



Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

Trabajo Final Laboratorio de Procesos Biotecnológicos

“Identificación de inhibidores peptídicos de proteasas con potencial aplicación biomédica obtenidos a partir de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Malcacha (papa andina)”.

Julia Martín

Director: Dr. W. David Obregón

Codirectora: Dra. Constanza Liggieri

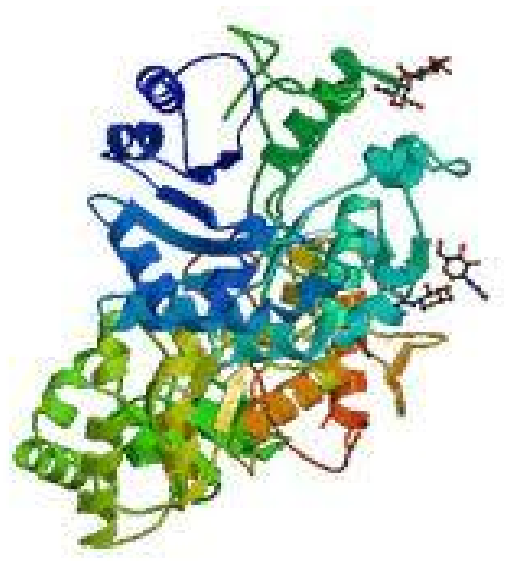
Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales
(LIPROVE)

ÍNDICE:

	Pág
Introducción.....	4
1. Las proteasas.....	5
1.1. Importancia de las proteasas.....	5
1.2. Clasificación.....	6
2. Inhibidores de proteasas.....	6
2.1. Tipos de inhibidores de proteasas.....	7
2.1.1. Inhibidores de cisteín proteasas.....	7
Inhibidores de aspartil proteasas.....	8
2.1.2. Inhibidores de serín proteasas.....	8
2.1.3. Inhibidores de metalocarboxiproteasas.....	10
2.2. Inhibidores de proteasas vegetales.....	11
2.2.1. Localización.....	11
2.2.2. Mecanismo de acción.....	12
2.2.3. Función.....	12
2.2.4. Aplicación y uso terapéutico.....	14
3. Objetivos.....	16
4. Materiales y Métodos.....	17
4.1 Material de partida.....	18
4.2 Obtención del extracto crudo.....	19
4.3 Cuantificación de proteínas por Bradford.....	19
4.4 Actividad inhibitoria sobre diferentes proteasas de distinto tipo meca- nístico.....	20
4.4.1 Determinación de actividad inhibitoria de cisteín proteasas.....	21
4.4.2 Determinación de actividad inhibitoria de serín proteasas.....	22
4.4.3 Determinación de actividad inhibitoria de metalocarboxiproteasas.....	23
4.5 Tratamiento térmico del extracto crudo.....	
4.6 Caracterización proteica.....	24
4.6.1 Electroforesis.....	25

4.6.2 Isoelectroenfoque.....	29
4.6.3 Estabilidad frente al pH.....	32
4.6.4 Estabilidad a distintas fuerzas iónicas.....	33
4.7 Metodologías de purificación.....	34
4.7.1 Cromatografía de afinidad utilizando tripsina inmovilizada.....	34
4.7.1.1 Inmovilización sobre gel de agarosa.....	34
4.7.1.2 Verificación de la actividad de la tripsina inmovilizada.....	35
4.7.1.3 Purificación a baja escala empleando micro columnas de Tripsina-agarosa.....	36
4.8 Análisis de la huella Peptídica o PMF/MALDI-TOF/MS.....	37

H
N
H
R
O
D
C
C
C
H
O
N



Las proteasas:

Las enzimas proteolíticas, o proteasas, son enzimas que catalizan la ruptura hidrolítica de enlaces peptídicos específicos en sus proteínas blanco. Estas enzimas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y microorganismos (Christeller, 2005; Haq *et al.*, 2004; Joanitti *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2002; Mosolov *et al.*, 2001b; Mosolov *et al.*, 2005; Neurath, 1989; Ryan, 1990; Supuran *et al.*, 2002; Valueva *et al.*, 2004).

En base a un análisis de secuencias completas de varios genomas, se estima que alrededor del 2% de todos los productos génicos son proteasas (Barrett *et al.*, 1998).

Importancia de las proteasas:

Las proteasas juegan un papel fundamental en casi todos los procesos biológicos. La digestión de proteínas de los alimentos, la apoptosis, coagulación de la sangre y las cascadas de señalización celular son algunos de los procesos en los que estas moléculas participan escindiendo proteínas o pro-enzimas (Ivanov *et al.* 2006).

Las proteasas han sido ampliamente usadas en la industria farmacéutica (Caffini *et al.*, 1988), ya que varias de ellas poseen actividades anti-inflamatorias y anti cancerígenas, entre otras (Dubey *et al.*, 2003; Sundd *et al.*, 1998). También son usadas en la generación de péptidos activos, esto es, con capacidades antioxidantes, antihipertensivas, etc., así como también en la producción de péptidos con propiedades funcionales realizadas tales como la solubilidad, la capacidad de formar espuma y la actividad emulsionante, entre otras.

Se ha demostrado que las proteasas participan en procesos que conducen al desarrollo de enfermedades de fuerte impacto social. Entre las principales enfermedades en las que aparecen involucradas las enzimas proteolíticas pueden mencionarse el cáncer, el SIDA (Baltimore *et al.* 1998; Bartlett *et al.* 1998), el asma (Katz *et al.* 1998; Rice *et al.* 1998, Agusti *et al.*, 1998; Mulligan *et al.* 2000), la malaria (Dahlgren *et al.* 2003; Rosenthal *et al.* 1998;) y el mal de Alzheimer (Maccioni *et al.* 2001; Roberts *et al.* 2002).

Por tal motivo también se ha despertado el interés por obtener o diseñar inhibidores que puedan actuar como agentes terapéuticos teniendo como "blanco" a las proteasas intervinientes en las citadas patologías.

El proceso proteolítico está involucrado en la movilización de proteínas tisulares, en la regulación del metabolismo de proteínas intracelulares y en el procesamiento de neuropéptidos y funciones neurales. Los inhibidores de proteasas, en cambio, controlan a las proteasas y son esenciales para la regulación fisiológica. Tales inhibidores de proteasas son pseudosustratos con afinidad hacia el sitio catalítico de las enzimas (Huber *et al.* 1993).

Clasificación de las proteasas:

Las proteasas, pertenecientes al grupo de las hidrolasas, se clasifican a su vez según su mecanismo catalítico en cuatro clases principales: serín, cisteín, aspártico y metalo proteasas. Las primeras tres clases reciben su nombre de acuerdo con los aminoácidos que forman parte de la conformación de su sitio activo y las metalo proteasas requieren iones metálicos para su actividad (Barrett, 1986).

Posteriormente, se describieron la treonín y la glutámico proteasa que utilizan treonina y ácido glutámico respectivamente, para formar la tríada catalítica (Rawlings *et al.*, 2008).

Inhibidores de proteasas:

Los inhibidores de proteasas (IPs) son usualmente pequeños polipéptidos que inhiben la acción de las proteasas. Se encuentran ampliamente distribuidos en varios tejidos de animales, plantas y microorganismos (Laskowski *et al.*, 1980).

Los IPs juegan importantes roles básicos, entre los que se destaca la función de prevenir la proteólisis en sitios donde esta actividad no debe producirse, así como también cumplen funciones regulatorias con el fin de garantizar una proteólisis parcial en un evento fisiológico determinado (Bode *et al.*, 2000). Se debe mencionar que algunos IPs podrían desempeñar un importante rol en la defensa contra las proteasas de presas y depredadores, como en el caso de los invertebrados marinos (Castañeda *et al.*, 1995; Mebs *et al.*, 1980; Sencic *et al.*, 1990; Shiomi *et al.*, 1985).

Los inhibidores de proteasas tienen la habilidad de inhibir enzimas proteolíticas, compitiendo con los sustratos por el sitio activo. Esto ha sido observado en proteinasas digestivas de mamíferos e insectos, así como también en enzimas bacterianas y fúngicas (Clemente *et al.*, 2006).

Esto ha convertido a los IPs en moléculas muy atractivas, no solo como herramientas valiosas en el establecimiento de relaciones estructura- función, si no también, debido a sus múltiples aplicaciones biotecnológicas y biomédicas (Birk, 2003; Hugli, 1996; Van Noorden, 1997; Zingali *et al.*, 1993).

Tipos de IPs:

Los IPs se encuentran divididos en cuatro grandes clases mecanísticas: inhibidores de serín proteasas, inhibidores de cisteín proteasas, inhibidores de aspartil proteasas e inhibidores de metalo proteasas; a excepción de las alfa-2-macroglobulinas que inhiben proteasas de todas las clases. (Hartley *et al.*, 1960).

IPs pertenecientes a dichas clases mecanísticas han sido además clasificados en 48 familias (Rawlings *et al.*, 2004), basadas en homologías en las secuencias aminoacídicas, relaciones topológicas entre los puentes disulfuro y la localización de los sitios reactivos (descriptos previamente por Laskowski y Kato, 1980).

Inhibidores de cisteín proteasas:

Los inhibidores de proteasas cisteínicas pueden actuar tanto intra como extracelularmente formando complejos con la enzima blanco. El mantenimiento de un equilibrio apropiado entre las proteasas cisteínicas libres y los complejos formados con sus inhibidores, es un evento crítico para el funcionamiento correcto de todos los sistemas vivos. De esta forma, son reguladores generales de enfermedades perjudiciales en las que las cisteín proteasas son los principales agentes de acción (Henskens *et al.*, 1996 y Grubb, 2000).

Este tipo de inhibidores pertenecen a una superfamilia de proteínas, subdividida a su vez, en cuatro familias: las estefinas, las cistatinas, los quinínógenos y las fitocistatinas (Turk *et al.* 1991). Las estefinas de 11 kDa, son proteínas predominantemente intracelulares que carecen de enlaces disulfuro; las cistatinas de 11-13 kDa contienen dos enlaces disulfuro en el extremo carboxilo-terminal del polipéptido; los quinínógenos de 60-120 kDa, están compuestos de tres cistatinas unidas en tándem; y por último las fitocistatinas de 5-87 kDa que presentan características similares a las encontradas en las subfamilias de las cistatinas (Turk *et al.* 1997).

Inhibidores de aspartil proteasas:

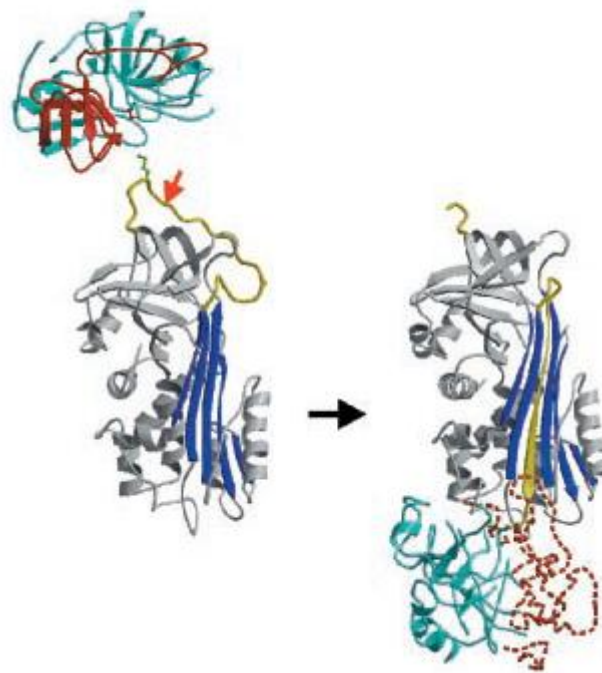
Los inhibidores de aspartil proteasas se caracterizan porque actúan a pH bajo y tienen dos residuos de ácido aspártico en su centro reactivo (Ryan, 1990). Estos inhibidores se unen a la hendidura del sitio activo de la enzima mediante enlaces de hidrógeno formados entre el oxígeno carbonilo de los aminoácidos (D-T-G-S) de la enzima y los grupos amida de los aminoácidos del enlace escindible del inhibidor (Pearl, 1987).

Estos inhibidores son escasos en la naturaleza y se han aislado de pocas plantas entre las cuales están: *Scopolia japonica* (Sakato *et al.*, 1975); *Triticum aestivum* (Galleschi *et al.*, 1997); *Solanum lycopersicum* (Cater *et al.*, 2002); *Solanum tuberosum* (Maganga *et al.*, 1992; Mares *et al.*, 1989; Ritonja *et al.*, 1990), *Cucurbita máxima* (SQAPI) (Christeller *et al.*, 1998), *Anchusa strigosa* (Abuereish, 1998) y *V. radiata* (VrAPI) (Kulkarni, 2009). Esto contrasta con el gran número de inhibidores de serín y cisteín proteinasas que han sido descubiertos (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Macedo *et al.*, 2007b; Ramos *et al.*, 2009; Richardson, 1991).

Inhibidores de serín proteasas:

Los inhibidores de serín proteasas están agrupados en numerosas familias, de las cuales citaremos 3 de las más importantes; a) Las serpinas ("Ser"ine "P"rotease "In"hibitors), b) Los inhibidores de tipo Bowman-Birk y c) Los inhibidores de tipo Kunitz.

Los primeros comprenden una familia de proteínas que antagonizan la actividad de dichas proteasas por un mecanismo conservado (Miranda *et al.*, 2006; y Ricagno *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). En dicho mecanismo, las serpinas presentan una secuencia péptido que imitaría al sustrato, en el bucle del centro reactivo, de su proteasa blanco. El clivaje de dicho bucle, desencadena un cambio conformacional que genera la translocación de la proteasa unida, desde la parte superior a la inferior de la molécula de serpina. Simultáneamente, parte del bucle truncado, se inserta en la lámina-beta A de la serpina, inactivando así la proteasa de forma irreversible.



En la figura de la izquierda puede observarse, mediante una representación de cintas, la región de la proteasa (turquesa y rojo) interaccionando con el inhibidor (cintas azules y grises con “loop” amarillo), de manera que una queda alineada sobre la otra. A la derecha se muestra el complejo formado entre ambas moléculas luego de la interacción, mostrando una completa incorporación del bucle truncado en el centro activo (amarillo), quedando incorporado en el medio de la lámina A de la serpina (azul).

Los inhibidores de serín proteasas aislados de muchas semillas de legumbres, en su mayoría pertenecen a inhibidores pertenecientes tanto a la familia de los Kunitz como de los Bowman-Birk (BBIs).

La masa molecular de los inhibidores tipo Kunitz, es alrededor de 20 kDa. Los mismos contienen cuatro residuos de cisteína, formando dos puentes disulfuro y un sitio reactivo único (Richardson, 1991).

Por otro lado, aquellos inhibidores ubicados dentro de la familia de inhibidores Bowman-Birk, presentan masas moleculares menores, entre 6 y los 9 kDa. En general cuentan con una sola cadena polipeptídica, con un patrón característico y conservado de catorce residuos cisteínicos, responsables de los siete puentes disulfuro intracatenarios. Estos últimos permiten el mantenimiento de la estabilidad y de la estructura doble cabeza de los BBI (Clemente, 2006; Qi *et al.*, 2005). Dichas cabezas ubicadas en lados opuestos, unen de forma independiente o simultánea, tripsina y quimiotripsina (Singh, 2002).

Todas estas familias de inhibidores han sido estudiadas por sus efectos en la coagulación, hemostasia y hemodinámica, e inflamación y cicatrización de heridas. (Cirino *et al.*, 1996; Coughlin, 2000; Di Cera, 2009; Kaneider *et al.*, 2007; Leger *et al.*, 2006; Macfarlane *et al.*, 2001; Molinari *et al.*, 2003; Niessen *et al.*, 2008; y Wang *et al.*, 2008). Durante la última década se ha vuelto más evidente que estas proteínas pueden encontrarse, además de expresadas en varios tipos de células, de forma endógena en el sistema nervioso central (SNC), sugiriendo un posible rol en la fisiología normal y en los estados de enfermedad de dicho tejido.

Varios grupos han demostrado así que estas moléculas inhibitoras pueden influir en la función y comportamiento sináptico. Además, una actividad aberrante de dichos inhibidores contribuyen de forma importante en la generación de determinados trastornos neurológicos, como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson, y accidente cerebro vascular (Akiyama *et al.*, 1992; Cinelli *et al.*, 2001; Fabbro y Seeds, 2009; Hamill *et al.*, 2007; Junge *et al.*, 2003; Nicole *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 2004).

Inhibidores de metalocarboxipeptidasas:

A diferencia de la amplia distribución en la naturaleza con la que se presentan la mayoría de los inhibidores de endopeptidasas, los inhibidores naturales de las carboxipeptidasas pancreáticas, se han purificado solamente a partir de tubérculos de papa (Rancour JM, CA Ryan 1963), parásitos intestinales del hombre (Homandberg GA, RJ Peanasky 1976) y tomate (Hass GM, CA Ryan 1980). Uno de los mecanismos de inhibición encontrados para un tipo de inhibidor de esta clase, es el que se da con la molécula de PCI (“potato carboxipeptidase inhibitor”, inhibidor de carboxipeptidasa de papa), el cual se basa en la interacción de su secuencia aminoacídica carboxilo terminal con la ranura del sitio activo de la enzima imitando la unión del sustrato a este sitio (Vendrell, 2000).

Inhibidores de proteasas vegetales:

En las plantas, los inhibidores de proteasas se encuentran generalmente tanto como componentes constitutivos en tejidos de almacenamiento como semillas y tubérculos o expresadas en respuesta a pestes o a ataques patógenos (Ryan, 1990).

En general los IPs de plantas presentan una masa molecular entre 4 a 85 kDa, aunque la mayoría están en el rango de 8 a 20 kDa (Ryan, 1990, Hung *et al.*, 2003). Estos inhibidores tienen usualmente un alto contenido de residuos de cisteína que forman puentes disulfuro, lo cual los hace resistentes al calor, a pHs extremos y a la proteólisis (Richardson, 1991; Greenblatt *et al.*, 1989; Fan y Xu, 2005). Por ejemplo, el inhibidor de tripsina (BCTI) de peso molecular 8 kDa, que fue purificado de semillas de *Brassica campestris*, es un tipo de inhibidor de tripsina de tipo Bowman–Birk, termoestable que inhibe la tripsina en una proporción molar de 1:1. La estabilidad de BCTI está aparentemente relacionada con la presencia de puentes disulfuro (Hung *et al.*, 2003).

En semillas, los IPs mantienen procesos fisiológicos como la regulación de los niveles de proteasas endógenas (Chye *et al.*, 2006), proteínas de almacenamiento (Mandal *et al.*, 2002), estabilización de las enzimas durante la fase de desecación (Lam *et al.*, 1999) y proteger a ellos mismos de las pestes (Haq *et al.*, 2004) y microorganismos invasivos (Mosolov y Valueva, 2006). Los IPs también colaboran en la regulación de la muerte celular programada.

Los IPs son pequeñas proteínas regulatorias, generalmente presentes en alta concentración; el contenido en plantas pueden variar entre el 1 y más del 10 % del total de proteínas solubles y se presentan en prácticamente todas las leguminosas, particularmente la soja, que contiene inhibidores de tipo Kunitz y Bowman-Birk (Whitaker, J. R., 1997).

Localización de los IPs:

Muchos de los IPs que han sido caracterizados pertenecen a las familias de las Gramíneas (*Poaceae*), Leguminosas (*Fabaceae*) y Solanáceas (Brzin *et al.*, 1995).

Como habíamos mencionado anteriormente, los IPs se encuentran usualmente en órganos de almacenamiento, como semillas y tubérculos, pero su aparición en la parte aérea de las plantas, como consecuencia de varios estímulos, también ha sido ampliamente documentada (De Leo *et al.*, 2002). Un número cada vez mayor de inhibidores de proteasas se encuentra en tejidos que no son de almacenamiento tales como hojas, flores y raíces (Brzin *et al.*, 1995; Sin *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2001).

En cuanto a la localización intracelular, solo unos pocos IPs de plantas han sido investigados. Un inhibidor de tripsina fue encontrado en el citosol de las células de los cotiledones de mung bean (brote de soja) (Chrispeels *et al.*, 1978).

Mecanismo de inhibición:

Tal como se citó anteriormente, la actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuro, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Bode *et al.* 1992; Iwanaga *et al.* 2005). Dicha actividad proteolítica puede ser regulada a múltiples niveles incluyendo la transcripción génica y el control sobre la maduración de los zimógenos (proenzimas) inactivos. Una vez activos, otro nivel de control involucra directamente la inhibición por inhibidores de proteasas endógenos (Fluhra *et al.*, 2011).

El proceso de inhibición puede darse mediante dos mecanismos alternativos, mecanismo reversible o mecanismo irreversible. Los inhibidores con mecanismos irreversibles cambian la conformación de la enzima al unirse a la misma, cortan un enlace peptídico interno y se unen de manera covalente; ni el inhibidor ni la enzima pueden participar en futuras reacciones. En reacciones reversibles, el inhibidor se une directamente al sitio activo de la proteasa; esta reacción es reversible y el inhibidor puede disociarse de la enzima tanto en estado virgen o luego de una modificación por la proteasa (Rawlings *et al.* 2004).

Función de los inhibidores de proteasas vegetales:

La principal función de los IPs de plantas se cree que es de defensa y de regulación de las proteinasas endógenas, pero también pueden funcionar como proteínas de almacenamiento (Birk, 2003; Mosolov *et al.*, 2001; Shewry, 2003).

La actividad de los IPs, se debe a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco en el tracto digestivo reduciendo así la habilidad del agente invasor a usar sus proteínas (Bode *et al.*, 1992; Iwanaga *et al.*, 2005; Norton, 1991; Srinivasan *et al.*, 2005).

La producción de estos inhibidores está altamente regulada por una ruta de transducción de señales que es iniciada por el ataque del patógeno y transducida como

una respuesta al daño. En plantas, los IPs se acumulan durante la maduración de la semilla, y se ha argumentado que la maduración de semillas es un indicador de su función de defensa.

El papel de los inhibidores en la regulación de las actividades proteolíticas es muy importante por la protección que proporcionan a tejidos y fluidos de la degradación no deseada, desempeñando un papel importante en la defensa de las plantas. Con el ataque de herbívoros se inicia la respuesta de defensa de la planta que incluye la inducción de la expresión de genes de inhibidores de proteasas que pueden estar ligados directamente con la resistencia al ataque del insecto. La inducción de expresión de genes de inhibidores de proteasas ocurre tanto en células del sitio del daño, como en lugares distantes a ese sitio. La respuesta de defensa puede incluir la expresión de múltiples inhibidores de proteasas que pueden inhibir un amplio número de proteasas digestivas del herbívoro.

Además, muchas plantas producen compuestos que actúan como defensas específicas naturales contra plagas y patógenos. Los péptidos antimicrobianos proveen la primera línea de defensa contra microorganismos invasores tanto en plantas como animales. Los péptidos en el rango de 15 a 40 aminoácidos de largo, de los cuales la mayoría son hidrofóbicos y catiónicos, están generalmente relacionados en la inmunidad innata. Tales péptidos proveen protección contra bacterias, hongos y virus, actuando sobre las paredes celulares de los patógenos (Kim *et al.* 2009).

Por esto, podemos decir que los IPs son una de las más importantes clases de proteínas de defensa en las plantas. Se han descrito IPs de plantas que actúan frente a proteasas de los principales grupos mecanísticos (De Leo *et al.* 2002). También la inmunidad innata es una estrategia de defensa ancestral usada por organismos multicelulares para controlar la flora natural y combatir patógenos (Kim *et al.* 2009). Dentro de los inhibidores que están relacionados con la resistencia de las plantas a los patógenos se han observado elevados niveles de inhibidores de tripsina y quimotripsina. La síntesis de polipéptidos inhibitorios en respuesta a ataques por proteasas producidas por microorganismos patógenos fue observada por primera vez en tomates infectados por *Phytophthora infestans*, en el cual se encontraron niveles elevados de inhibidores de tripsina y quimotripsina relacionados con la resistencia de las plantas al patógeno. Estudios posteriores mostraron que tubérculos de papas acumulan inhibidores proteicos de serín proteasas de 20 a 24 kDa en respuesta a heridas mecánicas e infección por *P. infestans* (Kim *et al.* 2009).

La acumulación de los IPs es elicitada por varios tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, incluyendo heridas mecánicas, ataque de insectos, ataque de patógenos y/o exposición a radiaciones UV. Respecto al daño mecánico, los fragmentos de pectinas que son liberados de la pared celular de la planta, y los oligómeros de quitosanos derivados de la pared celular de hongos, se asume que actúan como inductores extracelulares de la ruta de señales que dirige a la expresión de genes de inhibidores de proteasas. Los polisacáridos inductores no parecen ser inmóviles en la planta, por lo que es probable que estas moléculas únicamente induzcan en forma local la expresión de genes de inhibidores de proteasas. La magnitud de respuesta de defensa es mucho mayor en plantas atacadas por insectos que en plantas dañadas mecánicamente.

Dentro de los compuestos que se expresan durante el estrés podemos destacar a algunas “moléculas señal” tales como sistemina, metil jasmonato, etileno, ácido abscísico, oligómeros de la pared celular fúngica, y la conjugación ácidos grasos-aminoácidos encontrada en la secreción oral de larvas.

Otro ejemplo de su función como defensa es que algunos de los IPs de las plantas ingeridos inhiben proteasas digestivas del insecto herbívoro atacante, imponiendo un estrés fisiológico que retarda el crecimiento y desarrollo e incrementa la mortalidad (Horn *et al.* 2005).

Aplicación y uso terapéutico

Ha generado un gran interés que los inhibidores de proteasas de plantas pudieran ser usados a nivel comercial. Ya por el año 1991, los IPs de plantas habían sido usados como terapéuticos en diferentes enfermedades y en distintas aplicaciones en los laboratorios de investigación farmacológica (Richardson, 1991; Birk, 1993; Troll *et al.*, 1993; Banerji, 1994; Abdel-Meguid *et al.*, 2000; Leung *et al.*, 2000; Mendes-Silva *et al.*, 2003; Neuhof *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004).

Se ha observado que los IPs de muchas plantas inhiben potencialmente el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas y fúngicas patógenas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el uso como compuestos principales para el desarrollo de numerosos agentes antimicrobianos (Kim *et al.* 2009). Cocktels de inhibidores de proteasas son adicionados rutinariamente en muestras clínicas para ser usados en estudios proteómicos para inactivar proteasas (Jedinak *et al.* 2005), infecciones

parasitarias, fúngicas y virales (Dalton *et al.* 1997), malaria (Dahlgren *et al.* 2003), candidiasis (Abad-Zapatero *et al.* 1998), SIDA (Patick *et al.* 1998), hepatitis (Lin *et al.* 2004), herpes (Clercq, 2004), afecciones inflamatorias (Bilfinger *et al.* 2002) y respiratorias (Cataldo *et al.* 2003; Hugli 1996), cardiovasculares (Boos 2004), coagulopatías (Gladwell 2002) y la enfermedad de Alzheimer (Vassar *et al.* 1999).

La utilización de inhibidores de proteasas en el tratamiento contra el cáncer comenzó como estudios epidemiológicos en donde se podía observar que en las poblaciones vegetarianas alimentadas con leguminosas, la incidencia de cáncer de mamas, colon y próstata era menor (Fontham *et al.* 1993), lo que luego abrió el camino para nuevos estudios en los que se utilizaban inhibidores extraídos de dichas especies vegetales.

Muchos estudios han comprobado que estos inhibidores tienen propiedades supresoras sobre diferentes etapas de distintos tipos de cáncer. El tratamiento con el inhibidor de tripsina y quimotripsina a células irradiadas con rayos X ha disminuido claramente la transformación de las células por esta radiación con respecto a los controles (Yavelow *et al.* 1985).

Otros estudios con células cancerígenas indicaron que los inhibidores actúan sobre diferentes proteasas serínicas que están implicadas en las cadenas de señalización de este tipo de células (Billings *et al.* 1992; Gueven *et al.* 1998; Habres *et al.* 1992).

Por otra parte, otro tipo de aplicación potencial de los inhibidores de proteasas podría ser su utilización para una mejor protección de los cultivos, que se consigue utilizando combinaciones de inhibidores, como se ha visto con los inhibidores de proteasas de tipo I y II de la papa, producidos por plantas solanáceas como un mecanismo de defensa contra insectos y microbios. (Dunse *et al.* 2010).

OBJETIVOS:

- a) Obtener extractos crudos a partir de extractos vegetales de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “Malcacha”.
- b) Detectar actividad inhibitoria de proteasas en los extractos obtenidos.
- c) Caracterizar bioquímicamente el extracto crudo mediante electroforesis, isoelectroenfoque, contenido protéico, estabilidad térmica, estabilidad a pH extremos, entre otros ensayos.
- d) Diseñar una matriz de afinidad para inmovilizar tripsina en soportes de glioxil-agarosa.
- e) Purificar cromatográficamente inhibidores de proteasas (IPs) utilizando los soportes de afinidad diseñados previamente.
- f) Identificación de los inhibidores de proteasas mediante alguna técnica proteómica como Peptide Mass Fingerprint (PMF).
- g) Comparación de los inhibidores purificados obtenidos con los inhibidores de *Solanum tuberosum* previamente reportados.

MATERIALES

y

MÉTODOS



I) Material de partida

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum*, subespecie *andigenum*, variedad Malcacha. El nombre vulgar de esta especie es “papa andina”. Desde el punto de vista de los cultivos andinos, podríamos decir que nos encontramos frente a una región que presenta una amplia diversidad de ambientes propicios para el cultivo de estas especies, cuyas áreas abarcan las regiones de la Puna, la Quebrada de Humahuaca y los Valles de altura de la Cordillera de los Andes.

S. tuberosum es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia, de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura. El tubérculo es un tallo subterráneo y se halla engrosado a partir de los rizomas (el otro tipo de tallo subterráneo), para funcionar como un órgano de almacenamiento de nutrientes pudiendo presentar una forma alargada, redondeada u oblonga (ovalada); su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo. En dichos tubérculos se encuentran almacenados, entre otras cosas, inhibidores de proteasas (Dimitri *et al.* 1987).

Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Genero	Solanum
Especie	<i>S. tuberosum</i>

Nombre Binomial: *Solanum tuberosum* L.

Subespecie: *Solanum tuberosum* L.

2) Preparación del extracto crudo

La preparación del extracto crudo (EC) se realizó manteniendo las condiciones de extracción a bajas temperaturas durante todo el proceso de obtención y aislamiento proteico. Dentro de este contexto, los tubérculos de las papas fueron lavados, cortados y pelados en trozos pequeños, y a continuación se procesaron de dos formas distintas:

a) 161 gr. de papas cortadas fueron trituradas en mezclador (mixer), a baja velocidad y siempre manteniendo todo en hielo (dado que al ocurrir la desintegración se genera un aumento de temperatura y provocaría la desnaturalización de los inhibidores buscados), adicionando Dicloro Difenil Tricloro etano (DTT) 0.2 mM (para prevenir la oxidación de polifenoles) y agua bien fría al medio de extracción. Luego se sedimentó el almidón mediante incubación por 30 minutos en heladera. El sobrenadante (SN) fue centrifugado a 1956 x g durante 60 minutos a 4°C en tubos de muestra de 50 ml, usando una centrifuga Hermle Z323K. Posteriormente se transvasaron los SNs a tubos “eppendorf” y se procedió a centrifugar a 13527 g, durante 1 hora a 4°C, utilizando la misma centrifuga. Se recogió este nuevo sobrenadante para luego filtrarlo con filtro orange Sci PES de 0.2 micrómetros con jeringa BD Plastipak de 1 ml. Se recogió el SN en “eppendorf” para su almacenamiento en freezer a – 80°C. De esta manera nos quedamos con lo que hemos de denominar Extracto Crudo a (ECa).

b) En el otro procedimiento, se mezcló la papa procesada (95.03 gr. en este caso), en mezcladora a baja velocidad con DTT 10 mM, PVP 1.5 %P/V y EDTA 5mM (que por distintos mecanismos, y de forma conjunta, previenen la oxidación de polifenoles) en un volumen final de 200 ml. Al igual que en el protocolo anterior, se sedimentó el almidón, por incubación en heladera, durante 30 minutos. Se realizó una primera centrifugación, en tubos de muestra de 50 ml, durante 15 minutos (para sacar lo más grueso) a 1956 x g a 4°C y una segunda centrifugación por 60 minutos a 13527 g. Se recogió el SN en “eppendorfs” para su almacenamiento en freezer a – 80°C, al que denominamos ECb.

3) Cuantificación proteica por el método de Bradford (Bradford 1976)

Para la cuantificación de proteínas, se procedió al uso del método de Bradford, el cual resulta especialmente apto para la valoración de proteínas en extractos vegetales,

que frecuentemente contienen sustancias de naturaleza fenólica que interfieren con el método de Lowry.

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

Las curvas de calibración se confeccionaron utilizando seroalbúmina bovina (Sigma) en el rango de 0,2-1,4 mg/ml para el ensayo estándar y en el de 25-200 µg/ml para el micrométodo. Las diluciones respectivas se realizaron con cloruro de sodio 0,15M con el fin de mantener la fuerza iónica.

En el protocolo seguido para el Macrométodo, se mezclaron 50 µl. de cada una de las muestras (ECb y cada uno de los tratamientos térmicos), se agitó en vórtex y a los 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm.

Macrométodo	Volumen
Reactivo	250 µl.
Muestra	50 µl.
Micrométodo	Volumen
Reactivo	2000 µl.
Muestra	150µl.

4) Actividad inhibitoria sobre diferentes proteasas de distinto tipo mecanístico

Para la determinación de la actividad inhibitoria se utilizaron como blanco específico proteasas comerciales y proteasas obtenidas y caracterizadas en nuestro laboratorio. Para cumplir dicho objetivo se emplearon araujiana y papaína (proteasas cisteínicas), carboxipeptidasa A (metalo-carboxipeptidasa) y tripsina (proteasa serínica).

4.1. Determinación de actividad inhibitoria de proteasas cisteínicas

- Actividad inhibitoria de papaína usando PFLNA como sustrato

El PFLNA (L-Pyroglutamyl-L-phenylalanyl-L-leucine-p-nitroanilida) es un sustrato cromogénico específico para tiol proteasas. Las tiol proteasas hidrolizan al PFLNA con la liberación de p-nitroanilina, estimada espectrofotométricamente por su absorbancia a 410nm. El residuo fenilalanina en la posición P2 de PFLNA cumple con las exigencias de especificidad de las tiol proteasas (Filippova, 1984).

La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la papaína.

Reactivos:

Extracto Crudo(ECb)	150 µl.
Buffer de fosfatos: 0,1M; pH 6,5; KCl 0,3M; EDTA 0,1mM y DTT 3mM.	850 µl.
Papaína de Carica Papaya(Roche) 4,5e ⁻⁸ Dilución 1/100	5 µl.
PFLNA 0,75Mm(Diluido con DMSO)	5 µl.

Se realizaron los blancos correspondientes.

Se preincubó el buffer, la enzima y el inhibidor, durante 5 minutos, previo a la lectura de absorbancia.

- Actividad inhibitoria de araujiaina usando PFLNA como sustrato

Enzima: Araujiaína Hortorum , proveniente de la especie *Araujia hortorum*.

Se siguió el mismo protocolo que para la actividad inhibitoria de papaína.

- Actividad inhibitoria de papaína usando caseína como sustrato

Se empleó caseína, tipo Hammarsten (Research Orgánicos, Cleveland, OH, USA), como sustrato para la determinación de la actividad enzimática de las proteasas contenidas en el extracto crudo.

Reactivos:

Extracto Crudo (ECb)	300 μ l.
Caseína (conteniendo Cys 12 mM en Tris-Hcl 0.1 M pH 8,1).	1100 μ l.
Enzimas: Papaína $4,5e^{-8}$ M (1/300)	100 μ l.

El extracto crudo se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con la solución de papaína. Posteriormente la reacción se llevó a cabo en baño termostático a 42 °C, y se detuvo 20 min después por la adición de 1,8 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Cada tubo de ensayo fue centrifugado a 3.000 x g durante 30 min., y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm (Arribére *et al.*, 1998).

Para expresar la actividad enzimática se definió una unidad arbitraria a la que se llamó unidad caseinolítica (Ucas). Dicha unidad caseinolítica expresa la cantidad de proteasa que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en las condiciones del ensayo (Priolo *et al.*, 1991).

- Actividad inhibitoria de araujaína usando caseína como sustrato

Se siguió el mismo protocolo que con papaína

4.2. Determinación de actividad inhibitoria de proteasas serínicas

A los ECb se les realizaron determinaciones de actividad inhibitoria de proteasas serínicas utilizando tripsina como patrón de seguimiento, y usando BAPNA (N-benzoil-arginina-p-nitroanilida) como sustrato de la proteasa. La actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la tripsina.

Reactivos:

Buffer Tris-Hcl 0,1 M, CaCl ₂ , 50Mm pH=8	1,2 ml.
Tripsina	20 μ l.
Sustrato, BAPNA 20 mM	100 μ l.
Extracto crudo (ECb)	300 μ l.

La interacción específica de la tripsina con el sustrato (BAPNA) se produce a través del residuo de fenilalanina. La hidrólisis de este enlace peptídico genera entre otros productos de reacción, la p-nitroanilina, de color amarillo, lo que permite seguir espectrofotométricamente el progreso de la reacción mediante la medida de la velocidad de formación de este producto. Con este objeto se mide el aumento de absorbancia de la disolución con el tiempo, a la longitud de onda de máxima absorción de la p-nitroanilina (máx.=400 nm, coeficiente de extinción molar, $= 1.08 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) para distintas concentraciones iniciales de BAPNA.

4.3. Determinación de actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas.

Se utilizó en este caso como proteasa blanco Carboxipeptidasa A (CPA) de páncreas bovino (Sigma-Aldrich) de concentración $7,0 \times 10^{-9} \text{ M}$.

Para verificar que el EC de papa posee actividad inhibitoria de CPA se incubó a 37°C , 1,4 ml de buffer de reacción (Tris-HCl 20mM NaCl 0,5 M pH 8,0) con 100 μl de ECb de Malcacha y 15 μl de la solución de CPA durante 3 minutos. Seguidamente se agregaron 15 μl del sustrato específico AAFP [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] en concentración 10 mM.

Reactivos:

Buffer de reacción Tris-Hcl 20mM,NaCl0,5M,pH=8	100 μl .
ECb	100 μl .
Solución de CPA $7,09 \times 10^{-9}$	1400 μl .
AAFP 10 mM	15 μl .

La reacción se llevó a cabo a 37°C . La actividad fue registrada durante 3 min por el descenso de la absorbancia a 350 nm (la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja) durante 120 s.

El sustrato AAFP [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH es un sustrato típico para este tipo de metalocarboxipeptidasas. (Mock *et al.* 1996).

5) Tratamiento térmico al extracto crudo

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados hasta la actualidad presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuros, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas de temperatura.

Las muestras fueron tratadas térmicamente. Se calentaron a 60, 65, 70, 80, y 100 °C durante 60 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 9469 x g durante 60 min. a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente.

A cada uno de los sobrenadantes obtenidos se les determinó actividad inhibitoria de tripsina.

6) Caracterización proteica

Para caracterizar a las proteínas mediante métodos electroforéticos, ya sea para la determinación de masas moleculares o puntos isoelectrónicos, así como también para verificar la estabilidad de los inhibidores en condiciones extremas de pH o fuerzas salinas, entre otras, muchas veces es necesario concentrar la muestra para optimizar las condiciones de trabajo. Para ello fueron necesarios utilizar dos procesos de concentración proteica conocidas: a) Liofilización y b) precipitación con solventes orgánicos.

a) Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación de productos utilizando baja presión (vacío) y moderada temperatura. En la liofilización no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido (normal en procesos de secados), sino la sublimación del hielo. Por este motivo los productos deben permanecer obligatoriamente solidificados (congelados) durante el secado.

La liofilización es un conjunto de procesos (no solo el secado) y en ello el material resultante se presentará seco, pero con todas las características del producto original, forma, color, aroma, sabor y textura estarán preservados en el producto seco. Eso diferencia y destaca el proceso de liofilización de los otros utilizados en deshidrataciones.

En cuanto a las etapas del proceso puede hablarse de:

Congelación (la presión se mantiene constante, al ir descendiendo la temperatura hasta aproximadamente -35 grados); Deseccación primaria; Sublimación, Deseccación secundaria y Desorción.

Ventajas:

- Se obtienen productos de redisolución rápida
- La forma y características del producto final son esencialmente las originales
- Proceso idóneo para sustancias termolábiles
- Pérdida mínima de constituyentes volátiles
- Contenido muy bajo de humedad final, permitiendo el producto pueda almacenarse por un mayor tiempo, constituyendo productos de mayor estabilidad.
- Los constituyentes oxidables están protegidos

Inconvenientes:

- Alto costo de instalaciones y equipos
- Elevado gasto energético
- Operación de larga duración

b) Precipitación Acetónica en frío:

En muchos casos la precipitación con solventes orgánicos nos provee de un método en el cual puede recuperarse la proteína en un gran porcentaje respecto de la concentración nativa original. Una de las ventajas es que pueden eliminarse un gran porcentaje de sales y moléculas pequeñas interferentes que en el caso de usar la liofilización, también se concentrarían e interferirían en los ensayos de caracterización.

Para dicho fin, se toman 250 μ l. de la muestra en un “ependorf”, y se los mezcla con 5 volúmenes de acetona fría (Carlo Erba), agregados muy lentamente, gota a gota. Se deja dos horas en frío, a -20°C, y luego se centrifuga a 4°C durante 1 hora a 1200 x g. El sobrenadante se descarta y la acetona residual se seca en desecador (hasta que no haya olor a acetona).

6. a) Electroforesis

Protocolo de alta resolución con Tris-Tricina (AR SDS-Tricina-PAGE).

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 comparado con el caso del clásico buffer tris-glicina (Laemmli 1970). Se logra una resolución superior de polipéptidos, sobre todo en el rango de 5 a 20 kDa, con un sistema de dos geles de diferente concentración: un gel de apilamiento (4% T1 y 3% C2), y un gel de resolución (16,5% T y 3% C).

Otra ventaja de este sistema, si se lo desea emplear como purificación previa al microsecuenciamiento, es que la omisión de glicina previene interferencias.

Preparación de las muestras:

El extracto crudo y los extractos crudos tratados térmicamente y posteriormente liofilizados para concentrarlos, se resuspendieron en 100 ul. de agua destilada. Luego se sonificaron 4 minutos aproximadamente, de manera de redisolverlos bien.

Por cada 40 µl. de muestra se le agrega 5,6 µl. de buffer de muestra 6x, y 2,4 µl. de β-mercaptoetanol. Se llevan a ebullición durante 5 min. Se centrifuga a 2000 x g, durante 10 minutos, a 4°C. y se siembra sobrenadante.

Buffer de muestra	
Tris	9,42
SDS	12,00 gr.
Glicerol	48,00 ml.
Azul de bromofenol	12,00 mgr.
Se llevo a pH : 6,8 con HCl 1M	
AD, c.s.p	100 ml.

$$^1\%T = (g \text{ acrilamida} + g \text{ bisacrilamida}) \times 100 / \text{volumen total}$$

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

Preparación de los geles:

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto a tal efecto con el equipo Mini-Protean III Bio-Rad. La composición de los buffer y de los geles se indica a continuación:

Buffer del gel	
Trizma base	36,34gr.
SDS 0,3%	0,3 gr.
HCl 1M , c.s.p., pH=8,45	
AD, c.s.p	100 ml.

Gel de apilamiento (4%T, 3%C):

Acril-Bis (30:0,8)	1.32 ml.
Buffer del gel	2,48ml.
AD	6,2ml.
PSA 10 %	14 μ l.
TEMED	122 μ l.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida:

Se aplicaron las muestras y en los reservorios anódico y catódico de una celda Miniprotean III Bio-Rad se colocaron los correspondientes sistemas buffer.

Buffer Anódico 2 M:	
Tris	24, 2 gr
HCl 1 M, c.s.p.	pH = 8, 9
AD, c.s.p.	1000 ml

Buffer Catódico 1 M:	
Tris	12,1 gr
Tricina 0,1 M	17,9 gr
SDS 0,1 %	1,0 gr
AD, c.s.p.	1000 ml

Las corridas se realizaron a intensidad de corriente constante (15 mA por cada gel) durante el apilado, luego se aumentó la intensidad de corriente, lentamente hasta 30-40 mA por gel, al ingresar las proteínas al gel espaciador, valor que se mantuvo constante hasta la finalización de la electroforesis.

Fijación y Tinción:

Tinción con Coomassie blue R-250

Finalizada la corrida electroforética, los geles fueron fijados en solución fijadora durante 45 minutos (debe respetarse el tiempo de fijación, de lo contrario los péptidos no se fijan completamente, sino que difunden) y teñidos por inmersión en solución colorante durante 1 hora. Posteriormente se hicieron varios lavados, con solución decolorante, para eliminar la coloración de fondo. Esta tinción tiene una sensibilidad de 0.2-0.5 μ gr. por banda.

Solución fijadora	
Acido acético glacial	100 ml.
Metanol	400 ml.
AD, c.s.p	1000 ml.

Solución colorante	
Acido acético glacial	100 ml
Coomassie brilliant blue R-250	250 mgr
AD, c.s.p.	1000 ml

Solución decolorante	
Acido acético glacial	10 ml
Metanol	34ml.
AD, c.s.p.	100ml.

Tinción con Coomassie Coloidal

La tinción de proteínas por éste método (Neuhoff et al. 1988) provee niveles de detección en el orden de los nanogramos (permite detectar al cabo de una hora cantidades menores a 100 nanogr. de seroalbúmina bovina). Las condiciones del medio en el que se encuentra el colorante (alta concentración salina en un medio acuoso-metabólico) le confiere un carácter coloidal que reduce en gran medida la coloración inespecífica de fondo (background) debido a un efecto hidrofóbico que al mismo tiempo hace aumentar su afinidad por las proteínas fijadas en el gel.

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

Solución colorante:	
Sulfato de amonio	17,0 gr.
Acido acético glacial	0,5 ml
Metanol	34,0 ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1 gr
AD, c.s.p.	100 ml

Para la determinación de los pesos moleculares de las distintas especies proteicas se utilizaron como proteínas estándar una mezcla de proteínas patrones de bajo peso molecular (14.4 kDa, 20.1 kDa, 30 kDa 45 kDa, 66 kDa y 97 kDa, Protein Molecular Weight Markers, GE Healthcare) y otra de patrones peptídico (16,9 kDa; 14,4 kDa; 10,7 kDa; 8,2 kDa; 6,2 kDa y 2,5 kDa, Peptide Marker Kit GE Horse myoglobin peptides).

La determinación de los valores de PM se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los log del PM de las proteínas estándar en función de la distancia recorrida por la especie proteica de interés.

6.b) Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque (IEF) (Westergaard *et al.*, 1980) 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 isoeléctrico (pI). Permite resolver muestras muy complejas y determinar diferentes valores de pI en una misma corrida, tanto en trabajos analíticos como preparativos.

Preparación de las muestras:

Dado que las muestras deben tener una concentración de proteínas cercana a 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y presentar una fuerza iónica reducida, se procedió a liofilizar el retenido obtenido de la cromatografía de afinidad y luego se redisolvió el precipitado en agua bidestilada.

Las muestras listas para usar fueron conservadas en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de ser sometidas a IEF.

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 hidrofílica 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 MQ	5,5 ml
Anfolitos (Pharmalyte 3/10)	0,5 ml
Glicerol (25% p/v)	2,0 ml

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

Reactivos de polimerización

TEMED	5 μ l
PSA al 10 %	70 μ l

La mezcla fue depositada con micropipeta entre el plato de vidrio y la bandeja formadora de geles y el conjunto se mantuvo tapado e inmóvil durante toda la noche 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.

Aplicación de las muestras y condiciones de corrida

Las muestras se aplicaron con jeringa Hamilton (volúmenes de siembra: 5-12 μ l y 9 siembras por placa como máximo), permitiendo que difundan dentro del gel durante 5 min antes de iniciar el IEF.

Los geles se depositaron sobre los electrodos de grafito (previamente humedecidos con AD) 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 30 min., 200 V durante los siguientes 15 min y 450 V durante los 60 min finales.

Fijación y Coloración:

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

Solución fijadora

Acido sulfosalicílico	4 gr.
Metanol	30 ml
TCA	12, 5 gr
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

CUSO ₄ (se disolvió primero en agua)	500 mg
Acido acético glacial	10 ml
Etanol	27 ml
Coomassie brilliant blue R-250	40 mgr
AD, c.s.p.	100 ml

Solución decolorante I

Acido acético glacial	7 ml
Etanol	12 ml
CUSO ₄	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

6. c.) Estabilidad frente a distintos pHs:

Para continuar con la caracterización de los inhibidores de proteasas se procedió a evaluar su estabilidad frente a soluciones de distintos valores de pH para verificar si conservaban su actividad o se alteraban en ciertos intervalos del mismo. Para ello se emplearon buffers de Goods (Good, N.E, Izawa, S. 1972) y se utilizó como material de estudio los tratamientos térmicos de 65°C (TT65), los cuales mantienen a los inhibidores nativos y nos libera de un gran porcentaje de proteínas contaminantes.

Al tratamiento térmico a 65°C, se lo preincubó por 30 minutos a temperatura ambiente con buffer de Goods de distintos pHs.

Luego se midió actividad inhibitoria de tripsina, para ver como se veía afectada la misma, es decir cuan estable frente a los distintos pHs era nuestro inhibidor.

Reactivos:

Tratamiento térmico A 65°C	50 µl.
Buffer de Good	300 µl.

Medida de actividad:

Buffer Tris Hcl, 0.1 M CaCl ₂ -2H ₂ O 50 mM, pH =8	1.18 ml
Enzima: Tripsina	20 µl
Sustrato: BAPNA [10mM]	50 µl

Los buffers de Goods se encontraban a los siguientes pHs: 2.1; 4.3; 6.95; 8.1; 9.25; 11.2.

Preparación de los buffers:

TAPS	1, 3265 gr. (M = 265, 3).
AMP	1, 2462 gr. (M = 249, 3).
MOPS	1,156 gr. (M = 231, 2).
CAPS	1, 1065 gr.
MES	1,0860 gr. (M= 217,2)

A excepción de CAPS (que se disolvió en 25 ml de NaOH 0.1 M), el resto se disolvió en 100 ml de agua destilada.

Al buffer de Good de pH= 6.95 se le agrego 50 μ l de Triton + 9.3 mg. de EDTA.

6.d) Estabilidad a distintas fuerzas iónicas:

Otra propiedad que resultó de interés evaluar es la estabilidad de los inhibidores en distintos entornos de fuerza iónica. Para ello, se procedió a usar sal de cloruro de sodio de diferentes concentraciones y se uso como material de partida, el tratamiento de 65°C (TT65°C), por las mismas razones citadas anteriormente.

Al tratamiento térmico a 65° C se lo preincubó por 30 minutos a temperatura ambiente, con cada una de las concentraciones de NaCl.

Luego, se midió actividad inhibitoria de tripsina para ver cuán estable era dicho inhibidor.

Reactivos:

Tratamiento térmico a 65°C	50 μ l.
NaCl	200 μ l.

Medida de actividad:

Buffer Tris Hcl, 0.1 M CaCl ₂ -2H ₂ O 50Mm, pH =8	1.18 ml
Enzima: Tripsina	20 μ l
Sustrato: BAPNA [10mM]	50 μ l

Las concentraciones de NaCl utilizadas fueron: 0,05M; 0,15 M; 0,25 M; 0,5; 1M y 2M.

7) Metodologías de Purificación

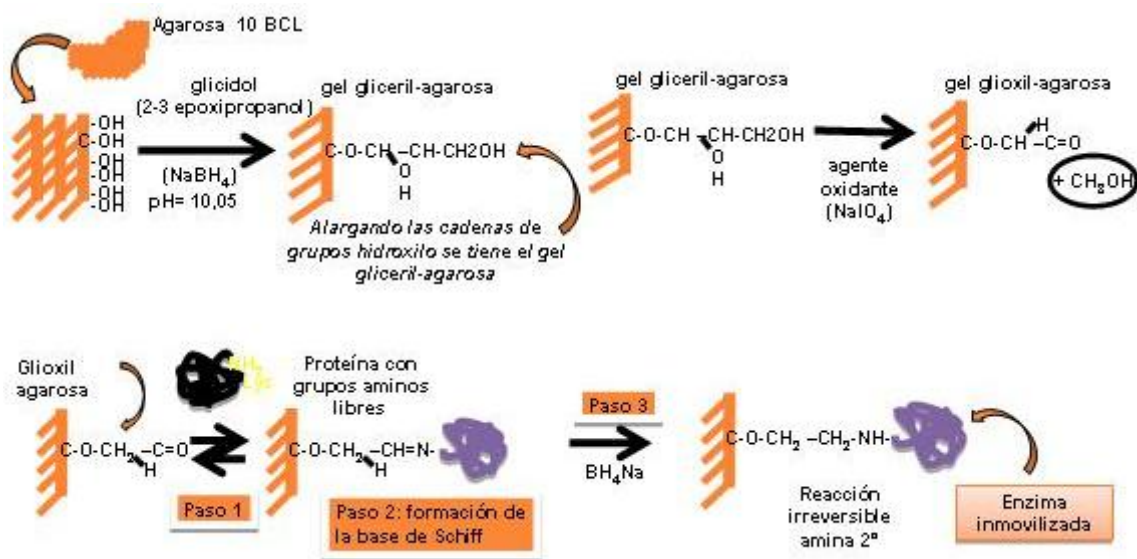
7.a) Cromatografía de afinidad utilizando tripsina inmovilizada

7. a.1) Inmovilización de tripsina sobre gel de glioxil-agarosa

El soporte utilizado para la inmovilización de la enzima comercial tripsina fue agarosa 4 BLC (Hispanagar). Dicho soporte debió ser previamente activado por la adición de grupos aldehído para que éstos reaccionen con los residuos aminoacídicos de la enzima (Guisán *et al.*, 1993).

Se preparo una solución de agarosa en frio, de 40 ml (conteniendo 23,33g de agarosa) a la cual se le adicionó bajo agitación, una solución conteniendo 0,76 g de NaOH y 0,32 g de NaBH₄ (muy inestable a la luz y a bajos valores de pH). En todo momento se controlo que el pH fuera mayor que 10. Luego se agregaron gota a gota, 7,5ml de glicidol. Esta mezcla se dejo en agitación durante 18 hs (en baño frio, debido a que se trata de una reacción exotérmica). Luego, se lavo el gel varias veces con agua destilada, filtrando bajo vacio. De esta forma se obtuvo el gel gliceril-agarosa. Los pasos siguientes del proceso total de activación correspondieron a la oxidación del gel; a 23,33 g de gel se le adicionaron 0,313 ml de agua destilada y una mezcla conteniendo 1,14 g NaIO₄ (necesario para oxidar los grupos alcoholes a aldehído) en 53 ml de agua destilada (100mM). De esta manera se obtiene el gel de glioxil-agarosa (peso final de gel 17,84 g). Por último, se lavó el gel con abundante agua destilada, de la misma forma con que se procedió anteriormente.

La inmovilización propiamente dicha del gel obtenido se realizó a 4° C, pH: 10, con bicarbonato de sodio 100 mM y NaBH₄ para reducir los grupos aldehídos libres. La tripsina se adicionó en una relación de 45 mg de proteína/g de agarosa en un volumen total de 25 ml. En la siguiente figura se muestra un esquema que describe la técnica empleada. Luego el gel se lava con abundante agua destilada y se seca por filtrado en vacío. Este soporte conteniendo a la enzima inmovilizada, atrapada mediante uniones covalentes (base de Schiff entre el grupo amino libre de la proteína y el grupo aldehído de la glioxil-agarosa), puede ser reutilizado en muchas aplicaciones ya que se ha demostrado que la enzima permanece unida y activa.



7. a.2) Verificación de la actividad de la tripsina inmovilizada

Desde el momento en que el gel glioxil-agarosa se puso en contacto con la tripsina, se fueron recolectando en tubos eppendorf alícuotas a distintos tiempos ($t=0$, $t=5$, $t=20$, $t=40$, $t=60$, $t=120$ y $t=180$ minutos), para ir verificando el porcentaje de inmovilización de la enzima. Para ello se realizó una prueba de actividad enzimática a cada tiempo (para evaluar a qué tiempo había comenzado la inmovilización y cómo evolucionaba) con el protocolo de actividad de tripsina con BAPNA. Se realizaron medidas a 410 nm a 40 °C durante 300 seg. Una vez que se verificó que el relleno es activo se procedió a evaluar si la muestra (extracto crudo de Malcacha) poseía actividad inhibitoria sobre el inmovilizado de tripsina.

Se incubó la enzima inmovilizada con el sustrato en buffer de reacción hasta que la lectura de la absorbancia se mantuvo con una pendiente constante (se mantenía una concentración de sustrato saturante). Luego se agregó *in situ* 50 μl de muestra y se observó si la pendiente se mantenía constante o iba disminuyendo hasta caer a cero. Cuando la pendiente caía a cero, se comprobaba entonces que la muestra inhibía la proteasa inmovilizada, por lo tanto, ese relleno pudo ser utilizado posteriormente para ensayos de cromatografía de afinidad.

También el ensayo se pudo hacer por incubación previa de la tripsina inmovilizada junto con 50 μ l de la muestra, y luego se agregó a lo último el sustrato, de esta manera si no se observaba aumento de absorbancia significaba que el extracto inhibía a la proteasa inmovilizada.

7. a.3) Purificación a baja escala empleando microcolumnas de tripsina-glioxil-agarosa

Se realizó una micropurificación empleando como soportes pequeños tubos de plástico adaptados, con entrada superior y salida de líquido inferior regulable, de una capacidad de alrededor de 200 μ l (Empty spin column SP-25, Agarose Beads Technologies). El problema de este tipo de columnas es que la muestra que se sembraba tenía que estar bien límpida y sin micropartículas en suspensión, ya que se tapaba fácilmente, debido a esto el ECb fue reclarificado por centrifugación durante 60 minutos a 14000 rpm. La separación constó de 5 pasos: lavado de la columna con 50 μ l buffer de reacción (Tris-HCl 0,1 M; CaCl₂ 50 mM; pH: 7,2) para equilibrado de la misma, siembra (y recirculación de la muestra) de 50 μ l de ECb, lavado de la columna con buffer de reacción para provocar la salida de partículas no retenidas en la columna, y elución con solución de HCl 1 M a pH: 3 que lograría la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor.

Por último se verificó si la fracción retenida recuperada de la cromatografía de microafinidad, conservaba su actividad inhibitoria de tripsina.

Reactivos:

Buffer Tris-Hcl 0,1M, CaCl ₂ 50Mm pH=8	1,3ml.
Retenido de Malcacha	300 μ l.
Tripsina 2,5mg/ml.	10 μ l.
BAPNA 10Mm	40 μ l.

Se preincubó el retenido de Malcacha con la enzima y buffer de reacción durante 5 minutos y luego se agregó el sustrato.

Al igual que antes, la actividad fue registrada por el aumento de la absorbancia a 410 nm mediante medidas continuas durante 180 segundos a 37°C. La inhibición se manifestó por la no hidrólisis del sustrato específico sintético por parte de la tripsina.

8) Análisis de la Huella Peptídica o PMF/MALDI-TOF/MS

Se identificaron los inhibidores aislados mediante digestión trípica de sus bandas electroforéticas (SDS-PAGE de cada inhibidor) y posterior análisis de la huella peptídica o “peptide mass fingerprint” (PMF). En este caso la huella peptídica se obtuvo mediante PMF/MALDI-TOF/MS, cuyas siglas significan: *Matrix-assisted laser desorption-ionization/mass spectrometry*. Una característica clave de dicha técnica, es que el genoma del organismo debe estar disponible y ser conocido para poder compararlo e identificarlo.

Para ello las bandas seleccionadas del gel de electroforesis (que tienen el peso molecular esperado para este tipo de inhibidores) fueron cortadas, lavadas y decoloradas de forma alternada con solución de acetonitrilo (25, 50 y 95 %) y agua ácida (H₂O-TFA 0,1 %). El producto final decolorado (pequeños fragmentos de gel) fue llevado a pH alcalino con solución de bicarbonato de amonio, y posteriormente fueron reducidos (DTT 10 mM) y alquilados (iodoacetamida 50 mM) los grupos Cys libres de los IPs para facilitar el despliegue de la proteína y permitir un mejor acceso de la tripsina. A continuación se incubaron los IPs desnaturalizados en presencia de tripsina a 37 °C durante 2 horas para la digestión de los inhibidores. Los péptidos así obtenidos fueron recuperados por extracción con acetonitrilo 60% (v/v), y luego secados, redissueltos en TFA 0,1% (v/v) y sometidos a espectrometría de masas MALDI-TOF/MS (Obregon, *et al.*, 2009).

En el proceso de espectrometría de masas, lo primero que hay que hacer es la siembra en placa: Para ello, los péptidos provenientes de la digestión trípica se adsorbieron sobre una matriz orgánica, la cual cristaliza en contacto con el aire. Esta mezcla se depositó en una tarjeta de un material conductor y se ionizó mediante una tecnología de generación de iones. MALDI “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization”, que consiste en bombardear con láser a dichos péptidos. La energía del láser causa una desestructuración de la matriz cristalizada generando una nube de partículas. Los iones de dicha nube se extraen al ser sometidos a un campo eléctrico (cada péptido da lugar a un ion), a través del cual estos son acelerados debido a su carga para penetrar en un tubo de recorrido sin campo eléctrico alguno. Para un voltaje de aceleración definido, el tiempo de vuelo (time of flight: TOF) que le lleva a un ion alcanzar el detector de masas (MS) es proporcional a su relación masa/carga (m/z), por lo que a cada ion le corresponde un valor numérico. El conjunto de los

valores m/z de todos los péptidos resultantes de la digestión triptica de una cierta proteína (el inhibidor en este caso), constituye la huella peptídica o “peptide mass fingerprint” (PMF).

Los espectros de masas obtenidos fueron analizados por el “software Flex analysis 2.0” y luego mediante la herramienta de búsqueda “Mascot Server” se identificaron los inhibidores de proteasas usando como base de datos los presentes en “NCBI nr y Swiss Prot database”.

Links:

http://www.matrixscience.com/search_form_select.html

http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF

http://www.matrixscience.com/help/seq_db_setup_nr.html

<http://bruker-daltonics-flexanalysis.software.informer.com/>

RESULTADOS



Elección del medio de extracción para la obtención del Extracto Crudo

De los dos procedimientos seguidos para la obtención del extracto crudo, escogimos el segundo, debido a que el ECa resultó empardecido por la oxidación de los polifenoles, como se explicó previamente. El segundo procedimiento nos permitió obtener un extracto crudo (ECb) mucho más clarificado, presentando una muy buena actividad inhibitoria frente a las proteasas blanco estudiadas.

La concentración de proteínas obtenidas por el método de Bradford para el ECb fue de 929,49 ug/ml.

Evidencia de la presencia de inhibidores de proteasas: Ensayos de inhibición proteolítica

Actividad inhibitoria de cisteín proteasas

a) Frente a papaína usando como sustrato PFLNA

Cuando el ECb fue incubado en presencia de papaína, se observó una disminución total de la actividad proteolítica de dicha enzima (Fig. 1). Lo cual nos da un indicio de que el ECb pudiera presentar moléculas inhibitoras de cisteín proteasas.

El porcentaje de inhibición, respecto del control, fue de un 99 %.

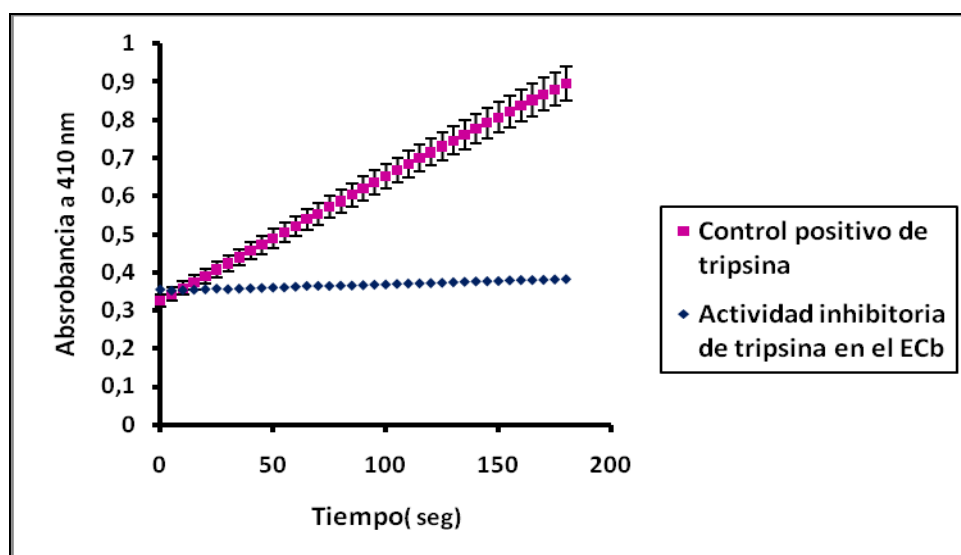


Figura 1: Actividad inhibitoria frente a papaína. En color rosa se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato (PFLNA), sin inhibidor (ECb). En color azul, se grafica la curva que corresponde a la actividad de la papaína con el sustrato (PFLNA) pero en presencia del inhibidor (ECb).

b) Frente a araujiaina usando como sustrato PFLNA

Cuando se realizó la medida de actividad inhibitoria para la proteasa araujiaina, no se observó actividad inhibitoria.

Se modificó el protocolo para determinar si la ausencia de inhibición se debía a una alta concentración de enzima para la cantidad de extracto agregada o si la concentración de sustrato era muy alta. Sin embargo, a pesar de las modificaciones realizadas, no se observó actividad inhibitoria.

c y d) Frente a papaína y araujiaina usando como sustrato caseína.

Cuando el extracto crudo se incubó tanto con araujiaina como con papaína usando como sustrato caseína, no se observó actividad inhibitoria en esas condiciones.

De los resultados obtenidos se puede dilucidar que araujiaina no es inhibida por el ECb de Malcacha. Es importante aclarar que tanto la araujiaina como la papaína hidrolizaron a la caseína, en ausencia del extracto crudo.

Por tal motivo, la única evidencia de la presencia de inhibidores de cisteín proteasas en el ECb fue demostrada por medio del ensayo de papaína utilizando PFLNA como sustrato (ítem a).

Actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasas

Para la determinación de actividad inhibitoria de metalocarboxipeptidasa se utilizó como proteasa modelo a la carboxipeptidasas A (CPA) pancreática de origen bovino (ver M&M sección 4.3) .

El ECb presentó una buena actividad inhibitoria de CPA en las condiciones de ensayo realizadas. La CPA hidroliza el sustrato naranja (AFFP) por lo que desaparece el color a medida que avanza la hidrólisis, lo cual se manifiesta por una caída en los valores de absorbancia a medida que transcurre la reacción. La incubación del EC con la CPA presentó una menor pendiente (-0.1121) respecto a la curva control de CPA (-0.2575) tal como se observa en la figura 2. Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los inhibidores presentes en el mismo produjeron una disminución en la actividad de la CPA que justifica la diferencia entre dichas pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con el EC, ésta hidrolizó

el sustrato color naranja completamente. Por lo tanto, el porcentaje de inhibición fue de 56 %.

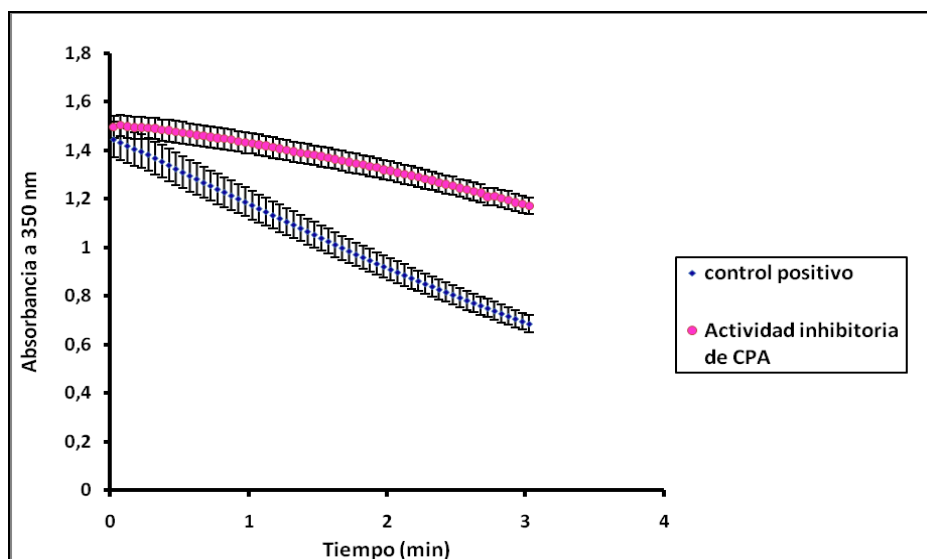


Figura 2: Actividad inhibitoria frente a CPA. En color azul se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la CPA en presencia del sustrato (PFLNA), sin inhibidor (ECb). En color rosa, se muestra la curva que corresponde a la actividad de la CPA pero en presencia del inhibidor (ECb).

Actividad Inhibitoria de serín proteasas

Actividad Inhibitoria de Tripsina con BAPNA:

El ECb presentó muy buena actividad inhibitoria de serín proteasas utilizando como proteasa modelo a la tripsina (Figura 3). La incubación del ECb con la tripsina presentó una menor pendiente (2.65×10^{-4}), respecto a la curva control de tripsina (3.4×10^{-3}). Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los inhibidores presentes en el mismo produjeron una disminución en la actividad de la tripsina que justifica la diferencia entre dichas pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con el EC, ésta hidrolizó el sustrato observándose un intenso color amarillo.

En este caso el porcentaje de inhibición, fue del 95 %.

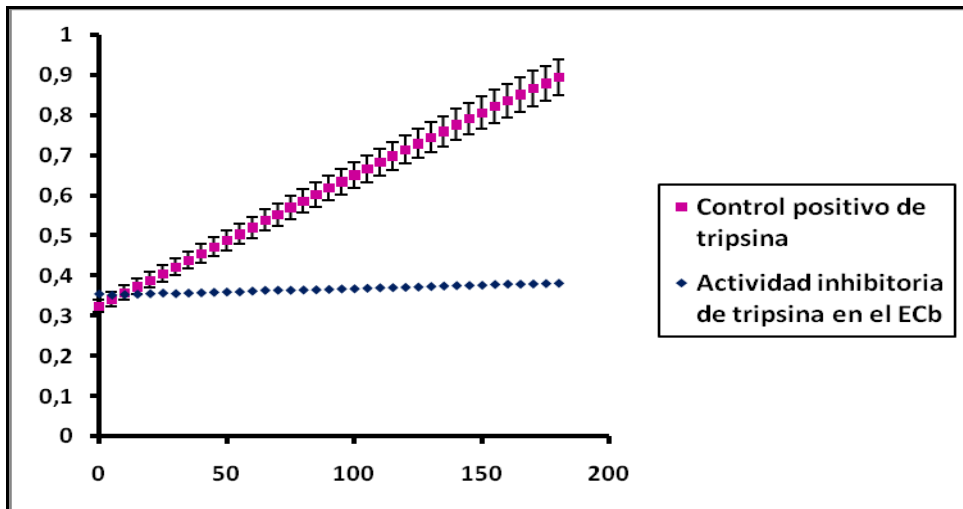


Figura 3: Actividad inhibitoria frente a tripsina. En color rosa se muestra la curva control, que corresponde a la actividad de la tripsina con el sustrato (BAPNA), sin inhibidor. En color azul, se observa la curva que corresponde a la actividad de tripsina con el sustrato (BAPNA) en presencia del inhibidor (ECb de Malcacha).

Los ensayos de inhibición de proteasas realizados arrojaron una significativa actividad inhibitoria del extracto crudo, con lo cual, nos encontramos frente a una muestra que presenta una gran cantidad de este tipo de moléculas. Nuestro estudio, por lo tanto, podría focalizarse a la caracterización de cualquiera de esos tipos de inhibidores. Así que, pese a que los porcentajes de inhibición fueron altos para todas las enzimas (ya sea papaína, carboxipeptidasa A o tripsina), se decidió seguir el análisis con los inhibidores de tripsina debido a que la enzima y sus sustratos se encuentran disponibles en el laboratorio y además están ampliamente descriptos en bibliografía.

Perfil electroforético del EC

Se le realizó una electroforesis desnaturalizante al extracto crudo para ver la distribución de tamaños de los componentes proteicos presentes en el ECb. La figura 4 muestra dicha distribución.

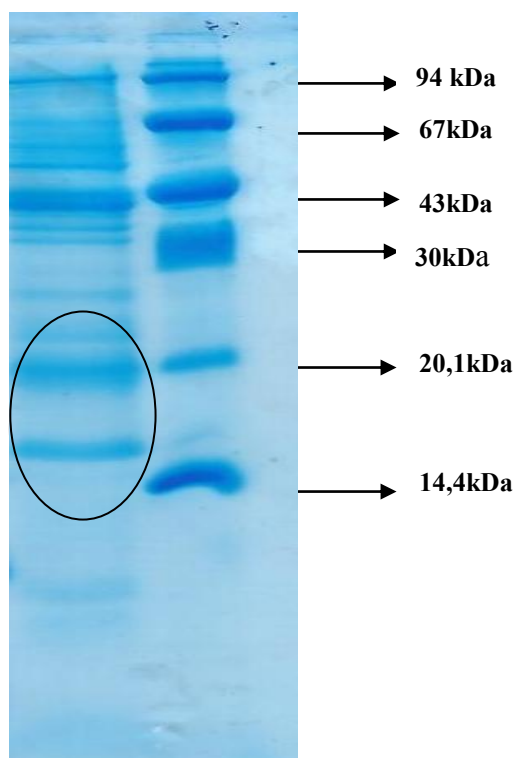


Figura 4: SDS-PAGE del extracto crudo de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad Malcacha. Calle 1: ECb. Calle 2: Patrón de bajo peso molecular (14KD a 94KDa).

Se puede observar en la electroforesis que los pesos moleculares de los componentes proteicos abarcan masas moleculares desde 3000 hasta 100000 Da. Los inhibidores de proteasas (IPs) presentes en los tubérculos de papa generalmente presentan un tamaño molecular que abarca desde los 4300 Da hasta los 24000 Da (Bártová, 2008). De esta manera se puede inferir a priori que las bandas indicadas con un círculo en el SDS-PAGE corresponderían a los inhibidores presentes en el ECb.

Como habíamos mencionado anteriormente, los IPs son termolábiles por lo que se pueden inactivar, en mayor o menor grado, por la acción de tratamientos térmicos. De todas formas, estos inhibidores son más estables térmicamente que, por ejemplo, la

patatina, principal componente del tubérculo de papa, que por encima de los 50°C comienza a insolubilizarse fuertemente (Bárta *et al.*, 2008).

La estabilidad térmica de los IPs depende de su peso molecular y de la cantidad de enlaces disulfuro formados en la molécula, cuya presencia en los inhibidores genera estructuras compactas que estabilizan la forma activa del inhibidor frente a elevados cambios térmicos (Herrera, 2003).

Por este motivo se procedió posteriormente a un proceso de clarificación de las restantes proteínas mediante diferentes tratamientos térmicos, y de esta forma poder analizar la estabilidad de los inhibidores buscados frente a la temperatura (Herrera, 2003).

Purificación parcial del extracto crudo por tratamiento térmico

Se incubó el ECb a distintas temperaturas para finalmente evaluar la actividad inhibitoria y la concentración proteica residual en cada uno de los tratamientos térmicos.

Determinación de concentración proteica de los TTs por el método de Bradford

El ECb se incubó a 60°C, 65°C, 70°C, 80°C, y 100°C durante 30 min. Posteriormente dichos tratamientos se reservaron en heladera por espacio de 20 min. Luego se centrifugó en tubos “eppendorf” 60 min en frío (4°C) a una velocidad de 10000 x g. Posteriormente se descartaron los pellets y se recolectó cada sobrenadante por separado en tubos “eppendorfs”. En este paso se podía observar a simple vista que la clarificación era más notable en los tratamientos térmicos a mayores temperaturas. Esta observación fue coincidente con la determinación de la concentración proteica por el método de Bradford, cuyos datos se muestran en la tabla 1.

Muestra	Concentración proteica (µg/µl)
EC	987,86
TT60	503,12
TT65	452,24
TT70	422,24
TT80	419,18
TT100	406,55

Tabla 1: Concentración de proteínas del ECb y de los distintos tratamientos térmicos.

Actividad inhibitoria residual luego de cada tratamiento térmico:

A cada uno de los TTs se le evaluó su actividad inhibitoria de tripsina y los resultados comparativos se observan en la figura 5.

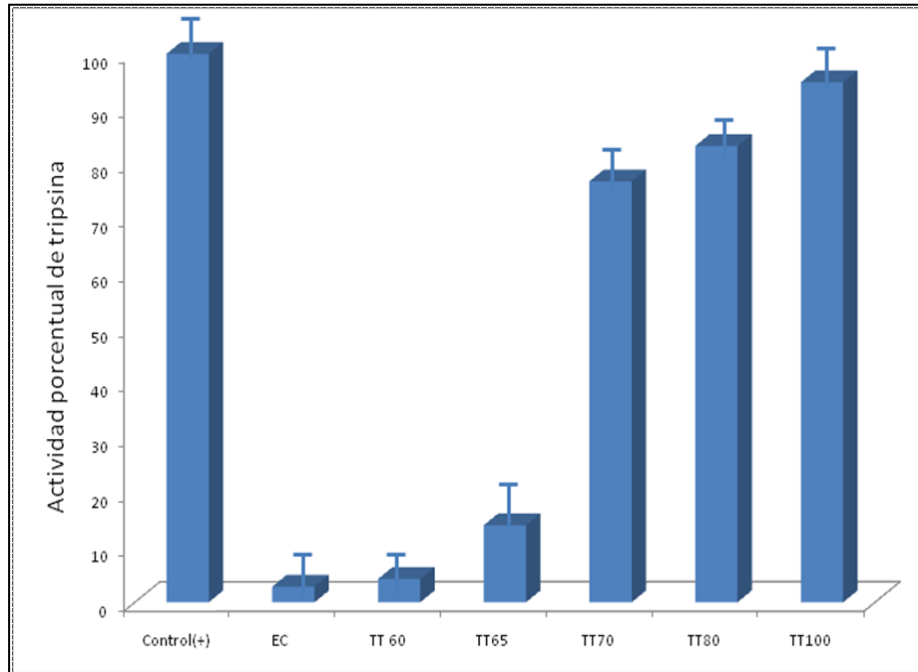


Figura 5: Actividad porcentual de tripsina frente al EC sin tratar y los EC resultantes de los |tratamientos térmicos. Control positivo: Tripsina en presencia del sustrato sintético BAPNA; EC: Extracto crudo de Malcacha + tripsina + BAPNA. TT60/TT65/TT70/TT80/TT100°C: EC tratado a las distintas temperaturas + tripsina + BAPNA.

Se observa que la actividad enzimática de tripsina disminuye hasta un 5% respecto de la actividad control, cuando se la incuba frente al ECb y al tratamiento térmico a 60°C. Cuando la enzima es incubada frente a TT65 la actividad se mantiene en un 20% de la original. En cambio los TT70, TT80 y TT90 no afectan en demasía a la actividad de tripsina, manteniendo una actividad residual del 80%, 85% y 95 % respectivamente.

Como podemos observar, el tratamiento térmico a 65°C es un buen método para usar como etapa de purificación ya que retiene un porcentaje significativo de la actividad inhibitoria de tripsina (inhibidores) y elimina gran cantidad de otras proteínas contaminantes.

SDS-PAGE de los tratamientos térmicos

La figura 6 muestra el perfil de tamaños moleculares del ECb y de los distintos tratamientos térmicos.

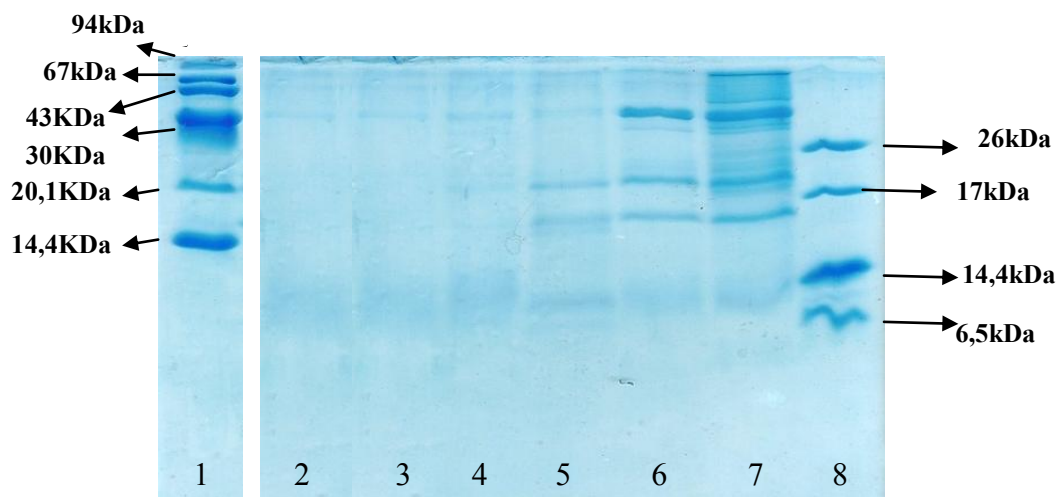


Figura 6: SDS-PAGE .Calle 1: Patrón de bajo peso molecular (14 a 94 kDa). Calle 2: Tratamiento térmico del EC a 100°C. Calle 3: Tratamiento térmico del EC a 80°C. Calle 4: Tratamiento térmico del EC a 70°C. Calle 5: Tratamiento térmico del EC a 65°. Calle 6: Tratamiento térmico a 60°C. Calle 7: EC sin tratar térmicamente. Calle 8: Patrones muropeptidicos (6,5 a 26 kDa).

Como puede observarse en el SDS-PAGE, a medida que aumenta la temperatura del tratamiento térmico al que es expuesto el ECb, se logra una mayor clarificación del mismo. Estos resultados siguen la misma tendencia de los obtenidos para la determinación de la concentración de proteínas (tabla 1) y los de actividad inhibitoria residual (figura 5). Según los datos obtenidos tanto el TT65 como el TT60 resultarían materiales óptimos para continuar con los estudios de este tipo de inhibidores.

Estabilidad de los inhibidores de tripsina frente al pH

Para evaluar cuál es el efecto causado en los posibles inhibidores de tripsina frente a distintos cambios de pH, se incubó el tratamiento a 65°C con los distintos buffers de Goods (pH 2-11) a temperatura ambiente, 30 minutos. Luego se evaluó la actividad inhibitoria residual sobre tripsina. Tal como se expresó

anteriormente, se eligió el TT65°C, ya que es una muestra más limpia de proteínas que el extracto crudo original, que nos posibilita evaluar y caracterizar mejor a nuestra muestra de inhibidores. Los resultados se pueden observar en la figura 7.

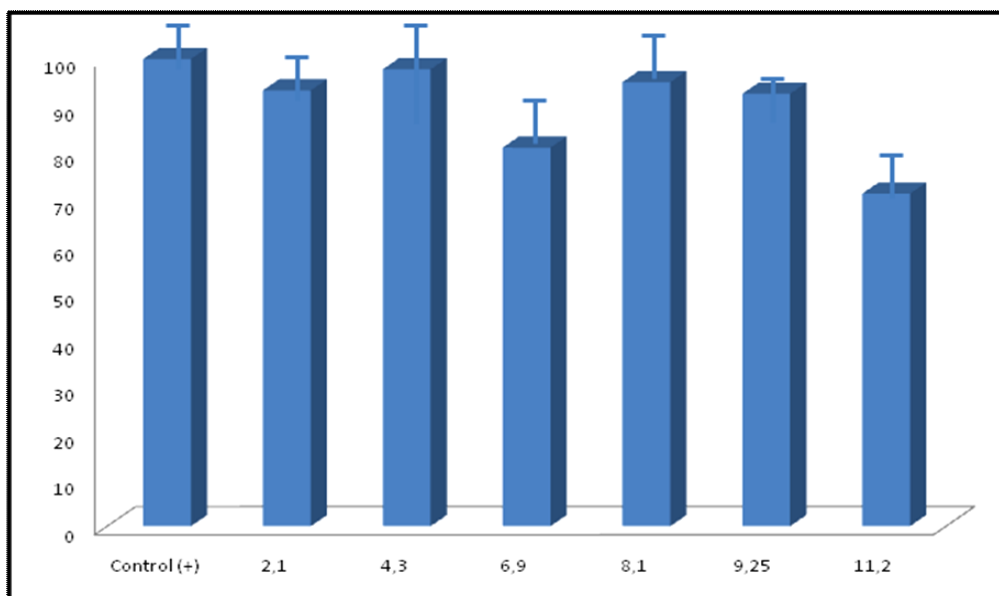


Figura 7: Actividad inhibitoria de tripsina en función del pH. Control positivo: TT 65°C en presencia de tripsina y BAPNA. pH 2,1/pH4, 3/pH6, 9/pH 8,1/ pH 9,25 y pH 11,2: TT 65°C incubado previamente con el buffer de Good del pH correspondiente + tripsina+ BAPNA.

Se puede ver en la figura que la actividad inhibitoria de tripsina se mantiene aproximadamente constante en un rango de pH de 2 a 8. Sin embargo en el valor de pH 11,2 la actividad decrece pero en forma no significativa. Esto comprobaría la gran estabilidad que poseen los inhibidores de serín proteasas.

Estabilidad de los inhibidores de tripsina frente distintos entornos de fuerza iónica

Para seguir con la caracterización de los inhibidores de tripsina, y observar cómo se ven afectados los mismos frente a otro factor externo como lo es el entorno iónico, se incubó el tratamiento térmico de 65°C con distintas concentraciones de NaCl. Luego se midió la actividad inhibitoria de tripsina, para comprobar si la misma se mantenía o no. Los resultados se pueden ver en la figura 8.

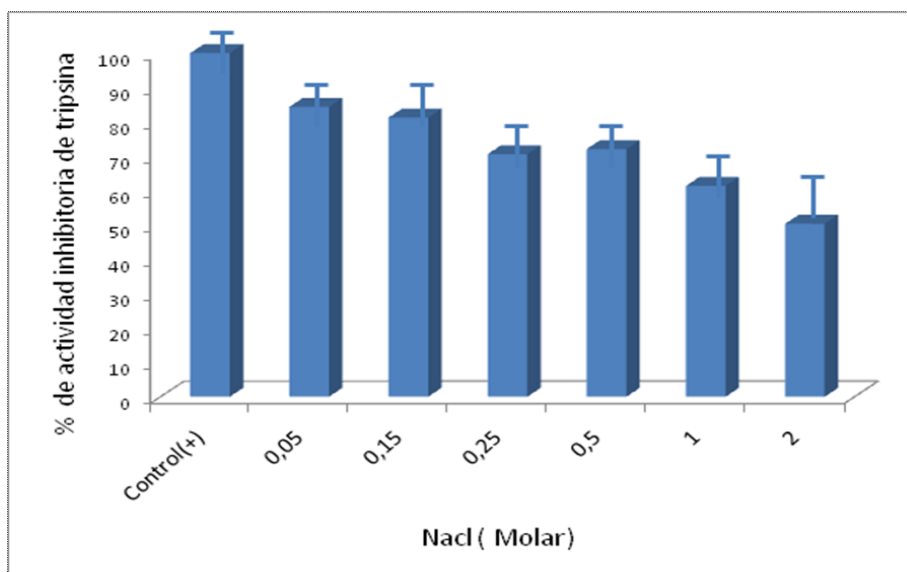


Figura 8: Actividad de tripsina en función de distintas concentraciones de NaCl. Control positivo: T.T a 65°C, en presencia tripsina y BApNA. 0, 05/ 0,15/0,25/0,5/1 y 2M: T.T a 65°C incubado 30 minutos con la concentración de NaCl respectiva en presencia de tripsina y BAPNA.

Puede verse en la figura 8 que, aunque no se aprecian diferencias importantes en los valores de actividad residual de tripsina, cuando el TT65 es sometido a altas concentraciones salinas (1M y 2M), comienza a afectarse en gran medida la estabilidad de los inhibidores presentes en dicho tratamiento térmico. De igual manera, no se llega a perder más del 50% de actividad inhibitoria. En cambio concentraciones molares menores que 0,5 M conservan más del 70% de actividad inhibitoria residual.

Inmovilización de tripsina en gel de agarosa

A cada una de las muestras recolectadas en los distintos tiempos, se le midió actividad residual de tripsina (M&M sección7.a.2) observándose buenos valores de actividad desde el tiempo inicial $t=5$, con lo cual, la inmovilización fue casi inmediata y constante a lo largo del tiempo evaluado como puede apreciarse en la figura 9.

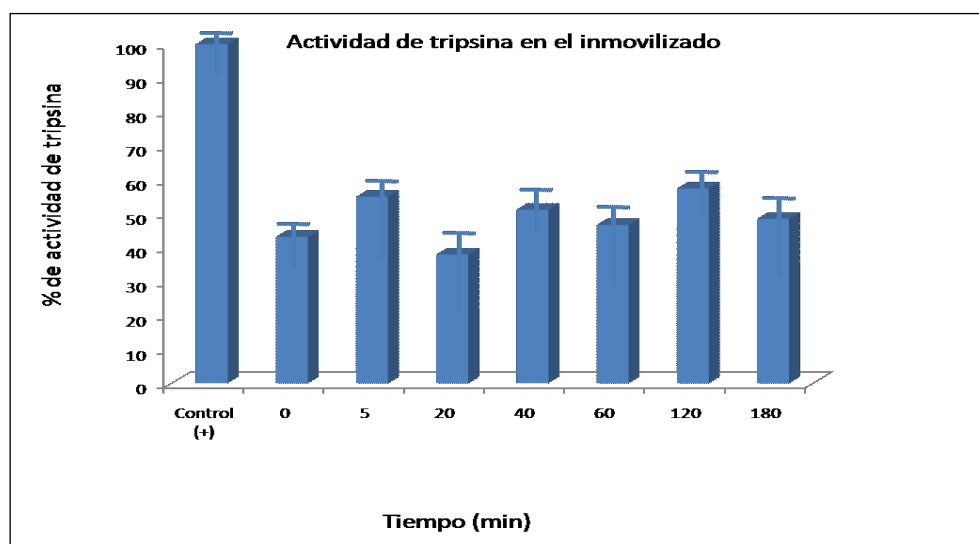


Figura 9: Actividad de tripsina en el inmovilizado. Control positivo: Tripsina más sustrato (BApNA).Tiempo 0, 5, 20, 40, 60, 80,120 y 180: Inmovilizado de tripsina más sustrato a los distintos tiempos de extracción de la muestra.

Purificación de un inhibidor de serín proteasa usando tripsina inmovilizada

La muestra empleada para la purificación por afinidad fue el TT65. La misma fue sembrada varias veces por un sistema de recirculación de manera de aumentar el número de contactos entre la enzima y su inhibidor. De esta manera las proteínas no retenidas al final de la columna volvían a sembrarse al inicio de la columna mediante una tubuladura que comunicaba el final con el comienzo de la misma. El buffer de elución utilizado fue Tris-HCl 0,1 M; CaCl₂ 50 mM; pH: 7,2. Luego de varias recirculaciones se empezó a coleccionar la fracción no retenida, y finalmente por cambio de buffer se realizó la elución final del pico retenido. La elución final se realizó con HCl 1M a pH: 3 que logró la desestabilización del complejo tripsina-inhibidor.

SDS-PAGE del pico retenido

El pico retenido (inhibidor) proveniente de la cromatografía de afinidad, el cual presentó un porcentaje de inhibición del 84%, se sometió a SDS-PAGE para ver tamaño molecular y grado de pureza que poseía.

En el gel se sembró el pico retenido, tripsina y tripsina incubada con el pico retenido. Esto último se hizo para ver si había reacción irreversible en la unión de la

tripsina al inhibidor y así, de esta manera, observar una banda del tamaño molecular igual a la sumatoria de masas de ambas proteínas. (23 kDa, tripsina, + 21 kDa inhibidor= 44 kDa). Finalmente la banda esperada no fue observada en el gel.

Debido a que las bandas no eran muy intensas, se procedió a realizar una precipitación acetónica (para concentrar las muestras), y realizar un nuevo SDS-PAGE. Sin embargo con este tratamiento de la muestra no pudo visualizarse la interacción tripsina-inhibidor. En la figura 9 se presentan los resultados obtenidos.

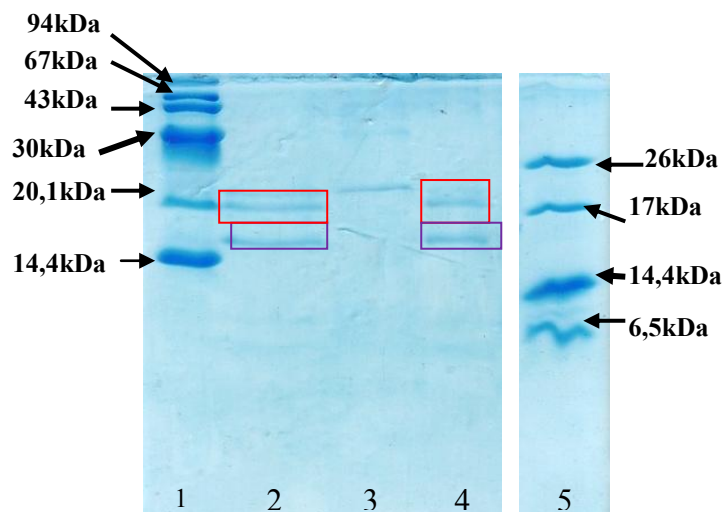


Figura 9: SDS-PAGE: Calle 1: patrón de bajo peso molecular (14kDa a 94kDa).Calle 2: pico retenido (inhibidor) más tripsina. Calle 3: tripsina. Calle 4: pico retenido solo. Calle 5: patrones multipéptidicos (6,5 kDa a 26 kDa).

En la corrida electroforética puede observarse, que tanto el inhibidor incubado con tripsina como solo, se observa una banda de alrededor de 15 kDa (□) y otra de aproximadamente 21 KDa (□). Además en la calle 2 se presenta una banda por encima de los 21 kDa que coincide con la banda que se observa en la calle 4. No se observa ninguna banda de 44 kDa, por lo cual puede dilucidarse que la tripsina no se unió fuertemente a su inhibidor durante la preparación de la muestra para electroforesis.

Isoelectroenfoque del pico retenido:

Se realizó un isoelectroenfoque (IEF) del pico retenido con el objeto de obtener estimadamente su punto isoeléctrico (pI). En la figura 10 se observa el perfil de pI del ECb de malcacha junto con el perfil del pico retenido. Observamos que la mayor parte

de las proteínas del ECb enfocan a pHs neutros y ácidos. Se puede observar también que en el pico retenido hay 3 bandas que enfocan a valores de pI entre 5,5 y 7. Hay una banda principal que tiene un pI cercano a 5,8 y otras dos que tienen un pI entre 6,6 y 6,8. Notamos que, hay diferencia del SDS-PAGE en el cual observamos 2 bandas, en esta corrida encontramos 3 bandas. Esto puede deberse a efectos de carga de los grupos sulfidrilos, por lo que existe una población de las mismas proteínas en las cuales están formados los puentes y otras en las cuales no. Eso podría pasar con las proteínas que enfocan entre 6,6 y 6,8; por lo cual se trataría de la misma proteína. En cambio la proteína principal enfoca a pI entre 5,6 y 5,9; valor esperado para la mayoría de este tipo de inhibidores de proteasas.

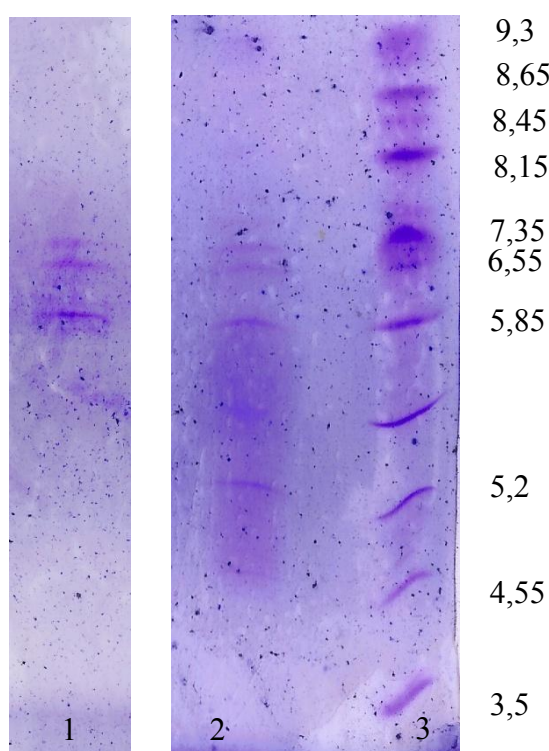


Figura 10: IEF del pico retenido de afinidad. Calle 1: Retenido de la cromatografía de afinidad. Calle 2: Extracto crudo de Malcacha. Calle 3 patrones de pI.

Identificación de un inhibidor de serín proteasas mediante MALDI-TOF/MS.

Las bandas provenientes del SDS-PAGE de la figura 9 (15 y 21 kDa) fueron sometidas a digestión trípica para posteriormente realizarles la identificación por huella peptídica. El espectro de la banda de 15 kDa no dio identificación con ninguna de las

proteínas presente en la base de datos utilizada. El espectro de la banda de 21 kDa dió identificación con un inhibidor de serín proteasa de tipo Kunitz perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas STI (soybean trypsin inhibitor, inhibidor de tripsina de soja).

En la figura 11 se observa el espectro de masas de los productos de la digestión triptica o huella peptídica de la banda electroforética de 21 kDa.

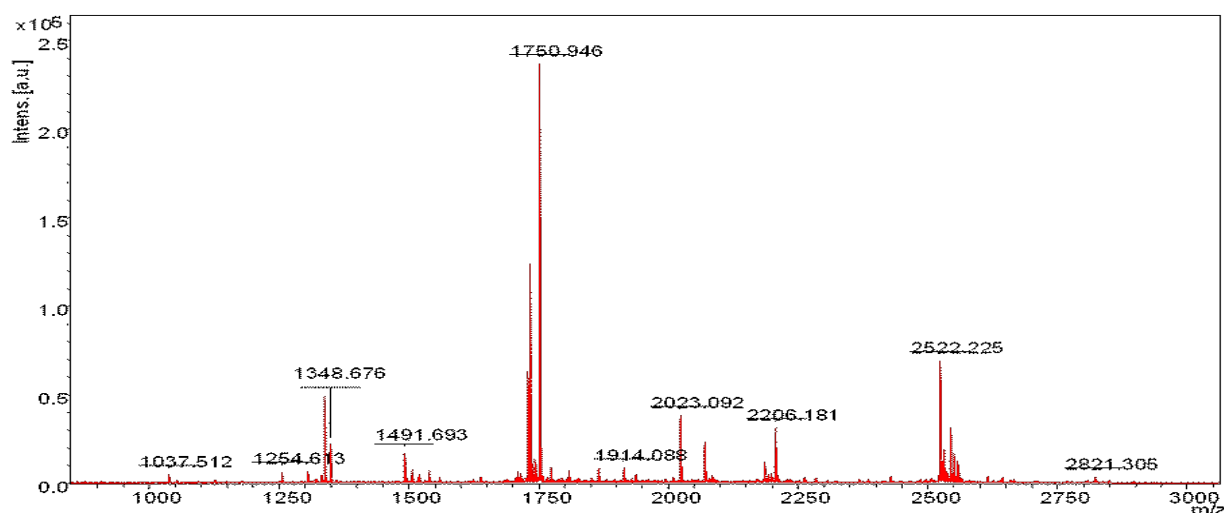


Figura 11: Espectro de masas de los péptidos de la digestión triptica de la banda de 21 kDa

A partir de estos datos de masas se realizó la búsqueda a fin de hallar identidad en la proteína. La herramienta de búsqueda utilizada fue el programa “Mascot Server Research” y los parámetros de búsqueda fueron los siguientes:

Type of search	: Peptide Mass Fingerprint
Enzyme	: Trypsin
Variable modifications	: Carbamidomethyl (C),Oxidation (M)
Mass values	: Monoisotopic
Protein Mass	: Unrestricted
Peptide Mass Tolerance	: ± 20 ppm
Peptide Charge State	: 1+
Max Missed Cleavages	: 3
Number of queries	: 20

- *Los resultados de búsqueda fueron los siguientes:*

Database: NCBI nr 20130127 (22663875 sequences; 7788533994).

Taxonomía: Viridiplantae (Green Plants) (1163159 sequences).

Timestamp: 28 Jan 2013 at 20:17:25 GMT.

Top Score: 78 for gi|392311607, Chain A, Crystal Structure Of Potato Serine Protease Inhibitor.

En la figura 12 se muestra un gráfico estadístico “Mascot Score Histogram” que muestra el “grado” de identificación de esta proteína. Según este análisis, la identidad de la proteína se da con un “top score” de 78, mayor a 73, lo cual representa, según el histograma, una probabilidad muy alta y con muy poco margen de error de análisis estadístico. De este modo podemos afirmar que estamos en presencia de un inhibidor de proteasa serínica de unos 21 kDa de masa molecular.

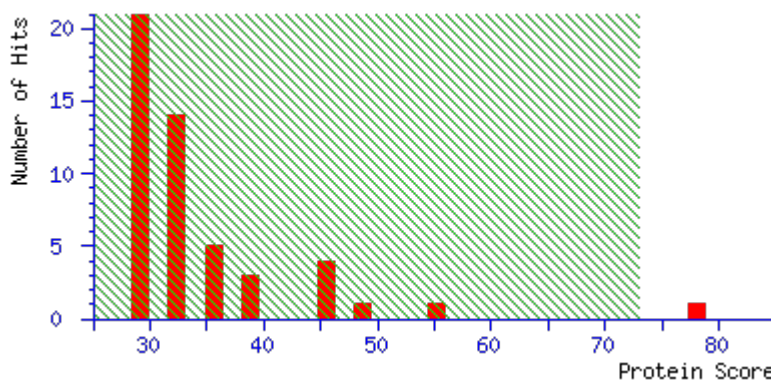


Figura 12: Mascot Score Histogram: Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 73 are significant ($p < 0.05$).

El inhibidor con el cual se lo identificó, presenta una masa nominal de 20293; pI de 5,62 y pertenece a la especie *Solanum Tuberosum*. Su secuencia aminoacídica se muestra a continuación, en donde los péptidos coincidentes con el inhibidor de la muestra estudiada se muestran en rojo.

1 LPSDATPVLD VTGKELDPRL SYRIISTFWG ALGGDVYL GK SPNSDAPCAN
51 GVFRYNSDVG PSGTPVRF IG SSSHFGQGIF EDLLNIQFA ISTSKMCVSY
101 TIWKVGDYDA SLGTMLLETG GTIGQADSSW FKIVKSSQFG YNLLYCPVTT
151 SSDDQFCLKV GVVHQNGKRR LALVKDNPLD VSFKQVQ

El porcentaje de cobertura de secuencia identificada fue de un 36% y las secuencias de péptidos coincidentes con las masas moleculares que identificaron al inhibidor se muestran en la tabla 2.

	fin	Mr (calc)	Secuencia del péptido
comienza			
1	19	2022.0633	-.LPSDATPVLDVTGKELDPR.L
1	23	2541.3439	-.LPSDATPVLDVTGKELDPRLSYR.I
41	54	1490.6572	K.SPNSDAPCANGVFR.Y + Carbamidomethyl (C)
41	67	2820.2886	K.SPNSDAPCANGVFRYNSDVGPSGTPVR.F + Carbamidomethyl (C)
55	67	1347.6419	R.YNSDVGPSGTPVR.F
170	187	2069.1633	R.RLALVKDNPLDVSEFKQVQ.-
171	187	1913.0622	R.LALVKDNPLDVSEFKQVQ.-

Tabla 2: Secuencias peptídicas coincidentes.

CONCLUSIONES



El extracto crudo seleccionado (ECb):

- Evidenció una concentración de proteínas de 929,49 µg/ml.
- No mostró actividad inhibitoria usando como proteasa a la araujiaina y como sustrato PFLNA. Mientras que frente a la proteasa papaína presento un porcentaje de inhibición de 99 %.
- No presentó actividad inhibitoria usando como proteasas araujiaina y papaína y como sustrato caseína.
- Exhibió actividad inhibitoria de CPA utilizando como sustrato AFFP dando un valor porcentual de 56 %.
- Manifestó actividad inhibitoria de tripsina empleando como sustrato BApNA obteniéndose un porcentaje de inhibición de 95 %.
- Mediante la caracterización electroforética se pudo identificar a priori la presencia de inhibidores en la muestra.

Clarificación del ECb:

- El tratamiento térmico a 65°C fue el seleccionado debido a que retuvo un porcentaje importante de la actividad inhibitoria de tripsina y a que presentó una significativa disminución de proteínas contaminantes, resultados confirmados tanto por el método de Bradford como por SDS-PAGE.

Caracterización del inhibidor:

- Presentó gran estabilidad frente a un intervalo de pH de 2-11,2.
- La estabilidad sólo se afecta de manera significativa frente a concentraciones de 1M y 2M.

Purificación del inhibidor:

- La actividad residual de tripsina se mantuvo estable desde el inicio de inmovilización y permitió realizar con eficacia la cromatografía de afinidad.
- Mediante cromatografía de afinidad se obtuvo un pico retenido que presentó un porcentaje de inhibición del 84%.

- Por SDS-PAGE se observaron dos bandas (15kDa y 21kDa) que corresponderían al inhibidor. Asimismo, por esta técnica, no se pudo lograr la verificación de la interacción tripsina-inhibidor.
- Únicamente el espectro de la banda de 21 kDa se identificó con un inhibidor de serín proteasa de tipo Kunitz perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas STI (soybean trypsin inhibitor, inhibidor de tripsina de soja).
- Por métodos bioinformáticos se pudieron comparar características del inhibidor presente en la muestra de Malcacha con un inhibidor de serín proteasas conocido y característico de la familia *solanum tuberosum*.

BIBLIOGRAFÍA

Abad-Zapatero, C., et al. (1998). "Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*. Implications for the design of antifungal agents". *Adv Exp Med Biol* 436: 297-313.

Abdel-Meguid, M., K. von der Helm, B.D. Korant, and J.C. Cheronis. 2000. *Proteases as Targets for Therapy*. Berlin: Springer-Verlag.

Abuereish, G. M. 1998. Pepsin inhibitor from roots of *Anchusa strigosa*. *Phytochemistry*. 48: 217-221.

Agusti, C, K. Takeyama, L.O. Cardel, I. Ueki, J. Lausier, Y.-P. Lou y J.A. Nadel (1998) "Goblet cell degranulation after antigen challenge in sensitized guinea pigs. Role of Neutrophils". *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 15:1253-8.

Akiyama, H., Ikeda, K., Kondo, H., McGeer, P.L., 1992. Thrombin accumulation in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett*. 146, 152–154.

Baltimore, D. y C. Heilman "HIV vaccines: prospects and challenges" *Scientific American* 279 (1), July 1998, págs. 78-83.

Banerji, A.P. and A.O. Fernandes. 1994. Field bean protease inhibitor preparations, unlike methotrexate, can completely suppress Yoshida sarcoma tumor in rats. *Cell Biol. Int*. 18: 1025-1034.

Barrett, A. J. 1986. The classes of proteolytic enzymes. In *Plant proteolytic Enzymes*, ed. M. J. Dalling, 1:1-16. Boca Raton, FL: CRC Press.

Barrett, A.J., N.D. Rawlings, and J.F. Woessner. 1998. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. New York: Academic Press.

Bartlett, J.G. y R.D. Moore "Improving HIV therapy" *Scientific American* 279 (1), 1998, págs. 64-73.

Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S. M.; Babu, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seed: Purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* 2006, 67, 232–241

Bilfinger, T. V.; Stefano, G. B. (2002). "The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena." *Curr Pharm Des* 8: 505–509.

Billings, P. C., St. Clair, W. H., Maki, P. A. & Kennedy, A. R. (1992) Distribution of the Bowman-Birk protease inhibitor in mice following oral administration. *Cancer Lett*. 62: 191-197.

Birk, Y. 1993. Protease inhibitors of plant origin and role of protease inhibitors in human nutrition: overview. In W. Troll and A.R. Kennedy (eds.), *In Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*. New York: Plenum Press, pp. 97-106.

- Birk, J. Plant protease inhibitors: Significance in nutrition, plant protection, cancer prevention, and genetic engineering. Published by Springer. 2003; 111-120.
- Bode, W.; Huber, R. Natural protease inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* 1992, 204, 433–451.
- Bode, W. Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1477: 241-252.
- Boos C.J. & G.Y. Lip (2004) "Novel therapies for the prevention of stroke", *Expert Opin Investig Drugs.* 13:1615-30.
- Bradford, M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brzin, J. and M. Kidric. 1995. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 13: 420-467.
- Caffini, N., Lopez, L., Natalucci, C., y Priolo, N., 1988, "Proteasas de plantas superiores .I. Características generales, rol fisiológico y aplicaciones"
- Castañeda, O.; Sotolongo, V.; Amor, A. M.; Stocklin, R.; Anderson, A.; Harvey, A. L. and Karlsson, E. Characterization of a potassium channel blocker from Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon.* 1995; 33: 603-613.
- Cataldo, F., Keheyan, & Y., Heymann, D. 2003, *Int. J. Astrobiol.*, 1, 79
- Cater, S. A; Less, W. E; Hill, J; Brzin, J; Kay, J; Phylip, L. H. 2002. Aspartic proteinases inhibitors from tomato and potato are more potent against yeast proteinases A than cathepsin D. *Biochim. Biophys. Acta.* 1596: 76-82.
- Chrispeels MJ, Baumgartner B, Harris N. Regulation of reserve protein metabolism in the cotyledons of mung bean seedlings. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Sep;73(9):3168–3172.
- Christeller, J. T; Farley, P. C; Ramsay, R. J; Sullivan, P. A; Laing, W. A. 1998. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* 254. 160-167.
- Christeller JT. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J* 272, 5710-5722.
- Chye, M.L., Sin, S.F., Xu, Z.F., Yeung, E.C., 2006. Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 42, 100– 108.
- Cinelli, P., Madani, R., Tsuzuki, N., Vallet, P., Arras, M., Zhao, C.N., Osterwalder, T., Rülke, T., Sonderegger, P., 2001. Neuroserpin, a neuroprotective factor in focal ischemic stroke. *Mol. Cell. Neurosci.* 18, 443–457.

- Cirino, G., Cicala, C., Bucci, M.R., Sorrentino, L., Maraganore, J.M., Stone, S.R., 1996. Thrombin functions as an inflammatory mediator through activation of its receptor. *J. Exp. Med.* 183, 821–827.
- Clemente, A., Domoney, C., 2006. Biological significance of polymorphism in the legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr. Prot. Pept.Sci.* 7,210-216
- Clercq, E. D. (2004). "Antiviral drugs in current clinical use". *J Clin Virol.* 30: 115-33.
- Coughlin, S.R., 2000. Thrombin signaling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258–264.
- Dahlgren, A., I. Kvarnstrom, L. Vrang, E. Hamelink, A. Hallberg, A. Rosenquist and B. Samuelsson (2003) "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmepsin I and II". *Bioorg. Med. Chem.* 11:3423-37 E.N. Lysogorskaya, E.S. Oksenoit, G.N.
- Dalton C B, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, Swaminathan B, Proctor MGriffin P M. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria monocytogenes* in Milk. *New England J Med* 1997; 336(2): 100-105.
- De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002). Plants-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res.* 30 (1): 347-348.
- Di Cera, E., 2009. Serine proteases. *IUBMB Life* 61, 510–515.
- Dubey, V.K. y Jagannadham M. (2003). Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochemistry* 62:1057-1071.
- Fabbro, S., Seeds, N.W., 2009. Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain. *J. Neurochem.* 109, 303–315.
- Fan, S. G; Xu, G. J. 2005. Plant proteinase inhibitors against phytophagous insects. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 46: 273-292.
- Fontham, E. and Correa, P. (1993) The epidemiologic approach to the study of protease inhibitors. In: *Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents*, pp. 1–8, Troll, W. and Kennedy, A. (eds.) Plenum Publishing Corporation, New York and London
- Galleschi, L; Bottari, A, Capocchi, R. R; Saviozzi, F. 1997. Partial characterization of a pepsin inhibitor from soft wheat bran. *Sci. Des Aliments.* 17: 173-182.
- Guisan, J.M., Penzol, G., Armisen, P., et al (1997) Immobilization of enzymes acting on macromolecular substrates. Reduction of steric problems. In: *Immobilization of enzymes and cells, Methods in Biotechnology*, vol I, (Bickerstaff, G.F., ed), Human Press Inc., Totowa, NJ, pp. 261-275.

- Gladwell, T. D. (2002). Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor. *Clin Ther* 24,38–58.
- Good, N. E. & S. Izawa (1972) “Hydrogen ion buffers”. *Meth. Enzymol.*, 24: 53-68
- Greenblatt DJ, Shader RI, and Harmatz JS (1989) Implications of altered drug disposition in the elderly: studies of benzodiazepines. *J Clin Pharmacol* 29:866– 872.
- Grubb, A. Cystatin C — properties and use as diagnostic marker. *Adv. Clin. Chem.* 2000. 35: 63–99.
- Gueven, N., Dittmann,K., Mayer,C. and Rodemann,H.P(1998) *Cancer let.*,125,77-82.
- Habres, J. M. & Billings, P. C. (1992) Intestinal epithelial cells contain a high molecular weight protease subject to inhibition
- Hamill, C.E., Caudle, W.M., Richardson, J.R., Yuan, H., Pennell, K.D., Greene, J.G., Miller, G.W., Traynelis, S.F., 2007. Exacerbation of dopamine terminal damage in a mouse model of Parkinson's disease by the G-protein coupled receptor, PAR1. *Mol. Pharm.* 72, 653–664.
- Haq SK, Atif SM, Khan RH. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: Natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 431, 145-159.
- Hartley, W. J., A. B. Grant y C. Drake. 1960. Control of white muscle disease and ill thrift with selenium. *New Zealand J. Agr.* 101:343.
- Hass GM, CA Ryan 1980 Carboxypeptidase inhibitor from ripened tomatoes;purification and properties. *Phytochemistry* 19: 1329-1333
- Henskens, M.C.; Veerman, E.C.I. and Amerongen, A.V.N. Cystatins in health and disease. *Biol. Chem.* 1996. 377: 71–86.
- Homandberg GA, RJ Peanasky 1976 Characterization of proteins from *Ascaris lumbricoides* which bind specifically to carboxypeptidase. *J. Biol Chem* 251: 2226-2233
- Horn, M., *et al.* (2005). "Differential elicitation of two processing proteases controls the processing pattern of the trypsin proteinase inhibitor precursor in *Nicotiana attenuata*." *Plant Physiol* 139(1): 375-88.
- Huber, A., *et al.* (1993). "Peri-operative elastase-alpha-1 proteinase inhibitor in patients with postoperative intervertebral discitis." *Acta Neurochir (Wien)* 120(3-4): 150-4.
- Hugli, T. E. Protease inhibitors: novel therapeutic application and development. *Trends Biotechnol.* 1996; 14: 409-12.
- Hung, Y.H., M.L. Huang and K.S. Chen, 2003. Service quality evaluation by service quality performance matrix. *Total Qual. Manage.*, 14: 79-89.

- Ivanov, I.I., Diehl, G.E., y Littman, D.R. (2006). Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 308, 59–82.
- Iwanaga, S.; Yamasaki, N.; Kimura, M.; Kouzuma, Y. Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 2005, 69, 220–223.
- Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). "Inhibitors of proteases as anticancer drugs." *Neoplasma* 52: 185–192.
- Joanitti GA, Freitas SM, Silva LP. 2006. Proteinaceous protease inhibitors: Structural features and multiple functional faces. *Current Enzyme Inhibition* 2, 199-217.
- Junge, C.E., Sugawara, T., Mannaioni, G., Alargamsy, S., Conn, P.J., Brat, D.J., Chan, P.H., Traynelis, S.F., 2003. The contribution of protease-activated receptor 1 to neuronal damage caused by transient focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 13019–13024.
- Kaneider, N.C., Leger, A.J., Agrawal, A., Nguyen, N., Perides, G., Derian, C., Covic, L., Kuliopulos, A., 2007. 'Role reversal' for the receptor PAR1 in sepsis-induced vascular damage. *Nat. Immunol.* 8, 1303–1312.
- Katz, B.A., J.M. Clark, J.S. Finer-Moore, T.E. Jenkins, C.R. Johnson, M.J. Ross, C. Luong, W.R. Moore and R.M. Stroud (1998) "Design of potent selective zinc-mediated serine protease inhibitors". *Nature* 391:608-12.
- Kim, J. Y., Park, S. C; Hwang, I; Cheong, H; Nah, J. W; Hahm, K. S; Park, Y. (2009). "Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity." *Int J Mol Sci* 10(6): 2860-72.
- Kulkarni, A; Rao, M. 2007. Biochemical characterization of an aspártico protease from *Vigna radiata*: kinetic interactions with the classical inhibitor pepstatina implicating a tight binding mechanism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1774: 619-627
- Lam, S. K., Hui, C., & Law, K. (1999). Organizational citizenship behavior: Comparing perspectives of supervisors and subordinates across four international samples. *Journal of Applied Psychology*, 84, 594–601.
- Laskowski, M. Jr. and Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. *Annu. Rev. Biochem.* 1980; 49: 593-626.
- Lawrence PK, Koundal KR. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* 5, 121-143.
- Leger, A.J., Covic, L., Kuliopulos, A., 2006. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation* 114, 1070–1077.
- Leung, D., G. Abbenante, and D.P. Fairlie. 2000. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J. Med. Chem.* 43: 305-341.

- Lin, Y.C., K.S. Hwang and F.S. Wang, 2004. A mixed-coding scheme of evolutionary algorithms to solve mixed-integer nonlinear programming problems. *Comput. Math. Appl.*, 47: 1295-1307.
- Maccioni, R.B., C. Ott, I.I. Concha and J.P. Muñoz (2001) "The protein kinase Cdk5. Structural aspects, roles in neurogenesis and involvement in Alzheimer's pathology". *Eur. J. Biochem.*, 268:1518-27.
- Macedo, M. L; Garcia, V. A; Freire, M. G; Richardson, M. 2007b. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (S.W) Willd. *Phytochemistry*. 68, 1104-1111.
- Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R., 2001. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 53, 245–282.
- Maganga, D. B; Strukelj, B; Pungercar, J; Gubensek, F; Turk, V; Kregar, I. 1992. Isolation and sequence analysis of the genomic DNA fragment encoding an aspartic proteinase inhibitor homologue from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant Mol. Biol.* 20. 311-313.
- Mares, M; Meloun, B; Pavlik, M; Kostka, V; Baudys, M. 1989. Primary structure of the cathepsin D inhibitor from potatoes and its structural relationship to soybean trypsin inhibitor family. *FEBS Lett.* 251. 94-98.
- Mandal, S.; Kundu, P.; Roy, B.; Mandal, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 37161– 37168.
- Mebs, D., & E. Gebauer, 1980. Isolation of proteinase inhibitory, toxic and hemolytic polypeptides from a sea anemone, *Stochactis* sp. *Toxicon*, 18 : 97-106.
- Mendes-Silva, W., M. Assafim, B. Ruta, R.Q. Monteiro, J.A. Guimaraes, and RB. Zingali. 2003. Antithrombotic effect of Glycyrrhizin, a plant-derived thrombin inhibitor. *Thromb. Res.* 112:93-98.
- Miranda, E., Lomas, D.A., 2006. Neuroserpin: a serpin to think about. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 709–722.
- Mock DM (1996). Biotin. In: *Present Knowledge in Nutrition*. Ziegler EE, Filer LJ (Eds.), 7 th Edition. ILSI Press, Washington, pp 220-235.
- Molinari, F., Meskanaite, V., Munnich, A., Sonderegger, P., Colleaux, L., 2003. Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Hum. Mol. Gene*
- Mosolov VV, Grigoryeva LI, Valueva TA. 2001a. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review). *Applied Biochemistry and Microbiology* 37, 115-123.

Mosolov VV, Grigoryeva LI, Valueva TA. 2001b. Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review). *Prikl Biokhim Mikrobiol.* 37, 643-650.

Mosolov VV, Valueva TA. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 41, 261-282.

Mosolov, V.V., Valueva, T.A., 2006. Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants with phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry (Moscow)* 71, 838–845.

Mulligan, M.S., A.B. Lentsch, M. Huber-Lang, R.-F. Guo, V. Sarma, C.D. Wright, T.R. Ulich and P.A. Ward (2000) "Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor". *Am. J. Pathol.* 15:1033-9.

Neuhof, C., M.L. Oliva, D. Maybauer, M. Maybauer, C. de Oliveira, M.U. Sampaio, C.A. Sampaio, and H. Neuhof. 2003. Effect of plant Kunitz inhibitors from *Bauhinia bauhinioides* and *Bauhinia rufa* on pulmonary edema caused by activated neutrophils. *Biol. Chem.*384: 939-944.

Neurath H. 1989. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem Sci* 14, 268-271.

Nicole, O., Goldshmidt, A., Hamill, C.E., Sorensen, S.D., Sastre, A., Lyuboslavsky, P., Hepler, J.R., McKeon, R.J., Traynelis, S.F., 2005. Activation of protease-activated receptor-1 triggers astrogliosis after brain injury. *J. Neurosci.* 25, 4319–4329.

Nielsen, H.M., Minthon, L., Londos, E., Blennow, K., Miranda, E., Perz, J., Crowther, D.C., Lomas, D.A., Janciauskiene, S.M., 2007. Plasma and CSF serpins in Alzheimer disease and dementia with Lewy bodies. *Neurology* 69, 1569–1579.

Niessen, F., Furlan-Frequia, C., Schaffner, F., Pawlinski, R., Bhattacharjee, G., Chun, J., Derian, C.K., Andrade-Gordon, P., Rosen, H., Ruf, W., 2008. Dendritic cell PAR1–S1P3 signalling couples coagulation and inflammation. *Nature* 452, 654–658.

Norton, G. Proteinase inhibitors. In *Toxic Substances in Crop Plants*; D'Mello, J. P. F., Duffus, C. M., Duffus, J. H., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, U.K., 1991; pp 68-106.

Obregon, W. D., et al. (2009). "Biochemical and PMF MALDI-TOF analyses of two novel papain-like plant proteinases." *Protein Pept Lett* 16(11): 1323-33.

Olson, E.E., Lyuboslavsky, P., Traynelis, S.F., McKeon, R.J., 2004. PAR-1 deficiency protects against neuronal damage and neurological deficits after unilateral cerebral hypoxia/ ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 964–971.

Park, S.S. and H. Ohba. 2004. Suppressive activity of protease inhibitors from buckwheat seeds against human T-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 117: 65-74.

- Patick, A. K; Duran, M; Cao, Y; Shugarts, D; Keller, M. R; Mazabel, E; Knowles, M; Chapman, S; Kuritzkes, D. R; Markowits, M. (1998). "Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir." *Antimicrob Agents Chemother* 42(10): 2637-44.
- Pearl, L. H. (1987). "The catalytic mechanism of aspartic proteinases." *FEBS Lett* 214(1): 8-12.
- Qi RF, Song ZW, Chi CW. 2005. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37, 283-292.
- Ramos, V; Freire, M. G. M; Parra, J. R. P; Macedo, M. L. R. 2009. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Com. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 152, 255-261.
- Rancoua JM, Caryan 1963 Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes. *Arch Biochem Biophys* 125: 380-383
- Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barret, A.J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem. J.* 2004; 378: 705-716.
- Rawlings, N. D; Morton, F. R; Kok, C. Y; Barrett, A. J. 2008. MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36: D320-D325.
- Ricagno, S., Caccia, S., Sorrentino, G., Antonini, G., Bolognesi, M., 2009. Human neuroserpin: structure and time-dependent inhibition. *J. Mol. Biol.* 388, 109–121.
- Rice, K.D., R.D. Tanaka, B.A. Katz, R.P. Numerof and W.R. Moore (1998) "Inhibitors of tryptase for the treatment of mast cell-mediated diseases". *Curr Pharmaceut Design* 4: 381-96.
- Richardson, M., 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), *Methods in Plant Biochemistry: Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*, vol. 5. Academic Press, New York, pp. 259–305
- Ritonja, A; Krizaj, I; Mesko, P; Kopitar, M; Lucovnik, P; Strukelj, B; Pungercar, J; Buttle, D; Barrett, A; Turk, V. 1990. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett.* 267. 13-15.
- Roberts, S.B. (2002) "Gamma-secretase inhibitors and Alzheimer's disease". *Adv Drug Deliv Rev.* 54:1579-88
- Rosenthal, P.J. (1998) "Proteases of Malaria Parasites: New Targets for Chemotherapy", *Emerging Infectious Diseases* 4(1). (<http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/rosenth.htm>).

- Ryan CA. 1990. Proteinase inhibitors in plants genes for improving defenses against insects and pathogens Annual Review of Phytopathology 28, 425-449.
- Sakato, K; Tanaka, H; Misawa, M. 1975. Broad-specificity proteinase inhibitors in *Scopolia japonica* (Solanaceae) cultured cells. Eur. J. Biochem. 55, 211-219.
- Senc̣ic̣, L. y Mac̣ek, P. (1990) new method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. Comp. Biochem. Physiol., 97B, 687–693.
- Shewry, P.R. 2003. Tuber storage proteins. Ann. Bot. 91: 755- 769.
- Shiomi KA, Itoh K, Yamanaka H, Kikuchi T (1985). Biological activity of crude venom from the crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci*. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51(7): 1151-1154.
- Singh RR and Appu Rao AG (2002). Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for “hyperreactive” disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. Biochim. Biophys. Acta 1597: 280-291.
- Sin, S. F., et al. (2004). "Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*." Planta 219(6): 1010-22.
- Srinivasan, A.; Giri, A. P.; Harsulkar, A. M.; Gatehouse, J. A.; Gupta, V. S. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. Plant Mol. Biol. 2005, 57, 359–374.
- Sundd, M., S.Kundu, G.P. y Medicherla, J.V.(1998).Purification and characterization of a highly stable cysteine proteasefrom the latex of *Ervataria Coronaria*.Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.62(10):1947-1955.
- Supuran CT, Scozzafava A, Clare BW. 2002. Bacterial protease inhibitors. Med Res Rev 22, 329-372.
- Troll, W. and A.R. Kennedy. 1993. Protease Inhibitors as Cancer Chemopreventive Agents. New York: Plenum Press.
- Turk, V., et al. (1991). "The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases." FEBS Lett 285(2): 213-9.
- Turk, B., et al. (1997). "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors." Biol Chem 378(3-4): 141-50.
- Valueva TA, Mosolov VV. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochemistry (Moscow) 69, 1305-1309.

Van Noorden, J. F. IBC's 2nd International Conference on Protease Inhibitors: Novel Therapeutic Applications and Development, Washington DC, 24-26 February. *Acta Histochem.* 1997; 249-55.

Vassar R., B.D. Bennett, S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz, P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers & M. Citron (1999) "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE", *Science* 22:735-41.

Vendrell, J., Querol, E. & Aviles, F. X. (2000). Metalloproteases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties. *Biochim. Biophys. Acta*, 1477, 284–298.

Wang, Y., Luo, W., Reiser, G., 2008. Trypsin and trypsin-like proteases in the brain: proteolysis and cellular functions. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 237–252.

Whitaker, J. R. Protease and R-amylase inhibitors of higher plants. In *Antinutrients and Phytochemicals in Food*; Shahidi, F., Ed.; ACS Symposium Series 662; American Chemical Society: Washington, DC, 1997; pp 10-17.

Xu, Z.; Friess, H.; Solioz, M.; Aebi, S.; Korc, M.; Kleeff, J. and Buchler, M.W. BCL-XL antisense oligonucleotides induce apoptosis and increase sensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine. *International Journal of Cancer*, October 2001, vol. 94, no. 2, p. 268-274.

Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W. & Kennedy, A. R. (1985) Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 5395-5399.

Zingali, R. B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.-C. and Bon, C. (1993) Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry.* 1993; 32: 10794-10802

