				
Enzima	Identificador	%	P(N)	Referencia
	ExPDB	Identidad		
Ervatamina B	1iwdA	52,66	7e ⁻⁵⁸	Biswas <i>et al.</i> , 2003
Ervatamina C	1o0eB	51,08	9e ⁻⁵⁰	Thakurta <i>et al.</i> , 2004
Caricaína	1ppo_	50,90	2e ⁻⁵³	Pickersgill <i>et al.</i> , 1991
Caricaína	1meg_	50,45	6e ⁻⁵³	Katerelos <i>et al.</i> , 1996
Zingipaína	1cqdA	48,80	8e ⁻⁵⁵	Choi <i>et al.</i> , 1999

Para la visualización del modelo se utilizó el programa Swiss-PdbViewer v3.5 <http://www.expasy.ch/spdbv/> (Guex & Peitsch, 1997).

38.1. Superposición de Estructuras

Con el objeto de comparar el modelo obtenido con las estructuras de referencia se realizó la superposición de las mismas utilizando el programa Swiss-PdbViewer v3.5 (Guex & Peitsch, 1997). El valor numérico que describe la similitud o diferencia de dos estructuras que se comparan es un

valor de distancia, el RMS (Root Mean Square) o RMSD (Root Mean Square Deviation).

El RMSD es una distancia que da idea de la diferencia estructural de dos topologías. De este modo, cuanto menor sea el valor de RMSD de comparación de ambas estructuras mayor es la similitud estructural de las mismas. Con el fin de determinar las desviaciones de la cadena principal (cadena de carbonos alfa) de cada modelo obtenido en relación a las estructuras de referencia se calculó el valor de RMS empleando el mismo programa de superposición.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SELECCIÓN DE ESPECIES VEGETALES PRODUCTORAS DE PROTEASAS

Las especies vegetales recolectadas en la región Patagónica para desarrollar el estudio de actividad proteolítica fueron las siguientes: *Colliguaja integerrima* Gill. et Hook., *Euphorbia collina* Phil., *Euphorbia peplus* L. y *Stillingia patagonica* (Speg.) Pax et Hoffmann, todas ellas pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, así como *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*). Estas especies fueron seleccionadas por presentar látex pues, como se ha comentado en la Introducción (*cfr.* 2.3.3, I) y en Materiales y Métodos (*cfr.* 1, M&M), se conocen muchas especies en las cuales este tipo de secreción presenta un elevado rendimiento en enzimas proteolíticas. Sin embargo una especie sin sistema de laticíferos pero con la presencia de una sustancia resinosa en su inflorescencia, denominada *Grindelia chilensis* (Corn.) Cabrera (*Asteraceae*), también fue incluida en la búsqueda. En el ítem 2 de Materiales y Métodos se incluye para cada una de las especies recolectadas una fotografía de la planta con flores y una descripción botánica de la misma.

1.1. Actividad Proteolítica de los Extractos Clarificados

La actividad caseinolítica de los extractos clarificados provenientes de las distintas especies vegetales (*cfr.* 3, M&M) fue ensayada a dos valores de pH diferentes: 6,6 (buffer fosfatos 0,1 M) y 8,4 (buffer Tris-HCl 0,1 M) y a una temperatura de 37 °C durante 3 horas de incubación, tiempo considerado suficientemente largo para evidenciar actividad proteolítica significativa (*cfr.* 6.1, M&M). Debido a los altos valores que presentaron sus blancos, el extracto

clarificado de *Euphorbia peplus* fue ensayado sobre el sustrato azocaseína (*cfr.* 6.2, M&M) en lugar de utilizar caseína. Los valores de proteínas fueron obtenidos por el método de Bradford (*cfr.* 5.1, M&M). Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 1.

Los extractos clarificados de *G. chilensis*, *C. integerrima* y *E. peplus* no mostraron actividad detectable en las condiciones del ensayo. Por su parte el extracto de *P. gilliesii* exhibió remarcada actividad específica, seguido por los

Especie Vegetal	Actividad (U_{cas}/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad Específica (U_{cas}/mg)
<i>Philibertia gilliesii</i>	0,721 ^a	0,163	4,42
<i>Euphorbia collina</i>	0,257 ^a	0,457	0,56
<i>Stillingia patagonica</i>	0,200 ^a	0,186	1,08
<i>Grindelia chilensis</i>	no detectable ^b	0,098	-
<i>Colliguaja integerrima</i>	no detectable ^b	0,619	-
<i>Euphorbia peplus</i>	no detectable ^{b,c}	0,248	-

Tabla 1. Actividad proteolítica de los extractos clarificados de seis especies vegetales recolectadas en Patagonia. (a): determinada a pH 8,4; (b): determinada a pH 8,4 y 6,6; (c): testeada contra azocaseína (unidades U_{azocas})

de las especies *S. patagonica* y *E. collina* quienes mostraron un valor menor (24,4 y 12,7 %, respectivamente, en relación con el de *P. gilliesii*). En estos tres casos los valores de actividad enzimática presentados en la tabla se obtuvieron a pH 8,4, donde los tres extractos poseen mayor actividad.

1.2. Efecto de Inhibidores Específicos

Se analizó el comportamiento de los extractos clarificados de las tres especies en las que se detectó actividad caseinolítica significativa (*Euphorbia collina*, *Stillingia patagonica* y *Philibertia gilliesii*) en presencia de inhibidores característicos de cada tipo mecanístico de proteasas (*cfr.* 10, M&M). En la Tabla 2 se consignan los valores correspondientes al porcentaje de inhibición (*cfr.* 10.1, M&M) de los tres extractos ensayados con cada uno de los inhibidores.

Inhibidor	% Inhibición		
	<i>Philibertia gilliesii</i>	<i>Stillingia patagonica</i>	<i>Euphorbia collina</i>
AIA (100 μM)	14,5	16,3	2,8
E-64 (100 μM)	62,2	100,0	2,3
PMSF (1 mM)	0,0	0,0	41,4
Pepstatina A (10 μM)	0,0	0,0	4,3
1-10 fenantrolina (10 mM)	4,5	24,5	0,0

Tabla 2. Efecto de inhibidores específicos sobre la actividad enzimática de los extractos con actividad proteolítica.

Debe tenerse en cuenta que las experiencias se realizaron con extractos casi crudos, en los cuales puede existir más de un tipo de proteasas y además sustancias que interfieran con la acción de los inhibidores ensayados, por lo que los resultados a este nivel son solamente orientativos. Los resultados obtenidos con el extracto de *Philibertia gilliesii* sugieren la presencia de una o más proteasas cisteínicas, al igual que en el caso del extracto de *Stillingia patagonica*. Por su parte el extracto de *Euphorbia collina* evidencia inhibición con PMSF, inhibidor específico de proteasas serínicas, lo que indicaría que su actividad enopeptidásica se debe a enzimas de este grupo catalítico.

1.3. Análisis del Perfil Electroforético

La composición polipeptídica de los extractos clarificados de cada una de las especies se analizó mediante electroforesis nativa (*cfr.* 22.1 y 22.1.2.1, M&M), desnaturalizante (*cfr.* 22.2.1, M&M) e isoelectroenfoque (*cfr.* 24, M&M). Además se realizaron los correspondientes zimogramas (*cfr.* 25, M&M) con el fin de detectar las fracciones proteolíticamente activas.

1.3.1. Electroforesis Desnaturalizante en Gradiente

Como puede observarse en la Figura 1, el extracto clarificado de *Philibertia gilliesii* (calles 2 y 6) mostró seis bandas proteicas y el extracto de *Stillingia patagonica* (carril 4) presentó cinco bandas. En ambos casos algunas de las bandas se ubican entre los patrones de 21,4 y 31 kDa, valores que se

corresponden con los de las masas moleculares características de endopeptidasas cisteínicas vegetales (Barret *et al*, 1998).

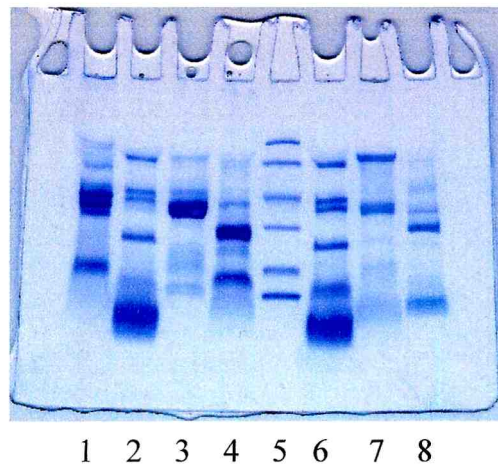


Figura 1. SDS-PAGE de los extractos clarificados. Carril 1: *E. peplus*; carril 2 y 6: *P. gilliesii*; carril 3: *C. integerrima*; carril 4: *S. patagonica*; carril 5: marcadores de peso molecular (97,4 kD; 66,2 kD; 45 kD; 31 kD; 21,4 kD y 14,4 kD); carril 7: *E. collina* y carril 8: *G. chilensis*.

El extracto de *E. collina* (carril 7) reveló la presencia de dos bandas mayoritarias de las cuales la que presenta mayor masa molecular se corresponde en tamaño a los valores hallados para un gran número de endopeptidasas serínicas vegetales (Lynn & Clevette-Radford, 1988). Los extractos sin actividad proteolítica evidenciaron la presencia de varias bandas de diferente masa molecular.

1.3.2. Electroforesis Nativa y Zimograma

En la Figura 2 se muestran las electroforesis nativas correspondientes a los extractos clarificados de las seis especies en estudio y el zimograma de las que manifestaron actividad proteolítica en las condiciones de ensayo (*Euphorbia collina*, *Stillingia patagonica* y *Philibertia gilliesii*).

El zimograma muestra una ancha banda de actividad con movilidad intermedia en el caso del extracto clarificado de *Euphorbia collina* (Figura 2 C, carril 1) y sólo indicios de actividad en el punto de siembra de *Stillingia patagonica* y de *Philibertia gilliesii* (Figura 2 C, carriles 2 y 3); el comportamiento observado en estos dos últimos extractivos implica que las

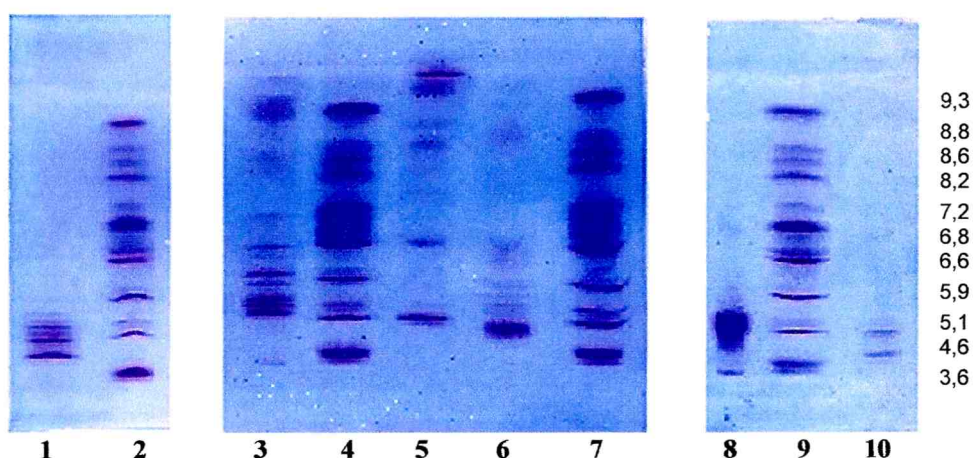


Figura 3. Isoelectroenfoque. Carril 1: *Euphorbia peplus*; carriles 2, 4, 7 y 9: patrones de *pI*; carril 3: *Stillingia patagonica*; carril 5: *Philibertia gilliesii*; carril 6: *Euphorbia collina*; carril 8: *Coliguaja integerrima*; carril 10: *Grindelia chilensis*.

1.3.4. Isoelectroenfoque con Zimograma

Como puede observarse en la Figura 4 el extracto de *E. collina* mostró solamente una banda con actividad caseinolítica que corresponde a la fracción de mayor intensidad y de *pI* más ácido. Por su parte, el extracto de *P. gilliesii* mostró al menos cuatro fracciones activas, todas ellas proteínas básicas.

Endopeptidasas de naturaleza básica fueron también características del látex de otras especies vegetales pertenecientes a la misma tribu que *P. gilliesii* -*Asclepiadeae*- como por ejemplo las de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000 y Obregón *et al.*, 2001), *Asclepias curassavica* (Liggieri *et al.*, 2004), *A. fruticosa* (Trejo *et al.*, 2001), *A. glaucescens* (Barragán *et al.*, 1985 y Tablero *et al.*, 1991), *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2004a), *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998 y Vairo Cavalli *et al.*, 2003) y *M. odorata* (Arribére *et al.*, 1999 y Vairo Cavalli *et al.*, 2001).

fracciones activas migraron al cátodo, lo que se corresponde con proteínas de naturaleza básica, tal como se comprobó luego al realizar el isoelectroenfoque-zimograma (*cfr.* 1.3.4).

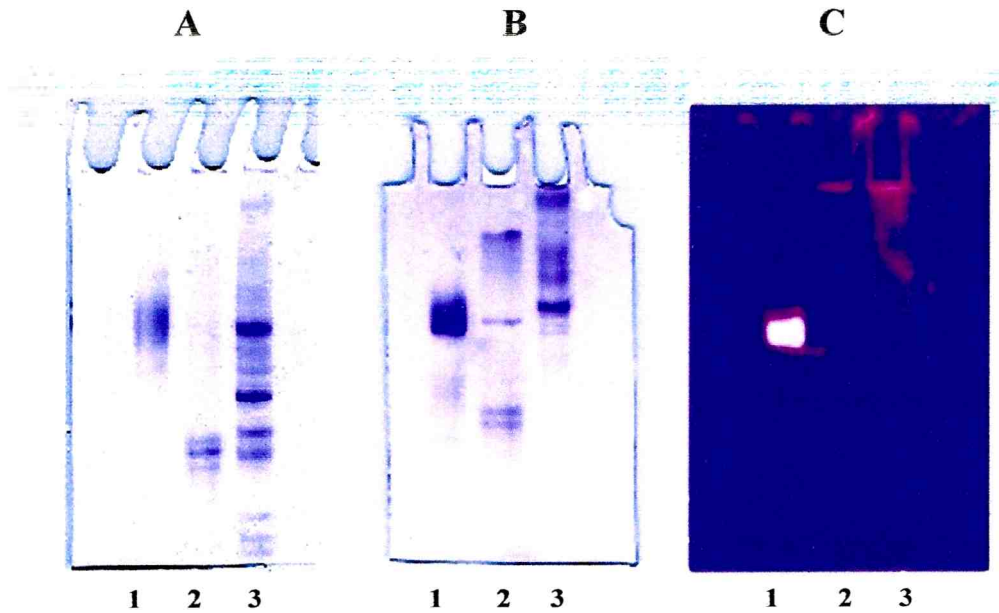


Figura 2. A: Electroforesis nativa. Carril 1: *Colliguaja integerrima*; carril 2: *Grindelia chilensis*; carril 3: *Euphorbia peplus*. **B: Electroforesis nativa.** Carril 1: *Euphorbia collina*; carril 2: *Stillingia patagonica*; carril 3: *Philibertia gilliesii*. **C: Zimograma.** Carril 1: *Euphorbia collina*; carril 2: *Stillingia patagonica*; carril 3: *Philibertia gilliesii*

1.3.3. Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque mostró que los extractos sin actividad proteolítica contuvieron pocas fracciones, todas ellas proteínas ácidas con *pI* menor a 5,9 (Figura 3).

El extracto de *S. patagonica* (carril 3) exhibió aproximadamente 10 fracciones proteicas dentro de un amplio rango de *pI* entre 5,1 y 9,3 o superior. El extracto de *E. collina* (carril 6) mostró al menos seis bandas proteicas dentro de un rango de *pI* de 4,4 a 9,0. *P. gilliesii*, el extracto con mayor actividad proteolítica, mostró un patrón complejo (carril 5), con bandas proteicas con valores de *pI* desde 4,7 hasta valores bastante mayores a 9,3.

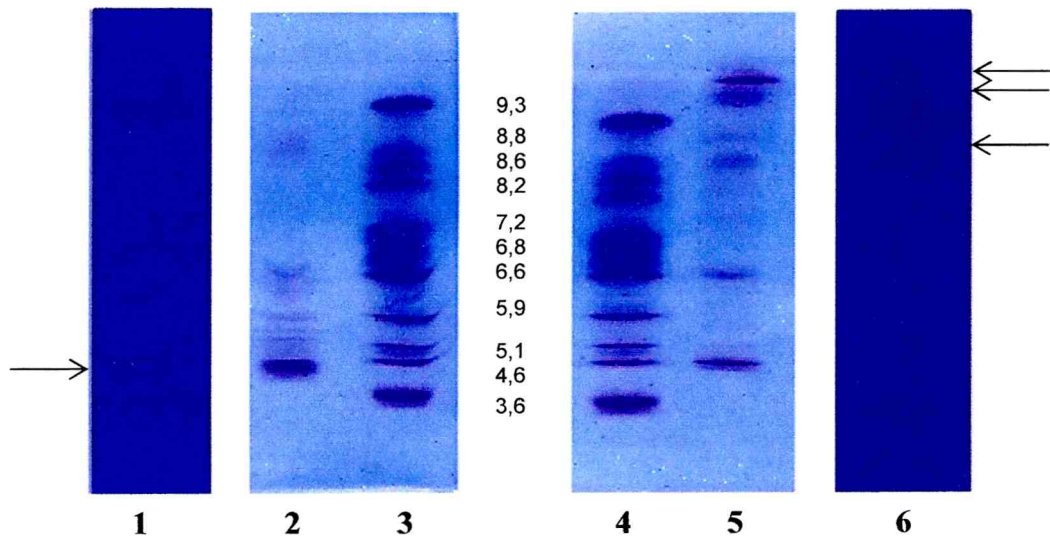


Figura 4. Isoelectroenfoque-Zimograma. Carriles 1 y 2: *Euphorbia collina*; carril 3 y 4: patrones de *pI*; carril 5 y 6: *Philibertia gilliesii*

La o las bandas proteolíticamente activas del extracto de *S. patagonica* no pudieron ser detectadas mediante la técnica de zimograma, posiblemente debido a la baja estabilidad que presentaron estas preparaciones.

2. ESPECIE SELECCIONADA: *PHILIBERTIA GILLIESII*

En función de los datos obtenidos en el ítem 1 se seleccionó a *Philibertia gilliesii* como la especie más adecuada para el aislamiento, caracterización y purificación de las endopeptidasas presentes en el látex obtenido de sus frutos.

2.1. Características de los Frutos

Los frutos de *Philibertia gilliesii* (Figura 5) son fusiformes y más largos que anchos. Su tamaño y peso varían sensiblemente; el más pequeño obtenido durante las recolecciones de los años 2002 a 2004 presentó un ancho de 1,4 cm y un largo de 3,3 cm, mientras que en el más grande las dimensiones fueron de 2,7 cm de ancho y 6,2 cm de largo.



Figura 5. *Philibertia gilliesii*. Planta, flores y frutos con látex fluyendo de los mismos

El peso de los frutos en estudio varió desde un valor promedio de 3,7 g para los más pequeños hasta un valor de 8,1 g para los más grandes. Las dimensiones y el peso promedio de los frutos recolectados para la posterior extracción del látex se indican en la Tabla 3.

Año	Tamaño Promedio		Peso Promedio
	Ancho (cm)	Largo (cm)	(g)
2002	2,21	4,86	5,86
2003	2,15	4,95	5,95
2004	2,20	4,92	5,92

Tabla 3. Características de los frutos de *Philibertia gilliesii*.

2.2. Obtención y Conservación de los Extractos Enzimáticos

El látex presente en los frutos de *Philibertia gilliesii* (pH cercano a 5) fue recolectado sobre buffer conteniendo protectores, como se indicó en el inciso 4.1 de Materiales y Métodos. El aspecto de la suspensión obtenida, denominada *extracto crudo*, fue algo turbio y de color blanquecino.

Dado que en la mayoría de las aplicaciones biotecnológicas se emplean extractos enzimáticos sólo parcialmente purificadas (Illanes, 1994), se clarificó el extracto crudo por centrifugación (*cfr.* 4.2, M&M). La solución límpida obtenida, denominada **philibertaína g**, fue caracterizada desde el punto de vista bioquímico y físicoquímico con el fin de disponer de una serie de parámetros útiles en una posible aplicación biotecnológica de dicha preparación enzimática. Recientemente se han empleado extractos clarificados de látex de *Calotropis gigantea* en aplicaciones biomédicas como la hidrólisis de coágulos de fibrina (Rajesh *et al.*, 2005) y el látex de *Carica papaya* para la degradación de efluentes proteicos (Biazus *et al.*, 2003).

2.2.1. Conservación de las Preparaciones Enzimáticas

La conservación es un aspecto de gran importancia para un producto que puede ser empleado industrialmente. En el caso de las preparaciones

enzimáticas se analizaron diferentes formas de almacenamiento: dos a bajas temperaturas y la tercera por liofilización.

2.2.1.1. Efecto del almacenamiento a bajas temperaturas

2.2.1.1.1. Efecto de la conservación a 8 °C y – 20 °C.

Con el fin de analizar la estabilidad de las peptidasas presentes en las preparaciones enzimáticas, tanto el extracto crudo como el clarificado (philibertaína g) se almacenaron a dos diferentes temperaturas (*cf.* 12.1, M&M).

Como se observa en la Figura 6 el almacenamiento de las preparaciones enzimáticas a bajas temperaturas produce una pérdida gradual de actividad enzimática.

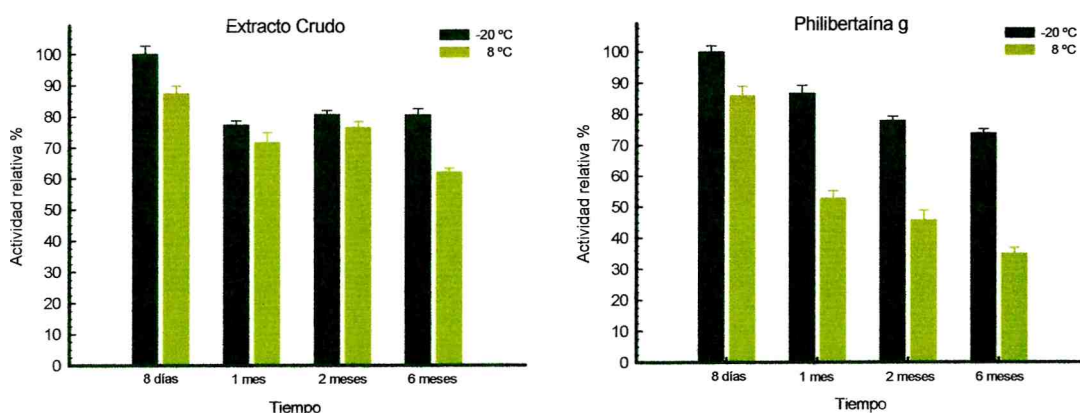


Figura 6. Estabilidad de las preparaciones enzimáticas a bajas temperaturas. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes ($n = 3$).

En el caso de las muestras conservadas a -20 °C el comportamiento es similar tanto para el extracto crudo como para el extracto clarificado perdiéndose alrededor del 25 % de actividad al cabo de 6 meses. En el caso de las muestras conservadas a 8 °C la pérdida de actividad es mayor, aunque es de destacar que el extracto crudo retiene algo más del 60 % de la actividad inicial hasta 6 meses en estas condiciones, lo que permitiría su conservación sin necesidad de temperaturas tan bajas; no ocurre lo mismo en el caso de philibertaína g que, en las condiciones de este ensayo, retiene sólo el 35 % de la actividad inicial.

2.2.1.1.2. Almacenamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por períodos más prolongados.

Se analizó el efecto de la baja temperatura ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) sobre philibertaina g durante tiempos más prolongados. En la Figura 7 se observa que luego de una reducción inicial de la actividad, la misma se mantiene prácticamente constante hasta 34 meses de almacenamiento, conservando alrededor de 70 % de la actividad inicial.

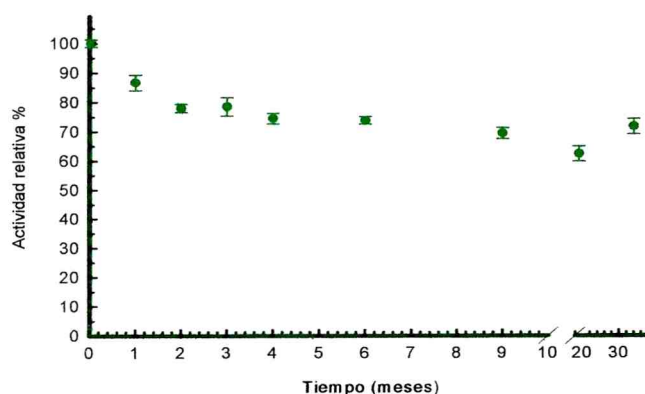


Figura 7. Actividad proteolítica de philibertaina g almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes ($n = 3$).

2.2.1.1.2. Efecto de la liofilización

El proceso de liofilización (*cfr.* 12.2, M&M) redujo la actividad de philibertaina g en un 25 % (Figura 8), valor que se mantuvo al menos hasta los

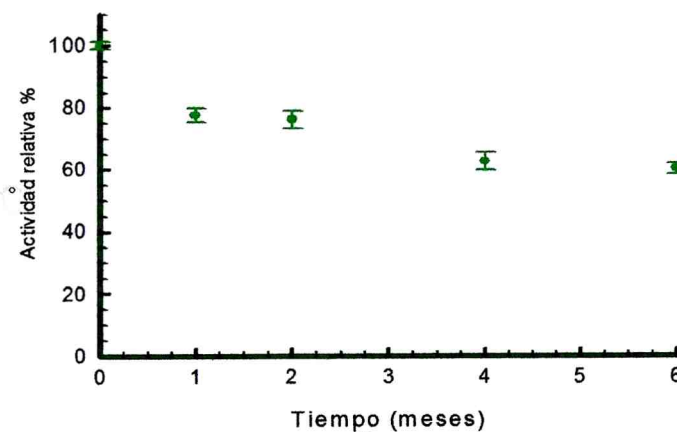


Figura 8. Efecto de la liofilización sobre la actividad proteolítica de philibertaina g. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes ($n = 3$).

dos primeros meses de conservación en heladera de las muestras liofilizadas. Entre los cuatro y los seis meses la muestra retuvo el 60 % de su actividad inicial.

2.3. Caracterización de Philibertaína g

Philibertaína g contuvo 1,22 mg/ml de proteínas determinadas por Bradford (*cf.* 5.1, M&M) y una actividad específica de 6,84 Ucas/mg de proteínas. Cabe aclarar que las diferencias observadas entre estos valores y los presentados en la Tabla 1 son debidas a que se trata de una muestra obtenida a partir de una segunda recolección de látex.

2.3.1. Preactivación de la Enzima por el Agregado de Cisteína

Las peptidasas cisteínicas para encontrarse en forma activa requieren tener reducido el grupo tiol del residuo de cisteína de su sitio activo. Dado que la cisteína *per se* es un muy buen agente reductor se la empleó con el fin de establecer las condiciones óptimas de preactivación de la preparación enzimática. Para ello se realizaron ensayos incubando el extracto enzimático con distintas concentraciones de cisteína a diferentes tiempos (*cf.* 9.1, M&M).

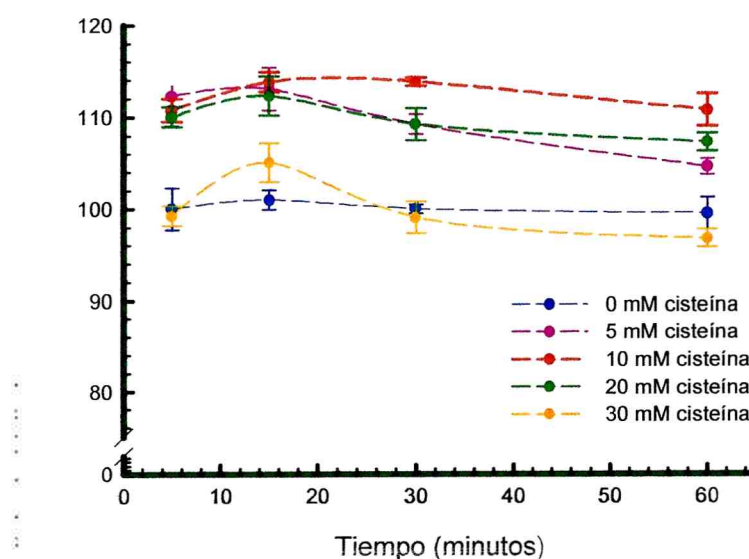


Figura 9. Preactivación de la preparación enzimática

Como se observa en la Figura 9, la mencionada preincubación con cisteína provocó un aumento máximo de 14 % en la actividad caseinolítica de philibertaína g. En algunas muestras en las que la enzima estuvo más oxidada se observaron incrementos mayores en la actividad al realizar la preincubación.

Para obtener la máxima actividad enzimática es suficiente la preincubación con cisteína 5 mM durante 15 minutos. Por otra parte puede observarse que una concentración de cisteína de 30 mM vuelve a disminuir la actividad de la enzima. Respecto a esta última observación cabe mencionar que en el año 2003 Nallamsetty *et al.* y Patel & Jagannadham reportan que tanto en ervatamina A (enzima cistínica de *Ervatamia coronaria*, *Apocynaceae*) como en heynaína (extraída de *Ervatamia heyneana*, *Apocynaceae*) se produce una pérdida de actividad cuando se adiciona cisteína pero ya en una concentración mayor a 0,5 mM. En el caso de heynaína los autores sugieren que el efecto mencionado podría deberse tanto a una perturbación de la estructura funcional por reducción de puentes disulfuros como a la formación de un complejo irreversible del agente reductor con la cisteína del sitio activo.

Es de destacar que en nuestro caso la preactivación de la muestra es necesaria para evitar que se origine una “fase lag” -o tiempo que demora la enzima en adquirir su máxima velocidad- aún en presencia de cisteína en el medio de reacción, efecto que de producirse puede generar errores en la determinación de la velocidad inicial a tiempos cortos.

2.3.2. Efecto del Agregado de Cisteína en la Mezcla de Reacción

Para establecer las condiciones del medio de reacción que permitan a la preparación enzimática de *Philibertia gilliesii* manifestar su máxima actividad, se incorporaron distintas concentraciones de cisteína (0 a 25mM) al sustrato (caseína), determinándose luego la actividad proteolítica a pH 8 del modo habitual (*cfr.* 9.2 y 6.1, M&M). Los ensayos se realizaron con enzima sin preactivar y preactivada con cisteína. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 10.

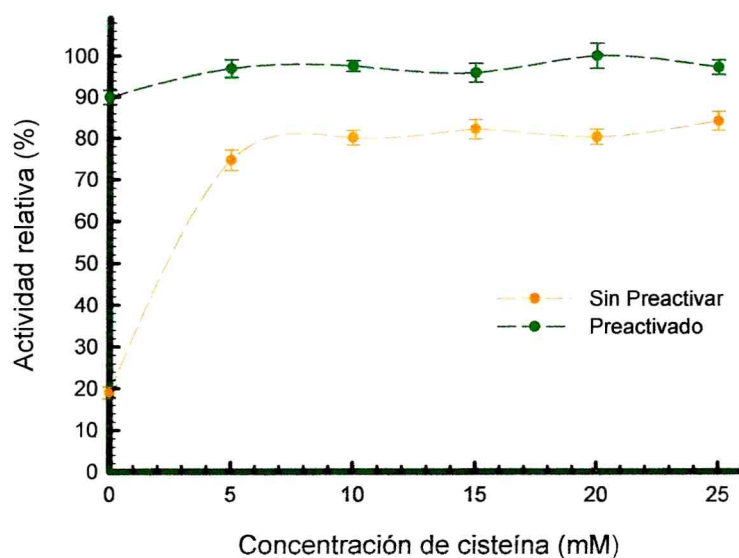


Figura 10. Efecto del agregado de cisteína en la mezcla de reacción.

En el caso de philibertaína g preactivada vemos que la presencia de cisteína en la mezcla de reacción incrementa la actividad enzimática en aproximadamente un 10 % respecto a los valores obtenidos en ausencia del agregado de la misma, lo que se justifica porque se mantiene el medio reductor durante toda la reacción. En el caso de philibertaína g sin preactivar el incremento de la actividad enzimática obtenido al agregar cisteína a la mezcla de reacción fue considerablemente mayor (60 %), alcanzándose un valor máximo cuando la concentración de cisteína en el medio de reacción llega a 10 mM. El gran incremento aquí observado es debido a que la cisteína del sitio activo no fue reducida ya que no se agregó cisteína en la mezcla de reacción (en el primer punto de la curva) y a que se trata de la preparación enzimática sin preactivar.

Como nos demuestra este experimento, la preactivación de las muestras coloca a las diferentes preparaciones en condiciones de expresar su máxima capacidad enzimática. En base a los resultados obtenidos, en los sucesivos ensayos de actividad no sólo se realizó la preactivación del extracto enzimático sino que también se utilizó una concentración de cisteína de 10 mM en la mezcla de reacción. Una mayor concentración de cisteína incrementa

innecesariamente los blancos, sin tener efecto positivo sobre la actividad proteolítica.

2.3.3. Actividad Endopeptidásica

La caseína es uno de los sustratos proteicos más ampliamente utilizados en los sistemas de ensayo para detectar actividad endopeptidásica debido a su bajo costo y al adecuado grado de pureza con que son obtenidos. El protocolo empleado (*cfr.* 6.1, M&M) provee por tanto de un método económico y sencillo para determinar actividad proteolítica, siendo muy utilizado para la selección de extractos crudos con actividad endopeptidásica (Sarath *et al.* 2001).

Philibertaína g presentó una actividad 8,53 U_{cas}/ml y mostró linealidad en el ensayo de actividad hasta los 4 minutos de reacción (Figura 11)

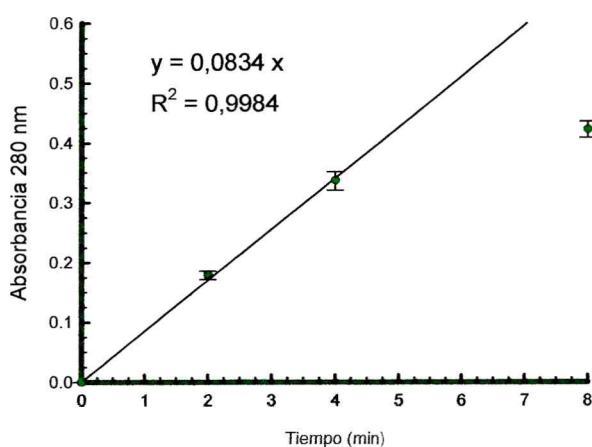


Figura 11. Actividad caseinolítica de philibertaína g (dilución 1:10)

2.3.4. Actividad Endoesterolítica

Los ensayos de actividad esterolítica (*cfr.* 7.1, M&M) se realizaron con el objeto de conocer las preferencias del extracto enzimático de *P. gilliesii* por los distintos sustratos sintéticos del tipo N- α -carbobenzoxi-aa-*p*-nitrofenil ésteres (N-CBZ-aa). Como puede observarse en la Figura 12, la preparación enzimática muestra la máxima actividad endoesterásica relativa con los derivados de glutamina y alanina (100 y 73 %), seguidos por los derivados de

ácido aspártico y asparagina (40 y 22 %, respectivamente), en menor proporción con los derivados de glicina, triptofano y leucina, en tanto que con tirosina y fenilalanina se obtuvo solo 5 % de actividad.

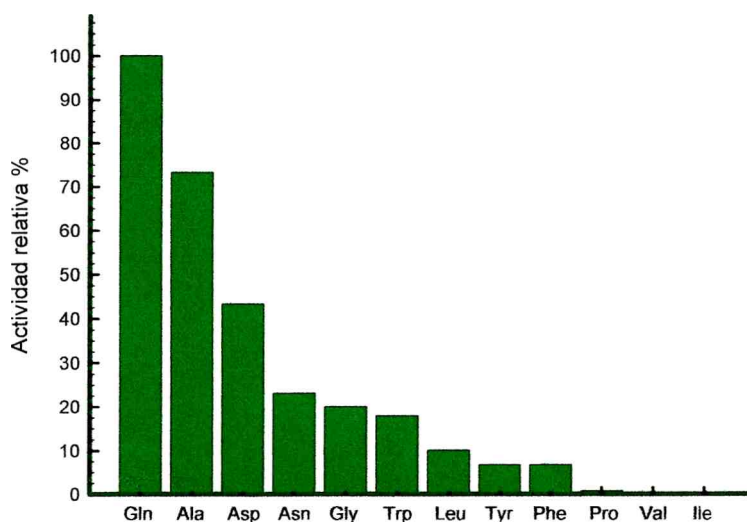


Figura 12. Actividad esterolítica del extracto enzimático de *Philibertia gilliesii*.

El orden de preferencia hacia los dos primeros sustratos fue inverso al obtenido en el caso de la preparación enzimática de *Asclepias fruticosa* (Trejo *et al*, 2001), que presentó un 100 % de actividad con alanina y un 85 % con glutamina ; por su parte el extracto crudo de *Funastrum clausum* (Morcelle *et al*, 2004a) manifestó un 100 % de actividad relativa hacia el derivado de alanina, aunque seguido por asparagina con sólo un 19 % de actividad relativa.

2.3.5. Actividad Carboxipeptidásica

Con el fin de detectar la presencia de carboxipeptidasas en el látex de *Philibertia gilliesii* se realizaron ensayos sobre philibertaína g y sobre un nuevo extracto que fue obtenido en presencia de inhibidores de proteasas cisteínicas -que podrían degradar la exopeptidasa buscada- e iones cinc requeridos para la expresión de la actividad de la enzima en cuestión (*cfr.* 4.3, M&M). La actividad carboxipeptidásica de las muestras fue determinada según el protocolo descrito (*cfr.* 8, M&M) utilizando como control positivo una

enzima comercial (carboxipeptidasa A bovina, CPA). No se detectó actividad carboxipeptidásica ni actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A (*cf.* 17, M&M) en ninguna de las muestras ensayadas.

2.3.6. Efecto del pH sobre la Actividad Proteolítica

2.3.6.1. Perfil de pH

Con el fin de conocer la variación de la actividad enzimática de philibertaina g con el pH del medio (Figura 13) se determinó la actividad caseinolítica en el rango 6-11 (*cf.* 13, M&M).

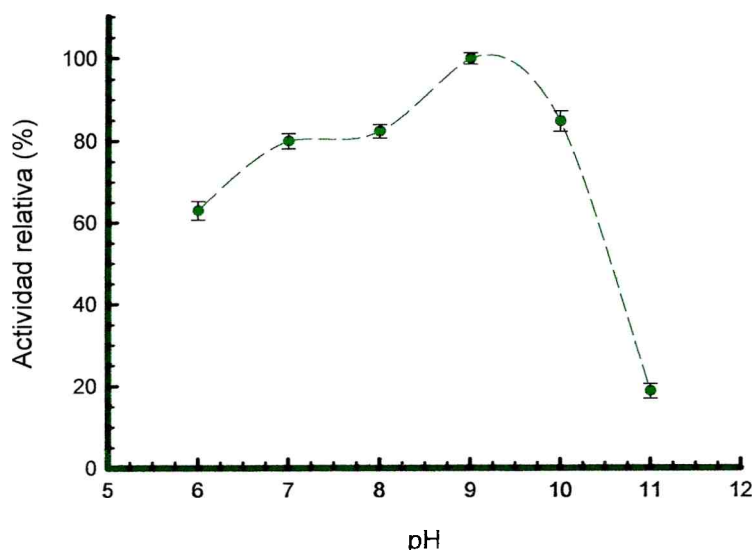


Figura 13. Perfil de pH de philibertaina g.

Como se observa en la figura, la preparación enzimática de *Philibertia gilliesii* presentó el 80 % de su actividad caseinolítica máxima entre los valores de pH 7 y 10. La curva presenta dos máximos, comportamiento normal en una preparación enzimática no purificada donde pueden coexistir más de una enzima con diferente pH óptimo.

La mayor actividad a valores de pH neutros y alcalinos es una característica común de todas la proteasas estudiadas hasta el momento pertenecientes a la tribu *Asclepiadeae*.

2.3.6.2. Estabilidad al pH

Se analizó el efecto del pH sobre la estabilidad de las enzimas presentes en la preparación enzimática (*cf.* 14, M&M). En la Figura 14 se puede observar que no se produjo disminución de la actividad caseinolítica luego de mantener philibertaína g 2 horas sobre hielo a valores de pH entre 7 y 10. Este ensayo demuestra una gran estabilidad del extracto enzimático de *Philibertia gilliesii* en condiciones alcalinas.

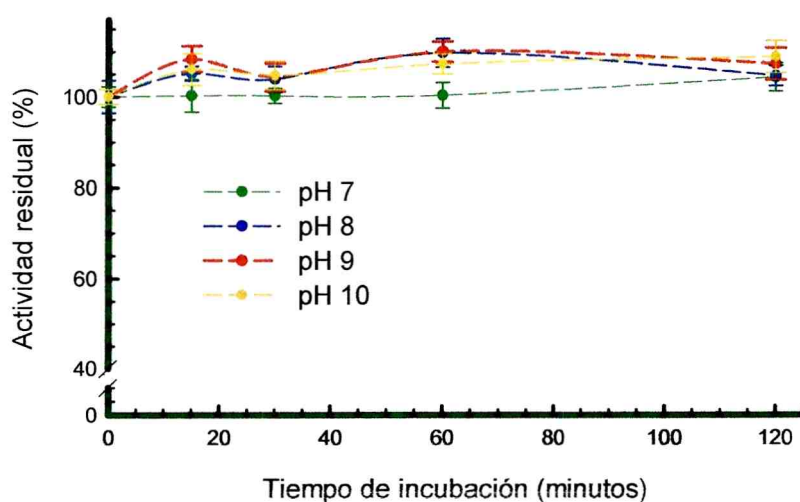


Figura 14. Curva de estabilidad al pH philibertaína g

2.3.7. Estabilidad a la Temperatura

Este ensayo nos permitió evaluar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de philibertaína g (*cf.* 16, M&M). En la Figura 15 se puede observar el comportamiento térmico del extractivo analizado el que presenta una gran estabilidad a temperaturas entre 25 y 45 °C, reteniendo más del 80 % de la actividad original luego de dos horas de incubación.

A 55 °C comienza a desestabilizarse reteniendo alrededor de un 40 % de la actividad inicial luego de una hora de incubación. La preparación se inactiva luego de 5 minutos a 75 °C.

El comportamiento térmico de la preparación enzimática resulta ventajoso si se la desea utilizar en procesos industriales, ya que un breve calentamiento a 75 °C permite detener la actividad proteolítica de la misma.

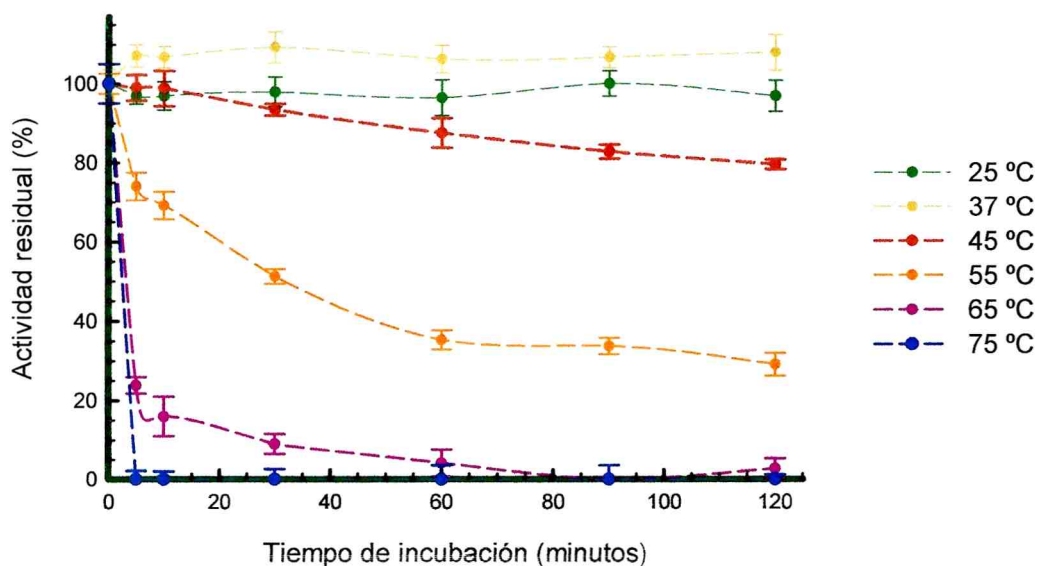


Figura 15 Estabilidad térmica de philibertaina g

Comparando la estabilidad térmica de philibertaina g con la de otras preparaciones enzimáticas obtenidas a partir del látex de especies vegetales pertenecientes a la misma familia (Tabla 4) podemos decir que el extractivo de *Philibertia gilliesii* tiene un comportamiento similar al obtenido a partir de

Especie vegetal	Actividad residual (%)			Referencias
	45 °C	60 °C	70 °C	
<i>Philibertia gilliesii</i>	85	5	0	
<i>Asclepias curassavica</i>	100	100	0	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
<i>Asclepias fruticosa</i>	77	0	0	Trejo <i>et al.</i> , 2001
<i>Funastrum clausum</i>	90	75	65	Morcelle <i>et al.</i> , 2004a
<i>Morrenia brachystephana</i>	95	80	45	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2003
<i>Morrenia odorata</i>	95	70	22	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001

Tabla 4. Estabilidad térmica de diferentes preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de látex. Los datos corresponden a 2 horas de incubación a las temperaturas indicadas.

Asclepias fruticosa, dado que ambas prácticamente se inactivan luego de dos horas de incubación a 60 grados; por su parte, las enzimas de *Funastrum*

clausum, *Morrenia brachystephana* y *M. odorata* presentan una gran estabilidad térmica a temperaturas tan altas como 70 °C.

2.3.8. 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, la misma suele disminuir cuando la concentración de sal (NaCl) se incrementa por encima de 0,2 M (Scopes, 1984). El incremento de la concentración salina sobre la actividad de philibertaina g (*cf.* 15, M&M) produce una disminución gradual de la misma, aunque reteniendo el 60 % de la actividad inicial aún en NaCl 1 M (Figura 16).

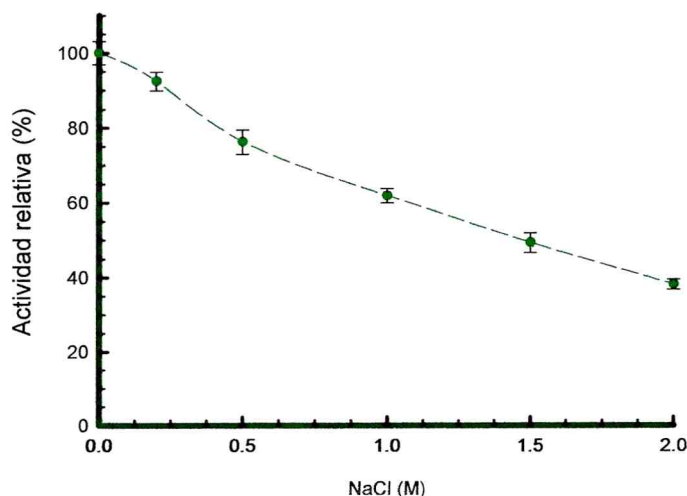


Figura 16. Efecto de la concentración salina sobre la actividad caseinolítica del extractivo de *P. gilliesii*. Los datos resultan de promediar dos ensayos independientes ($n = 3$).

Esta característica es valiosa en su posible uso para procesar enzimáticamente material crudo marino. Un ejemplo de este tipo de procesos es la obtención de la salsa de pescado, condimento muy utilizado para la preparación de arroces en el sudeste asiático, mezclando carne cruda de pescado, jugo de ananá (rico en enzimas proteolíticas) y aproximadamente un 20 % de sal (Owens & Mendoza, 1985; Gildberg, 1992).

2.3.9. Efecto de Agentes Químicos

Se evaluó el comportamiento de philibertaína g en presencia de distintos agentes químicos normalmente utilizados en la industria (*cfr.* 11, M&M). En el caso de la manufactura del cuero existen varias etapas, muchas de las cuales involucran proteasas en condiciones hostiles a causa del agregado de aditivos como surfactantes, agentes reductores, altas concentraciones salinas, cambios en el pH y la temperatura, adición de preservantes y otras enzimas necesarias para mejorar la eficiencia del proceso (Uhlig, 1998). Del mismo modo las enzimas presentes en los detergentes están expuestas a agentes quelantes, surfactantes y oxidantes (como los blanqueadores) y a altas temperaturas y pH alcalino (Uhlig, 1998). En la Tabla 5 se puede ver el comportamiento de la preparación enzimática de *P. gilliesii* frente a diferentes sales utilizadas en la industria alimenticia, surfactantes y desnaturalizantes.

Agente Químico	Concentración	Actividad Residual (%)
Control	-	100,0
SDS ^a	1 %	2,7
SDS ^b	1 %	0,0
Tritón X-100	1 %	4,6
Urea	4 M	163,0
EDTA	10 mM	97,9
NaCl	0,3 M	85,2
CaCl ₂	10 mM	76,2

a) en la mezcla de reacción

b) preincubado con el extractivo enzimático.

Tabla 5. Efecto de agentes químicos sobre la actividad del extractivo de *Philibertia gilliesii*.

2.3.10. Inhibición con Acido Iodoacético del Extractivo Enzimático

El ácido iodoacético (AIA) al igual que la iodoacetamida son compuestos químicos usados como inhibidores irreversibles de proteasas cisteínicas. Estos inhibidores bloquean los grupos sulfhidrilos libres, reaccionando no sólo con el residuo de cisteína del sitio activo sino también con la cisteína que normalmente se adiciona como activador.

El ensayo de inhibición con ácido iodoacético (*cf.* 10.3, M&M) se realizó con preparaciones enzimáticas sin preactivar y preactivadas con cisteína (Tabla 6).

Concentración AIA	% Actividad Residual	
	Sin preactivar	Preactivado
0 mM	100	100
1 mM	70,7	1
10 mM	27,6	0
15 mM	8,5	0

Tabla 6. Efecto del AIA sobre el extracto enzimático de *Philibertia gilliesii* sin preactivar y preactivado.

Dado que en una población de moléculas de endopeptidasas cisteínicas normalmente hay un porcentaje de ellas en las que los grupos sulfhidrilo del sitio activo se encuentran oxidados, antes de inhibir la enzima es necesario tratar previamente la preparación con un agente reductor -como por ejemplo cisteína o ditioneitol (DTT)- para que todos los grupos sulfhidrilo del sitio activo se encuentren en forma reducida y puedan luego ser bloqueados por el inhibidor.

En el experimento realizado se observa que la preparación enzimática sin preactivar no llega a ser inactivada ni aún con elevadas concentraciones de AIA. Es de fundamental importancia considerar este aspecto para evitar una inhibición incompleta al momento de utilizar inhibidores específicos de grupo, tales como el aquí mencionado o el E-64, en particular si éste último será empleado para titular el sitio activo.

El experimento precedente permitió explicar la elevada actividad residual observada en la Tabla 2 sobre el extracto clarificado de *P. gilliesii* cuando fue incubado con 100 μ M de AIA, sin haber sido activado previamente.

2.3.11. Caracterización Electroforética

2.3.11.1. Electroforesis nativa con polaridad invertida y zimograma

Teniendo en cuenta los resultados de la electroforesis en estado nativo (*cfr.* 1.3.2, R&D) y del IEF (*cfr.* 1.3.4, R&D) realizados durante el *screening* de las diferentes especies vegetales se decidió analizar el perfil proteico en estado nativo de philibertaína g, invirtiendo la polaridad de los electrodos (*cfr.* 22.1.2.2, M&M). En este caso las proteínas con carga positiva a pH 8,8 son las que ingresan y se separan dentro del gel de poliacrilamida. Aquellas proteínas con carga negativa a ese valor de pH se mueven desde el punto de siembra hacia el buffer del reservorio superior.

En la Figura 17 podemos observar 5 bandas proteicas. La primera en el borde del punto de siembra, la segunda en la interfase entre el gel de stacking y el gel de resolución y las otras 3 en la parte superior del gel de resolución. A excepción de la banda localizada en la interfase de los geles, todas las demás presentan actividad proteolítica como se observa en el zimograma (*cfr.* 25, M&M).

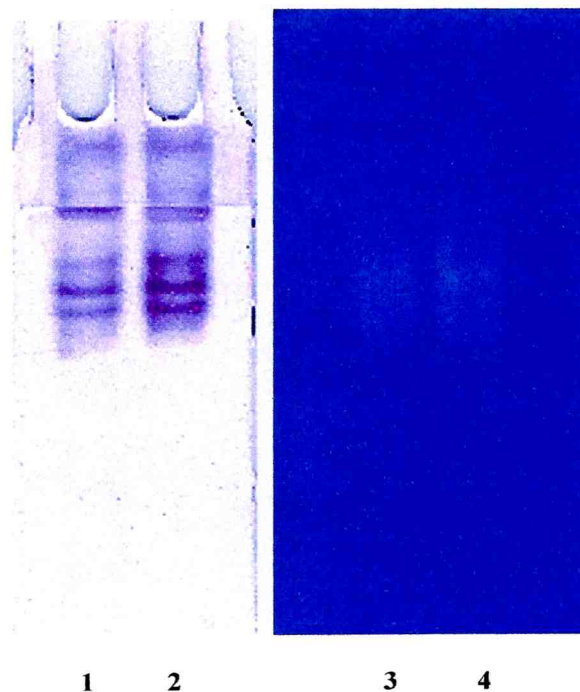


Figura 17. Electroforesis nativa con electrodos invertidos del extractivo de *P. gilliesii*. Calles 1 y 2: electroforesis a dos concentraciones de muestra diferentes, calles 3 y 4: zimogramas.

2.3.11.2. Comparación entre los perfiles obtenidos por electroforesis desnaturalizante reductora y no reductora

Con el fin de completar el análisis del perfil proteico del extracto enzimático proveniente del látex de *Philibertia gilliesii*, se realizó una electroforesis en presencia de SDS, pero en condiciones no reductoras, lo que permite detectar las bandas con actividad proteolítica por medio de un zimograma (*cf.* 22.2.2, 22.2.2.4 y 25, M&M). El perfil así obtenido (Figura 18) es muy diferente al obtenido en condiciones reductoras (*cf.* 22.2.1, M&M). En las presentes condiciones las proteínas se encuentran semidesnaturalizadas (Figura 18. calles 2 y 3) y se observan 7 bandas proteicas cuyos pesos moleculares estimados son 106,3; 83,4; 64,1; 40,3; 35,2; 29,6 y 22,5 kDa, además de una banda muy ancha con un peso promedio de 15,8 kDa.

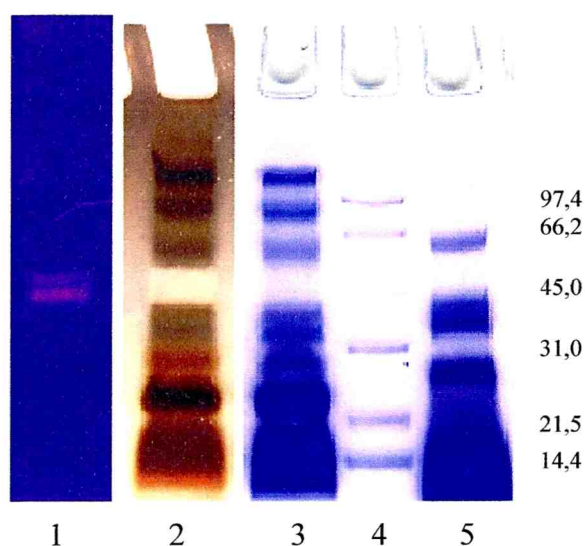


Figura 18. SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras y zimograma. Calle 1: zimograma de la electroforesis no reductora (calle 3), calle 2: electroforesis no reductora teñida con nitrato de plata, calle 3: electroforesis no reductora teñida con Coomassie Blue, calle 4: patrones de peso molecular calle 5: electroforesis reductora teñida con Coomassie Blue.

Debemos considerar que estos pesos moleculares son sólo orientativos por tratarse, como hemos dicho, de un sistema no completamente desnaturalizante en el cual el SDS puede no acceder a algunas regiones de la proteína. Si comparamos estos resultados con el perfil correspondiente a condiciones

totalmente desnaturalizantes (Figura 18, calle 5) se puede observar que en este último caso desaparecen las dos bandas de mayor peso molecular y hallamos una nueva banda de 65,5 kDa, dos bandas muy cercanas de 44 y 37,6 kDa, otra de 26,7 kDa y se mantiene la zona de 14 kDa, tomando el valor correspondiente al punto medio de las mismas.

Es interesante observar que la actividad proteolítica (Figura 18, carril 1) que fue determinada por la técnica habitual de zimograma (*cf.* 25, M&M), puede además detectarse al teñir con plata (*cf.* 22.2.1.4.2, M&M) el gel de poliacrilamida que estuvo en contacto con la placa de agarosa embebida en caseína utilizado para realizar el zimograma (Figura 18, calle 2). En esta figura la zona con actividad enzimática -donde la caseína está hidrolizada- queda sin ninguna tinción, contrastando intensamente con un fondo color marrón producido por la presencia de caseína proveniente de la placa de agarosa, que ha quedado adherida a la poliacrilamida luego del contacto. En ambos geles se puede observar dos bandas activas de peso molecular muy cercano una de otra con 45,3 y 42,1 kDa cada una (como indicamos antes estos valores son orientativos).

El perfil proteico de philibertaína g en condiciones no reductoras es muy diferente al obtenido de otras especies vegetales como por ejemplo el de *Calotropis procera* (perteneciente a la misma tribu *Asclepiadeae*) que presenta solamente 3 bandas proteicas de peso molecular entre 20 y 29 kDa (Dubey & Jagannadham, 2003), algo similar ocurre con el perfil proteico obtenido en condiciones reductoras. Por su parte, los extractivos obtenidos a partir del látex de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1996), *M. odorata* (Arribére *et al.*, 1999), *Araujia hortorum* (Obregón *et al.*, 2001) y *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2004a), todas ellas pertenecientes a la misma tribu (*Asclepiadeae*) presentan en SDS-PAGE solamente dos bandas de peso molecular entre 21 y 31 kDa y péptidos de autodegradación menores a 14 kDa. Como hemos indicado más arriba el perfil de *P. gilliesii* en SDS-PAGE muestra tres bandas (65,5; 40,8 y 37,6 kDa) de mayor peso molecular al esperado para proteasas cisteínicas, una de alrededor de 27 kDa, que se encuentra dentro de los tamaños hallados en otras fitoendopeptidasas de esta

clase y una zona de menor peso molecular, probablemente constituida principalmente por productos de hidrólisis.

2.3.11.3. Isoelectroenfoque con zimograma

La Figura 19 A muestra el isoelectroenfoque (*cf.* 24, M&M) de philibertaína g, en un rango de pH de 3 a 9.

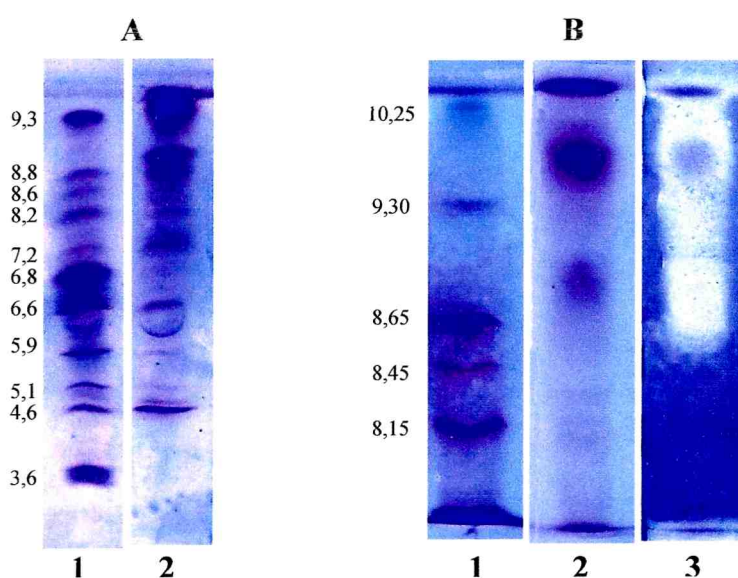


Figura 19. Isoelectroenfoque de philibertaína g. **A)** IEF con anfolitos de amplio espectro (3-9). Calle 1: patrones de pI y calle 2: philibertaína g. **B)** IEF con anfolitos de alto pI (8-10). Calle 1: patrones de pI, calle 2: philibertaína g y calle 3: zimograma.

Dicha preparación enzimática demostró contener una gran cantidad de componentes proteicos con *pI* en un rango que va de 4,6 a valores mayores a 9,3.

Con el fin de evaluar con más detalle los valores de *pI* de las fracciones alcalinas se realizó un isoelectroenfoque con anfolitos de rango de pH 8 a 10. En la Figura 19 B se puede distinguir claramente 3 zonas con actividad proteolítica: una con un *pI* entre 8,5 y 9,0, otra con *pI* entre 9,3 y 10,25 y por último una fracción de *pI* > 10,25. Además, si se observa cuidadosamente el zimograma de la mencionada figura, puede advertirse la presencia de una cuarta fracción activa de *pI* entre 9 y 9,3. Casi la totalidad de las proteasas vegetales obtenidas a partir del látex de especies pertenecientes a la familia

Apocynaceae son de naturaleza básica con *pI* mayores a 9. Sin embargo, ha sido informada la existencia de 5 proteasas ricas en aminoácidos ácidos con *pI* entre 3,6 y 6,19 extraídas del látex de *Asclepias glaucescens* (*Apocynaceae*) (Barragán *et al.*, 1985). La multiplicidad de proteasas que muestra el látex obtenido de *Philibertia gilliesii* es un fenómeno claramente establecido en otras especies vegetales. El látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*) contiene 4 proteasas que son tanto funcional como estructuralmente distintas (Glazer & Smith, 1971; Lynn, 1979), de la misma manera el látex de *Ficus glabrata* y *Ficus carica* (*Moraceae*) contiene varias proteasas diferenciables electroforética y cromatográficamente (Sgarbieri *et al.*, 1964). Del látex de *Calotropis gigantea* (*Apocynaceae*) se han aislado 4 proteasas cisteínicas que poseen diferente composición aminoacídica, mapa peptídico, movilidad electroforética entre otras propiedades distintivas (Abraham & Joshi, 1979; Pal & Sinha, 1980). Sundd *et al.*, 1998; Kundu *et al.*, 2000 y Nallamsetty *et al.*, 2003 estudian tres proteasas alcalinas con diferente secuencia N-terminal, peso molecular, *pI* y condiciones óptimas de actividad, aisladas del látex de *Ervatamia coronaria* (*Apocynaceae*). En nuestro laboratorio también se han purificado 3 diferentes proteasas alcalinas del látex de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001) como así también dos proteasas cisteínicas de *Morrenia brachystephana* (Vairo Cavalli *et al.*, 2001 y 2003), aunque *Asclepias fruticosa* posee una única proteasa (Trejo *et al.*, 2001). Las últimas especies citadas pertenecen a la familia *Apocynaceae*, al igual que la que es objeto del presente trabajo.

3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS CON POSIBLE APLICACIÓN INDUSTRIAL

3.1. Hidrolizados de Agua de Cola

Se denomina agua de cola al efluente líquido de las fábricas de harina de pescado. Este subproducto líquido de la industria pesquera, contiene principalmente proteínas y sólidos suspendidos por lo que puede ser utilizado en la obtención de hidrolizados proteicos de utilidad en la industria alimentaria.

La composición del agua de cola es altamente variable y depende fuertemente de la composición inicial de la materia prima y de las condiciones de almacenamiento y de operación de la planta de harina. La composición química aproximada del agua de cola es 9,4 % (p/v) de sólidos totales, 7,1 % (p/v) de proteínas determinadas por Kjeldahl, 0,3 % (p/v) de lípidos y 2,1 % (p/v) de cenizas, con un valor de pH de 6,2 (del Valle & Aguilera, 1990).

El agua de cola empleada en el presente estudio fue obtenida de la fábrica de harina de pescado instalada en la empresa Harengus S.A., ubicada en el parque industrial pesquero de la ciudad de Puerto Madryn. El agua de cola fue recolectada luego del procesamiento de la materia prima consistente en desechos de merluza (*Merluccius hubbsi* y *Macruronus magellanicus*), mezclados con savorín (*Seriolella porosa*) y langostino (*Pleoticus muelleri*). El tratamiento preliminar realizado al agua de cola en el laboratorio se indica en Materiales y Métodos (*cf.* 18.1, M&M).

3.1.1. Caracterización Físicoquímica y Análisis Electroforético del Agua de Cola

Los resultados de los análisis físicoquímicos del agua de cola (*cf.* 18.3, M&M) se presentan en la Tabla 7. Los valores determinados son comparables - considerando la variabilidad que presenta este producto- a los obtenidos por del Valle & Aguilera (1990).

Ensayo	Valores Determinados (g /100ml de agua de cola)
Sólidos Totales	6,86 ± 0,04
Proteínas	6,06 ± 0,03
Cenizas	0,99 ± 0,01
Humedad	93,14 ± 0,04
pH	6,74

Tabla 7: Propiedades físicoquímicas del agua de cola.

Con el propósito de conocer el perfil proteico de la muestra de agua de cola completa (*cf.* 18.2, M&M), así como el de la fracción soluble (FS) y el de la fracción insoluble (FI), se realizó una electroforesis desnaturizante y reductora (*cf.* 22.4, M&M) empleando el método de SDS-Tricina-PAGE de alta resolución (Pardo & Natalucci, 2002). Las proteínas fueron analizadas luego de ser solubilizadas de dos formas diferentes (*cf.* 18.4, M&M) empleando en un caso buffer de muestra clásico (BM) y en el otro urea 9 M (urea).

En la Figura 20 se observa que los perfiles proteicos obtenidos con los dos métodos de solubilización fueron equivalentes tanto para la FI como para el agua de cola completa, por lo que se optó por utilizar siempre buffer de muestra tanto para solubilizar las proteínas totales del agua de cola, las diferentes fracciones y los hidrolizados obtenidos posteriormente (3.1.2, R&D).

El análisis electroforético de las proteínas del agua de cola completa muestra que una gran parte corresponde a proteínas de alto peso molecular (>66 kDa), presentando además una importante fracción de aproximadamente 40 kDa y, en menor proporción, proteínas de bajo peso molecular. La fracción soluble está compuesta sólo por las bandas de alto peso molecular, además de la de 40 kDa. En cambio la fracción insoluble se encuentra enriquecida en 3 bandas de bajo peso molecular ($\leq 14,4$ kDa), además de aquellas observadas en el agua de cola total. Estas proteínas de bajo peso molecular estarían interactuando con las proteínas de mayor peso molecular para formar

agregados insolubles antes del proceso de solubilización previo a la electroforesis.

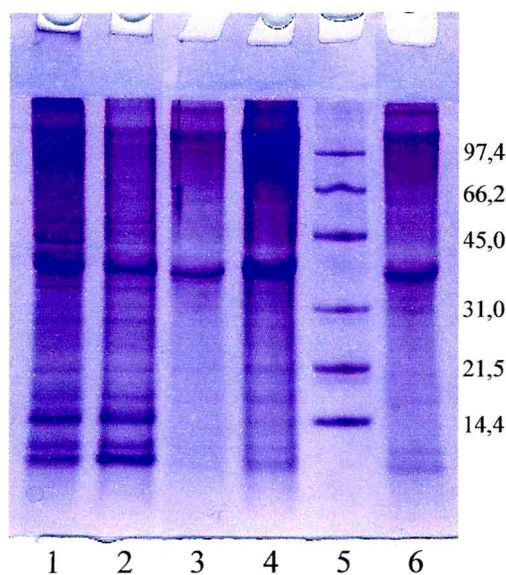


Figura 20. SDS-Tricina-PAGE de las distintas fracciones de agua de cola.
 Calle1: Fracción Insoluble (FI) en BM, calle 2: FI en urea, calle 3: FS, calle 4: agua de cola completa en urea, calle 5: patrones de peso molecular y calle 6: agua de cola completa en BM.

Es de destacar una importante diferencia con lo detectado por del Valle & Aguilera (1991), donde la distribución de pesos moleculares de las proteínas solubles analizadas por exclusión molecular, muestra una menor proporción de proteínas de alto peso molecular (67 kDa), además de una elevada proporción de componentes en la región de 3 kDa.

3.1.2. Determinación del Grado de Hidrólisis de Proteínas de Agua de Cola y Análisis por SDS-PAGE de los Péptidos Obtenidos

Utilizando las proteínas de pescado contenidas en el agua de cola como sustrato se determinó el grado de hidrólisis (GH) producido por el extracto enzimático clarificado (philibertaina g) obtenido del látex de *Philibertia gilliesii*. El grado de hidrólisis obtenido a pH 9 fue comparado con el producido por alcalasa en las mismas condiciones -Figura 21- (*cfr.* 18.5, M&M).

Como puede observarse en la Figura 21, la curva de progreso de reacción obtenida por las cisteín-proteasas presentes en el extracto de *P. gilliesii* mostró un perfil similar, aunque con un GH considerablemente más bajo que el correspondiente a alcalasa (proteasa microbiana serínica).

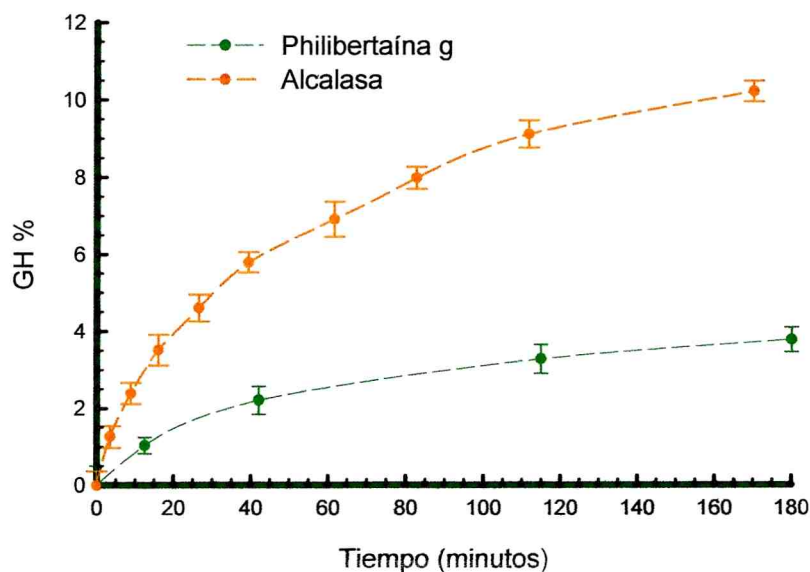


Figura 21. Grado de hidrólisis de philibertaína g sobre las proteínas de agua de cola. Comparación con alcalasa.

Luego de 1 hora de reacción el GH fue alrededor de un 37 % respecto al obtenido con alcalasa, relación que se mantuvo prácticamente constante al cabo de 3 horas (GH de alcalasa 10,2 % y GH de philibertaína g 3,8 %).

Con el fin de realizar el análisis de los productos obtenidos se tomaron muestras a diferentes tiempos de hidrólisis y se realizaron las electroforesis de las mismas por SDS-Tricina-PAGE (*cf.* 22.4, M&M). Con el fin de no perder péptidos de bajo peso molecular se cambió en este caso el porcentaje de monómeros del gel de resolución, respecto al utilizado en el análisis realizado a las distintas fracciones del agua de cola, lo que provocó la retención de una banda proteica en la interfase entre el gel espaciador y el gel de resolución.

Al realizar el análisis de los geles (Figura 22) se observa que los perfiles electroforéticos de los hidrolizados obtenidos con alcalasa y con philibertaína son notoriamente diferentes para grados de hidrólisis equivalentes (2 minutos para alcalasa y 10 minutos para philibertaína g), lo que seguramente

le confiere propiedades funcionales diferenciales al producto de ambos tratamientos enzimáticos.

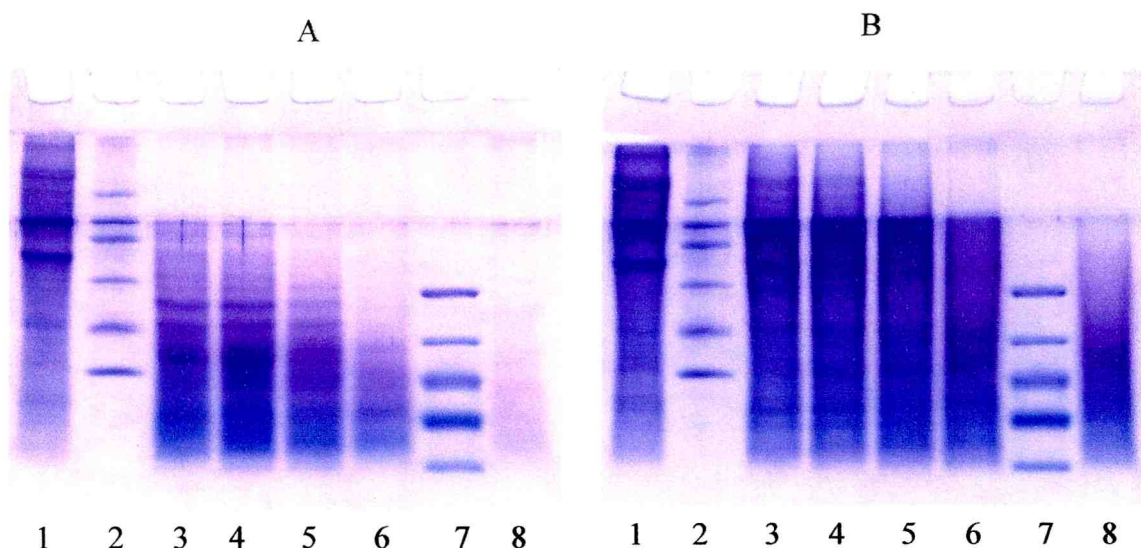


Figura 22. Electroforesis de los hidrolizados de proteína de pescado con alcalasa (A) y con philibertaina g (B). Para ambas electroforesis, carril 1: agua de cola sin hidrolizar; Carril 2 y 7: marcadores de bajo peso molecular (97,4; 66,2; 45; 31; 21,4 y 14,4 kDa) y patrones peptídicos (26,6; 17; 14; 6,5 y 3,5 kDa), respectivamente, Carril 3 a 6 y 8: hidrolizados de la muestra a 2, 5, 10, 30 y 180 min de reacción

El agua de cola sin hidrolizar muestra en los geles de SDS-Tricine-PAGE 4 bandas dentro del gel espaciador, siendo las tres primeras más importantes en intensidad con un peso molecular mayor a 100 kDa y una de menor intensidad con 96,4 kDa. Luego le sigue una banda ancha e intensa en la interfase entre el gel espaciador y el gel de resolución de aproximadamente 66,3 kDa. Dentro del gel de resolución se ve una banda de gran intensidad de 40,9 kDa, debajo de ella tres bandas muy delgadas en la zona de entre 26 y 40 kDa y 3 bandas tenues de 20,3; 15,4 y 8,7 kDa.

En la Figura 23 se muestra el densitograma obtenido del análisis del gel de electroforesis realizado con los hidrolizados a diferentes tiempos.

Luego de 2 minutos de tratamiento de las proteínas de agua de cola con *alcalasa* (GH 0,74 %) ya no son detectables las proteínas de mayor peso molecular, mientras que se manifiestan parcialmente degradadas las proteínas correspondientes a las bandas de 66,3 y 40,9 kDa y aparecen nuevas bandas de

27,1; 22; 16,6; 12 y 7,5 kDa. Después de 180 minutos de hidrólisis (GH 10,22 %) se observan péptidos de bajo peso molecular.

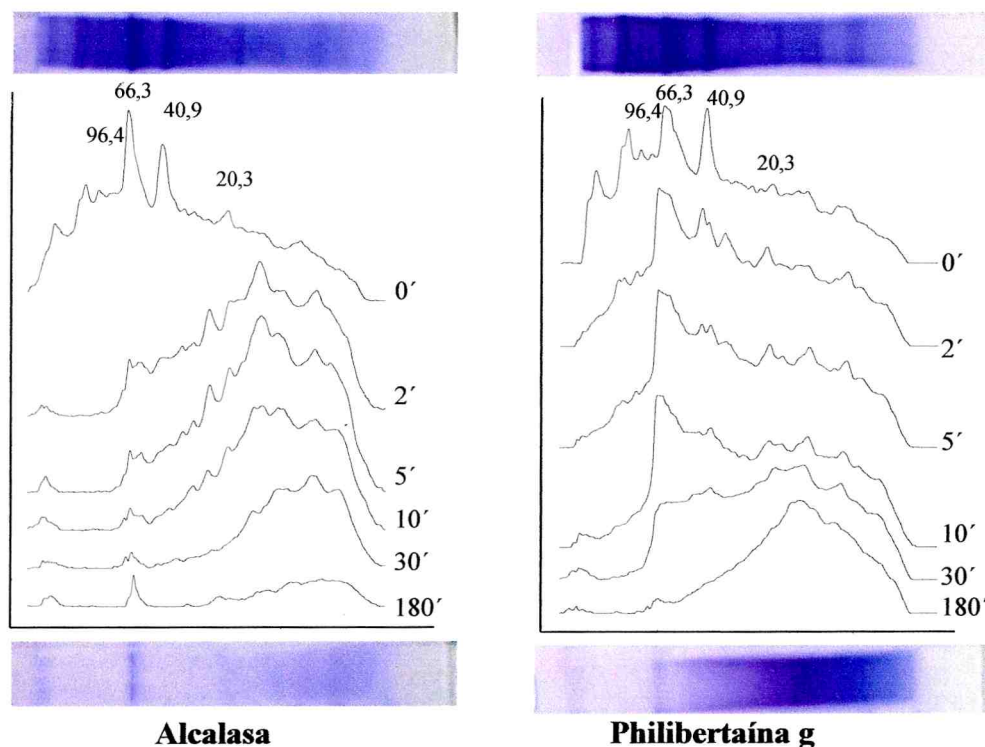


Figura 23. Densitograma obtenido a partir de datos de las electroforesis anteriores. Hidrolizados de proteínas de pescado con alcalasa e hidrolizados de proteínas de pescado con philibertaína. Los números sobre las bandas corresponden a los kDa calculados para cada polipéptido.

Luego de 2 minutos de hidrólisis de las mismas proteínas de agua de cola con *philibertaína g* (GH < 0,2 %) son degradadas notoriamente las proteínas de mayor PM (hasta 96,4 kDa), se mantiene prácticamente inalterada la de 66,3 kDa y comienza la degradación de la banda correspondiente a 40,9 kDa. Aparecen dos nuevas bandas de 38,5 y 32 kDa, respectivamente y se intensifican las de menor peso molecular (< 21,5 kDa). Luego de 180 minutos de hidrólisis (GH 3,8 %) se observan mayormente péptidos de bajo PM y vestigios de la banda correspondiente a 66,3 kDa.

Cabe mencionar que las muestras hidrolizadas (con alcalasa y philibertaína g) y las utilizadas como blanco o sin hidrolizar (*cf.* 18.5, M&M) presentaron un comportamiento funcional diferencial. Mientras las muestras “blanco” gelificaron a 4 °C, las hidrolizadas permanecieron líquidas a la

mencionada temperatura. Esta capacidad de formación de geles es debida al tratamiento térmico involucrado en el proceso de cocción de la materia prima durante la fabricación de harina de pescado.

En los sobrenadantes de las muestras hidrolizadas a los 180 min se utilizó la técnica de Bradford (*cf.* 5.1, M&M) para determinar la concentración proteica remanente. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 8.

Agua de Cola	Proteínas µg/ml
Sin tratamiento enzimático (blanco)	674 ± 5
Hidrolizada con philibertaína g	163 ± 4
Hidrolizada con alcalasa	86 ± 7

Tabla 8: Concentración de proteínas en los sobrenadantes de la muestra blanco y los dos tipos de hidrolizados obtenidos.

Los valores obtenidos para la concentración de proteínas en cada muestra se correlacionan con la disminución de la cantidad de proteínas solubles que pueden observarse en las electroforesis a medida que transcurre el tiempo de hidrólisis (Figura 22) y también con la pérdida de la propiedad de los hidrolizados de gelificar a bajas temperaturas. La concentración de proteínas es uno de los factores más importantes que determinan las características finales de un gel, y la mayoría de las proteínas exhiben una concentración mínima por debajo de la cual no gelifican (Pilosof, 2000). Es necesario destacar que los valores de la Tabla 8 corresponden a las proteínas presentes en los sobrenadantes luego de cada tratamiento y, como hemos dicho, han sido determinadas por Bradford, en tanto que la concentración de "proteínas" del agua de cola completa (Tabla 7) corresponde a la determinación por Kjeldahl donde se mide el N total (proteico y no proteico).

3.2. Ensayos de Coagulación de Leche

Con el objeto de tener un conocimiento preliminar acerca de la posibilidad de que philibertaína g pueda ser útil como cuajo vegetal o -en su defecto- como aditivo en la elaboración de quesos se realizaron ensayos de

coagulación de leche bovina (*cf.* 20, M&M) empleando esta preparación enzimática y comparándola con las de otras tres endopeptidasas aisladas en el LIPROVE. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 9 en la cual podemos observar que de las cuatro enzimas ensayadas a un mismo valor de actividad enzimática es philibertaína g la que presentó mayor actividad coagulante (1 CU); por su parte, la preparación obtenida del látex de *Asclepias fruticosa*, una especie de la misma tribu (*Asclepiadeae*), prácticamente no tuvo actividad coagulante (0,04 CU). En cuanto a las preparaciones enzimáticas obtenidas a partir de frutos de especies pertenecientes a la familia *Bromeliaceae*, han mostrado una capacidad similar entre ellas. Balansaína tuvo 0,41 CU en tanto que el valor obtenido para Hieronymaína fue de 0,29 CU.

Proteasa	Asclepaína f	Balansaína	Hieronymaína	Philibertaína g
Dilución del Extracto	1/3	1/3	1/12	1/7
Ucas/g proteína (relación E/S)	8,9	8,9	8,9	8,9
Tiempo de Coagulación (min)	27,3	2,4	3,5	1,0
Unidades Coagulantes *	0,04	0,41	0,29	1,00

Tabla 9. Capacidad coagulante de leche de cuatro endopeptidasas vegetales. *Corregida por el factor de dilución.

Si bien para producir quesos se usa habitualmente cuajo bovino, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevos coagulantes de la leche. Esto es debido al interés por obtener nuevos sabores en estos productos y, en algunos países, a principios religiosos y culturales. En la Península Ibérica se utilizan proteasas aspárticas de origen vegetal en la producción de quesos con características organolépticas particulares (Tavaria *et al.*, 1997; Fernández-Salguero & Sanjuán, 1999; Silva & Malcata, 1999), alguna de las cuales han sido clonadas (Faro *et al.*, 1999). Philibertaína g podría ser ensayada sobre leche bovina o, eventualmente, caprina y ovina para evaluar luego las características físicas y organolépticas del producto obtenido.

3.3. Hidrolizados Parciales de Caseínas de Leche Vacuna

Para obtener hidrolizados parciales de caseínas bovinas (*cfr.* 19, M&M) que pudieran aportar cambios favorables en las propiedades funcionales de los productos resultantes y ser empleados en la industria de alimentos, se analizó la acción de philibertaína g sobre dichas proteínas lácteas.

La caseína está formada por cuatro fracciones proteicas principales: α_{S1} , α_{S2} , β y κ , las que fueron hidrolizadas parcialmente por las proteasas presentes en el extractivo generando un patrón polipeptídico característico para cada tiempo de hidrólisis.

3.3.1. Análisis por SDS-Tricina-PAGE de los Péptidos Obtenidos

Para analizar los productos de hidrólisis de las caseínas de la leche (*cfr.* 19.3, M&M) por acción del extracto enzimático de *Philibertia gilliesii* se utilizó SDS-Tricina -PAGE de alta resolución (*cfr.* 22.4, M&M).

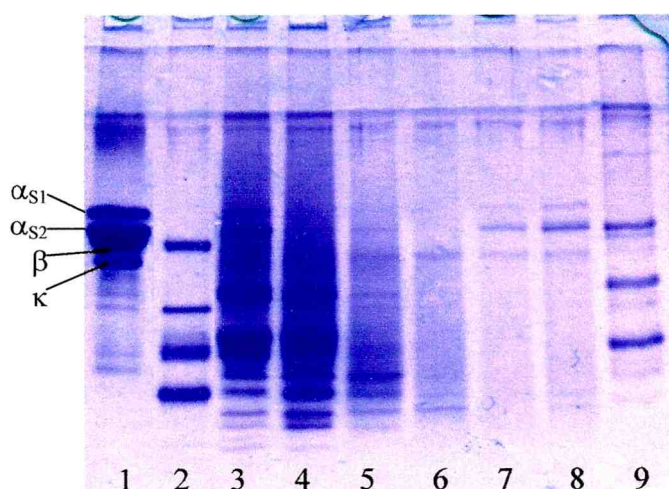


Figura 24. SDS-Tricina-PAGE de alta resolución de los hidrolizados de caseínas por philibertaína g. Calle 1: caseinato bovino, calle 2: patrones peptídicos (26,6; 17; 14 y 6,5 kDa), calles 3-8: hidrolizados de las muestras a 5, 10, 30, 60, 90 y 180 min, respectivamente y calle 9: patrones de bajo peso molecular (97,4; 66,2; 45; 31; 21,4 y 14,4 kD).

En la Figura 24 podemos observar los perfiles peptídicos obtenidos luego de la hidrólisis a diferentes tiempos.

Luego de los 5 minutos de iniciada la reacción de hidrólisis puede verse que las cuatro fracciones de caseína fueron parcialmente degradadas, apareciendo dos grupos de bandas de gran intensidad (17,5-18 kDa y 13,5-15 kDa), así como una serie de péptidos más pequeños (9,5; 6,5; 5 y 4 kDa).

A los 10 min la serie de péptidos de menor peso molecular se intensifican. A los 30 min la hidrólisis es casi completa, aunque aún pueden visualizarse las bandas de 9; 6,5; 5 y 4 kDa. A tiempos mayores la hidrólisis es prácticamente total.

En la Figura 25 se muestra el densitograma obtenido del análisis del gel de electroforesis realizado con los hidrolizados a diferentes tiempos.

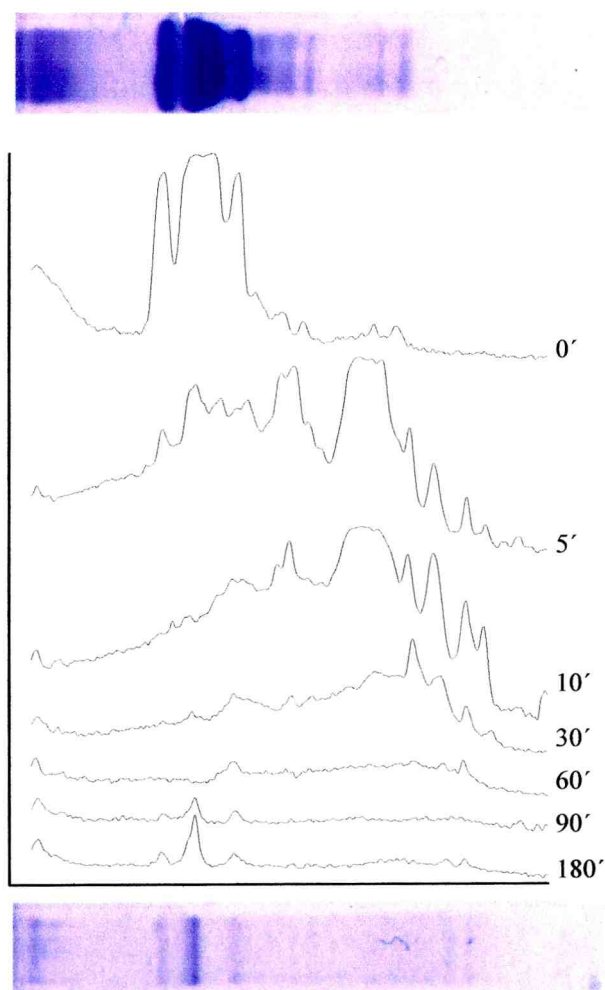


Figura 25. Densitograma obtenido a partir de datos de la electroforesis anterior. Hidrolizado de caseínas bovina con extracto clarificado de *Philibertia gilliesii*.

Los resultados obtenidos podrían ser útiles en diferentes aplicaciones que poseen los hidrolizados parciales de caseínas. Sabemos que la hidrólisis parcial de las proteínas cambia sus propiedades químicas, físicas, biológicas e inmunológicas. Una de las características de los hidrolizados es su alta absorción a nivel gastrointestinal en relación a la proteína completa, por lo que pueden utilizarse en dietas para pacientes con mala función gastrointestinal por reducción del área de absorción o por una capacidad digestiva reducida, en nutrición deportiva y para el control de peso (Frøkjær, 1994; Steinke *et al.*, 1992). Además, los hidrolizados proteicos con un adecuado grado de hidrólisis son útiles en el control de varios tipos de alergias alimenticias (Cordle, 1994), entre ellas la provocada por las caseínas de la leche, ya que al producirse la hidrólisis parcial desaparecen epitopes para IgE, dando lugar a un producto de alto valor nutricional e hipoalergénico (Benot López, 2000).

4. PURIFICACION DE ENDOPEPTIDASAS A PARTIR DE PHILIBERTAÍNA G

4.1. Precipitación Acetónica Fraccionada

Como primer paso de purificación de las endopeptidasas presentes en el extractivo enzimático proveniente del látex de *Philibertia gilliesii* (philibertaína g) se realizó una precipitación acetónica fraccionada (*cfr.* 21.1, M&M), cuyos resultados se grafican en la Figura 26. En ella puede observarse que al agregar 0,5 volúmenes de acetona precipitó un 20 % de las proteínas presentes, las que retuvieron apenas un 4,5 % de la actividad caseinolítica inicial. Por isoelectroenfoco pudo comprobarse que en esta etapa precipitan proteínas con diferentes valores de *pI*, aunque el mayor porcentaje de las mismas pertenecen a la zona correspondiente a valores de *pI* entre 8 y 9 (datos no mostrados). En cuanto a la recuperación de la actividad enzimática el valor máximo se obtiene empleando 3 volúmenes de acetona.

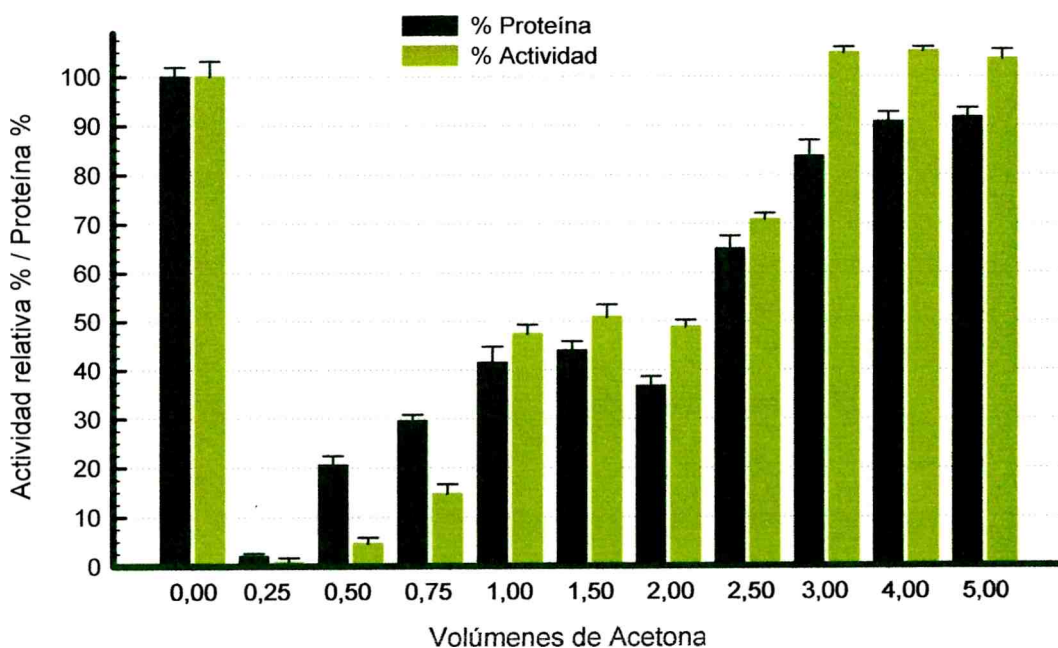


Figura 26. Precipitación acetónica fraccionada de philibertaína g.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores se optó por obtener la preparación enzimática parcialmente purificada (PEPP) mediante una primera precipitación de philibertaína g con medio volumen de acetona y una segunda

precipitación del sobrenadante obtenido empleando 3 volúmenes de acetona fría ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Este paso de purificación, además de permitir reducir la cantidad de proteínas inactivas, facilita la clarificación total de la preparación enzimática, obteniéndose una muestra adecuada para la purificación cromatográfica por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) y fue la muestra utilizada en todas las separaciones cromatográficas realizadas a partir de esta etapa.

4.2. Cromatografía de Intercambio Iónico

La estrategia de purificación de las endopeptidasas presentes en la PEPP proveniente del látex de *Philibertia gilliesii* se planificó en base a los resultados arrojados por isoelectroenfoque-zimograma. El perfil proteico obtenido fue prácticamente igual al mostrado en la Figura 19 A, revelando la presencia de al menos 7 fracciones proteicas de distinto *pI*. Dos de las fracciones presentan *pI* ácido y carecen de actividad proteolítica, aparecen fracciones minoritarias de *pI* cercano a la neutralidad que tampoco presentan actividad y se detectan al menos cuatro fracciones en la zona alcalina con intensa actividad proteolítica. Al realizar un IEF-zimograma en el rango de alto *pI* (*cf.* 2.3.11.3, Figura 19 B) se detectó que de estas últimas 4 fracciones con actividad proteolítica la de *pI* más bajo posee un valor comprendido entre 8,5 y 9, la segunda posee un valor de *pI* entre 9 y 9,3, la tercera se encuentra en la zona de *pI* de 9,3 a 10,25 y la última muestra un *pI* $> 10,25$. Con el objetivo de eliminar las fracciones ácidas e intentar la separación de las bandas alcalinas se seleccionó la cromatografía de intercambio catiónico como primer paso de purificación. Es de destacar que nos encontramos frente a una muestra inusualmente compleja considerando lo reportado en la bibliografía existente, incluyendo las diferentes proteasas de látex previamente estudiadas en el LIPROVE.

4.2.1. Selección de los Parámetros Cromatográficos

Dada la cercanía de los valores de *pI* de las fracciones activas visualizadas por IEF-zimograma, se realizaron una serie de cromatografías

tratando de optimizar la resolución de la técnica por medio del manejo de dos variables principales: el pH de corrida y el rango del gradiente salino.

Mediante una cromatografía de intercambio catiónico, empleando como relleno SP-Sepharosa Fast Flow equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM de pH 7,95 se inició la puesta a punto de la técnica (*cfr.* 21.2.1.1, M&M). Luego de sembrada la muestra se realizó un lavado con el buffer de partida para eliminar las proteínas no retenidas. Las proteínas retenidas fueron eluidas con un gradiente lineal de NaCl en el mismo buffer. En la primera etapa se varió la pendiente del gradiente, como se muestra en las Figuras 27 a 29.

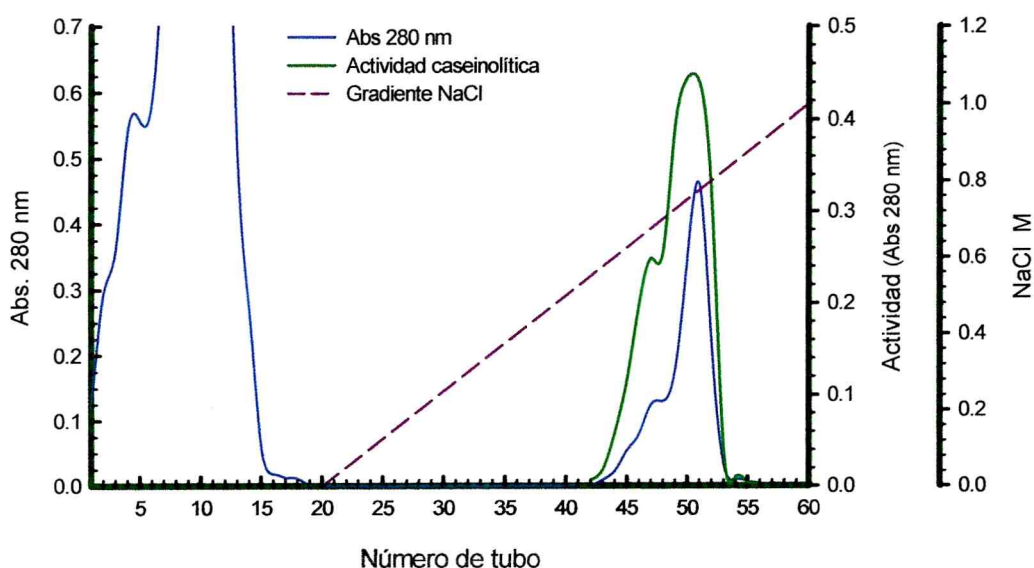


Figura 27. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Tris-HCl pH 7,95; gradiente de cloruro de sodio 0,0-1,0 M.

En el primer cromatograma (Figura 27) se observa la elución de una importante fracción no retenida prácticamente sin actividad caseinolítica durante el lavado. La presencia de una mezcla de proteínas proteolíticamente activas sólo se insinúa por la formación de hombros en las curvas de proteínas (absorbancia a 280 nm) y de actividad.

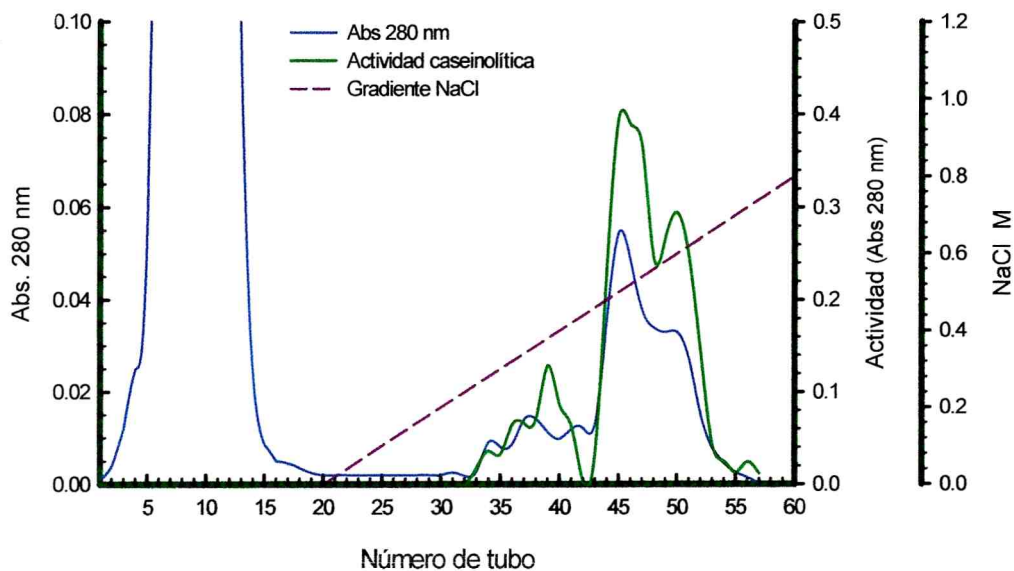


Figura 28. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Tris-HCl pH 7,95; gradiente de cloruro de sodio 0,0-0,8 M.

El segundo cromatograma (Figura 28) ya permite distinguir cinco fracciones con actividad proteolítica, número que se incrementa en el tercero de ellos (Figura 29).

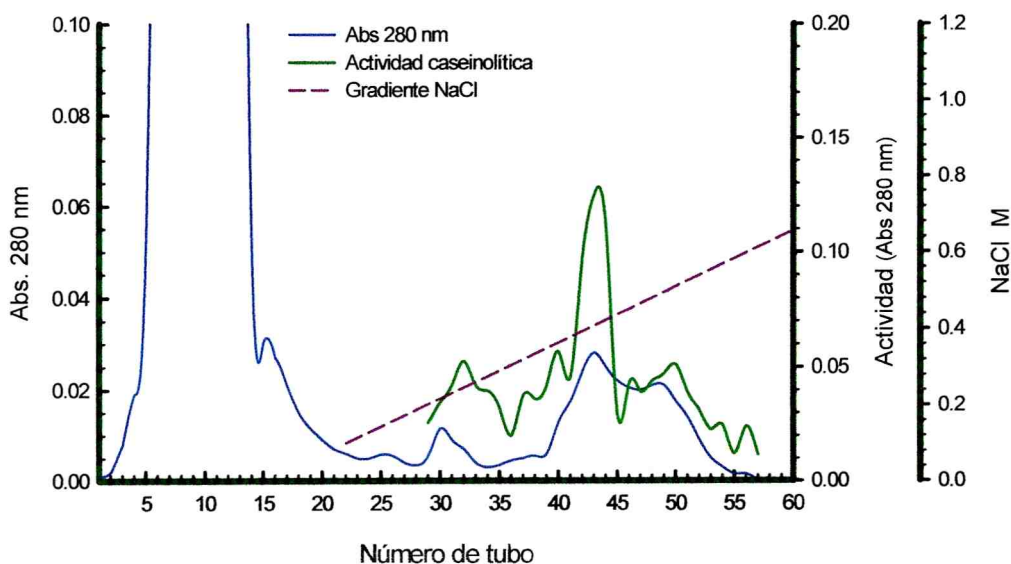


Figura 29. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Tris-HCl pH 7,95; gradiente de cloruro de sodio 0,1-0,7M.

Puede observarse claramente que a medida que se fue estrechando el gradiente salino (*cfr.* 21.2.1.2, M&M) se logró una mayor separación de los componentes de la mezcla en las sucesivas cromatografías.

Ante estos resultados y para lograr una mejor separación de los componentes activos de la muestra, se decidió realizar las cromatografías variando el pH en una unidad hacia valores más alcalinos (*cfr.* 21.2.1.3, M&M) con lo que se pudieron eluir más fácilmente las proteínas alcalinas dado que se encontraban más cerca de su *pI*.

El primer cromatograma de esta serie (no mostrado) se realizó empleando el mismo gradiente salino (0,1 – 0,7 M) para no modificar dos variables al mismo tiempo. La mejor resolución lograda con el buffer Tris-HCl 50 mM de pH 8,95 se muestra en la Figura 30; en dicha corrida se utilizó un programa que incluyó una primera etapa de elución isocrática con NaCl 0,1 M y una segunda consistente en un gradiente lineal de NaCl de 0,1 a 0,4 M.

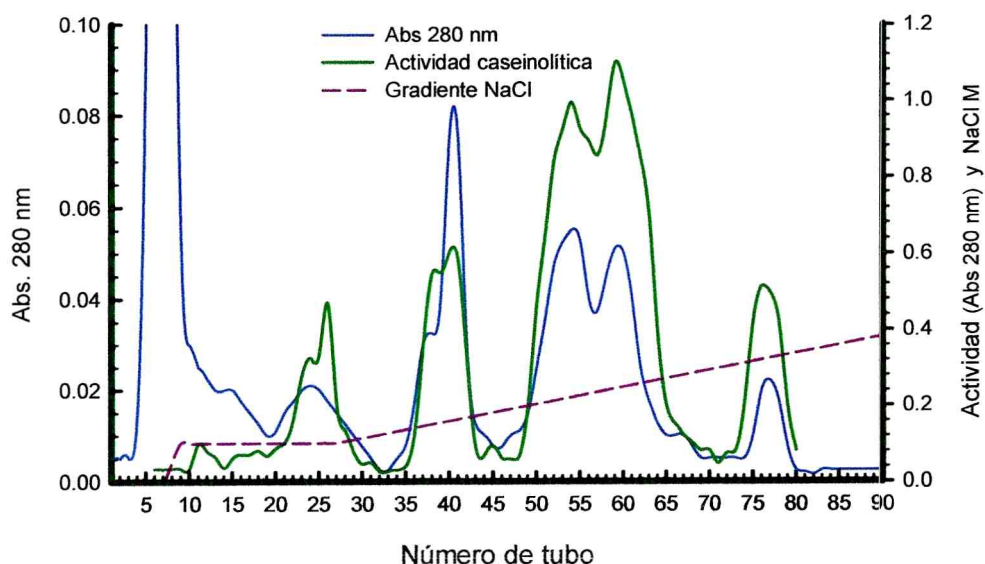


Figura 30. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Tris-HCl pH 8,95; elución isocrática con 0,1 M de NaCl y gradiente lineal de cloruro de sodio 0,1-0,4M.

Si bien se mejoró significativamente la resolución con el mencionado cambio de pH, el inconveniente observado con este sistema buffer (Tris-HCl 50 mM de pH 8,95) fue que al estar en el límite de su poder amortiguador el tiempo invertido en equilibrar la columna resultó muy extenso e implicó además un excesivo consumo de reactivos. Con el fin de superar este inconveniente se seleccionó como sistema buffer Glicina-NaOH 50 mM de pH 8,95 (*cf.* 21.2.1.4, M&M). Para comprobar si la variación de las especies del buffer producían alguna modificación en el perfil cromatográfico se realizó una nueva corrida con el nuevo buffer, pero manteniendo las mismas condiciones de gradiente y velocidad que las utilizadas para obtener el cromatograma de la Figura 30.

Como puede observarse en la Figura 31, el grado de conservación del perfil proteico fue bueno, por lo que mediante cambios sucesivos en la velocidad de flujo, el valor de pH y el gradiente de elución se pudo mejorar la separación de los componentes de esta muestra tan compleja. Las Figuras 32 a 34 ejemplifican algunas de las etapas del proceso (*cf.* 21.2.1.5, M&M).

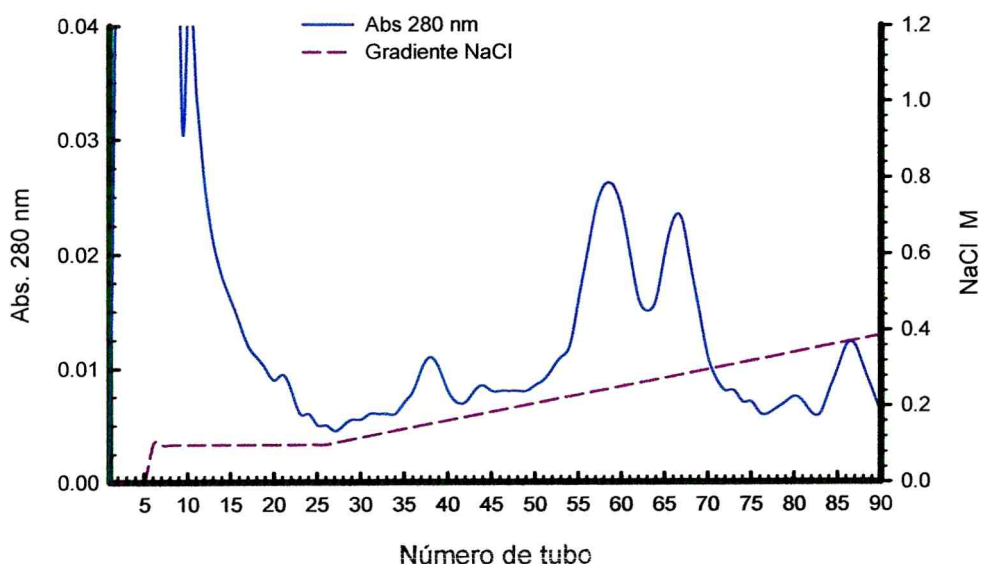


Figura 31. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Glicina-NaOH pH 8,95; elución isocrática con 0,1 M de NaCl y gradiente lineal de cloruro de sodio 0,1-0,4M.

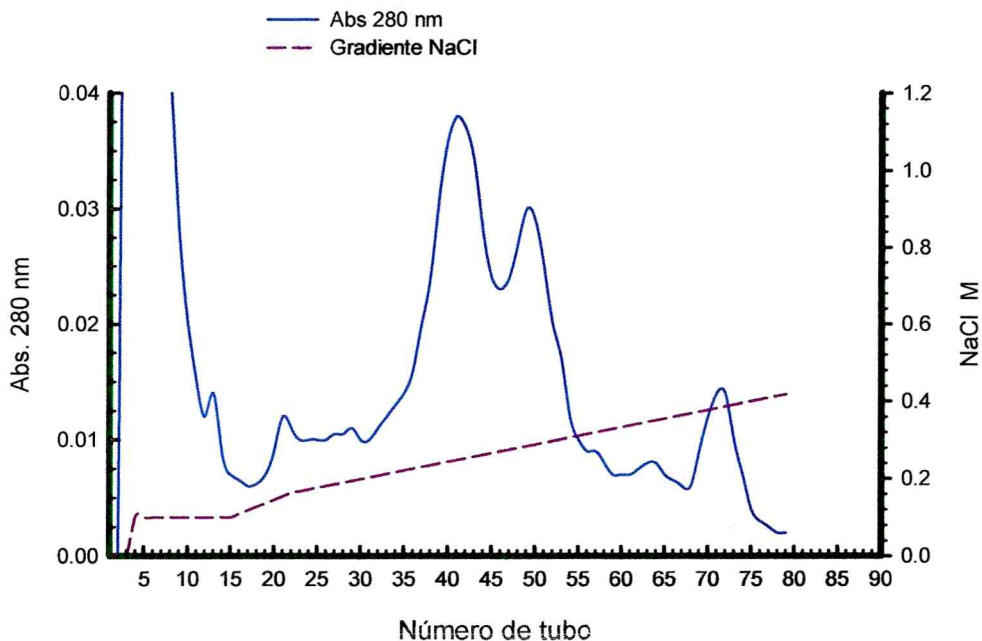


Figura 32. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Glicina-NaOH pH 8,95; elución isocrática con 0,1 M de NaCl al doble de velocidad de flujo y gradiente variable de cloruro de sodio entre 0,1-0,4M.

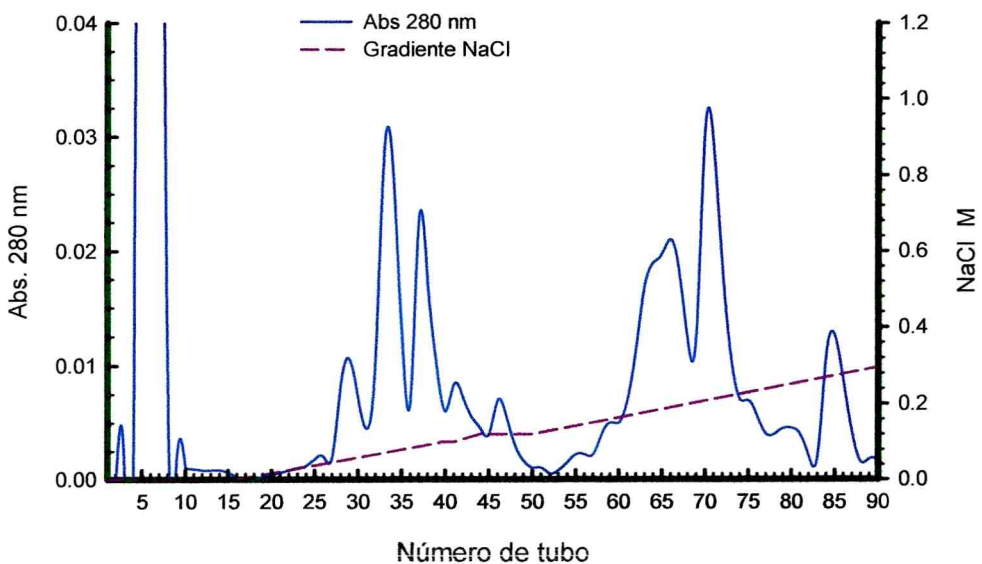


Figura 33. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Glicina-NaOH pH 8,64 y gradiente variable entre 0,1 y 0,4M.

4.2.2. Condiciones Cromatográficas Seleccionadas para la Purificación

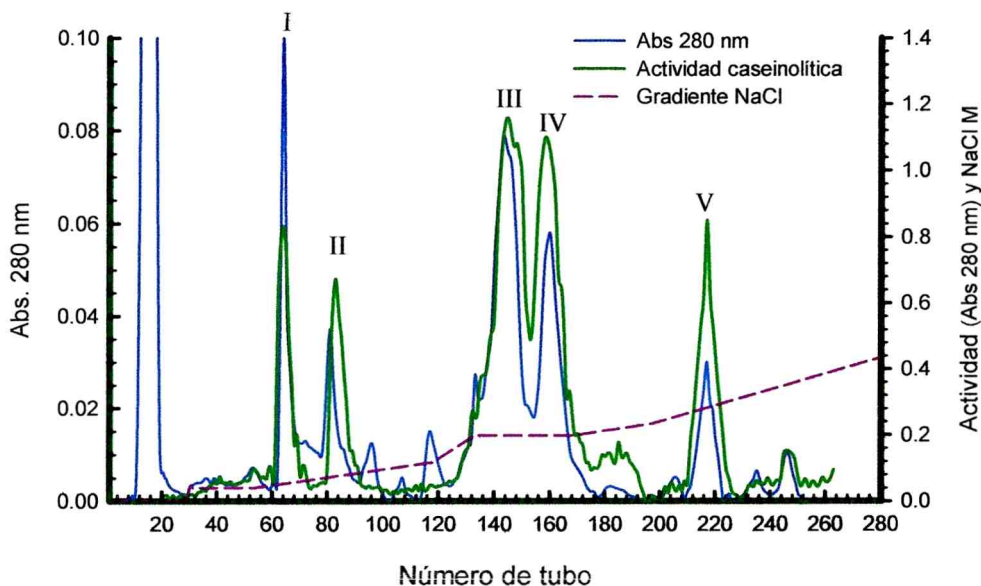


Figura 34. Cromatografía de intercambio catiónico. Buffer Glicina-NaOH pH 8,64 y gradiente variable 0,1-0,4M.

El cromatograma correspondiente a la mejor resolución lograda con este sistema se representa en la Figura 34. La elución de las diferentes fracciones se obtuvo aplicando un programa que incluyó seis condiciones diferentes de fuerza iónica (*cfr.* 21.2.1.5, M&M). El primer paso consistió en un lavado isocrático con NaCl 0,035 M. Luego se aplicó un gradiente de NaCl de 0,035 a 0,1 M, que permitió separar cuatro fracciones, de las cuales las dos con mayor concentración de proteínas presentaron actividad proteolítica. A continuación se aplicó un gradiente muy corto de 0,1 a 0,17 M de NaCl, seguido de una etapa isocrática con 0,17 M de NaCl; en este último paso eluyeron dos fracciones proteicas con actividad caseinolítica. Para finalizar, luego de un pequeño gradiente de 0,17 a 0,20 M, se cambió la pendiente (NaCl 0,20 a 0,35 M) y eluyó la fracción de mayor punto isoeléctrico que presentó interesante actividad proteolítica y buena actividad específica.

La fracción no retenida prácticamente no presentó actividad proteolítica en ninguna de las condiciones probadas.

El perfil proteico obtenido (Figura 34) muestra las cinco fracciones ya mencionadas, las que poseen importante actividad caseinolítica y que fueron denominadas I, II, III, IV y V. Las fracciones I y II eluyeron con el primer gradiente de NaCl. La fracción III se observa en el cromatograma como un pico ancho conteniendo un pequeño hombro, lo que estaría indicando la presencia de más de una proteína. Por su parte, las fracciones III y IV no se separan completamente a pesar de ser eluidas isocráticamente (0,17 M NaCl). La fracción más básica con actividad proteolítica (pico V) es eluida a una concentración de NaCl cercana a 0,3 M.

4.2.2.1. Análisis electroforético de las diferentes fracciones cromatográficas

La fracción no retenida y cada uno de los picos activos obtenidos de la cromatografía de intercambio catiónico fueron evaluados por electroforesis reductora y desnaturalizante (*cfr.* 22.3, M&M). El correspondiente electroforetograma se muestra en la Figura 35.

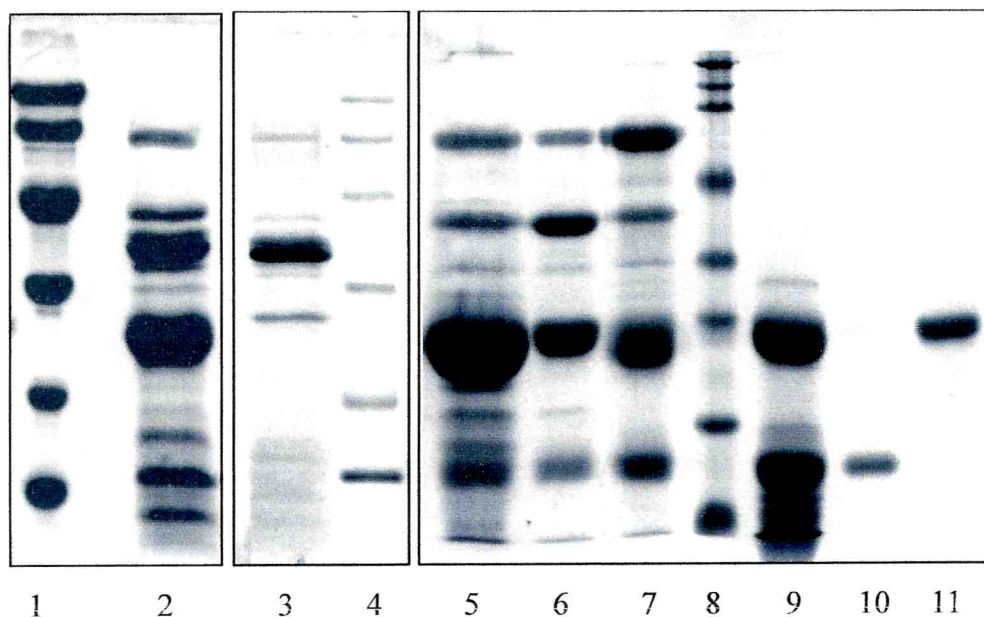


Figura 35. SDS-PAGE de las fracciones obtenidas por intercambio catiónico. Calles 1 y 4: patrones de bajo peso molecular (97,4; 66,2; 45,0; 31,0; 21,5 y 14,4 kDa), calle 2: PEPP, calle 3: fracción no retenida, calle 5: fracción I, calle 6: fracción II, calle 7: fracción III, calle 8: patrones de amplio rango de peso molecular (220, 120, 100, 55, 38, 29, 20 y 7 kDa), calle 9: fracción IV calle 10: muestra sin interés y calle 11: fracción V.

Podemos observar que la preparación enzimática parcialmente purificada (Figura 35, calle 2) conserva un perfil proteico equivalente al del extracto clarificado (*cf.* 1.3.1, Figura 1, R&D), con 5 bandas proteicas principales de peso molecular 65,5; 44,0; 37,6; 26,7; *ca.* 14 kDa, y péptidos menores a 14 kDa. La fracción no retenida (Figura 35, calle 3) se encuentra en menor concentración que la PEPP y conserva parte del perfil proteico de la misma, aunque fuertemente enriquecida en la banda de 37,6 kDa; es importante destacar que esta banda no se observa en ninguna de las restantes fracciones separadas por cromatografía y se comprobó por IEF (Figura 36, calle 2) que se trata de la proteína ácida presente en la PEPP.

Las fracciones I, II y III (Figura 35, calles 5, 6 y 7) tienen perfiles muy similares teniendo intensificadas diferentes bandas de acuerdo a la fracción analizada. Es interesante remarcar que las bandas de más alto peso molecular (65.5 y 44.0) eluyen constantemente a lo largo de la columna desde el no retenido hasta la fracción III y que recién en la fracción IV (Figura 35, calle 9) se observa la desaparición de estas proteínas de mayor peso molecular.

La única fracción que resultó homogénea por SDS-PAGE fue la recolectada en la fracción V (Figura 33, calle 11), a la que denominamos *philibertaina g I*.

Debemos destacar que en todas las fracciones analizadas (I a V) provenientes del cromatograma presentado en la Figura 34, hay una banda mayoritaria cuyo peso molecular se corresponde con el de las proteasas cisteínicas vegetales (*ca.* 25 kDa).

4.2.2.2. Análisis por IEF de las diferentes fracciones

El análisis por isoelectroenfoque (*cf.* 24, M&M) revela que en la fracción no retenida obtenida por cromatografía de intercambio catiónico eluye la proteína ácida de *pI* de 4,6 presente en la preparación enzimática parcialmente purificada de *Philibertia gilliesii* (PEPP), junto a una pequeña cantidad de proteínas de muy alto *pI* que migran al electrodo.

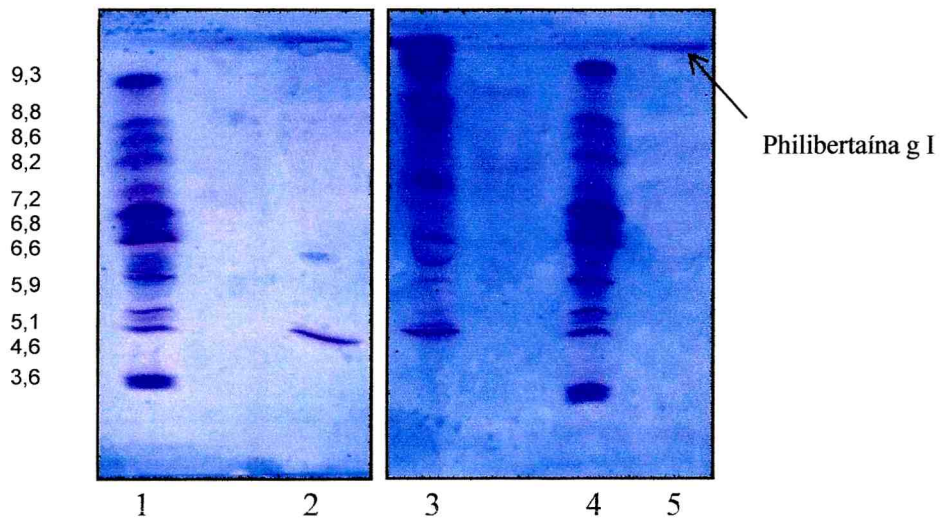


Figura 36. IEF de algunas fracciones obtenidas por intercambio catiónico.
 Calle 1 y 4: patrones de *pI*, calle 2: fracción no retenida, calle 3:
 PEPP y calle 5: fracción V.

El isoelectroenfoque de la fracción V muestra una única banda proteica que migra al electrodo negativo con un *pI* mayor a 9,3.

4.2.2.3. Esquema de Purificación de Philibertaína g I

El esquema de purificación de philibertaína g I es mostrado en la Tabla 10. La preparación enzimática parcialmente purificada obtenida del látex de frutos de *Philibertia gilliesii* retuvo el 95,4 % de su actividad proteolítica inicial y el 80 % del contenido de proteínas. El valor menor a 1 del factor de purificación (0,77 veces) que presenta philibertaína g I puede explicarse pues esta enzima es una fracción minoritaria entre las diferentes fracciones activas y presenta una actividad específica menor que la actividad específica total dada por el conjunto de las fracciones que restan purificar. Por su parte el valor de recuperación no es bajo dada la cantidad de fracciones proteolíticamente activas que posee el extracto enzimático de partida, de las cuales hemos purificado una fracción minoritaria. Nuestro interés en caracterizar esta fracción es que se trata de la peptidasa con el valor de *pI* más alcalino (superior a 10,25), valor poco frecuente en proteínas.

Etapas de Purificación	Actividad Proteínas (U _{cas.})	Proteínas (mg)	Actividad Específica (U _{cas./mg})	Purificación (n-veces)	Recuperación (%)
Extracto clarificado	25,02	3,66	6,84	1,00	100,0
PEPP	23,86	2,96	8,06	1,18	95,4
Philibertaína g I	1,26	0,24	5,28	0,77	5,0

Tabla 10. Purificación de philibertaína g I a partir del látex de *Philibertia gilliesii*.

4.3. Caracterización de Philibertaína g I

Para nombrar la nueva endopeptidasa purificada del látex de *Philibertia gilliesii*, philibertaína g I, se ha seguido el criterio de Greenberg & Winnick (1940) quienes recomiendan utilizar la terminación “ain” para las nuevas enzimas de origen vegetal habiéndose tenido en cuenta además la nomenclatura usual para proteasas provenientes de látex de la tribu *Asclepiadeae* (Priolo *et al.*, 2000).

Una de las características de la enzima purificada es su elevado carácter básico, propiedad que es observada en otras proteasas aisladas de látex como por ejemplo morrenaínas b I y b II, ambas con un valor de *pI* mayor a 9,3, purificadas del látex de *Morrenia brachystephana* (Arribére *et al.*, 1998; Vairo Cavalli *et al.*, 2003); morrenaína o II (*pI* > 9,3) del de *Morrenia odorata* (Vairo Cavalli *et al.*, 2001); araujaína h III (*pI* > 10,25) del de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.*, 2000; Obregón *et al.*, 2001); asclepaína f (*pI* > 9,3) del de *Asclepias fruticosa* L. (Trejo *et al.*, 2001); proceraina (*pI* 9,32) del de *Calotropis procera* (Kumar Dubey & Jagannadham, 2003); asclepaína c I (*pI* > 9,3) del de *Asclepias curassavica* L. (Liggieri *et al.*, 2004) y funastraína c II (*pI* > 9,3) del de *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.*, 2004). Todas las enzimas mencionadas fueron obtenidas a partir del látex de especies pertenecientes a la tribu *Asclepiadeae*.

4.3.1. Determinación de la Masa Molecular

La masa molecular de philibertaína g I fue de 25,6 kDa (Figura 37, A) estimada por la técnica electroforética de SDS-PAGE (*cf.* 22.3, M&M), mientras que el valor obtenido mediante la técnica de espectrometría de masas (MALDI-TOF) fue de 23.530 Da (Figura 37, B). Esta última técnica (*cf.* 29, M&M) no sólo permitió determinar con exactitud la masa de la enzima, sino que confirmó la pureza de philibertaína g I.

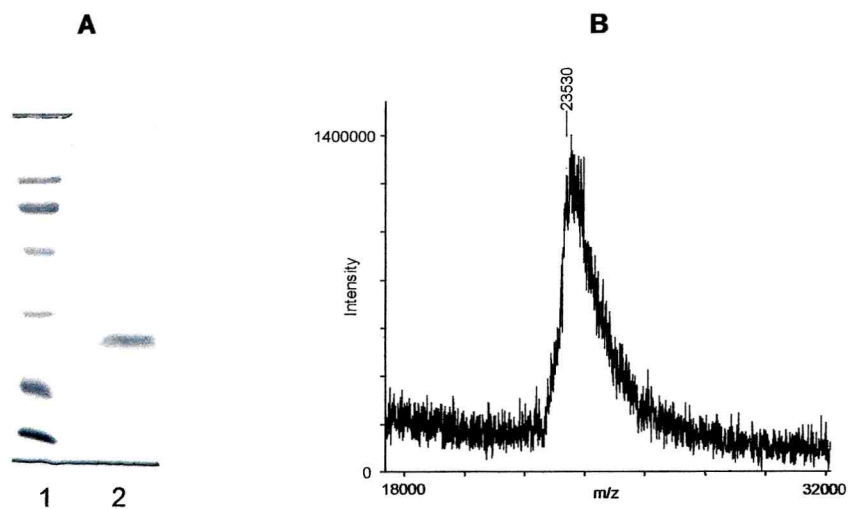


Figura 37. A) SDS-PAGE de philibertaína g I. Calle 1: patrones de peso molecular, calle 2: philibertaína g I. B) Espectro de masas de philibertaína g I (MALDI-TOF).

4.3.2. Determinación de la Secuencia del Péptido N-terminal

Se determinaron 23 residuos aminoacídicos de la secuencia N-terminal de philibertaína g I utilizando el método de Edman (*cf.* 30, M&M). La secuencia obtenida fue alineada con la de otras proteasas cisteínicas, mostrando más del 50 % de identidad con veinte peptidasas cisteínicas vegetales, tal como se muestra en la Tabla 11.

Philibertaína g I mostró un alto grado de identidad (73 %) con la proteinasa omega, una de las cisteínproteasas presentes en el látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y con proteasas presentes en *Arabidopsis thaliana*, *Zinnia elegans*, *Daucus carota* y *Brassica napus*.

Proteasa o especie vegetal	Secuencia N-terminal	Referencias	Identidad (%)
Philibertaina g I	LPASVDWRKEGAVLPRIHQGQCG	Sequeiros <i>et al.</i> , 2005	100
Papaya proteinasa omega	LPENVDWRKKGAVTPVRHQGSCG	Revell <i>et al.</i> , 1993	73
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LPTSDWRKNGAVTPVKNQGQCG	Sato <i>et al.</i> , 2000	73
<i>Zinnia elegans</i>	LPKSDWRKKGAVAPVKNQGQCG	Demura <i>et al.</i> , 2002	73
<i>Daucus carota</i>	LPSSVDWRKHGAVTPIKNQGRCC	Sakuta <i>et al.</i> , 2001	73
<i>Brassica napus</i>	LPIISVDWRKKGAVTPIKDNQGSCE	Wan <i>et al.</i> , 2002	73
Asclepaina c I	LPNSVDWRQKGVVFPVIRDNQKCC	Liggieri <i>et al.</i> , 2004	69
<i>Daucus carota</i>	VPATMDWRKKGAVTPIKNQGQCG	Mitsubishi <i>et al.</i> , 2004	69
<i>Vigna mungo</i>	VPASVDWRKKGAVTDVKDNQGQCG	Akasofu <i>et al.</i> , 1990	69
<i>Ricinus communis</i>	VPASVDWRKKGAVTSVKDNQGQCG	Schmid <i>et al.</i> , 1998	69
Araujaina h III	LPESVDWRKKNLVFPVRNQGQCG	Obregón <i>et al.</i> , 2001	69
Papaya proteinasa IV	LPESVDWRKAGAVTPVKHQGYC-	Taylor <i>et al.</i> , 1995	68
Asclepaina f	LPDSVDWREKGVVFPVIRNQGK--	Trejo <i>et al.</i> , 2001	66
Araujaina h II	VPDSIDWREKDA-LPIRNQGQCG	Obregón <i>et al.</i> , 2001	65
<i>Trifolium repens</i>	IPSTVDWRKKGAVTPVKNQGQCG	Asp <i>et al.</i> , 2004	65
<i>Medicago truncatula</i>	VPSTVDWRKKGAVTPVKNQGQCG	Liu <i>et al.</i> , 2003	65
Funastraina c II	LPNSVDWRQKGVVSAIRNQGKCC	Morcelle <i>et al.</i> , 2004	65
<i>Astragalus sinicus</i>	VPSNVDWRQKGVVFPVIRNQGQCG	Naito <i>et al.</i> , 2000	60
Morrenaina b II	LPDSVDWRKKNLVFPVRNQGKCC	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001	60
Ervatamina b	LPSEVDWRKSGAVNSIKNQKQCC	Biswas <i>et al.</i> , 2003	60
Ervatamina c	LPEQIDWRKXGAVTPVWNQGW	Sundd <i>et al.</i> , 1998	57
Morrenaina b I	VPDKIDYREKGAFLDIRNQGQDC	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2003	56

Tabla 11. Determinación del grado de identidad de la secuencia N-terminal de philibertaina g I con las de otras endopeptidasas cisteínicas vegetales. Los residuos idénticos hallados para cada proteasa con respecto a philibertaina g I están remarcados en color verde.

Comparando la secuencia N-terminal de la enzima purificada con las de las proteasas pertenecientes a la misma familia (*Apocynaceae*) se obtuvieron

los siguientes valores de identidad: asclepaína c I y araujaína h III (69 %), asclepaína f (66 %), araujaína h II y funastraína c II (65 %), morrenaína b II y ervatamina b (60 %), ervatamina c (57 %) y morrenaína b I (56 %). Se encontraron algunas secuencias altamente conservadas como el residuo “P” en la posición 2 que está presente en todas las secuencias analizadas, el motivo VDWR que se encuentra en un 80 % de los casos y el motivo QG que está ausente solamente en ervatamina b.

La posición 19 de la secuencia N-terminal de philibertaína g I está ocupada por un residuo de Gln, el que participa en la catálisis de la hidrólisis de la unión peptídica estabilizando al oxianión del intermediario tetraédrico (Barret *et al.*, 2004). El residuo de Cys en la posición 22, conservado en casi todas las secuencias comparadas, generalmente se encuentra formando un puente disulfuro con un residuo de Cys más interno, lo que ayuda a estabilizar la estructura tridimensional de la enzima.

4.3.3. Efecto de la Concentración Salina sobre la Actividad Enzimática

El extracto clarificado de *Philibertia gilliesii* -philibertaína g- presentó una actividad residual del 85,2 % en presencia de NaCl 0,3 M, como se mostró en la Tabla 5 (*cfr.* 2.3.9, R&D), en tanto que la fracción purificada -philibertaína g I- presentó una actividad residual del 50 % en las mismas condiciones, lo que demuestra una mayor sensibilidad a esta sal. El valor de la concentración salina utilizado en este ensayo es el mismo que el que está presente al ser eluída la enzima en la cromatografía de intercambio iónico, lo que obliga a desalar la fracción purificada (*cfr.* 27, M&M) si se desea lograr su máxima actividad luego de la elución.

4.3.4. Perfil de pH

4.3.4.1. Utilizando caseína como sustrato

En la Figura 38 se muestra el perfil de pH de la enzima purificada actuando sobre caseína como sustrato natural (*cfr.* 6.1, M&M).

Puede observarse que el pH óptimo fue de aproximadamente 7,6, conservando más del 80 % de su actividad máxima en el rango de pH 6,7 a 8,7 y al menos el 50 % de dicha actividad entre los valores de pH 6,1 y 9,8.

Los datos obtenidos nos confirman que philibertaína g I contribuye al primer pico del perfil de pH obtenido para el extracto clarificado de *Philibertia gilliesii*, el cual presentó dos máximos tal como se observa en la Figura 13 (cfr. 2.3.6.1).

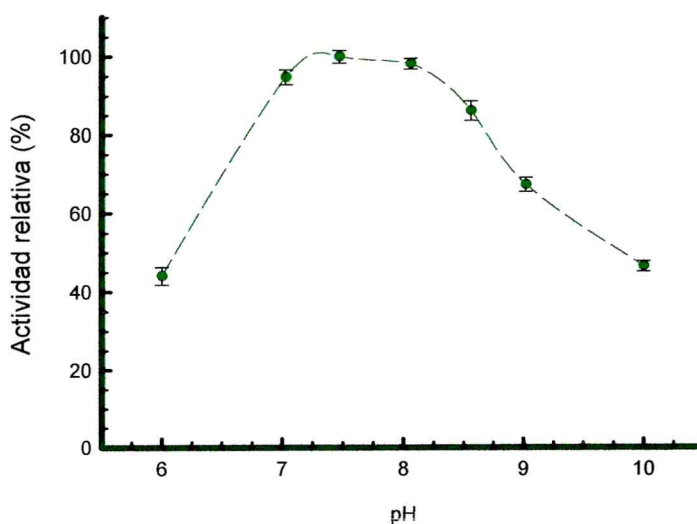


Figura 38. Perfil de pH sobre la actividad proteolítica de philibertaína g I con caseína como sustrato.

4.3.4.2. Utilizando PFLNA como sustrato

El perfil de pH de philibertaína g I frente al sustrato sintético PFLNA (cfr. 7.2, M&M) está representado en la Figura 39.

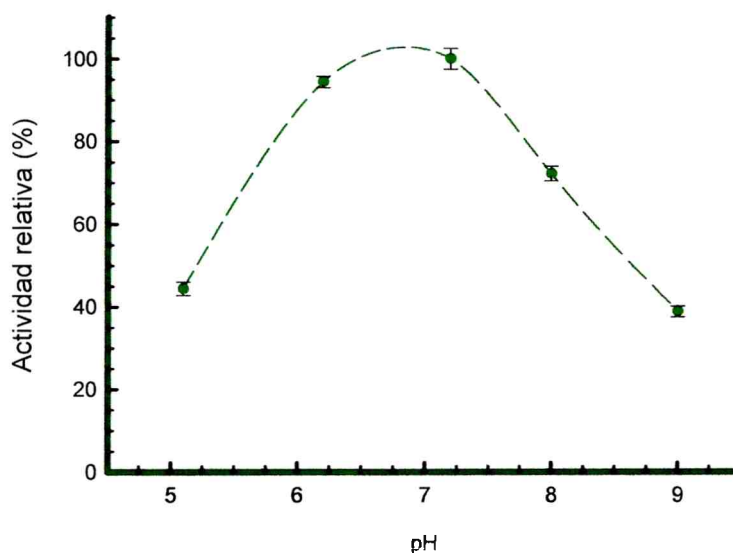


Figura 39. Perfil de pH sobre la actividad amidolítica de philibertaína g I con PFLNA como sustrato.

Frente a este sustrato el pH óptimo fue de 6,8, con más del 80 % de su actividad máxima en el rango de pH 5,8 a 7,8 y al menos el 50 % de la mencionada actividad entre los valores de pH 5,2 y 8,6.

El pH óptimo sobre PFLNA es muy cercano a aquéllos obtenidos para otras proteasas tales como papaína, bromelaína y funastraína c II (Filippova *et al.*, 1984; Morcelle *et al.*, 2004b).

4.3.4.3. Determinación de parámetros cinéticos sobre el sustrato sintético PFLNA

El sustrato cromogénico PFLNA, específico para proteasas de la familia de la papaína (Filippova *et al.*, 1984), fue empleado para determinar la constante de Michaelis de philibertaína g I (*cfr.* 7.2, M&M).

A partir de la medición de las velocidades iniciales (V_0) de la reacción de hidrólisis para diferentes concentraciones de PFLNA y utilizando el programa SigmaPlot v8.0 se realizaron los cálculos de regresión no lineal de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten que permitió obtener las constantes cinéticas de philibertaína g I.

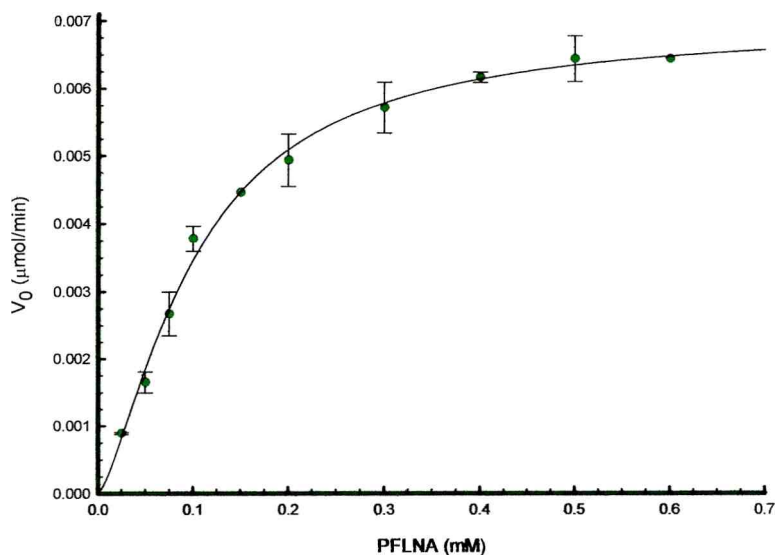


Figura 40. Velocidad inicial versus concentración de sustrato de la hidrólisis enzimática de PFLNA por philibertaína g I.

En la Figura 40 se observan los valores de la velocidad inicial de hidrólisis a diferentes concentraciones de PFLNA. Los valores de los parámetros calculados para dicho sustrato fueron: $K_m = 0,15 \pm 0,01$ mM y $V_{max} = 0,0086 \pm 0,0003$ μmol/min.

El valor de K_m hallado para philibertaína g I fue comparado con los obtenidos por Filippova *et al.* (1984) para papaína, ficina y bromelaína (0,34 mM; 0,43 mM y 0,3 mM, respectivamente) resultando ser prácticamente la mitad de estos valores, por lo que su afinidad por PFLNA es dos veces mayor.

4.3.4.4. Efecto de inhibidores

La Tabla 12 muestra la actividad residual de la enzima purificada, empleando PFLNA como sustrato, luego de ser inhibida (*cfr.* 10.2, M&M) con los siguientes inhibidores específicos de grupo: E-64 (inhibidor de proteasas cisteínicas), pepstatina A (inhibidor de proteasas aspárticas), 1,10-fenantrolina (inhibidor de metaloproteinasas) y PMSF (inhibidor proteasas serínicas).

Inhibidores	Concentración	Actividad Residual (%)
Control	-	100,0
PMSF	1 mM	95,0
E-64	100 μ M	0,0
Pepstatina A	1 μ M	95,0
1,10-fenantrolina	10 mM	93,3

Tabla 12. Efecto de inhibidores específicos de clase sobre la actividad amidolítica de philibertaína g I.

La actividad enzimática fue completamente inhibida por E-64, confirmando que philibertaína g I pertenece al grupo catalítico de las endopeptidasas cisteínicas, lo que caracteriza a todas las proteasas purificadas hasta el momento a partir del látex de especies pertenecientes a la tribu *Asclepiadeae*.

4.4. Purificación de Philibertaína g II

Luego de realizar el análisis de los perfiles electroforéticos obtenidos por SDS-PAGE de las fracciones separadas por cromatografía de intercambio catiónico, observamos que en las fracciones I a III coeluyen junto a la banda principal -de peso molecular esperado para proteasas cisteínicas (*ca.* 25 KDa)- polipéptidos de mayor y menor peso molecular. La fracción IV sólo contiene la banda principal de *ca.* 25 KDa junto a polipéptidos de menor PM y, como ya ha sido mencionado, sólo la fracción V está constituida por una proteína pura con actividad endopeptidásica a la que denominamos philibertaína g I y hemos caracterizado bioquímica y estructuralmente (*cfr.* 4.3).

El análisis anterior nos permite plantear la hipótesis de la existencia de fuertes interacciones inespecíficas entre las proteínas presentes en la muestra sembrada, las que van desapareciendo al incrementarse la fuerza iónica a lo largo de la cromatografía. Este tipo de interacciones no han sido halladas descriptas en la bibliografía, ni habían sido observadas previamente en nuestro laboratorio.

Con el fin de separar por tamaño los constituyentes de la muestra que fuera analizada por cromatografía de intercambio catiónico (PEPP) se recurrió a la cromatografía de exclusión molecular, técnica que permite aislar componentes de diferente masa gracias al mayor retardo de las moléculas más pequeñas dentro del gel.

4.4.1. Cromatografía de Exclusión Molecular a Baja Fuerza Iónica

La PEPP, inhibida con tetrionato de sodio, fue filtrada y luego sembrada en una columna rellena con Sephacryl S-100 (*cfr.* 21.3, M&M). El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 41.

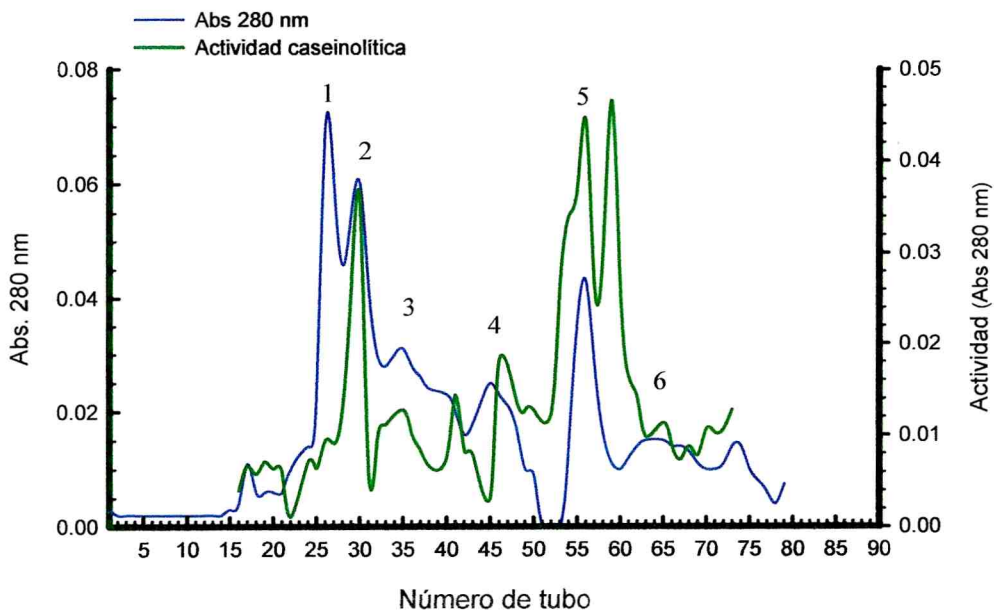


Figura 41. Cromatografía de exclusión molecular. Sephacryl S-100. Buffer Gly-NaOH 50 mM pH 8,6, conteniendo tetrionato de sodio 5mM.

Al analizar el cromatograma obtenido vemos que, aunque presenta dos zonas con mayor actividad proteolítica (picos 2 y 5) se observa una salida continua de proteína activa a lo largo de todo el cromatograma, desde la zona correspondiente a los mayores valores de PM hasta la que corresponde a los valores más bajos. Para conocer la composición polipeptídica de los eluatos se los dividió en seis fracciones, las que fueron analizadas por electroforesis.

4.4.1.1. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas

Se realizó una electroforesis desnaturalizante y reductora en geles de poliacrilamida (*cfr.* 22.3, M&M) de las seis fracciones antes mencionadas. La Figura 42 muestra los resultados obtenidos.

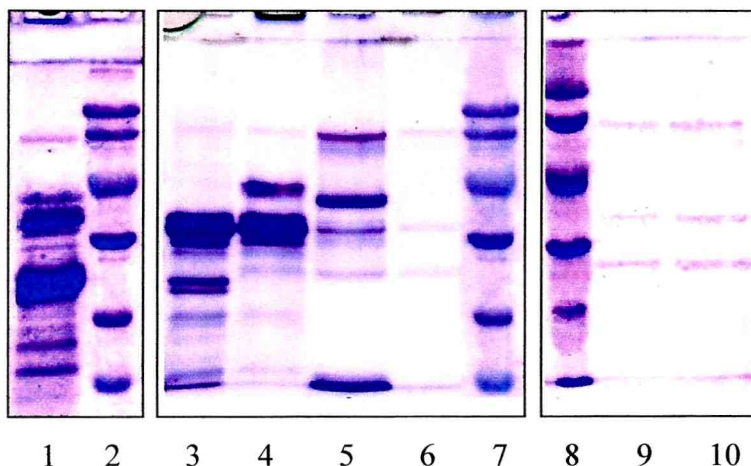


Figura 42. SDS-PAGE de las fracciones recolectadas en la cromatografía de exclusión molecular. Calle 1: PEPP, calles 2, 7 y 8: patrones de bajo peso molecular (97,4; 66,2; 45,0; 31,0; 21,5 y 14,4 kDa), calle 3: fracción 1, calle 4: fracción 2, calle 5: fracción 3, calle 6: fracción 4, calle 9: fracción 5 y calle 10: fracción 6.

Como puede observarse en la Figura 42, el perfil proteico de la fracción 1, que corresponde al primer pico con elevada concentración proteica, está fuertemente enriquecido por bandas de pesos moleculares cercanos a 37 kDa, en menor medida aparecen dos bandas de 25 y 26 kDa y luego polipéptidos de entre 20 y 14 kDa. La fracción 2 sigue presentando las bandas de mayor intensidad de PM cercano a 37 kDa, aunque aparece una banda notoria de aproximadamente 44 kDa, además de una banda tenue de 28 kDa que luego se observa en las restantes fracciones; desaparecen las bandas de 26 y 25 kDa y se observan algunos polipéptidos de menor PM en baja concentración. El perfil de la fracción 3 cambia considerablemente, estando formado por bandas nuevas de pesos moleculares cercanos a 66 kDa, 40 kDa y 14 kDa y se mantienen una banda delgada de 37 kDa y una tenue de 28 kDa. Los perfiles de las fracciones 4, 5 y 6 son similares entre ellos y constan fundamentalmente de 3 bandas de 66, 37 y 28 kDa cada una.

Considerando que en la primera fracción debían eluir las proteínas de mayor tamaño, que en casi todas las fracciones eluyen proteínas de 66 kDa junto a proteínas de 37, 28 y 14 kDa -cuando debían aparecer proteínas de PM decreciente en cada una de las fracciones- y teniendo en cuenta el análisis realizado por SDS-PAGE (*cf.* 4.2.2.1, Figura 35) de las fracciones recolectadas en la cromatografía de intercambio iónico, resulta reforzada la hipótesis de la existencia de una importante interacción inespecífica entre las proteínas presentes dentro de la preparación enzimática parcialmente purificada.

En base a los resultados expuestos se decidió realizar una segunda cromatografía de exclusión, empleando la misma muestra aunque disuelta en buffer conteniendo NaCl 0,3 M y manteniendo la concentración salina constante a lo largo de toda la corrida.

4.4.2. Cromatografía de Exclusión Molecular con NaCl 0,3 M

La muestra (PEPP) fue preparada empleando la misma cantidad de philibertaína g e idéntico procedimiento que el empleado para preparar la de la cromatografía del ítem 4.4.1, aunque conteniendo 0,3 M de NaCl en el buffer (*cf.* 21.3.2, M&M). El aspecto transparente de dicha muestra fue muy diferente al obtenido con baja fuerza iónica y el aumento en la absorbancia a 280 nm observado durante la corrida cromatográfica se corresponde con la mejor solubilización de proteínas en estas condiciones, lo que redundó en un aumento en la cantidad total de proteínas solubles en la muestra sembrada y en un notable incremento en la actividad enzimática, como se observa en la Figura 43.

El análisis del cromatograma en las nuevas condiciones de fuerza iónica nos muestra un cambio importante en el perfil de proteico. Por su parte, el cambio en el perfil de actividad caseinolítica es notable ya que en este último caso la actividad enzimática se concentra casi completamente en dos picos cercanos, a diferencia del cromatograma anterior donde hallamos actividad enzimática a lo largo de toda la corrida cromatográfica.

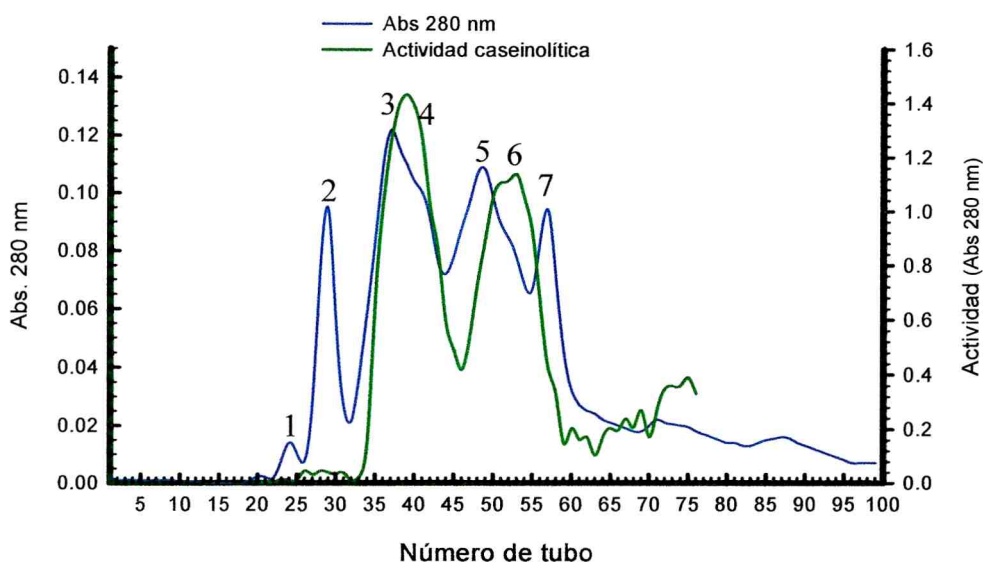


Figura 43. Cromatografía de exclusión molecular con 0,3 M NaCl. Sephacryl S-100, equilibrada y corrida con buffer Gly-NaOH 50 mM pH 8,6 conteniendo tetratratonato de sodio 5mM y NaCl 0,3 M.

Al igual que en 4.4.1, se dividieron los eluatos en siete fracciones con el objeto de conocer su composición polipeptídica por medio de electroforesis.

4.4.2.1. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones obtenidas

El análisis de cada una de las fracciones recolectadas a la salida de la cromatografía se realizó mediante electroforesis reductora y desnaturizante en geles de poliacrilamida (*cfr.* 22.3, M&M).

Los resultados presentados en la Figura 44 revelan que en este caso en la primera fracción recolectada (fracción 1) se concentra la banda de 66 kDa, sin la presencia de bandas de bajo peso molecular. En la siguiente fracción (fracción 2) hay una pequeña proporción del polipéptido de 66 kDa y aparece una banda de 37 kDa. En la fracción 3 permanece la banda de 37 kDa y aparecen dos bandas nuevas, una de 44 kDa y otra ancha de gran intensidad de aproximadamente 28 kDa, calculados en el centro de la banda. La fracción 4 pertenece al hombro del tercer pico del cromatograma y presenta la banda de 28 kDa de gran intensidad, presente en la fracción anterior, aunque aparecen varias bandas intensas de menor tamaño, una bien definida debajo de la anterior y una serie de bandas de peso molecular menor a 19 kDa.

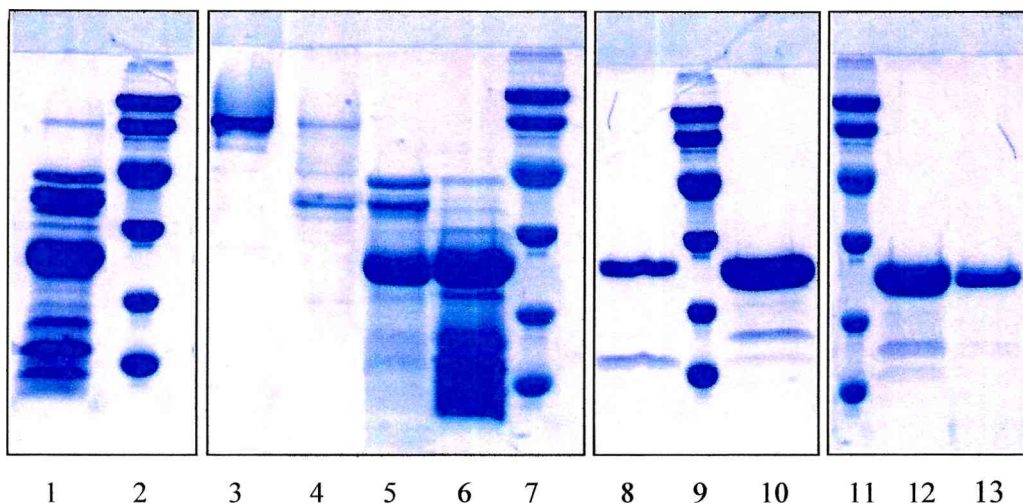


Figura 44. SDS-Page de las fracciones recolectadas de la cromatografía de exclusión molecular con 0,3 M NaCl. Calle 1: PEPP, calles 2, 7, 9 y 11: patrones de bajo peso molecular (97,4; 66,2; 45,0; 31,0; 21,5 y 14,4 kDa), calle 3: fracción 1, calle 4: fracción 2, calle 5: fracción 3, calle 6: fracción 4, calle 8: fracción 5, calles 10 y 12: fracción 6 y calle 13: fracción 7.

La fracción 5 está constituida por un único polipéptido importante de 27,5 kDa, acompañado por algunas bandas tenues de bajo PM; esta fracción es parte del segundo pico con actividad caseinolítica. La fracción 6 también está constituida por un único polipéptido que forma una ancha banda por su elevada concentración, con una muy pequeña impureza de menor PM; esta fracción corresponde a la zona de mayor actividad enzimática del segundo pico de actividad. Por su parte, la fracción 7 se muestra homogénea conteniendo un polipéptido de 26,5 kDa.

Si comparamos los perfiles electroforéticos de las fracciones recolectadas en ambas cromatografías, en ausencia y presencia de NaCl 0,3 M, podemos apreciar que el aumento de la fuerza iónica cambia radicalmente dichos perfiles. A baja fuerza iónica proteínas de bajo peso molecular estarían formando agregados proteicos que superan largamente el PM de los mayores polipéptidos presentes en la muestra (65,5 kDa) y eluyen al principio de la cromatografía. Por su parte, en las fracciones recolectadas durante la cromatografía realizada a mayor fuerza iónica eluyen en primer término las proteínas de alto PM, seguidas por las de PM más bajo. De todos modos se presenta una zona de tamaño intermedio donde puede advertirse la presencia de agregados remanentes. De este modo se confirma la existencia de interacción

inespecífica entre los distintos polipéptidos presentes en la PEPP, la que puede ser reducida mediante el incremento de la fuerza iónica.

En un trabajo posterior debería incrementarse más aún la fuerza iónica, recolectar los polipéptidos del tamaño esperado para endopeptidasas cisteínicas y purificar las diferentes enzimas presentes en esta compleja muestra por cromatografía de intercambio iónico.

De todos modos, el empleo de la técnica de exclusión molecular en presencia de NaCl 0,3 M nos permitió aislar una fracción con actividad proteolítica que luego de ser ultrafiltrada (*cf.* 27, M&M) para eliminar péptidos de bajo PM y sales, resultó pura por IEF y MALDI-TOF. La nueva enzima purificada fue denominada *philibertaina g II*.

4.4.3. Caracterización de Philibertaina g II

4.4.3.1. Isoelectroenfoque y zimograma

La fracción 6 ultrafiltrada fue analizada mediante isoelectroenfoque-zimograma (*cf.* 24 y 25, M&M) con el objeto de conocer su *pI* y verificar su homogeneidad (Figura 45).

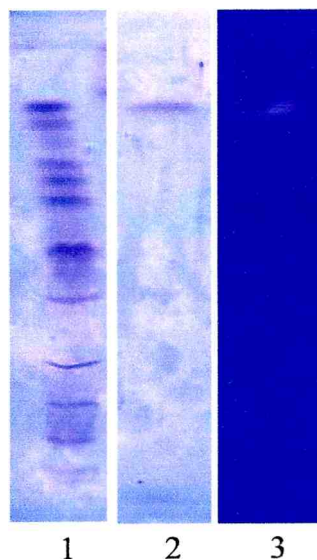


Figura 45. IEF – zimograma de philibertaina g II. Calle 1: patrones de *pI* (9,3; 8,65; 8,45; 8,15; 7,35; 6,85; 6,55; 5,85; 5,20; 4,55 y 3,5), calle 2: fracción 6 purificada, calle 3: zimograma de la fracción 6 ultrafiltrada.

En la figura podemos ver que philibertaína g II resultó proteolíticamente activa y homogénea por isoelectroenfoque y que posee un valor de punto isoeléctrico de 9,4.

4.4.3.2. Secuencia N-terminal

La secuencia de los primeros 19 residuos aminoacídicos pertenecientes al extremo N-terminal de philibertaína g II fue determinada utilizando el método de Edman (*cf.* 30, M&M). En la Tabla 13 se muestra dicha secuencia

Proteasa	Secuencia N-terminal	Identidad (%)	Referencias
Philibertaína g II	LPE SVDWREKGVVFPXRNQ	100,0 (19/19)	
Asclepaína f	LPD SVDWREKGVVFP I RNQ	89,5 (17/19)	Trejo <i>et al.</i> , 2001
Ervatamin a	LPEHVDWRAK-----	80,0 (8/10)	Nallamsetty <i>et al.</i> , 2003
Araujiaína h III	LPESVDWRKKNL VFPVRNQ	78,9 (15/19)	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Asclepaína c I	LPNSVDWRQKGVVFP I RDQ	78,9 (15/19)	Liggieri <i>et al.</i> , 2004
Asclepaína c II	LPSEVDWRQKGVVFP I RNQ	78,9 (15/19)	Comunicación personal
Funastraína c II	LPNSVDWRQKGVVSAI RNQ	73,7 (14/19)	Morcelle <i>et al.</i> , 2004b
Morrenaína o II	LPD SVDWRKKNL VFPVRNQ	73,7 (14/19)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001
Morrenaína b II	LPD SVDWRKKNL VFPVRNQ	73,7 (14/19)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2001
Asclepaína b	LPNEVDWRKNGVVFP I RNQ	73,7 (14/19)	Lynn <i>et al.</i> , 1980
Asclepaína a	LPNSIDWRQKNVVFPIKNQ	68,4 (13/19)	Lynn <i>et al.</i> , 1980
Araujiaína-h II	VPDSIDWREKDAVLP I RNQ	63,2 (12/19)	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Papaína	IPEYVDWRQKGA VTPVK NQ	63,2 (12/19)	Drenth <i>et al.</i> , 1968
Philibertaína g I	LPASVDWRKEGAVLP I RHQ	63,2 (12/19)	Sequeiros <i>et al.</i> , 2005
Ervatamin c	LPEQIDWRKKGAVTPVWNQ	63,1 (12/19)	Thakurta <i>et al.</i> , 2004
Ervatamin b	LPSEVDWRSKGA VNSIKNQ	57,9 (11/19)	Biswas <i>et al.</i> , 2003
Heynain	LPEQIDXRXXGAVNP-----	53,3 (8/15)	Patel & Jagannadham, 2003
Morrenaína b I	VPDKIDYREKGA VLDI RNQ	52,6 (10/19)	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2003

Tabla 13. Determinación del grado de identidad de la secuencia N-terminal de philibertaína g II con el de otras endopeptidasas cisteínicas pertenecientes a la familia Apocynaceae, y con el de papaína. Los residuos idénticos hallados para cada proteasa con respecto a philibertaína g II están remarcados en color verde.

en comparación con las obtenidas para otras proteasas cisteínicas purificadas a partir de especies pertenecientes a la familia *Apocynaceae* y con la de papaína.

Como puede observarse la secuencia N-terminal de philibertaína g II presentó un 63,2 % de identidad con papaína, proteasa tipo del Clan CA y de la familia C1A (Barret *et al.*, 2004).

El mayor grado de identidad de la secuencia N-terminal de philibertaína g II (89,5 %) fue el obtenido con la de “asclepaína f”, una proteasa cisteínica presente en el látex de *Asclepias fruticosa* (*Apocynaceae*), con quien además comparte otras características tales como su *pI* alcalino (> 9,3) y un valor similar de peso molecular -25 kDa obtenido por SDS-PAGE- (Trejo *et al.*, 2001).

Es interesante resaltar que el porcentaje de identidad obtenido con el N-terminal de philibertaína g I (63,2 %), también purificada a partir del látex de *Philibertia gilliesii* fue menor al que se obtuvo para 10 secuencias N-terminales pertenecientes a otras especies vegetales.

Se realizó también una búsqueda de homología usando el programa Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>, ID: 1150201148-26787-116057497933. BLASTQ4 (Altschul *et al.*, 1997) disponible en Internet, de la secuencia N-terminal de philibertaína g II, lo que permitió establecer que posee un grado de identidad de entre el 63 y el 78 % con más de 40 proteasas cisteínicas vegetales. En este caso, el mayor grado de homología fue obtenido con la secuencia N-terminal de una proteasa cisteínica (número de acceso al Genbank BAA14403) proveniente de *Oryza sativa* (*Poaceae*). En este caso el grado de similaridad fue de 84 % y el identidad de 78 %.

Tal como ocurre con el N-terminal de philibertaína g I, aquí también se encontraron algunos residuos altamente conservados como el de P en la posición 2 y el de Q en la posición 19; estos aminoácidos están presente en todas las secuencias analizadas en la Tabla 13. Por su parte, el motivo DWR se encuentra en un 89 % de los casos. Otros residuos aminoácídicos particularmente conservados son los de Lys 10, Val 13, Pro15 y Asn 18 que se encuentran presentes en las secuencias comparadas en un 83,3 %, 100 %, 82,4 % y 87,5 %, respectivamente.

4.4.3.3. Masa molecular

El valor de la masa molecular de philibertaína g II obtenido mediante espectrometría de masa (MALDI-TOF) fue de 23.977 Da (*cfr.* 29, M&M).

Endopeptidasas Vegetales	Masa Molecular (Da)	Referencias Bibliográficas
Philibertaína g II	23.977	
Philibertaína g I	23.530	Sequeiros <i>et al.</i> , 2005
Araujaína h I	24.031	Priolo <i>et al.</i> , 2000
Araujaína h II	23.718	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Araujaína h III	23.546	Obregón <i>et al.</i> , 2001
Asclepaína f	23.652	Trejo <i>et al.</i> , 2001
Morrenaína b I	23.205	Vairo Cavalli <i>et al.</i> , 2003
Ervatamina b	23.000	Biswas <i>et al.</i> , 2003
Ervatamina c	23.000	Thakurta <i>et al.</i> , 2004
Funastraina c II	23.636	Morcelle <i>et al.</i> , 2004
Asclepaina c I	23.200	Leggieri <i>et al.</i> , 2004

Tabla 14. Masas moleculares determinadas por espectrometría de masas (MALDI-TOF) de diferentes endopeptidasas purificadas de especies vegetales pertenecientes a la familia *Apocynaceae*.

El mencionado valor es cercano al de otras endopeptidasas pertenecientes a especies vegetales de la familia *Apocynaceae* y obtenidos por el mismo método, tal como puede observarse en la Tabla 14.

5. CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE *PHILIBERTIA GILLIESII*

Con el objeto de verificar la multiplicidad de proteasas presentes en el látex de *Philibertia gilliesii* y conocer sus secuencias completas se realizó la clonación y el secuenciamiento de los ADNc sintetizados utilizando cebadores diseñados específicamente para obtener dichas secuencias a partir de moléculas de ARN mensajero extraídas del látex.

5.1. Obtención de ADNc a Partir de ARN total

5.1.1. Diseño de Cebadores Específicos

A partir del conocimiento de la secuencia aminoacídica del extremo N-terminal de la enzima purificada, philibertaína g I, se diseñaron dos cebadores (*primers*) específicos llamados Phili-F 2-7 y Phili-F 5-11 (cebadores directos) siguiendo el procedimiento indicado en el ítem 31.1 de M&M. Los cebadores se diseñaron con degeneraciones en algunas de sus bases, las que se muestran en la Tabla 15.

Nombre	Secuencia
N-terminal	L P A S V D W R K E G
Phili-F 2-7	5` CCw GCy TCw GTh GAT TGG 3`
Phili-F 5-11	5` GTh GAT TGG mGw AAA GAr GG 3`

Tabla 15. Cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia N-terminal de philibertaína g I. Los cebadores fueron diseñados con degeneraciones en algunas de sus bases donde “w” representa A o T; “y” representa C o T; “h” representa T, C o A; “m” representa A o C y “r” representa A o G.

Además fue necesario diseñar los cebadores reversos como el cebador oligo d(T)₂₀ que fue utilizado en la reacción de retrotranscripción (RT), el oligonucleótido R₀R₁polid(T) que fue utilizado en algunas de las reacciones de PCR subsiguientes y el cebador R₁ que fue utilizado en la técnica de Nested-PCR. Dichos cebadores se muestran en la Tabla 16.

Nombre	Secuencia
oligo d(T)₂₀	5` TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT 3`
R₀R₁polid(T)	5` -CCGGAATTCAGTGCAGGGTACCCAATACGACTCACTATAGGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3`
R₁	5` - GGTACCCAATACGACTCACTATAGGGC-3`

Tabla 16. Cebadores utilizados en las reacciones de RT-PCR, PCR y Nested PCR.

Se utilizó además el cebador 5`Nt 3-11 (*cfr.* 31.1, M&M) diseñado por Trejo (2005) en base a la secuencia de una endopeptidasa cisteínica aislada del látex de *Asclepias fruticosa*, una especie perteneciente a la misma tribu que *Philibertia gilliesii*.

5.1.2. Obtención de ADNc a Partir del ARN Total

A partir de hojas y de látex presente en los frutos de *Philibertia gilliesii* se extrajo el ARN total (ARN_T) tal como se indicó en el ítem 31.2 de M&M, luego se realizó una reacción de retrotranscripción, con el fin de obtener el ADNc de todos los ARN mensajeros, utilizando el cebador oligo d(T)₂₀. Además se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con el objetivo de amplificar los ADNc específicos para proteasas cisteínicas utilizando el cebador Phili-F 2-7. Ambos procedimientos se realizaron en un solo paso utilizando las enzimas transcriptasa reversa y *Taq* polimerasa (*cfr.* 31.3, M&M).

El ADNc amplificado fue analizado por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (*cfr.* 23 y 23.5, M&M), como se muestra en la Figura 46.

El análisis del gel confirma la presencia de bandas del tamaño molecular esperado -800 pares de bases (pb)- correspondiente al tamaño promedio de secuencias maduras de ADNc de proteasas cisteínicas.

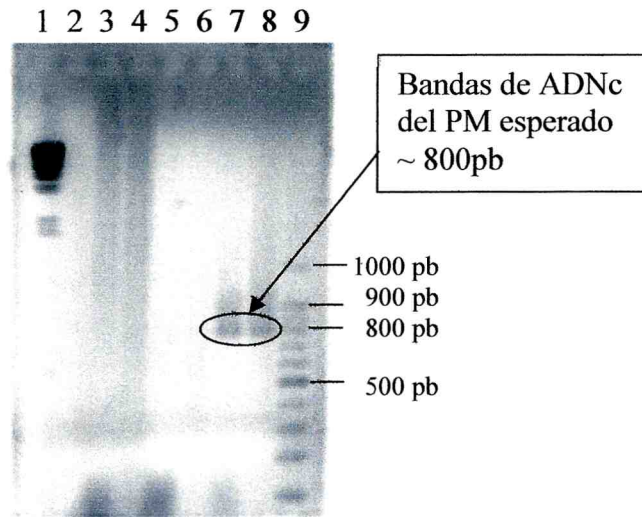


Figura 46. Análisis de los fragmentos obtenidos por RT-PCR sobre geles de agarosa al 1,5 %. Calle 1: marcadores de peso molecular “*Hind III*”. Calle 2: control negativo sin . Calles 3 y 4: controles negativos sin transcriptasa reversa pero con ARN_T de hoja y látex, respectivamente. Calle 5 y 6: muestra proveniente de RT-PCR usando ARN_T extraído de hoja. Calles 7 y 8: muestra proveniente de RT-PCR usando ARN_T extraído de látex. Calle 9: marcadores de peso molecular “*Bio-Logicos*”.

Se realizó una segunda reacción de amplificación por PCR (*cfr.* 32, M&M) empleando el mismo cebador directo (Phili-F 2-7) y el R₀R₁polid(T) como cebador reverso con el fin de poder realizar posteriormente una reacción de confirmación (Nested-PCR). Para esta reacción se empleó como molde el ADNc extraído del gel de agarosa (*cfr.* 34, M&M) obtenido en la reacción de RT-PCR.

Con el fin de verificar que los fragmentos de peso molecular esperado contuvieran la secuencia de interés y de esta manera confirmar la identidad de los productos, se realizó la reacción denominada Nested-PCR (*cfr.* 33, M&M) que utiliza cebadores específicos más internos. Para ello las bandas presentes en el gel realizado luego de la segunda PCR fueron extraídas de la agarosa y utilizadas como molde en la reacción antes mencionada. En este caso los cebadores directos fueron Phili-F 5-11 y 5’Nt 3-11 y el reverso fue R1, todos ellos cebadores más internos. En la Figura 47 se observan los productos de la

Nested-PCR en un gel de electroforesis de agarosa al 2 % (*cfr.* 23 y 23.5, M&M) en la que se evidencia la amplificación específica de las bandas antes mencionadas.

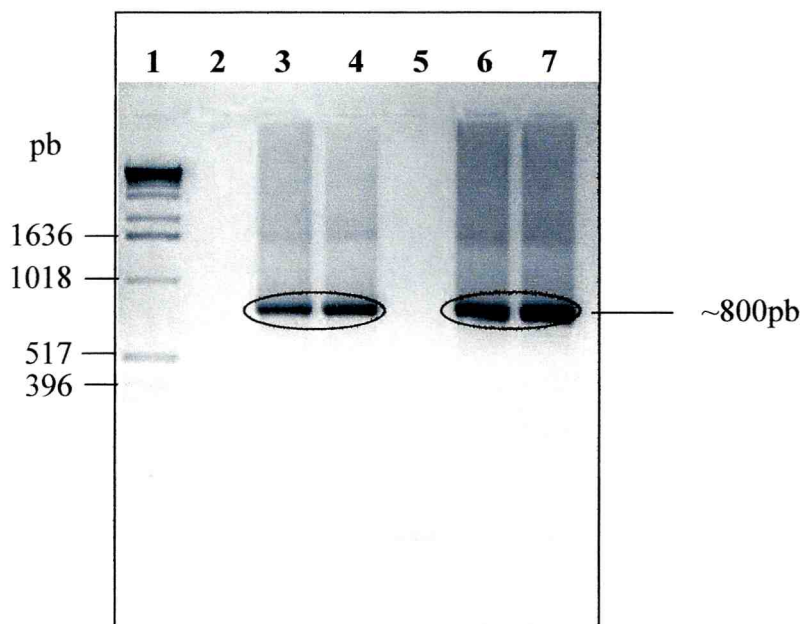


Figura 47. Análisis de los fragmentos obtenidos por Nested-PCR sobre un gel de agarosa al 2 %. Calle 1: patrones de PM “Marker X” (12,2 – 0,07 Kbp). Calle 2: control negativo sin ADNc y con Phili-F 5-11, calles 3 y 4: fragmentos amplificados con Phili-F 5-11, calle 5: control negativo ADNc y con 5’Nt 3-11, calles 6 y 7: fragmentos amplificados con 5’Nt 3-11.

5.2. Clonación de los Fragmentos Amplificados

Los productos de amplificación, obtenidos en la RT-PCR, la segunda PCR y los obtenidos por Nested-PCR, fueron clonados (*cfr.* 35, M&M) en *Escherichia coli* (XL1-Blue) empleando el vector comercial “pGEM-T Easy” (*cfr.* 35.1.1, M&M). Se seleccionaron 5 clones procedentes de cada cebador directo. Se denominaron C₁, C₂, C₃, C₄ y C₅ a los clones cuyos plásmidos contienen fragmentos derivados del cebador Phili-F 2-7. Los clones P₁, P₂, P₃, P₄ y P₅ son aquellos originados por el cebador Phili-F 5-11 y los clones S₁, S₂, S₃, S₄ y S₅ son aquellos originados empleando el cebador 5’Nt 3-11. La confirmación de que los clones (colonias blancas) seleccionados (*cfr.* 35.2.3, M&M) contenían el inserto esperado se realizó realizando la amplificación del

inserto por PCR (*cf.* 32, M&M) y luego una electroforesis de los productos obtenidos en gel de agarosa al 2 % (*cf.* 23 y 23.5, M&M).

En la Figura 48 podemos observar que la mayoría de clones analizados presentan un inserto de PM de aproximadamente 820 pb, a excepción del clon C₂ que presenta una segunda banda muy cercana, de menor tamaño y con menor concentración, los clones P₁ y P₅ que exhiben una banda de aproximadamente 770 y 650 pb, respectivamente y el clon P₃ no tuvo amplificación.

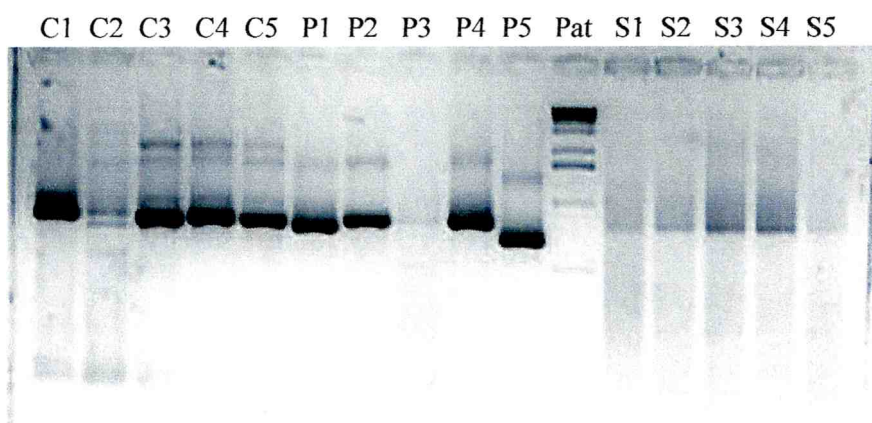


Figura 48. Análisis de los clones seleccionados sobre geles de agarosa al 2 %. Calles 1 a 5: productos de PCR de los clones C₁, C₂, C₃, C₄ y C₅, Calles 6 a 10: productos de PCR de los clones P₁, P₂, P₃, P₄ y P₅, calle 11: patrones de peso molecular (0,07 – 12,2 Kbp) y calles 12 a 16: productos de PCR de los clones S₁, S₂, S₃, S₄ y S₅.

Para cuantificar los insertos contenidos en el ADN plasmídico, con el fin de informar su concentración al servicio de secuenciamiento, se prepararon cultivos de cada uno de los clones y luego se realizó la extracción y purificación de los plásmidos según el protocolo descrito en el ítem 36.1 de M&M. Una alícuota de cada una de las muestras conteniendo el ADN plasmídico fue digerida con la enzima de restricción EcoRI (*cf.* 36.2, M&M) con el fin de liberar el inserto que posteriormente fue cuantificado utilizando un gel de agarosa al 1% (*cf.* 23 y 23.5, M&M). Las muestras fueron enviadas a secuenciar al Servicio de Secuenciación de la Universidad Autónoma de Barcelona (*cf.* 36.3, M&M). Se solicitó la secuenciación utilizando los cebadores “T7 promotor” y “SP6 promotor” (cada uno de estos cebadores permiten amplificar a partir de cada uno de los extremos de la zona de inserción de ADN en el vector pGEM-T Easy, tal como se encuentra explicado

en el ítem 35.1.1 de M&M), lo que permitió obtener la secuencia de las dos cadenas de los fragmentos de ADN para alguno de los clones enviados.

5.3. Análisis de las Secuencias Obtenidas

Las secuencias obtenidas a partir de los clones fueron analizadas detalladamente y alineadas empleando el software de alineamiento Clustal-X (Thompson *et al.*, 1997) que permite realizar el alineamiento múltiple de secuencias (*cf.* 37, M&M). Se obtuvieron dos secuencias consenso denominadas Phili-A y Phili-B.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron traducidas en sus diferentes marcos de lectura posibles con el software disponible en la Web <http://arbl.cvmb.colostate.edu/molkit/translate/index.html> obteniendo la secuencia aminoacídica de cada una (Figuras 49 y 50).

```

1  V D W R K E G V V F P I R N Q G E C G S
1  gttgattggagaaaagaagggtgtgtttttcccatcagaaatcaaggggaatgtgggagt
21  C W T F S A V A A M E T L V G I K Y G R
61  tgctggacattctcggcagttgctgccatggaaacccctcggtgggattaaatcggctgt
41  M I A L S E Q E L L D C E R T S Y G S Q
121  atgattgcattatccgagcaagactattggactgcgaaagaacaagttatggtagtcaa
61  G G F F D T A F E Y V A R N G I T T R D
181  ggaggtttctttgatactgcatttgagtatgtagccaggaatggattaccactcgggac
81  K Y P Y R G Q Q G Q C Y Q M Q K V V R I
241  aaatatccatataaggggtcaacaagggcaatgttatcaaatgcaaaaagtggtagaatt
101  S G Y R R V P A Y N E A Q L Q L A V A G
301  tctggttatcggagagtacctgcataaacgaggcacagcttcaacttgcgtgttgaggga
121  G V V S T A V K S K S R D F Q F Y R S G
361  ggagtagtcagtactgccgttaaatctaaaagcagagatttccagttctatcgcggtt
141  L F T G A C G P K L D H A V S L A G Y I
421  ttatttactggagcttgcggtccaaaattggatcatgcagtgagtccttgcgtggatatatt
161  T G G G S R Y R I V R N S W G T T W G E
481  actggaggtgggagtaggtatcggattgtgagaaactcttgggggtacaacttggggagag
181  G G Y M R L P M N A G P A E G Y C G V A
541  ggtggatacatgagacttccaatgaatgcaggaccggctgaaggttattgtggagttgcc
201  T Q P S Y P V M N stop
601  acgcagccctcttatccagttatgaattaaagagtcagaaaacttatgcatttcaaga

661  caatatatatatgtacgtgtgacttctatatgaattgaataaaacttctatattaa

721  aaagatatntttattataaaaaaaaaagccctatagtgagtcgtattgggtacc
    
```

Figura 49. Phili-A: secuencias consenso nucleotídica y aminoacídica. El triplete “taa” (en rojo) corresponde a la señal de stop para la síntesis proteica y la secuencia “aataaa” (en rojo y subrayada) corresponde a la secuencia señal de poliadenilación. Las secuencias nucleotídicas sombreadas en gris corresponden a las secuencias de los cebadores directo y reverso utilizados.

```

1  V D W R K E G A V L P I R E Q G G C G S
1  gtagattggcgtaaagaagggtgccgtttcctccaattagagagcaaggagggtgtgggagt
21  C W A F S A V A S V E A I N K I K N G R
61  tgctgggcttctcagcagttgcttcagtggaagcaattaataaaataaagaacggacga
41  L I A L S E Q M L V D C V T D S L G C I
121  ttaatcgcattatccgaacaaatgctggtagactgtgtaacagacagtcctcgggtgcatt
61  A G R Q T D A F Q Y I R N Y G I A S R K
181  gcaggtcgacaaacagatgcattccaatacataaggaactatggtattgcctctaggaag
81  D Y P Y K A V Q G T C Q D K K I V L K I
241  gactaccgctataaggctgtacaaggacttgtaagacaaaaaatagtgcttaaaatt
101  I G D G N I V R F T E S Y L Q S M A A S
301  attggtgacggtaatatagttcggtttacggagagttaccttcaaagcatggcagcctct
121  Q V V S V N I K S A S E D F Q F Y G S G
361  caagtagtgagtgtaacataaaaagtgtagcagaggacttccagttctatggttcgggt
141  I F T G K C G D K I D H G V N V A G Y G
421  atatttactggaaaatgtggtgacaaaattgatcatggcgtgaaactggcgggatacgg
161  S L N G K D Y W I I R N S W G T R W G D
481  tctttaaacggaaaagattattggatcataaggaactcctggggtacaagatggggagac
181  R G Y M R L L R N S K D S D G K C G I R
541  cgaggttatatgagattgctacgaaattcgaaagattccgacggtaaatgcggaattaga
201  T L L T Y P I M A S A S E E G N I S I I
601  acacttctaacatatcctatcatggcctctgctagcgaagaaggaaatattagcatcatt
221  stop
661  tgaatatgagaggagtttcctaaatatgtctactcaaacttttgagataattaaggatg

721  taataatccctcattactaatgagaagttattggtgttttgctttttcttaaaaaaaaaa

781  aaaaaaaaaaccctatagtgagtcgtattgggtacc

```

Figura 50. Phili-B: secuencias consenso nucleotídica y aminoácida. El triplete “tga” (en rojo) corresponde a la señal de stop para la síntesis proteica. Las secuencias nucleotídicas sombreadas en gris corresponden a las secuencia de los cebadores directo y reverso utilizados en la reacción.

Ambas secuencias, Phili-A y Phili-B, presentaron entre un 47 % y un 52 % de similitud con más de 50 secuencias proteicas pertenecientes a endopeptidasas cisteínicas vegetales, al ser analizadas mediante Blastp, herramienta del NCBI¹, <http://www.ncbi.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>; cada secuencia tuvo su número de ingreso ID: 1145484437-16797-88560457278.BLASTQ1 e ID: 1145484748-31719-79823814854. BLASTQ4, para Phili-A y Phili-B, respectivamente. Se detectaron además en estos análisis dominios conservados correspondientes a proteasas cisteínicas.

Phili-A y Phili-B pertenecerían a secuencias maduras de proteasas cisteínicas con 209 y 220 residuos de aminoácidos, respectivamente. Los 11 residuos extra que posee la secuencia Phili-B pertenecen a su extremo carboxilo terminal.

¹ NCBI: National Center for Biotechnology. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool nucleotide.

Se realizó el análisis y la comparación de las secuencias (*cfr.* 37, M&M) con el fin de establecer el porcentaje de identidad (Tabla 17) y evaluar la homología entre Phili-A y Phili-B con respecto a las secuencias de cuatro diferentes proteasas cisteínicas: una perteneciente a la misma familia *Apocynaceae* presente en la especie vegetal *Asclepias fruticosa* (Trejo, 2005) y las otras tres fueron papaína (1PPN) y proteinasa omega (1PPO), ambas presentes en el látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*) y la cisteínproteasa AAR25797, perteneciente a *Solanum tuberosum* (*Solanaceae*). Se utilizó el programa Clustal X para alinear las secuencias y el programa Treeview para agruparlas por similitud (Figura 51); la secuencia perteneciente a *Solanum tuberosum* se utilizó con el fin de emplearla como “fuera de grupo” (*outgroup*).

Nº	Entidad	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4	Nº 5	Nº 6
1	Phili-A	100					
2	Asclepaína f	67,6	100				
3	Phili-B	51,7	55,1	100			
4	Papaína (1PPN)	47,3	48,3	46,3	100		
5	Proteinasa omega (1PPO)	51,2	52,6	50,7	69,8	100	
6	<i>S. tuberosum</i> (AAR25797)	13,0	14,5	13,5	10,2	12,1	100

Tabla 17. Porcentaje de identidad entre las secuencias proteicas Phili-A y Phili-B y las de Asclepaína f, papaína, proteinasa omega y una proteasa de *Solanum tuberosum*.

El programa empleado ubicó las secuencias obtenidas en dos grupos diferentes en el correspondiente cladograma (Figura 51). Al observar el mencionado cladograma vemos que Phili-A tendría un origen común con Asclepaína f, en tanto que Phili-B se diferenció a partir de un ancestro común en una etapa anterior.

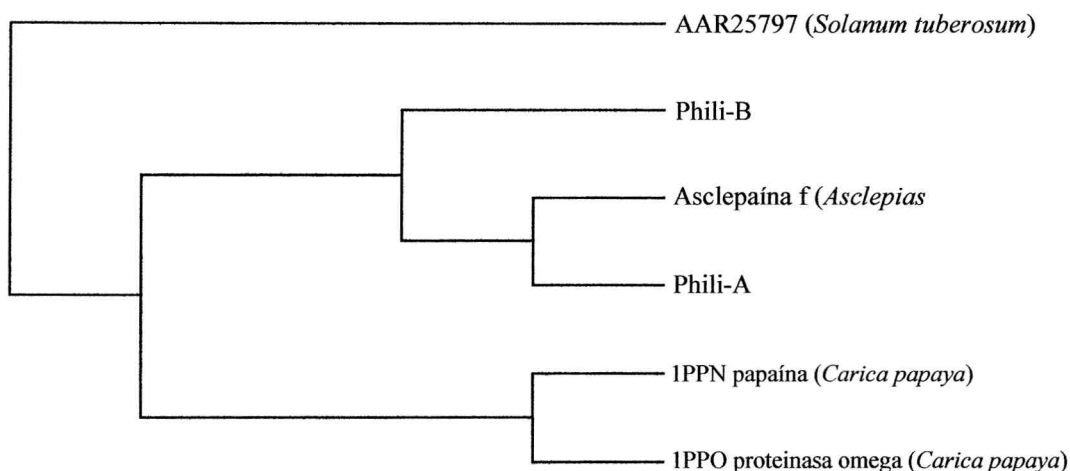


Figura 51. Cladograma de las secuencias proteicas de Phili-A y Phili-B y de las secuencias proteicas de otras 4 proteasas cisteínicas pertenecientes a otras especies vegetales.

Si tenemos en cuenta las diversas fracciones con actividad proteolítica observadas en el IEF-zimograma mostrado en la Figura 19 del ítem 2.3.11.3 de R&D y las diferentes fracciones con actividad endopeptidásica eluidas del cromatograma, es razonable encontrar en el látex una mezcla de ARNm que codifiquen para diferentes peptidasas, lo que se corresponde con los resultados aquí obtenidos.

Ambas secuencias aminoacídicas (Phili-A y Phili-B) fueron introducidas en el programa Compute pI/Mw Tool disponible en http://www.expasy.org/cgi-bin/pi_tool.html para calcular algunas de las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Para la secuencia de Phili-A la masa molecular relativa calculada fue de 22,992 kDa y el *pI* de 9,14, mientras que para Phili-B la masa molecular fue de 24,138 kDa y el *pI* de 8,79. Los mencionados valores de *pI* se encuentran dentro de los obtenidos para philibertaína g por IEF-Zimograma, que presentó bandas proteolíticamente activas con valores de *pI* entre 8,5 y > 10,25 (*cf.* 2.3.11.3).

5.3.1. Análisis de la Estructura Primaria

Las secuencias polipeptídicas Phili-A y Phili-B, analizadas por Swiss-Model Blast (*cf.* 37.2, M&M) mostraron un grado de identidad de 45 a 56 % con más de 20 proteasas cisteínicas de la familia C1A que poseen estructura cristalográfica resuelta con alta resolución, entre ellas papaína.

En la Figura 52 se muestra el alineamiento (mediante el programa Clustal X) de la estructura primaria de las secuencias Phili-A y Phili-B con las secuencias completas de algunas proteasas cisteínicas que han sido resueltas por cristalografía de rayos X. Quimopapaína “1YAL” (Maes *et al.*, 1996), actinidaína “2ACT” (Baker *et al.*, 1980) y caricaína “1PPO” (Pickersgill *et al.*, 1991), son las que exhiben mayor similitud con Phili-A (56,1 %, 51,3 % y 51,0 % de identidad, respectivamente). Mientras que las que presentan mayor identidad con Phili-B son ervatamina B “1IWD” (Biswas *et al.*, 2003), ervatamina C “1O0E” (Thakurta *et al.*, 2004) y seguida por caricaína “1PPO” (Pickersgill *et al.*, 1991) con 52,7 %; 51,1 % y 50,9 % de identidad, respectivamente.

En ambas secuencias, Phili-A y Phili-B, se encuentran los residuos aminoacídicos pertenecientes al sitio activo de las endopeptidasas cisteínicas - por lo tanto involucrados en el mecanismo catalítico- así como también residuos altamente conservados implicados en la formación y mantenimiento de la estructura tridimensional que caracteriza a estas peptidasas.

2act	--LPSYVDWRSAGAVVDIKS	Q	G	E	C	G	G	W	A	F	S	A	I	A	T	V	E	G	I	N	K	I	T	S	G	S	L	I	S	L	S	E	Q	E	L	I	D	C	G	R	58														
1cqd	DDLPSIDWRENGAVVPVKN	Q	G	G	C	G	S	C	W	A	F	S	T	V	A	A	V	E	G	I	N	Q	I	V	T	G	D	L	I	S	L	S	E	Q	Q	L	V	D	C	--	58														
1iwd	--LPSFVDWRSKGAVNSIKN	K	Q	C	G	S	C	W	A	F	S	A	V	A	A	V	E	S	I	N	K	I	R	T	G	Q	L	I	S	L	S	E	Q	E	L	V	D	C	--	56															
1o0e	--LPEQIDWRKKGAVTPVKN	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	F	S	T	V	S	T	V	E	S	I	N	Q	I	R	T	G	N	L	I	S	L	S	E	Q	E	L	V	D	C	--	56														
1ppo	--LPENVDRKKGAVTPVRH	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	F	S	A	V	A	T	V	E	G	I	N	K	I	R	T	G	K	L	V	E	L	S	E	Q	E	L	V	D	C	--	56														
1ppn	--IPEYVDWRQKGAFTPVKN	Q	G	S	C	G	S	C	W	A	F	S	A	V	T	I	E	G	I	I	K	I	R	T	G	N	L	N	E	Y	S	E	Q	E	L	L	D	C	--	56															
lyal	--YQSIDWRAKGAFTPVKN	Q	G	A	C	G	S	C	W	A	F	S	T	I	A	T	V	E	G	I	N	K	I	V	T	G	N	L	L	E	L	S	E	Q	E	L	V	D	C	--	56														
Phili-A	-----GVPFPIRNOGECG	S	C	W	T	F	S	A	V	A	A	M	E	T	L	V	G	I	K	Y	G	R	M	I	A	L	S	E	Q	E	L	L	D	C	--	46																			
Phili-B	-----GAVLPIREQGGCG	S	C	W	A	F	S	A	V	A	S	V	E	A	I	N	K	I	K	N	G	R	L	I	A	L	S	E	Q	M	L	V	D	C	--	46																			
		*	:	:	*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:															
2act	TQNTRG	C	D	G	G	Y	I	T	D	G	F	Q	F	I	I	N	D	G	G	I	N	T	E	N	Y	P	Y	T	A	Q	D	G	C	D	V	A	L	Q	D	Q	K	Y	V	T	I	D	T	Y	E	N	V	P	Y	118	
1cqd	TTANHG	C	R	G	G	W	M	N	P	A	F	Q	F	I	V	N	N	G	G	I	N	S	E	E	T	Y	P	Y	R	G	Q	D	G	I	C	N	S	T	V	N	-	A	P	V	S	I	D	S	Y	E	N	V	P	S	117
1iwd	DTASHG	C	N	G	G	W	M	N	N	A	F	Q	Y	I	I	T	N	G	G	I	D	T	Q	Q	N	Y	P	S	A	V	Q	S	C	K	P	Y	R	L	-	-	R	V	S	I	N	G	F	Q	R	V	T	R	114		
1o0e	DKKNHG	C	L	G	G	A	F	V	F	A	Y	Q	Y	I	I	N	N	G	G	I	D	T	Q	A	N	P	Y	K	A	V	Q	G	P	Q	A	A	S	-	-	-	K	V	S	I	D	G	Y	N	G	V	F	113			
1ppo	ERRSHG	C	K	G	G	Y	P	P	A	L	E	Y	V	A	K	N	G	-	I	H	L	R	S	K	Y	P	K	A	K	Q	G	T	C	R	A	K	Q	V	G	G	P	I	V	K	T	S	G	V	G	R	V	Q	P	115	
1ppn	DRRSYG	C	N	G	G	Y	P	W	S	A	L	Q	L	V	A	Q	Y	G	-	I	H	R	N	T	Y	P	Y	E	G	V	Q	R	Y	C	R	S	R	E	K	G	P	Y	A	A	K	T	D	G	V	R	Q	V	P	115	
lyal	DKHSYG	C	K	G	G	Y	Q	T	S	L	Q	Y	V	A	N	N	G	-	V	H	T	S	K	V	P	Y	Q	A	K	Q	Y	K	C	R	A	T	D	K	P	G	P	K	V	K	I	T	G	Y	K	R	V	P	S	115	
Phili-A	ERTSYG	S	Q	G	G	F	F	D	T	A	F	E	Y	V	A	R	N	G	-	I	T	T	R	D	K	Y	P	Y	R	G	Q	Q	Q	C	Y	Q	M	Q	-	-	-	K	V	V	R	I	S	G	Y	R	R	V	P	A	102
Phili-B	VTDSLGC	I	A	G	R	Q	T	D	A	F	Q	Y	I	R	N	Y	G	-	I	A	S	R	K	D	Y	P	Y	K	A	V	Q	G	T	C	Q	D	K	K	-	-	-	I	V	L	K	I	I	G	D	N	I	V	R	102	
		:	:	:	:	*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:		
2act	NNEWALQ	T	A	V	T	Y	Q	P	V	S	V	A	L	D	A	A	G	D	A	F	K	Q	Y	A	S	G	I	F	T	G	P	C	G	T	A	V	D	H	A	I	V	I	V	G	Y	G	T	E	G	G	V	D	Y	W	178
1cqd	HNEQSLQ	K	A	V	A	N	Q	P	V	S	V	T	M	D	A	A	G	R	D	F	Q	L	Y	R	S	G	I	F	T	G	S	C	N	I	S	A	N	H	A	L	T	V	V	G	Y	G	T	E	N	D	K	D	F	W	177
1iwd	NNESALQ	S	A	V	A	S	Q	P	V	S	V	T	V	E	A	A	G	A	P	F	Q	H	Y	S	S	G	I	F	T	G	P	C	G	T	A	Q	N	H	G	V	I	V	G	Y	G	T	Q	S	G	K	N	Y	W	174	
1o0e	CNEXALK	Q	A	V	A	V	P	S	T	V	A	I	D	A	S	A	Q	F	Q	Q	Y	S	S	G	I	F	S	G	P	C	G	T	K	L	N	H	G	V	T	I	V	G	Y	-	-	-	Q	A	N	Y	W	169			
1ppo	NNEGNLL	N	A	I	A	K	Q	P	V	S	V	V	V	E	S	K	G	R	F	Q	L	Y	K	G	G	I	F	E	G	P	C	G	T	K	V	D	H	A	V	T	A	V	G	Y	G	K	S	G	K	G	Y	I	175		
1ppn	YNEGALLY	S	I	A	N	Q	P	V	S	V	V	L	E	A	A	G	K	D	F	Q	L	Y	R	G	G	I	F	V	G	P	C	G	N	K	V	D	H	A	V	A	A	V	G	Y	G	P	N	-	-	-	Y	I	171		
lyal	NCETSFL	G	A	L	A	N	Q	P	L	S	V	L	V	E	A	G	G	K	P	F	Q	L	Y	K	S	G	V	F	D	G	P	C	G	T	K	L	D	H	A	V	T	A	V	G	Y	G	T	S	D	G	K	N	Y	I	175
Phili-A	YNEAQLQ	L	A	V	A	G	V	V	S	T	A	V	K	S	K	S	R	D	F	Q	F	Y	R	S	G	L	F	T	G	A	C	G	P	K	L	D	H	A	V	S	L	A	G	Y	I	T	G	G	S	R	Y	R	162		
Phili-B	FTESYLQ	S	M	A	A	S	Q	V	V	S	V	N	I	K	S	A	S	E	D	F	Q	F	Y	G	S	G	I	F	T	G	K	C	G	D	K	I	D	H	G	V	N	V	A	G	Y	G	S	L	N	G	K	D	Y	W	162
		*	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	:	

2act	IVKNSWDTTWGEEGYMRILRNVGG-AGT C GIAT M PSYPVKYNN-----	220
1cqd	IVKNSWGKNWGESGYIRAERNIENPDGK C GITR F ASYPVKKGNTN-----	221
1iwd	IVRNSWGQNWGNQGYIWMERNVASSAGL C GIAQ L PSYPTKA-----	215
1o0e	IVRNSWGRYWGEKGYIRMLR--VGGCGL C GIAR L PYYPTKA-----	208
1ppo	LIKNSWGTAWGEKGYIRIKRAPGNSPGV C GLYK S SYPTKN-----	216
1ppn	LIKNSWGTGWGENGYIRIKRGTGNSYGV C GLYT S SFYPVKN-----	212
1yal	I IKNSWGPNWGEKGYMRLKRQSGNSQGT C GVYK S SYPFKGF-----	218
Phili-A	IVRNSWGTTWGEGGYMRLPMNAGPAEGY C GVAT Q PSYPVMN-----	203
Phili-B	IIRNSWGTRWGDRGYMRLLRNSKSDGK C GIRT L LTYPIMASASEEGNISII	214
	:::***: ** : **:	* **:
		**

Figura 52. Alineamiento múltiple obtenido utilizando Clustal X de Phili-A y Phili-B con endopeptidasas cisteínicas de la familia C1A. Actinidaina (2ACT), zingipaina (1CQD), ervatamina B (1IWD), ervatamina C (1O0E), caricaína (1PPO), papaína (1PPN) y quimopapaína (1YAL). Los asteriscos (*) señalan los residuos de amino ácidos idénticos entre todas las secuencias alineadas, los dos puntos (:) muestra un cambio conservado de aa. Los residuos del centro catalítico se representan en color rojo, las cisteínas que se encontrarían formando puentes disulfuros se representan sobre fondo amarillo. En color verde se marcan los residuos que forman parte del bolsillo hidrofóbico que contiene el puente de hidrógeno formado entre la Asn (N) y la His (H) del centro catalítico. En color púrpura se marcan los residuos del subsitio S2.

Los residuos catalíticos de la familia C1 son la Cys²⁵ y la His¹⁵⁹, que forman la díada catalítica (numeración de la papaína madura). Además, otros dos residuos son importantes para la catálisis en la papaína y enzimas relacionadas. Estos residuos son la Gln¹⁹ que participa en la formación del “hueco oxianiónico”, un centro electrofílico que estabiliza el intermediario tetraédrico y la Asn¹⁷⁵ el cual parece orientar el anillo imidazólico de la His¹⁵⁹ catalítica. La cisteína catalítica (Cys²⁵) es seguida por un residuo aromático altamente conservado (Trp); este aminoácido hidrofóbico es reemplazado por Gly en algunas peptidasas de la familia C2 y C12 (Barret *et al*, 2004). Otros residuos conservados son los de Phe¹⁴¹, Trp¹⁷⁷ y Trp¹⁸¹, los que conforman el bolsillo hidrofóbico en el que está localizado el puente de hidrógeno formado entre la Asn¹⁷⁵ y la His¹⁵⁹.

La secuencia de Phili-B presenta los siete residuos de Cys altamente conservados en las peptidasas cisteínicas. Como vimos anteriormente, la Cys²⁵ pertenece al sitio activo, en cambio los restantes 6 residuos de Cys participan en la formación de los tres puentes disulfuro presentes en la estructura de esta clase de enzimas (Cys²²-Cys⁵⁶, Cys⁶³-Cys⁹⁵ y Cys¹⁵³-Cys²⁰⁰, siguiendo la numeración de la papaína madura). Por su parte la secuencia de Phili-A, contiene sólo seis de estos siete residuos altamente conservados. Esta secuencia

posee un residuo de Ser en lugar de la Cys⁶³ que pese a ser un cambio conservado de amino ácido -debido a que mantiene el carácter polar- imposibilita la formación de uno de los puentes disulfuro.

El subsitio S2 es el subsitio de especificidad de sustrato dominante para la mayoría de las peptidasas cisteínicas de la subfamilia C1A tipo papaína. En la papaína y endopeptidasas relacionadas este subsitio muestra preferencia por residuos con cadena lateral hidrofóbica o aromática en la correspondiente posición P2 del sustrato. La catepsina B, por el contrario, acepta en el subsitio S2 residuos de Arg -que posee carga positiva- debido a la presencia de un residuo de ácido glutámico en el fondo de dicho bolsillo S2 en lugar del residuo de serina (Ser²⁰⁵) presente en papaína (Barret & Rawlings, 2004).

En la secuencia de Phili-A se observa que los residuos involucrados en el bolsillo de S2 son mayoritariamente hidrofóbicos (Tabla 18), de modo similar a lo que ocurre en papaína. Una excepción la constituye el residuo de la posición 205 (numeración papaína) que tanto en papaína como en esta secuencia está representado por un residuo hidrofílico (Ser y Gln, respectivamente) los que pueden formar puente de hidrógeno.

Enzima	Posición* de los residuos involucrados en el subsitio S ₂					
	67	68	133	157	160	205
Papaína (1PPN)	Tyr	Pro	Val	Val	Ala	Ser
Quimopapaína (1YAL)	Tyr	Gln	Leu	Leu	Ala	Ser
Ervatamina C (100E)	Ala	Phe	Ala	Leu	Gly	Leu
Phili-A	Phe	Phe	Ala	Leu	Ala	Gln
Phili-B	Arg	Gln	Asn	Ile	Gly	Leu

Basado en la numeración de la papaína.

Tabla 18. Residuos de amino ácidos formando el bolsillo de la posición S2 de Phili-A, Phili-B, papaína (1PPN), quimopapaína (1YAL) y ervatamina C (100E). Los residuos aminoacídicos aromáticos y apolares se encuentran sombreados en color gris, los polares sin carga en color amarillo y los cargados en azul.

En la secuencia de Phili-B encontramos una variación importante que podría influir fuertemente en la especificidad de la enzima: presenta un residuo de arginina con carga positiva en la posición 67 (numeración papaína) en lugar

de un aminoácido hidrofóbico (Tabla 18). Además, en la mencionada posición 205 presenta un aminoácido no polar (Leu), que también la diferencia de papaína. Este cambio también lo posee ervatamina C.

5.4. Estructura Terciaria, Modelo Tridimensional (3D)

5.4.1. Organización Global

La estructura tridimensional (3D) de las cadenas polipeptídicas de ambas secuencias, Phili-A y Phili-B, fueron obtenidas (*cfr.* 38, M&M) mediante el servicio automatizado de modelado por homología de estructuras proteicas “Swiss-Model” (Schwede *et al.*, 2003; Guex & Peitsch, 1997 y Peitch, 1995). Las cadenas polipeptídicas de ambas secuencias, Phili-A y Phili-B, muestran un plegamiento comparable entre ellas y muy similar al que presentan las proteasas cisteínicas del tipo de la papaína. En la Figura 53 se muestra en forma ampliada el modelo 3D obtenido para Phili-A. Por su parte la Figura 54 permite observar con detalle los residuos catalíticos del centro activo.

El plegamiento que presenta la estructura es del tipo $\alpha + \beta$ según la clasificación utilizada por la base de datos SCOP². Como sucede con las proteasas cisteínicas de la familia de la papaína la cadena polipeptídica se pliega en dos dominios, encontrándose el sitio activo en la hendidura existente entre ellos. El dominio de la izquierda, denominado dominio L, está constituido principalmente por hélices α y el dominio de la derecha, dominio R, tiene fundamentalmente una estructura de hojas β antiparalelas.

² SCOP (Structural Classification of Proteins), base de datos que agrupa a las proteínas basándose en una clasificación estructural de las mismas, clasifica a las proteínas por comparación de estructuras secundarias regulares además de tener en cuenta otros elementos como la arquitectura global de la proteína y a la distribución espacial de los elementos de estructura secundaria regular.

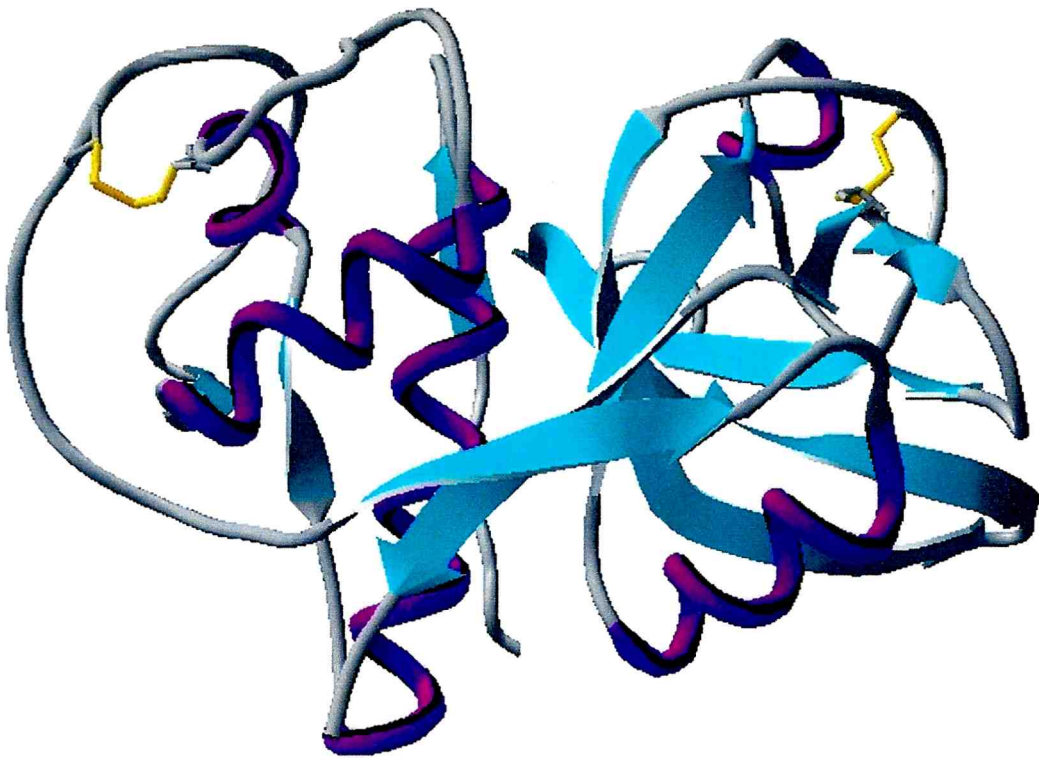


Figura 53. Modelo tridimensional de Pili-A. En color celeste se representan las estructuras hojas β antiparalelas, en color púrpura las hélices α y los puentes disulfuro se representan en color amarillo.

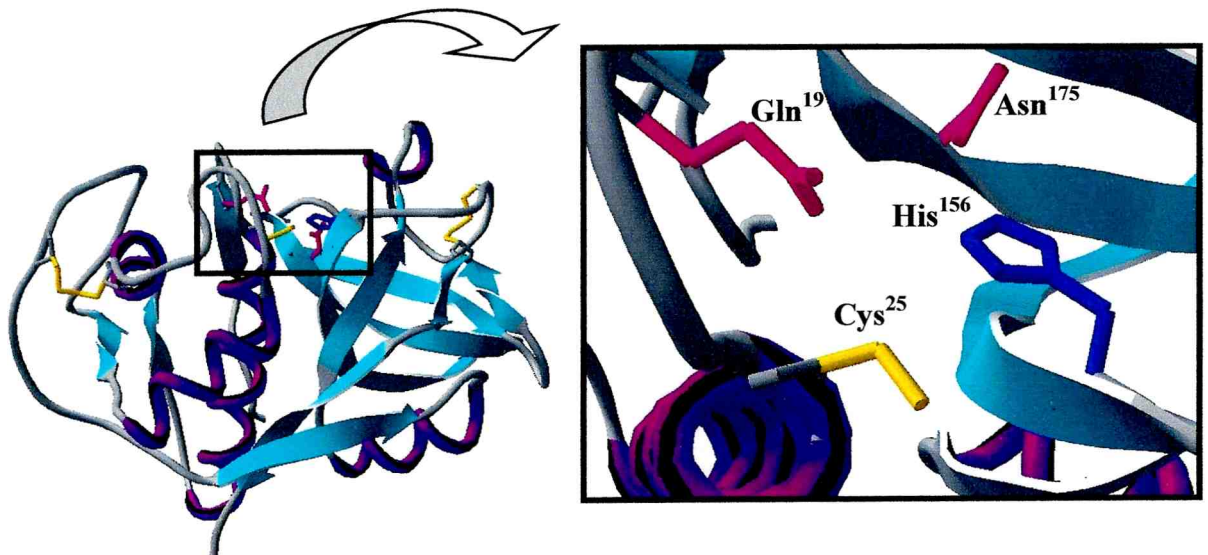


Figura 54. Modelo 3D de Pili-A. Se muestran en detalle los residuos catalíticos pertenecientes al sitio activo.

La Cys²⁵ sobre el dominio L y la His¹⁵⁹ sobre el R están situadas una de cada lado de la hendidura interdominio, formando la díada catalítica de la enzima. Los otros dos residuos importantes en el proceso catalítico, Gln¹⁹ y Asn¹⁷⁵, están situados sobre los dominios L y R, respectivamente (Figura 54).

El modelo 3D de Phili-A presenta dos de los tres puentes disulfuro altamente conservados en las proteasas cisteínicas del tipo de la papaína. Cada uno se encuentra sobre un dominio diferente, el puente formado por las Cys⁵⁶-Cys⁹⁵ (numeración de papaína) estabiliza el dominio L mientras que el puente disulfuro Cys¹⁵³-Cys²⁰⁰ le confiere estabilidad al dominio R. Recordemos que la formación del tercer puente disulfuro, característico de las cisteínproteasas, no es posible para esta cadena polipéptidica debido a que el residuo de Cys⁶³ se encuentra sustituido por uno de Ser.

5.4.2. Superposición Tridimensional de las Estructuras Obtenidas por Homología con Estructuras Conocidas Obtenidas por Cristalografía

Las estructuras 3D de Phili-A y Phili-B, obtenidas mediante modelado por homología, fueron superpuestas (*cf.* 38.1, M&M) con las estructuras 3D -obtenidas por cristalografía- correspondientes a tres proteasas cisteínicas vegetales. Phili-A fue comparada con caricaína (1PPO) y actinidaína (2ACT) y Phili-B con ervatamina B (1IWD) y caricaína (1PPO) como se muestra en la Figura 55. Estas estructuras obtenidas por cristalografía fueron empleadas, entre otras, como molde para obtener el modelo 3D (*cf.* 38., M&M) de las secuencias analizadas.

Los valores de la desviación cuadrática media relativa (RMSD), que da una idea de la semejanza entre dos estructuras (*cf.* 38.1, M&M), fueron obtenidos para la cadena de carbonos α de la estructura de Phili-A con cada una de las estructuras de referencia (1PPO: 0,58; 1AEC: 0,72; 1MEG: 0,47; 2ACT: 0,73 y 1PCIa: 0,54) y para la estructura de Phili-B con sus estructuras de referencia (1IWD: 0,53; 1O0Eb: 0,69; 1PPO: 0,92; 1MEG: 0,86 y 1CQD: 0,59). Estos bajos valores de RMSD para los átomos de carbono alfa (<1 Å) indican una cercana similitud en la conformación global de la estructura. No obstante, algunas desviaciones topológicas son observadas sobre ambas

estructuras. En la estructura perteneciente a Phili-A se detectaron cinco zonas variables y cuatro en la de Phili-B. Un solo tramo señalado con el número 2 pertenece al fin de una hélice alfa, los restantes cambios conformacionales involucran regiones desordenadas (loops) es decir sin estructura secundaria (numeradas 1, 3, 4 y 5 en la Figura 55). El extremo N-terminal, en ambas estructuras, es más corto debido a que no se incorporó en el modelado la secuencia correspondiente al cebador.

De los datos presentados se observa una clara similitud estructural entre Phili-A y Phili-B con las proteasas con las que se las ha comparado, confirmando que ambas estructuras integran la familia C1A de las proteasas cisteínicas que lidera papaína.

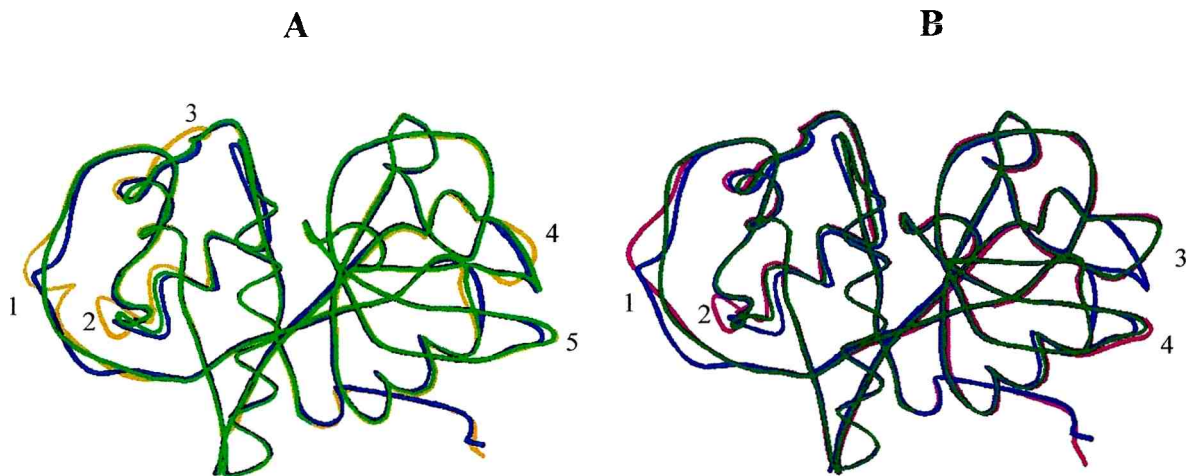


Figura 53. **A)** Superposición de los carbonos α en estilo cinta del modelo 3D obtenido para Phili-A (verde claro) con la estructura 3D obtenida por cristalografía de: caricaína "1PPO" (azul) y actinidaína "2ACT" (naranja). **B)** Superposición de los carbonos α en estilo cinta del modelo 3D obtenido para Phili-B (verde) con la estructura 3D obtenida por cristalografía de: caricaína "1PPO" (azul) y ervatamina B "1IWD" (rosa).

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

I. SELECCIÓN DE ESPECIES DE LA REGIÓN PATAGÓNICA Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE SUS PROTEASAS

Las seis especies vegetales objeto del presente estudio han sido recolectadas en la región Patagónica; ellas fueron: *Colliguaja integerrima* Gill. et Hook., *Euphorbia collina* Phil., *Euphorbia peplus* L. y *Stillingia patagonica* (Speg.) Pax et Hoffmann, todas ellas pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*, así como *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*) y *Grindelia chilensis* (Corn.) Cabrera (*Asteraceae*).

Se pudo determinar que la preparación obtenida a partir del látex de *P. gilliesii* exhibió la mayor actividad proteolítica específica, seguida por las de *S. patagonica* y *E. collina*, en tanto que las de *G. chilensis*, *C. integerrima* y *E. peplus* no mostraron actividad detectable. El uso de inhibidores específicos de los diferentes tipos mecanísticos de endopeptidasas permitió determinar que los extractos de *Philibertia gilliesii* y de *Stillingia patagonica* poseen proteasas cisteínicas. Por su parte el extracto de *Euphorbia collina* contendría proteasas de tipo serínico. Los extractivos obtenidos se caracterizaron por electroforesis nativa, desnaturalizante e isoelectroenfoque con zimograma obteniéndose perfiles característicos para las seis especies estudiadas. El extracto de *P. gilliesii* mostró un patrón complejo, constituido por numerosas bandas proteicas con valores de *pI* entre 4,7 a valores bastante mayores a 9,3; las bandas con actividad proteolítica sólo se observaron en la zona alcalina del gradiente.

2. ESPECIE SELECCIONADA: *PHILIBERTIA GILLIESII*

En función de los datos obtenidos se seleccionó a *Philibertia gilliesii* como la especie más adecuada para el aislamiento, caracterización y purificación de las endopeptidasas presentes en el látex obtenido de sus frutos. La preparación clarificada de esta especie, a la que denominamos *philibertaína g*, presentó una actividad específica de 6,84 Ucas/mg de proteína y fue caracterizada con el fin de disponer de una serie de parámetros útiles en una posible aplicación biotecnológica. Se determinó que el mejor método para su conservación fue el congelamiento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que la preparación requiere una preactivación con cisteína para expresar su máxima actividad, al igual que la presencia de este reductor en el medio de reacción. La mejor actividad esterolítica la presentó con los N-CBZ-derivados de glutamina y alanina. Sobre caseína mostró actividad entre los valores de pH 6 y 11, con el 80 % de su actividad máxima entre pH 7 y 10; en este último rango posee una excelente estabilidad hasta las dos horas de incubación. Su estabilidad térmica fue muy buena luego de dos horas de incubación a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque se inactiva luego de 5 minutos a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$, lo que resulta ventajoso para detener la actividad en procesos industriales. *Philibertaína g* retuvo el 60 % de la actividad inicial aún en presencia de una concentración 1 M de NaCl, característica valiosa en procesos de material crudo marino, y se mostró muy activa en presencia de Urea 4 M, EDTA 10 mM y CaCl_2 10 mM. El ácido iodoacético inhibe casi por completo su forma activada. Al analizarla por electroforesis desnaturalizante no reductora pueden detectarse la presencia de dos bandas activas de PM muy cercano. Por isoelectroenfoque muestra un patrón muy complejo de proteínas, aunque las que son proteolíticamente activas poseen un *pI* entre 8,5 y $> 10,25$.

3. OBTENCIÓN DE HIDROLIZADOS PROTEICOS CON POSIBLE APLICACIÓN INDUSTRIAL

Con el fin de evaluar la posibilidad de aplicar *philibertaína g* para hidrolizar parcialmente el subproducto líquido de la industria pesquera (agua de cola), con posible utilidad en la industria alimentaria, se determinó el grado

de hidrólisis (GH) producido por la enzima en estudio en relación al producido por alcalasa en las mismas condiciones. Aunque el GH obtenido fue menor que el correspondiente a alcalasa (*ca.* 40 %), el análisis por electroforesis muestra que los productos obtenidos son notoriamente diferentes para el mismo grado de hidrólisis, confiriéndole propiedades funcionales diferenciales a ambos hidrolizados.

Con el objeto de tener un conocimiento preliminar acerca de la posibilidad de que *philibertaína g* pueda ser útil como cuajo vegetal o -en su defecto- como aditivo en la elaboración de quesos se realizaron ensayos de coagulación de leche bovina en los cuales se la comparó con otras tres endopeptidasas aisladas en el LIPROVE, resultando ser la que presentó mayor actividad coagulante. Además se obtuvieron hidrolizados parciales de caseínas bovinas que pudieran aportar cambios favorables en las propiedades funcionales de los productos resultantes y favorecer su empleo en la industria de alimentos; la acción de *philibertaína g* sobre dichas proteínas lácteas dio como resultado un hidrolizado proteico que, analizado por SDS-Tricina-PAGE de alta resolución, mostró un perfil de los productos obtenidos característico para esta preparación enzimática, por lo que sería interesante *a posteriori* evaluar sus propiedades funcionales.

4. PURIFICACION DE ENDOPEPTIDASAS A PARTIR DE PHILIBERTAÍNA G

4.1. Cromatografía de Intercambio Iónico

La purificación por cromatografía de intercambio catiónico de *philibertaína g I*, la endopeptidasa más alcalina presente en la preparación enzimática proveniente del látex de *Philibertia gilliesii*, resultó muy complicada a raíz de la inusual complejidad de la muestra de partida, requiriendo un fino ajuste del pH de trabajo y del programa de elución, lo que pudo lograrse luego de numerosas etapas intermedias. Finalmente -con un programa que incluyó seis condiciones diferentes de fuerza iónica- se obtuvo la fracción pura, la que eluyó a una concentración 0,3 M de NaCl a pH 8,6.

4.2. Caracterización de Philibertaína g I

El análisis por isoelectroenfoque de philibertaína g I ultrafiltrada mostró una única banda proteica con un pI mayor a 9,3 que migra al electrodo negativo. La masa molecular de philibertaína g I, determinada por SDS-PAGE fue de 25,6 kDa, mientras que el valor obtenido por espectrometría de masas (MALDI-TOF) fue de 23.530 Da. Esta última técnica permitió no sólo determinar con exactitud la masa de la enzima, sino que también confirmó la pureza de la misma. Los perfiles de pH frente a caseína y PFLNA mostraron valores de pH óptimos de alrededor de 7,6 y 6,8, respectivamente. En cuanto al valor de K_m fue de 0,15 +/- 0,01 mM y el de V_{max} 0,0086 +/- 0,0003 $\mu\text{mol}/\text{min}$, mostrando una afinidad dos veces mayor por el sustrato PFLNA que la que poseen papaína, ficina y bromelaína. La actividad enzimática fue completamente inhibida por E-64, confirmando que philibertaína g I pertenece al grupo catalítico de las endopeptidasas cisteínicas, lo que caracteriza a todas las proteasas purificadas hasta el momento a partir del látex de especies pertenecientes a la tribu *Asclepiadeae*.

El N-terminal de la nueva enzima (23 residuos) mostró más del 50 % de identidad con veinte peptidasas cisteínicas vegetales y un alto grado de identidad (73 %) con la proteinasa omega, una de las endopeptidasas cisteínicas del látex de *Carica papaya* (*Caricaceae*). Al comparar dicha secuencia con la de otras enzimas obtenidas de especies pertenecientes a la misma familia botánica, el porcentaje de identidad varió entre el 56 y 69 %, mostrando además motivos característicos de las endopeptidasas de la subfamilia C1A del Clan CA, cuya enzima tipo es papaína.

4.3. Purificación de Philibertaína g II

Luego de realizar el análisis por SDS-PAGE de los perfiles obtenidos de las fracciones separadas por cromatografía de intercambio catiónico surgió la hipótesis de la existencia de fuertes interacciones inespecíficas entre las diferentes proteínas presentes en la preparación enzimática, denominada philibertaína g. Es de destacar que este tipo de interacciones no han sido halladas descriptas en la bibliografía relacionada a extractivos vegetales

provenientes de látex y/o frutos en general, ni habían sido observadas previamente en nuestro laboratorio. Por cromatografía de exclusión molecular en presencia de fuerza iónica, originada por NaCl 0,3 M, hemos podido aislar una segunda fracción con actividad proteolítica que, luego de ser ultrafiltrada para eliminar péptidos de bajo PM y sales, resultó pura por IEF y MALDI-TOF. La nueva enzima purificada fue denominada ***philibertaina g II***. La masa molecular de *philibertaina g II* obtenida mediante espectrometría de masa fue de 23.977 Da y su punto isoeléctrico de 9,4. La secuencia de sus primeros 19 residuos aminoácidos del extremo N-terminal fue comparada con las de otras proteasas cisteínicas de *Apocynaceae* y con la de papaína, presentando un 63,2 % de identidad con esta enzima tipo. El grado de identidad más elevado (89,5 %) se obtuvo con la secuencia de “*asclepaína f*”, una proteasa cisteínica presente en el látex de *Asclepias fruticosa* (*Apocynaceae*), pero es de destacar que el valor fue más bajo con el N-terminal de *philibertaina g I* (63,2 %), purificada también a partir del látex de *Philibertia gilliesii*. El grado de identidad que mostró respecto a más de 40 proteasas cisteínicas vegetales varió entre el 63 y el 78 %, observándose además la presencia de residuos altamente conservados.

5. CLONADO Y SECUENCIAMIENTO DE LOS ADNc CORRESPONDIENTES A PROTEASAS PRESENTES EN EL LÁTEX DE *PHILIBERTIA GILLIESII*

A partir del ARN total presente en el látex de *Philibertia gilliesii* y empleando las técnicas de retrotranscripción, PCR y Nested-PCR con cebadores específicos, se obtuvieron ADNc del tamaño esperado para endopeptidasas cisteínicas vegetales (*ca.* 800 pb). Se obtuvieron dos secuencias consenso denominadas Phili-A y Phili-B, las que fueron traducidas lográndose la secuencia aminoacídica correspondiente a cada una. Ambas secuencias presentaron entre un 47 % y un 52 % de similitud con más de 50 secuencias proteicas pertenecientes a endopeptidasas cisteínicas vegetales, detectándose además dominios conservados correspondientes a proteasas cisteínicas, por lo

que Phili-A y Phili-B pertenecerían a secuencias maduras de proteasas cisteínicas con 209 y 220 residuos de aminoácidos, respectivamente. Se calcularon algunas propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos correspondientes a Phili-A y Phili-B. Sus masas relativas fueron 22,992 kDa y 24,138 kDa y sus *pI* 9,14 y 8,79, respectivamente. Como podemos recordar, los valores de *pI* calculados se encuentran dentro de los obtenidos para philibertaína g por IEF-Zimograma. Luego de alinear las secuencias y agruparlas por similitud se pudo observar que Phili-A tendría un origen común con Asclepaína f una proteasa cisteínica de *Asclepias fruticosa* (*Apocynaceae*), en tanto que Phili-B se habría diferenciado a partir de un ancestro común en una etapa anterior.

La secuencia de Phili-B presenta los siete residuos de Cys altamente conservados en las peptidasas cisteínicas (la Cys²⁵ pertenece al sitio activo y los 6 residuos de Cys que participan en la formación de tres puentes disulfuro que estabilizan la estructura). Por su parte la secuencia de Phili-A contiene sólo seis de estos siete residuos, por lo que sólo puede formar dos puentes disulfuro. Una característica interesante observada en la secuencia de Phili-B es la presencia de un residuo de arginina con carga positiva en la posición 67 (numeración papaína) en lugar de un aminoácido hidrofóbico; estos aminoácidos constituyen el bolsillo S2, fundamental en la especificidad de este grupo de enzimas. Esta importante variación podría influir fuertemente en la especificidad de la enzima en cuestión.

Mediante modelado por homología se obtuvieron las estructuras tridimensionales (3D) de las cadenas polipeptídicas de ambas secuencias, Phili-A y Phili-B, las que mostraron un plegamiento comparable entre ellas y muy similar al que presentan las proteasas cisteínicas del tipo de la papaína (del tipo $\alpha + \beta$). Como sucede con las proteasas cisteínicas de la familia de la papaína, la cadena polipeptídica se pliega en dos dominios, encontrándose el sitio activo en la hendidura existente entre ellos. El dominio de la izquierda, o dominio L, está constituido principalmente por hélices α , en tanto que el dominio de la derecha, o dominio R, posee fundamentalmente una estructura de hojas β antiparalelas.

De la comparación de las estructuras 3D de Phili-A y Phili-B, obtenidas mediante modelado por homología, con estructuras 3D -obtenidas por cristalografía- correspondientes a tres proteasas cisteínicas vegetales se obtuvieron valores de la desviación cuadrática media, para la cadena de carbonos α . Estos valores fueron muy bajos indicando una gran similitud en la conformación global de la estructura.

De los datos presentados se observa una notoria similitud estructural entre Phili-A y Phili-B y las proteasas con las cuales se las ha comparado, confirmando que ambas estructuras integran la subfamilia C1A de las proteasas cisteínicas que lidera papaína (clan CA subfamilia C1A según la clasificación dada por el sistema MEROPS).

6. RESUMEN

- De seis especies vegetales recolectadas en la Región Patagónica Extraandina de Argentina, *Philibertia gilliesii* fue seleccionada por poseer una elevada actividad proteolítica en su látex con una interesante composición en diferentes endopeptidasas de *pI* alcalino.
- A partir de dicha especie se obtuvo y caracterizó *philibertaína g*, una preparación enzimática apropiada para su empleo en procesos biotecnológicos.
- Se obtuvieron hidrolizados proteicos empleando *philibertaína g* sobre sustratos tales como agua de cola y caseínas y se ensayó la capacidad coagulante de la preparación enzimática.
- A partir de *philibertaína g* se aislaron y caracterizaron dos nuevas endopeptidasas cisteínicas: *philibertaína g I* (*pI* mayor a 10,25, masa molecular 23.530 Da por MALDI-TOF) y *philibertaína g II* (*pI* 9,4 y masa molecular 23.977 Da por MALDI-TOF). Las secuencias N-terminales de ambas mostraron homología con endopeptidasas cisteínicas de la subfamilia C1A del Clan CA, cuya enzima tipo es papaína.

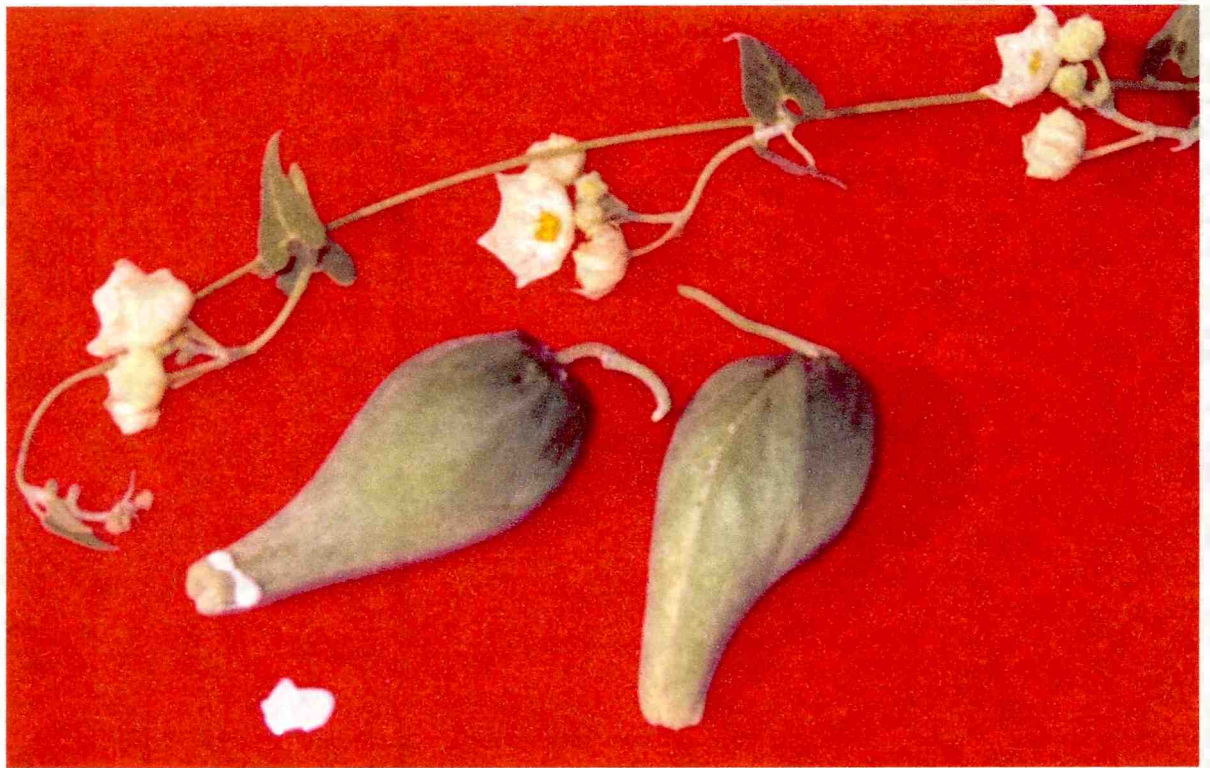
7. PERSPECTIVAS FUTURAS DEL TRABAJO

De los resultados obtenidos se desprende que en un trabajo posterior deberían ser purificadas y caracterizadas las restantes endopeptidasas cisteínicas del látex de *Philibertia gilliesii*, así como lograr el clonado y secuenciamiento de los demás ADNc correspondientes a los ARNm presentes en el látex de esta especie para luego hallar las correspondencias por comparación de las estructuras primarias obtenidas con las deducidas.

La obtención de los ADNc que incluyan las regiones pre y pro permitirían tener una visión más completa aún y permitirían su expresión en un vector eucariótico adecuado, lo que mejoraría la posibilidad de utilizar estas enzimas en procesos biotecnológicos.

Como suele ocurrir en todo trabajo, los resultados obtenidos pueden ser la base de un nuevo comienzo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, K.I. & P.N. Joshi** (1979) "Studies on proteinases from *Calotropis gigantea* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrate", *Biochim. Biophys. Acta* **568**: 111-9.
- Adam, Z. & A.K. Clarke** (2002) "Cutting edge of chloroplast proteolysis", *Trends Plant. Sci.* **7**; 451-6.
- Adler-Nissen, J.** (1986) "Enzymic hydrolysis of food proteins", Elsevier, London & NY.
- Akasofu, H., D. Yamauchi, & T. Minamikawa** (1990) "Nucleotide sequence of the gene for the *Vigna mungo* sulfhydryl-endopeptidase (SH-EP)", *Nucleic Acids Res.* **18** (7): 1892.
- 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.
- Arima, K., T. Uchikoba, H. Yonezawa, M. Shimada, & M. Kaneda** (2000) "Cucumis-like protease from the latex of *Euphorbia supina*". *Phytochemistry* **53**: 639-644.
- Aronson, N.N., Jr. & A.J. Barrett** (1978) "The specificity of cathepsin B. Hydrolysis of glucagon at the C- terminus by a peptidyl-dipeptidase mechanism", *Biochem. J.* **171**: 759-765.
- Arribére, M.C., A.A. Cortadi, M.P. Bettioli, N.S. Priolo, & N.O. Caffini** (1996) "Isolation, Purification and Partial Characterization of a New Protease from the Latex of Fruits of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)", *Acta Farm. Bonaerense* **15**: 169-76.
- Arribére, M.C., A.A. Cortadi, M.S. Gattuso, M.P. Bettioli, N.S. Priolo, & N.O. Caffini** (1998) "Isolation and biochemical characterization of latex

- comparison of *Asclepiadaceae* latex proteases and characterization of *Morrenia brachystephana* Griseb. Cysteine peptidases", *Phytochem Anal* **9**: 267-73.
- Arribère, M.C., S.E. Vairo Cavalli, N.S. Priolo, N.O. Caffini, M.S. Gattuso, & A.A. Cortadi** (1999) "Proteolytic enzymes from the latex of *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)", *Acta Horticulturae* **501**: 259-68.
- Asp, T., S. Bowra, S. Borg, & P.B. Holm** (2004) "Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and enzymatic characterisation of a cysteine protease from white clover (*Trifolium repens*)", *Plant Sci.* **167**: 825-837.
- Bairoch, A. & R. Apweiler** (2000) "The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000", *Nucleic Acids Res.* **28**: 45-48.
- Bajza Z. & V. Vrcek** (2001) "Thermal and enzymatic recovering of proteins from untanned leather waste", *Waste Manage.* **21**: 79-84.
- Baker, E.N. & E.J. Dodson** (1980) "Crystallographic Refinement Of The Structure Of Actinidin At 1.7 Angstroms Resolution By Fast Fourier Least-Squares Methods", *Acta Crystallogr., Sect. A* **36**: 559.
- Barragán, B.E., M.T. Cruz, L.M. del Castillo, & M. Castañeda-Agulló** (1985) "Proteinases of mexican plants. XI. Asclepain g from the látex of *Asclepias glaucescens*", *Rev Latinoam. Quim* **16**: 117-9.
- Barrett, A.J. & N.D. Rawlings** (1991) "Types and families of endopeptidases", *Biochem. Soc. Transact.* **19**: 707-15.
- Barret, A.J., N.D. Rawlings, & J.F. Woessner** (1998) "Handbook of Proteolytic Enzymes", Academic Press, London, pág. 545.
- Barret, A.** (1999) "Peptidases: a view of classification and nomenclature". En: "Proteases. New Perspectives" (Turk, V. editor), págs. 1-12. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland.
- 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.

- Barrett, A.J., N.D. Rawlings & J.F. Woessner, eds** (2004) "Handbook of Proteolytic Enzymes" (2nd. Ed.), Elsevier Academic Press, London, UK.
- Beers, E.P., A.M. Jones, & A.W. Dickerman** (2004) "The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*", *Phytochemistry* **65**: 43-58.
- Benot López, S.** (2000) "Alergia a las proteínas de la leche de vaca: edad límite de uso apropiado. Informe de evaluación de la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía", Ed. Luis Montoto, Sevilla, España.
- Biazus, J.P.M.; J.C. Curvelo Santana, & R. Rodrigues de Souza** (2003) "Otimização Da Biodegradação de Efluentes Proteicos por Enzimas Papaínas", *Anais Do XIV Simpósio Nacional De Fermentações. XIV Simpósio Nacional De Fermentações*, Florianópolis, SC, Brasil.
- Biswas, S., C. Chakrabarti, S. Kundu, M.V. Jagannadham, & J.K. Dattagupta** (2003) "Proposed amino acid sequence and the 1.63 Å X-ray crystal structure of a plant cysteine protease, ervatamin B: some insights into the structural basis of its stability and substrate specificity", *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **51** (4): 489-497.
- Blum, H., H. Beier, & H.J. Gross** (1987) "Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels", *Electrophoresis* **8**: 93-9.
- 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.
- Buvat, R.** (1989) "Ontogeny, cell differentiation and structure of vascular plants". Springer Verlag, Berlin.
- Cabrera, A.L.** (1972) "Regiones Fitogeográficas Argentinas", en "Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería" (Parodi, L.R., editor), 2nd edition. Vol. 2. Buenos Aires: Editorial Acme.
- Cabrera, A.L. & A.A. Willink** (1973) "Biogeografía de América Latina", Washington, DC: OEA, Serie de Biología, Monogr N° 13.

- 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.
- Chichkova, N.V., S.H. Kim, E.S. Titova, M. Kalkum, V.S. Morozov, Y.P. Rubtsov, N.O. Kalinina, M.E. Taliansky, & A.B. Vartapetian** (2004) "A plant caspase-like protease activated during the hypersensitive response", *Plant Cell* **16**: 157-71.
- Choi, K. H., R.A. Laursen, & K.N. Allen** (1999) "The 2.1 Å structure of a cysteine protease with proline specificity from ginger rhizome, *Zingiber officinale*" *Biochemistry* **38** (36), 11624-11633.
- Cordle, C.T.** (1994) "Control of food allergies using protein hydrolysates", *Food Technol.* **48**: 72-6.
- Correa, M.N.** (1971), en "Flora Patagónica", Parte VII, *Colección Cient. INTA*, Buenos Aires.
- Correa, M.N.** (1988), en "Flora Patagónica", Parte V, *Colección Cient. INTA*, Buenos Aires.
- Correa, M.N.** (1999), en "Flora Patagónica", Parte VI, *Colección Cient. INTA*, Buenos Aires.
- Coupé, M., & J. d'Auzac** (1972) "Mise en évidence de polysomes fonctionnels dans le latex d'*Hevea brasiliensis* (Kunth) Müll. Arg.", *C.R. Acad. Sci. Paris* **274**: 1031-4.
- Coupé, M., & J. d'Auzac** (1974) "Caractéristiques de l'incorporation d'acides aminés par les polysomes isolés du latex d'*Hevea brasiliensis*", *Phytochemistry* **13**: 85-8.
- Da Cunha, M., C.G. Costa, R.D. Machado, & F.C. Miguens** (1998) "Distribution and differentiation of the laticifer system in *Chamaesyce thymifolia* (L.) Millsp. (*Euphorbiaceae*)", *Acta Bot. Neerl.* **47**:209-218
- Dalling, Michael J.** (1986) "Plant proteolytic enzymes", Editorial CRC Press, Inc. págs. 76-80.
- del Valle, J.M. & J.M. Aguilera** (1990) "Recovery of liquid by-products from fish meal factories: a review", *Process Biochem. Int.* **25**: 122-131.

- del Valle, J.M. & J.M. Aguilera** (1991) "Physicochemical Characterisation of Raw Fish and Stickwater from Fish Meal Production", *J. Sci. Food Agric.* **54**: 429-441.
- 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-2 beta", *J. Biol. Chem.* **269**: 25172-7.
- Demura, T., G. Tashiro, G. Horiguchi, N. Kishimoto, M. Kubo, N. Matsuoka, A. Minami, M. Nagata-Hiwatashi, K. Nakamura, Y. Okamura, N. Sassa, S. Suzuki, J. Yazaki, S. Kikuchi, & H. Fukuda** (2002) "Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 15794-15799.
- Devanathan, G., J.L. Turnbull, E. Ziomek, E.O. Purisima, R. Menard, & T. Sulea** (2005) "Carboxy-monopeptidase substrate specificity of human cathepsin X", *Biochem. Biophys. Res. Commun* **329**: 445-452.
- Dimitri, M.J.L.** (1972) "La región de los bosques andino-patagónicos: sinopsis general", *Col. Cientif. INTA* **10**. Buenos Aires.
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, H.M. Swen, & B.G. Wolthers** (1968) "Structure of papain", *Nature* **218**: (145), 929-2.
- Driessen, C., R.A.R. Bryant, A.M. Lennon-Duménil, J.A. Villadangos, P.W. Bryant, G.P. Shi, H.A. Chapman, & H.L. Ploegh** (1999) "Cathepsin S controls the trafficking and maturation of MHC class II molecules in dendritic cells", *J. Cell Biol.* **147**: 775-790.
- Dubey, K.V. & M.V. Jagannadham** (2003) "Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*", *Phytochemistry* **62**: 1057-1071.
- Dunn, B.M., J. Kay, A. Gustchina, & A. Wlodawer** (1994) "Subsite preferences of retroviral proteinases", *Meth. Enzymol.* **241**: 254-78.
- Edman, P.** (1950) "Method for determination of the amino acid sequence in peptides", *Acta Chem. Scand.* **4**: 283-93.
- Edman, P. & G. Begg** (1967) "A protein sequenator", *Eur. J. Biochem.* **1**: 80-91.

- Endress, M.E. & P.V. Bruyns** (2000) "A Revised Classification of the *Apocynaceae*", *Bot. Rev.* **66**: 1-56.
- Esau, K.** (1985) "Anatomía Vegetal", Editorial Omega págs. 346-365.
- Faro, C., M. Ramalho-Santos, M. Vieira, A. Mendes, R. Andrade, P. Verissimo, X. Lin, J. Tang & E. Pires** (1999) "Cloning and characterization of cDNA encoding cardosin A, an RGD-containing plant aspartic proteinase", *J. Biol. Chem.* **274**: 28724-9.
- Fernández-Salguero, J. & E. Sanjuán** (1999) "Influence of vegetable and animal rennet on proteolysis during ripening in ewes' milk cheese", *Food Chem.* **64**: 177-83.
- Filippova, I. Yu., E. N. Lysogorskaya, E. S. Oksenoit, G. N. Rudenskaya, & V. M. Stepanov** (1984) "L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilide –A chromogenic substrate for thiol proteinase assay", *Anal. Biochem.* **143**, 293-297.
- Fineran, B.A.** (1983) "Differentiation of non-articulated laticifers in *Poinsettia (Euphorbia pulcherrima Willd.)*", *Ann. Bot.* **52**:279-293
- Fox, P.F.** (1989) "Proteolysis during cheese manufacture and ripening", *J. Dairy Sci.* **72**: 1379-1400.
- Frøkjær, S.** (1994) "Use of hydrolysates for protein supplementation", *Food Technol.* **48**: 86-8.
- Fujinaga, M., M.M. Cherney, H. Oyama, K. Oda, & M.N. James** (2004) "The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 3364-3369.
- Gepstein, S., G. Sabehi, M.J. Carp, T. Hajouj, M.F. Neshet, I. Yariv, C. Dor, & M. Bassani** (2003) "Large-scale identification of leaf senescence-associated genes", *Plant J.* **36**: 629-42.
- Gildberg, A.** (1992) "Enzymic processing of marine raw materials", *Process Biochem.* **28**: 1-15.
- Giordani, R.** (1978) "Autophagie cellulaire et différenciation des laticifères non articulés chez une asclepiade", *Biol. Cell.* **33**: 253-60.

- Glazer, A.N. & E.L. Smith** (1971) "Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes", in: Boyer, P. D. (Ed.), *The Enzymes*, 3rd edn. Vol. 3. London: Academic Press, 501-546.
- Good, N.E. & S. Izawa** (1972) "Hydrogen ion buffers", *Meth. Enzymol.* **24**: 53-68.
- Green, D. P. L.** (1984) "Are prohormones converted to hormones during secretion", *Med.Hypotheses* **15**: 47-59.
- Greenberg, D.M. & T. Winnick** (1940) "Plant proteases. (I) Activation-inhibition reactions", *J. Gen. Physiol.* **135**: 761-773.
- Groves, M.R., M.A. Taylor, M. Scott, N.J. Cummings, R.W. Pickersgill, & J.A. Jenkins** (1996) "The prosequence of procaricain forms an alpha-helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft", *Structure* **4** (10), 1193-1203.
- Grudkowska, M. & B. Zagdańska** (2004) "Multifunctional role of plant cysteine proteinases", *Acta Biochim. Polon.* **51**: 609-24
- Guex, N. & M.C. Peitsch** (1997) "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling", *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- Hartley, B.S.** (1960) "Proteolytic enzymes", *Ann. Rev. Biochem.* **29**: 45-72.
- Hashimoto, F., T. Horigome, M. Kanbayashi, K. Yoshida, & H. Sugano** (1983) "An improved method for separation of low-molecular-weight polypeptides by electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel", *Anal. Biochem.* **129**: 192-9.
- Iizuka, K. & T. Aishima** (1999) "Tenderization of beef with pineapple juice monitored by Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis", *J Food Sci.* **64**: 973-977.
- Iizuka, K & T. Aishima** (2000) "Comparing beef digestion properties of four proteolytic enzymes using infrared spectrometry and chemometric analysis", *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1413-1420.
- Illanes, A.** (1994) "Biotecnología de enzimas", pp 197. Monografía N° 35, Sec. Gral. De la OEA & Ed. Univ. de Valparaíso de la Univ. Cat. de Valparaíso, Chile.

- Inamdar, J.A., V. Murungan, & R.B. Subramanian** (1988) "Ultrastructure of non-articulated laticifers in *Allamanda violacea*", *Ann. Bot.* **62**: 583-8.
- 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** (1), 35-39.
- Kekwick, R.G.O.** (1986) "Preliminary observations concerning protein synthesis by *Hevea brasiliensis* latex in vitro", IRRDB Meeting Hainan, China.
- Kirschke, H., J. Langner, B. Wiederanders, S. Ansorge, P. Bohley, & H. Hanson** (1977) "Cathepsin H: an endoaminopeptidase from rat liver lysosomes", *Acta Biol. Med. Ger.* **36**: 185-199.
- Konno, K., C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tatishi, Y. Tamura, & M. Hattori** (2004) "Papain protects papaya tree from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex", *Plant J.* **37**: 370-378
- Kundu, S., M. Sundd, & M.V. Jagannadham** (2000) "Purification and characterization of a stable cysteine protease Ervatamin B, with two disulfide bridges, from latex of *Ervatamia coronaria*", *J. Agric. Food Chem.* **48**: 171-179.
- Laemmli, U.K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", *Nature* **227**: 680-5.
- Lee, K.B. & P.G. Mahlberg** (1999) "Ultrastructure and development of nonarticulated laticifers in seedlings of *Euphorbia maculata* L.", *J. Plant Biol.* **42**: 57-62.
- Lennox, F.G. & W.J. Ellis** (1945) "Euphorbain, a protease occurring in the latex of the weed *Euphorbia lathyris*", *Biochem. J.* **39**: 465-70.
- Liggieri, C.S., M.C. Arribére, S.A. Trejo Canals F., F.X. Aviles, & N.S. Priolo** (2004) "Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L.", *Protein J.* **23**: 403-411.
- Liu, J., L.A. Blaylock, G. Endre, J. Cho, C.D. Town, K.A. VandenBosch, & M.J. Harrison,** (2003) "Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental

- stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis”, *Plant Cell* **15**: 2106-2123.
- Lively**, M.O. & C.M. Ashwell (1999) “Signal peptidases” En: *Proteases. New perspectives. Molecular and Cell Biology Updates* (V. Turk, ed.) Basel: Birkhäuser Verlag, pp. 35-43.
- López**, L.M.I., Natalucci, C.L., Caffini, N.O. & Curotto, E. (1993) “Isolation and partial purification of serine proteinases present in the latex of *Maclura pomifera* (“osage orange”) fruits”, *Acta Aliment. (Budapest)* **22**: 131-42.
- 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.
- Lynn**, K.R. (1979) “Purification and some properties of two proteases from papaya latex”, *Biochim. Biophys. Acta* **569**: 193–201.
- Lynn**, K.R., W.J. Brockbank, & N.A. Clevette-Radford (1980) “Multiple forms of the asclepains cysteinyl proteases from milkweed”, *Biochim. Biophys. Acta* **612**, 119-25.
- Lynn**, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1984a) “Euphorbain P, a serine protease from *Euphorbia pulcherrima*”, *Phytochemistry* **23**: 682-683.
- Lynn**, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1984b) “Purification and characterization of hevain, a serine protease from *Hevea brasiliensis*”, *Phytochemistry* **23**: 963-964.
- Lynn**, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1985) “Three serine proteases from the latex of *Euphorbia cyparissias*”, *Phytochemistry* **24**: 925-928.
- Lynn**, K.R. & N.A. Clevette-Radford (1988) “Proteases of *Euphorbiaceae*” *Phytochemistry* **27**: 45-50.
- Maes**, D., J. Bouckaert, F. Poortmans, L. Wyns, & Y. Looze (1996) “Structure of Chymopapain at 1.7 Angstroms Resolution”, *Biochemistry* **35**, 16292.
- Mahlberg**, P.G. (1959) “Karyokinesis in non-articulated laticifers of *Nerium oleander* L.”, *Phytomorphology* **9**: 110-8

- Mahlberg, P.G.** (1961) "Embryogeny and histogenesis in *Nerium oleander* II. Origen and development of the non-articulated laticifer", *Am. J. Bot.* **48**: 90-99.
- Mahlberg, P.G.** (1963) "Development of non-articulated laticifers in seedling axis of *Nerium oleander*", *Bot. Gaz.* **124**: 224-31.
- Mahlberg, P.G. & P.S. Sabharwal** (1968) "Origin and early development of nonarticulated laticifers in embryos of *Euphorbia marginata*", *Am. J. Bot.* **55**: 375-81.
- Mahlberg, P.G.** (1993) "Laticifers: an historical perspective", *Bot. Rev.* **59**: 1-23.
- Mantell, S.H., J.A. Matthews, & R.A. McKee** (1986) "Principles of plant biotechnology", Blackwell Sci.Pub., Oxford, pp. 207-12.
- Marty, F.** (1970) "Rôle du système membranaire vacuolaire dans la différenciation des laticifères d' *Euphorbia characias* L. ", *C.R. Acad. Sci.* **271D**: 2301.
- Marty, F.** (1973) "Vésicules autophagiques des laticifères différenciés d'*Euphorbia characias* L.", *C.R. Acad. Sci.* **277D**: 1317.
- Matile, P., B. Jans, & R. Rickenbacher** (1970) "Vacuoles of *Chelidonium* latex: lysosomal property and accumulation of alkaloids", *Biochem. Physiol. Pflanzen* **161**: 447.
- McMullen, A.I.** (1959) "Nucleotides of *Hevea brasiliensis* látex. A ribonucleoprotein component", *Biochem. J.* **72**: 545-9.
- McMullen, A.I.** (1962) "Particulate ribonucleoprotein components of *Hevea brasiliensis* látex", *Biochem. J.* **85**: 491-5.
- Meissner, L.** (1966) "Über den RNS- und Proteingehalt isolierter Milchsäfe und den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in die Latexproteine", *Flora* **156**: 634-54.
- Menon, M., P.J. Vithayathil, S.M. Raju, C.S. Ramadoss** (2002) "Isolation and characterization of proteolytic enzymes from the latex of *Synadenium grantii* Hook, 'f'", *Plant Sci.* **163**: 131-139.
- Mitsuhashi W., T. Yamashita, T. Toyomasu, Y. Kashiwagi, & T. Konnai** (2004) "Sequential Development of Cysteine Proteinase Activities and

- Gene Expression during Somatic Embryogenesis in Carrot”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 705-13.
- Morcelle**, S.R., N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2004a) “Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex”, *Fitoterapia* **75**: 480-493.
- Morcelle**, S.R., S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Aviles, & N.S. Priolo (2004b) “Funastrain c II: a cysteine endopeptidase purified from the latex of *Funastrum clausum*”, *Protein J.* **23**: 205-215.
- 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.
- Nallamsetty**, S., S. Kundu, & M.V. Jagannadham (2003) “Purification and Biochemical Characterization of a Highly Active Cysteine Protease Ervatamin a from the Latex of *Ervatamia coronaria*”, *J. Protein Chem.* **22**: 1-13.
- Nelson**, D. & M. Cox (2004) “Lehninger Principles of Biochemistry” (4th. Ed.), Freeman, N.Y.
- Obregón**, W.D., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2001) “Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits”, *J. Protein Chem.* **20**: 317-25.
- Oliva**, G.E, L. Montes, & E.M. Mascó (1993) “Collecting native forage germplasm in Patagonia. FAO/IBPGR”, *Plant Genet. Res. Newslett.* **93**: 34-7.
- Owens**, J.D. & L.S. Mendoza (1985) “Enzymatically hydrolysed and bacterially fermented fishery products”, *J. Food Technol.* **20**: 273-93.
- Page**, R.D.M. (1996) “TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers” *Comput. Applications Biosci.* **12**: 357-358.
- Pal**, G. & N.K. Sinha (1980). “Isolation, crystallization, and properties of calotropins DI and DII from *Calotropis gigantea*”, *Arch. Biochem. Biophys.* **202**: 321-9.

- Pardo, M.F., L.M.I. López, N.O. Caffini, & C.L. Natalucci** (2001) "Properties of a milk clotting protease isolated from fruits of *Bromelia balansae* Mez", *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **382**: 871-4.
- Pardo, M.F. & C.L. Natalucci** (2002) "Electrophoretic Analysis (Tricine SDS-PAGE) of bovine caseins", *Acta Farm. Bonaerense* **21**: 57-60.
- 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.
- Patel, B.K. & M.V. Jagannadham** (2003) "A High Cysteine Containing Thiol Proteinase from the Latex of *Ervatamia heyneana*: Purification and Comparison with Ervatamin B and C from *Ervatamia coronaria*", *J. Agric. Food. Chem.* **51**: 6326-6334.
- Peitsch, M. C.** (1995) "Protein modeling by E-mail", *Bio/Technology* **13**: 658-660.
- Peterson, G.L.** (1979) "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall", *Anal. Biochem.* **100**: 201-20.
- Phan, I.Q., S.F. Pilbout, W. Fleischmann, & A. Bairoch** (2003) "NEWT, a New Taxonomy Portal", *Nucleic Acids Res.* **31**(13): 3822-3.
- Pickersgill, R.W., P. Rizkallah, G.W. Harris, & P.W. Goodenough** (1991) "Determination Of The Structure Of Papaya Protease Omega", *Acta Crystallogr., Sect. B* **47**, 766-71.
- Pilosof, A.M.R** (2000) "Gelificación", en "Caracterización funcional y estructural de proteínas". Edición (A. M.R. Pilosof & G. B. Bartholomai, eds), Editorial Universitaria de Buenos Aires (eudeba), pág. 75-95.

- Podgorski, I. & B.F. Sloane** (2003) "Cathepsin B and its role(s) in cancer progression", *Biochem. Soc. Symp.* **70**: 263-276.
- Polgar, L. & P. Halasz** (1982) "Current problems in mechanistic studies of serine and cysteine proteinases", *Biochem. J.* **207**: 1-10.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L.M.I. López, & N.O. Caffini** (2000) "Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits", *J. Protein Chem.* **19**: 39-48.
- Pujarnisclé, S.** (1968) "Caractère lysosomal des lutoïdes du latex d'*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.", *Physiol. Vég.* **6**: 27-46.
- Rachmilewitz, T. & A. Fahn** (1982) "Ultrastructure and development of the laticifers of *Ficus carica* L.", *Ann. Bot.* **49**: 13-22.
- Ragonese, A.R.** (1967) "Vegetación y ganadería en la República Argentina". INTA, *Col Científ* **5**. Buenos Aires.
- Rajesh, R., C.D. Raghavendra Gowda, A. Nataraju, B.L. Dhananjaya, K. Kemparaju, & B.S. Vishwanath** (2005) "Procoagulant activity of *Calotropis gigantea* latex associated with fibrin(ogen)olytic activity", *Toxicon* **46**: 84-92.
- Rao, M.B., A.M. Tanksale, M.S. Ghatge, & V.V. Deshpande.** (1998). "Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases", *Microbio. Mol. Biol. Rev.*, **62**: 597-635.
- 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.
- Rawlings, N.D., F.R. Morton, & A.J. Barret** (2006) "MEROPS: the peptidase database", *Nucleic Acids Res.* **34**: D270-D272.

- 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**, 221-225.
- Ruiz Leal, A.** (1972) "Los confines boreal y austral de las provincias patagónica y central respectivamente", *Bol. Soc. Argent. Bot.* **13**: 89-118.
- Sakuta, C., A. Oda, M. Konishi, S. Yamakawa, H. Kamada, & S. Satoh** (2001) "Cysteine proteinase gene expression in the endosperm of germinating carrot seeds", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**, 2243-2248.
- Salvesen, G. & H. Nagase** (2001) "Inhibition of proteolytic enzymes" en "Proteolytic enzymes" (R.J. Beynon, and J.S. Bond, eds.), Oxford University Press Inc NY, pp. 105-30.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, & T. Maniatis** (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarath, G., M.G. Zeece, & A.R. Penheiter** (2001) "Protease assay methods, en Proteolytic enzymes (R.J. Beynon & J.S. Bond, eds.), Oxford University Press, NY, USA, pág.47-48.
- Sato, S., Y. Nakamura, T. Kaneko, T. Katoh, E. Asamizu, H. Kotani, & S. Tabata**, (2000) "Structural analysis of *Arabidopsis thaliana* chromosome 5. X. Sequence features of the regions of 3,076,755 bp covered by sixty P1 and TAC clones" *DNA Res.* **7**, 31-63.
- Schägger, H. & G. von Jagow** (1987) "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa", *Anal. Biochem.* **166**: 368-79.
- Schechter, I & A. Berger** (1967) "On the size of the active site in proteases", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**: 157-62.
- 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.

- Schwede, T, J. Kopp, N. Guex, & M.C. Peitsch** (2003) "SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server", *Nucleic Acids Res.* **31**: 3381-3385.
- Scopes, R.K.** (1984) "Protein purification. Principles and practice", Springer-Verlag, N.Y., pág. 219.
- Seemüller, E., A. Lupas, D. Stock, J. Löwe, R. Huber, & W. Baumeister** (1995) "Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease", *Science* **268**: 579-582.
- Sequeiros, C., L.M.I. López, N.O. Caffini, & C.L. Natalucci** (2003) "Proteolytic activity in some Patagonian plants from Argentina", *Fitoterapia* **74**, 570-577.
- Sequeiros, C., M.J. Torres, S.A. Trejo, J.L. Esteves, C.L. Natalucci & L.M.I. López** (2005) "Philibertain g I, the most basic cysteine endopeptidase purified from the latex of *Philibertia gilliesii* Hook. et Arn. (*Apocynaceae*)", *Protein J.* **24**: 445-453.
- Serpe, M.D., A.J. Muir, & A.M. Keidel** (2001) "Localization of cell wall polysaccharides in nonarticulated laticifers of *Asclepias speciosa* Torr.", *Protoplasma* **216**: 215-26.
- Serpe, M.D., A.J. Muir, & A. Driouich** (2002) "Immunolocalization of β -D-glucans, pectins, and arabinogalactan-proteins during intrusive growth and elongation of nonarticulated laticifers in *Asclepias speciosa* Torr.", *Planta* **215**: 357-70.
- Sgarbieri, V.C., S.M. Gupte, D.E. Kramer, & J.R. Whitaker** (1964) "Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus carica* and *Ficus glabrata*", *J. Biol. Chem.* **239**: 2170–2177.
- Silva, S.V. & F.X. Malcata** (1999) "On the activity and specificity of cardosin B, a plant proteinase on ovine caseins", *Food Chem.* **67**: 373-8.
- Solomon, M., B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem, & A. Levine** (1999) "The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants", *Plant Cell* **11**: 431-43.

- Soriano, A.** (1983) "Deserts and semi-deserts of Patagonia", en "Temperate deserts and semi-deserts. Ecosystems of the World" (West, N.E., ed.), Vol. 5. Págs. 423-60. Elsevier, Amsterdam.
- Steinke, F.H., D.H Waggle, & M.N. Volgarev** (1992) "New protein foods in human health: nutrition, prevention and therapy", CRC Press., Florida.
- Stennicke, H.R. & G.S. Salvesen** (2000) "Caspases controlling intracellular signals by protease zymogen activation", *BBA Protein Struct. M.* **1477**: 299-306
- Sundd, M., S. Kundu, G.P. Pal, & M.V. Jagannadham** (1998) "Purification and characterization of a highly stable cysteine protease from the latex of *Ervatamia coronaria*", *Biosci. Biotech. Biochem.* **62**: 1947 –1955.
- Tavaria, F.K., M.J. Souza, A. Domingos, F.X. Malcata, P. Brodelius, A. Clemente, & M.S. Pais** (1997) "Degradation of caseins from milk of different species by extracts of *Centaurea calcitrapa*", *J. Agric. Food Chem.* **45**: 3760-5.
- Taylor, M .A., K.C. Baker, G.S. Briggs, I.F. Connerton, N.J. Cummings, K.A. Pratt, D.F. Revell, R.B. Freedman, & P. W. Goodenough,** (1995) "Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes", *Protein Eng.* **8** (1), 59-62.
- Thakurta, P.G., S. Biswas, C. Chakrabarti, M. Sundd, M.V. Jagannadham, & J.K. Dattagupta** (2004) "Structural Basis of the Unusual Stability and Substrate Specificity of Ervatamin C, a Plant Cysteine Protease from *Ervatamia coronaria*", *Biochemistry*, **43**: 1532-1540.
- 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.
- Thompson, J.D., T.J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, & D.G. Higgins,** (1997) "The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for

- multiple sequence alignment aided by quality analysis tools” *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Torres**, M.J. becaria de Formación de Postgrado CONICET, Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LIPROVE). Fac. de Cs. Exactas-UNLP (comunicación personal, 2005)
- Trejo**, S.A., L.M.I. López, C.V. Cimino, N.O. Caffini, & C.L. Natalucci (2001) “Purification and characterization of a new plant endopeptidase isolated from the latex of *Asclepias fruticosa* L. (*Asclepiadaceae*)” *J. Protein Chem.* **20**: 469-77.
- Trejo**, S.A. (2005) “Purificación, caracterización bioquímica y estructural y expresión de una endopeptidasa cisteínica de látex de *Asclepias fruticosa* L. (*Apocynaceae*)”, Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Tupý**, J. (1969) “Nucleic acids in latex and production of rubber in *Hevea brasiliensis*”, *J. Rubber. Res. Inst. Malaya* **21**: 468-76
- Uhlig**, H. (1998) “Industrial enzymes and their applications”, Wiley-Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., NY, Toronto, USA. pp. 351-357; 369-374.
- Vairo Cavalli**, S.E., A. Cortadi, M.C. Arribére, P. Conforti, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2001) “Comparison of two cysteine endopeptidases from latices of *Morrenia brachystephana* Griseb. and *Morrenia odorata* (Hook et Arn.) Lindley (*Asclepiadaceae*)”, *Biol. Chem.* **382**: 879-883.
- Vairo Cavalli**, S.E., M.C. Arribére, A. Cortadi, N.O. Caffini, & N.S. Priolo (2003) “Morrenain b I, a papain-like endopeptidase from the latex of *Morrenia brachystephana* Griseb. (*Asclepiadaceae*)”, *J. Protein Chem.* **22**: 15-22.
- van der Hoorn**, R.A.L. & J.D.G. Jones (2004) “The plant proteolytic machinery and its role in defence”, *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**: 400-7.
- van der Hoorn**, R.A.L, M.A. Leeuwenburgh, M. Bogyo, M.H.A.H. Joosten, & S.C. Peck (2004) “Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants”, *Plant Physiol.* **135**: 1170-8.

- Varughese, K.I., Y. Su, D. Cromwell, S. Hasnain, & N.H. Xuong** (1992) "Crystal structure of an actinidin-E-64 complex", *Biochemistry* **31** (22), 5172-5176.
- Vila, A.R. & C. Bertonatti** (1993) "Situación ambiental de la Argentina". Fundación Vida Silvestre Argentina, Bol. Técn. Buenos Aires.
- Visser, S.** (1993) "Proteolytic enzymes and their relation to cheese ripening and flavor: an overview", *J. Dairy Sci.* **76**: 329-50.
- 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.
- Westergaar, J.L., C. Hackbarth, M.W. Treuhaf, & R.C. Roberts** (1980) "Detection of proteinases in electrophoretograms of complex mixtures", *J. Immunol. Meth.* **34**: 167-75.
- Wheeler, D.L., C. Chappey, A.E. Lash, D.D. Leipe, T.L. Madden, G.D. Schuler, T.A. Tatusova, & B.A. Rapp** (2000) "Database resources of the National Center for Biotechnology Information", *Nucleic Acids Res.* **28**:10-14.
- Wilson, K.J., C.L. Nessler, & P.G. Mahlberg** (1976) "Pectinase in *Asclepias* latex and its possible role in laticifer growth and development", *Am. J. Bot.* **63**: 1140-4.
- Wilson, K.J. & P.G. Mahlberg** (1978) "Ultrastructure of non-articulated laticifers in mature embryos and seedlings of *Asclepias syriaca* L. (*Asclepiadaceae*)", *Am. J. Bot.* **65**: 98-109.
- Wilson, K.J. & P.G. Mahlberg** (1980) "Ultrastructure of developing and mature nonarticulated laticifers in the milkweed *Asclepias syriaca* L. (*Asclepiadaceae*)", *Am. J. Bot.* **67**: 1160-70.
- Wiśniewski, K. & B. Zagdańska** (2001) "Genotype-dependent proteolytic response of spring wheat to water deficiency", *J. Exp. Bot.* **52**: 1455-63.
- Zhao, C., B.J. Johnson, B. Kositsup, & E.P. Beers** (2000) "Exploiting secondary growth in *Arabidopsis*. Construction of xylem and bark cDNA

libraries and cloning of three xylem endopeptidases”, *Plant Physiol.* **123**: 1185-96.