



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO DEN CIENCIAS

BIOTECNOLOGIA

DISEÑO Y  
CONSENSO

CONSTRUCCION DE UNA CISTATINA

**TESIS**  
QUE PARA  
**MAESTRAEN**  
PRESENTA:  
**ARELI DEL**

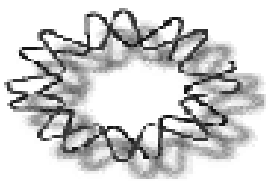
OBTENER ELGRADO DE:  
**CIENCIAS**

**CARMEN MORAN GARCIA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. LORENZO SEGOVIA FORCELLA

CUERNAVACA, MORELOS 2008





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Para Ti:

S. D. L. T.

Por todo

Gracias

A la Familia Morán García  
Ramón, Bertha, Edgar y Eder  
Los Quiero

Llegar a este punto no ha sido nada fácil, pero sin duda el contar en mi vida con gente tan maravillosa como ustedes, me ha permitido llegar hasta aquí e ir por lo que sigue, mi agradecimiento para todos:

A mis papás por darme su apoyo y unas alas inmensas que siempre me llevan a donde quiero ir, a mis hermanos por estar ahí y compartir mis sueños.

A mis abuelos, por ser mi inspiración, mi ejemplo y por cuidarme siempre.

A mi familia, por entender mis ausencias, por esperarme, por ser los mejores.

A Lorenzo, por todo, por tu apoyo para continuar con mi formación académica, por aceptar una isla chiva en el territorio puma, por la oportunidad de trabajar en el grupo estos años y los que faltan.

Al grupo LS, originales y adoptados que están y que ya no están: Vivis, Ili, Archis, Adri, Marel, Mariana, Dago, Lore, Haven, Javier, Alex, Ernesto, Fernando, Pancho y Paloma, por la convivencia, el tour, la música de viernes, las noches de uno, las pizzas en el mundial y los desayunos semanales.

A Viviana, por resolver mis dudas y aclarar mis ideas, por toda la ayuda, por los pasteles también, gracias.

A las niñas, Ari, Di, Luz, Carmen, Nancy y Eliz por su amistad y apoyo incondicional, siempre.

Y muy formalmente:

Al Dr. Flavio Henrique-Silva y su grupo por su valiosa colaboración.

Al comité tutorial Dr. Joel Osuna y Dr. Miguel Lara por su opinión y crítica para el desarrollo de este trabajo.

Al Jurado revisor por sus comentarios y sugerencias para esta tesis.

Al Lab. de Físicoquímica e Ing. de Proteínas del Departamento de Bioquímica de la Fac. de Medicina UNAM, por permitirme hacer uso de su equipo para los ensayos de Dicroísmo Circular, de igual forma a la Dra. Mariana Peimbert por su asesoría para realizar esta parte del proyecto.

Al Dr. Humberto Flores por su asesoría para utilizar el equipo TECAN.

Por supuesto a la UNAM.

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Lorenzo Segovia Forcella.

**ÍNDICE.**

Abreviaturas.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Ingeniería de consensos.....	6
Las cistatinas.....	8
El modelo de inhibición.....	10
Antecedentes.....	12
Incremento en la estabilidad del factor de transcripción P53.....	12
Las chaperonas GroEL.....	12
El dominio SH3.....	13
La proteína verde fluorescente.....	13
La glicoproteína gp120.....	14
Las cistatinas como mecanismo de defensa en plantas.....	15
Generación de cistatinas quimeras.....	15
Cistatinas multidominio.....	16
Cistatina modificada.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivo.....	18
Metodología.....	19
Resultados.....	30
Determinación de la secuencia consenso.....	30
Diseño de los oligonucleótidos.....	31
Síntesis del gen de la cistatina consenso.....	31
Expresión de la cistatina consenso.....	32
Purificación de la cistatina consenso y de la cistatina 1.....	34
Ensayo de actividad.....	37
Dicroísmo circular.....	38
Determinación de Tm.....	39

Resultados Anexos.....	40
Discusión.....	41
Conclusiones.....	44
Perspectivas.....	44
Alineamiento.....	45
Referencias.....	48



**ABREVIATURAS.**

T<sub>m</sub> Temperatura media de desnaturalización

°C grados centígrados

ADN Ácido Desoxiribonucleico

M Molar

kDa kilo Daltones

pb pares de bases

L litro

EDTA Ácido etilen diamino tetra-acético

TEMED Tetrametiletildiamina

μL microlitros

pmol picomolas

μg microgramos

V volts

IPTG Isopropil β-D-1-Tiogalactopiranosido

SDS Dodecil Sulfato de Sodio

min minutos

LB Medio de cultivo Luria-Bertani

DO Densidad Optica

nm nanometros

mL mililitro

mM milimolar

h horas

mA miliamperes

rpm revoluciones por minuto

μM micromolar

## RESUMEN.

Entender los mecanismos que dictan la estabilidad en las proteínas contribuye en gran medida, al diseño de proteínas con propiedades específicas que les permitan realizar una actividad en particular, aún en condiciones que disten de ser su óptimo natural. La Ingeniería de consensos es un enfoque experimental que surgió en los últimos años con el fin de incrementar la estabilidad en las proteínas. Esta estrategia se basa en el concepto del Consenso el cual enuncia lo siguiente: en una posición dada de un alineamiento de secuencias de proteínas homólogas, el respectivo aminoácido consenso contribuye en mayor medida a la estabilidad de la proteína que el aminoácido no consenso. Las cistatinas son proteínas inhibidoras de cisteín-proteasas. Utilizando la Ingeniería de consensos se obtuvo la secuencia que corresponde a una cistatina consenso, posteriormente se sintetizó y expresó el gen que corresponde a esta proteína. La cistatina consenso, presenta un incremento en su  $T_m$  (*Melting temperature* Temperatura media de desnaturalización) de 23°C respecto de la cistatina 1 de caña de azúcar contra la cuál se comparó. El análisis pertinente sobre el perfil de inhibición de la cistatina consenso, nos reveló además un aumento en su actividad y rango de especificidad como inhibidor de cisteín-proteasas.

**RESUMEN.**

Entender los mecanismos que dictan la estabilidad en las proteínas contribuye en gran medida, al diseño de proteínas con propiedades específicas que les permitan realizar una actividad en particular, aún en condiciones que disten de ser su óptimo natural. La Ingeniería de consensos es un enfoque experimental que surgió en los últimos años con el fin de incrementar la estabilidad en las proteínas. Esta estrategia se basa en el concepto del Consenso el cual enuncia lo siguiente: en una posición dada de un alineamiento de secuencias de proteínas homólogas, el respectivo aminoácido consenso contribuye en mayor medida a la estabilidad de la proteína que el aminoácido no consenso. Las cistatinas son proteínas inhibidoras de cisteín-proteasas. Utilizando la Ingeniería de consensos se obtuvo la secuencia que corresponde a una cistatina consenso, posteriormente se sintetizó y expresó el gen que corresponde a esta proteína. La cistatina consenso, presenta un incremento en su  $T_m$  (*Melting temperature* Temperatura media de desnaturalización) de 23°C respecto de la cistatina 1 de caña de azúcar contra la cuál se comparó. El análisis pertinente sobre el perfil de inhibición de la cistatina consenso, nos reveló además un aumento en su actividad y rango de especificidad como inhibidor de cisteín-proteasas.

## **INTRODUCCIÓN.**

Uno de los retos de la Biotecnología lo constituye el diseño de enzimas que desempeñen su función biológica bajo un amplio rango de temperaturas y condiciones desnaturalizantes para que de esta forma puedan ser empleadas en procesos industriales a gran escala, en aplicaciones biotecnológicas o bien con fines terapéuticos. En procesos como éstos es deseable que las enzimas puedan trabajar a altas temperaturas, pues esta condición favorece la velocidad de reacción o bien la solubilidad de los reactantes, además puede evitarse la contaminación por microorganismos (1). Dado lo anterior, resulta de gran relevancia el entender los mecanismos que determinan la estabilidad en las proteínas y buscar la manera de potencializar esta propiedad.

Buscando contribuir con esta idea se han implementado tres diferentes estrategias: el diseño racional ó Ingeniería de proteínas, la Evolución dirigida y la Ingeniería de consensos. Y más que decidir cuál de estas estrategias resulta ser la mejor, debe considerarse la manera de combinarlas con el fin de obtener mejores resultados.

En los experimentos de Evolución dirigida se realizan ciclos de mutagénesis al azar y selección, con ello se ha mimetizado el proceso evolutivo natural, para tratar de entender como operan los mecanismos de evolución en las proteínas. Mediante este tipo de experimentos se han obtenido indicios acerca de los determinantes de la estabilidad en las proteínas. Después de varios ciclos de evolución y selección a los que se ve sometido un polipéptido para incrementar su estabilidad, generalmente se favorece la aparición de residuos aromáticos, lo que sugiere que estos cambios contribuyen para mejorar el empacamiento del núcleo hidrofóbico de las proteínas (2).

Por su parte el diseño racional o Ingeniería de proteínas se enfoca en la sustitución de residuos específicos muy bien delimitados, con base en la información disponible acerca de la relación estructura-función de la proteína que se requiere modificar. Si bien utilizar un enfoque racional para incrementar la estabilidad de las proteínas resulta sumamente complicado, puesto que ignoramos la contribución exacta de cada residuo a la estabilidad global de un polipéptido (3).

Como Boris Steipe menciona en sus trabajos de Estadística termodinámica; la estabilidad de una proteína puede estar determinada por una multitud de interacciones tanto locales como de rango más amplio. La posición de cada residuo en la estructura de una proteína representa un componente independiente y puede encontrarse en un microestado específico, debido a la naturaleza misma de cada residuo, aunque es el sistema completo (la proteína) el que finalmente debe responder ante una necesidad global. Por lo que podemos considerar que la estabilidad termodinámica se refiere al equilibrio entre la diferencia de la energía libre en el estado desplegado y el estado nativo de una proteína (4,5).

Si bien buscamos incrementar la estabilidad de una proteína, puede ser necesario que varias sustituciones de aminoácidos se combinen en una mutante múltiple pues en muchos casos los efectos estabilizadores de mutaciones individuales no son independientes sino aditivos (6).

## **INGENIERÍA DE CONSENSOS.**

Una de las estrategias para identificar mutaciones estabilizantes involucra la comparación de secuencias de las proteínas más estables con aquellas menos estables, esto con el fin de identificar patrones de aminoácidos que correlacionen con la estabilidad. Pero debido a la gran similitud entre la estructuras de proteínas termofílicas y mesófilas estamos muy lejos aún de generalizar estrategias que permitan obtener un incremento en la estabilidad termodinámica, en una proteína determinada.

Por ejemplo las proteínas termofílicas presentan características como son el aumento de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno respecto a las proteínas mesófilas, este tipo de características les permiten mantener un valor alto de  $T_m$  (*Melting temperature* Temperatura mediade desnaturalización). Al trabajar con enzimas termofílicas se ha observado también que la disminución de su actividad enzimática a temperatura ambiente se debe a la reducción de su flexibilidad conformacional (7). Este punto de vista sugiere que el acoplar la estabilidad y la actividad enzimática puede ser posible y que las enzimas más estables no resultan por ello menos eficientes.

En los últimos años surgió un tipo de enfoque semiracional distinto de la Ingeniería de proteínas y la Evolución dirigida, pero que de igual forma pretende abordar el incremento de la estabilidad en las proteínas; esto es la Ingeniería de consensos.

La Ingeniería de consensos permite predecir mutaciones estabilizantes con base en la información obtenida, del análisis de los perfiles de secuencias de proteínas homólogas. La idea fundamental de esta estrategia experimental se resume en el siguiente enunciado: en una posición dada de un alineamiento de secuencias de proteínas homólogas, el respectivo aminoácido consenso contribuye en mayor medida a la estabilidad promedio de la proteína que el aminoácido no consenso.

La Ingeniería de consensos puede complementar las estrategias de la Ingeniería de proteínas y de Evolución dirigida, para generar datos que contribuyan a predecir la combinación de sustituciones necesaria, que permiten un incremento en la estabilidad, con tan solo conocer la secuencia de una familia de proteínas y posteriormente de ser necesario refinarse con información estructural y funcional.

Esta técnica se planteó originalmente en un estudio sobre dominios variables de inmunoglobulinas y subsecuentemente, con fragmentos de cadena sencilla (scFvs) y anticuerpos completos. Este trabajo resultó de particular interés para el empleo de scFvs con fines terapéuticos (8) y la generación de proteínas que funcionen como armazones para generar librerías de ligandos específicos (9).

Los anticuerpos son proteínas, cuya estabilidad es conferida en gran parte por puentes disulfuro, el ambiente reductor del citoplasma previene la formación de estos enlaces, por ello su estabilidad y funcionalidad puede verse afectada, Ohage *et al* encuentran que ciertos anticuerpos resultan naturalmente más estables en el ambiente citoplasmático que otros, al analizar sus secuencias se observó que eran muy semejantes a la secuencia consenso, que se obtenía al realizar un alineamiento de las regiones variables de distintos anticuerpos. Entre mayor era el parecido de la secuencia de un anticuerpo respecto de la secuencia consenso, estos resultaban significativamente más estables y funcionales (8). La hipótesis que formuló este grupo enuncia lo siguiente: el repertorio de inmunoglobulinas se asemeja a un conjunto canónico de secuencias, cada una generada a partir de un grupo de secuencias germinales,

las cuáles son seleccionadas en un proceso de mutaciones al azar, para ser compatibles con cada aspecto de la función de los anticuerpos.

La Ingeniería de consensos ha sido utilizada en varios otros casos para incrementar la estabilidad de diferentes proteínas ya sea diseñando proteínas consensos *ab initio* ó modificando la secuencia de proteínas ya existentes para que se asemejen a la secuencia consenso correspondiente y en ningún modo ha sido limitada a dominios de anticuerpos, pues se ha aplicado también a la estabilización de otros tipos de proteínas entre ellos: las chaperonas GroEL (10), los dominios SH3 (11), la proteína Azami verde (9) siguiendo distintos objetivos y para muy diversas aplicaciones.

El ejemplo más representativo de la Ingeniería de consensos es un estudio realizado por Lehman, *et al*, donde comparan 13 secuencias de fitasas de hongos y obtienen una proteína consenso que presenta un incremento de 22°C en su  $T_m$  (12). Este es uno de los trabajos más sobresalientes, debido a que de manera sencilla y rápida se obtuvo un aumento significativo en la termoestabilidad de esta proteína. En un estudio posterior de este grupo (13), se sumaron algunas secuencias más al alineamiento original y se efectuó además un análisis detallado de cada una de las mutaciones realizadas originalmente, con esta información se consiguió elevar la  $T_m$  de la fitasa consenso de 78°C hasta 90.4°C, estos valores se obtuvieron mediante un estudio de calorimetría diferencial de barrido. Las curvas de capacidad calorífica obtenidas con este estudio se muestran en la figura 1.

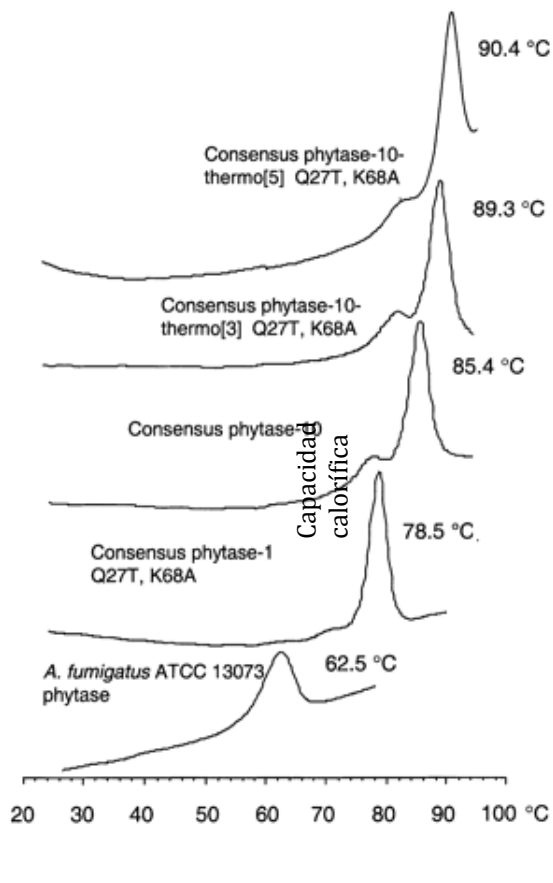


Fig. 1. Análisis calorimétrico de distintas variantes obtenidas en base a diferentes combinaciones de mutaciones. La variante 10 termo[5] presenta la temperatura de desnaturalización más alta (90.4°C)(13).

Con el fin de contribuir al establecimiento de algunos de los principios generales sobre el tipo de sustituciones que permiten el incremento en la estabilidad de una proteína, en el presente trabajo utilizamos la Ingeniería de consensos como un enfoque semiracional que nos permita obtener proteínas más estables. Las cistatinas son las proteínas que sirvieron como modelo de estudio en este proyecto, por lo que a continuación enunciaré algunos datos sobre estas proteínas.

## LAS CISTATINAS.

Las cistatinas son inhibidores de cisteína-proteasas. Las proteasas pueden clasificarse en serín-proteasas, cisteín-proteasas, aspártico-proteasas y metalo-proteasas de acuerdo al átomo catalítico que presentan. Para cada grupo de proteasas se han identificado inhibidores específicos (14). En la siguiente tabla se representan los distintos tipos de proteasas y algunas proteínas de cada grupo.

PROTEASAS	átomo catalítico	PROTEÍNAS
Serín-proteasas	Ser, His	Tripsina, Quimiotripsina, Elastasa, Catepsina G
Aspártico-proteasas	Asp, Try	Catepsinas D y E, Renina, Pepsina
Metallo-proteasas	Ión metálico	Carboxipeptidasas A y B, Aminopeptidasas
Cisteín-proteasas	Cys	Papaína, Ficina, Bromelina, Catepsinas B, C, H, K, L, O, S y W

Tabla 1. Grupos de proteasas y representantes de cada grupo (14).

Las cistatinas son proteínas inhibidoras que mediante un mecanismo de tipo no competitivo impiden la actividad proteolítica de cisteín-proteasas. Estas proteínas conforman una superfamilia, que a su vez se divide en cuatro familias de acuerdo a su ubicación y función dentro de las células, sus similitudes de secuencia y estructura. Las cistatinas pueden encontrarse en microorganismos, animales y plantas (14).

### Familia 1 Estefinas.

Las estefinas son proteínas citosólicas con un peso molecular de 11 kDa, estas proteínas no presentan puentes disulfuro.

### Familia 2 Cistatinas.

Estas proteínas presentan puentes disulfuro y glicosilaciones y un peso molecular en un rango que va de entre 13 y 24 kDa, presentan también un péptido señal para ser secretadas fuera de la célula.

### Familia 3 Quininógenos.

Estas son proteínas multidominio al igual que las proteínas de la familia 2, presentan glicosilaciones y puentes disulfuro, con una masa molecular que puede estar entre 60 y 120 kDa, son las cistatinas más grandes.

### Familia 4 Fitocistatinas.

Las cistatinas de plantas ó fitocistatinas son proteínas con peso molecular de alrededor de 13 kDa aunque existen algunas excepciones como la cistatina de tomate, una proteína conformada por 8 dominios y con una masa molecular aproximada de 110 kDa. Las proteínas de esta familia comparten con las estefinas la característica de no presentar puentes disulfuro (14).

Las fitocistatinas mejor caracterizadas a la fecha son tres encontradas en el arroz (*Oryza sativa*). Algunas de las características que se han determinado para estas proteínas, indican que sus especificidades y patrones de expresión difieren significativamente, según la fase de desarrollo en que se encuentre la planta y/o el tipo de tejido del que se trate (15). Se ha visto también que las cistatinas se expresan en mayor medida durante la maduración y germinación de las semillas, en la etapa posterior a la floración, la senescencia de las hojas, durante el ataque de depredadores y como respuesta a procesos infecciosos (16).

Las fitocistatinas se expresan además cuando se presentan condiciones de estrés biótico y abiótico (17,18). Esto ha sido observado con detalle en plantas de cebada y plántulas de castañas, las cuales fueron sujetas a condiciones de anaerobiosis, oscuridad, bajas temperaturas, estrés salino, por calor y frío, donde se comprobó como la expresión de cistatinas aumentó significativamente en estas condiciones (19,20).

En plantas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) también se ha evaluado la expresión de cistatinas y se encontró que los niveles de expresión más altos ocurren en tejidos vegetativos y semillas maduras y disminuyen en la etapa posterior al proceso de germinación (17). Estos datos sugieren que su expresión se inhibe en orden de favorecer la degradación de proteínas de reserva, por acción de cisteín-proteasas endógenas durante la germinación, de esta forma participan como reguladores del recambio proteico de la célula durante la germinación (21,22).

Se sabe además que estas proteínas mantienen varias isoformas en una misma especie de planta, esto se atribuye a las variedad de funciones que tienen dentro de la célula y la necesidad de discernir entre proteasas endógenas y exógenas (23,24).

## **EL MODELO DE INHIBICIÓN.**

La actividad de las cistatinas como inhibidores de cisteín-proteasas se realiza mediante la formación de complejos estables, que impiden, alteran ó previenen el acceso al sitio activo de las proteasas (16). A pesar del elevado número de fitocistatinas descritas, solo se dispone



de datos estructurales precisos de la orizacistatina I de arroz, cuya estructura tridimensional ha sido determinada por espectroscopía de resonancia magnética nuclear (25).

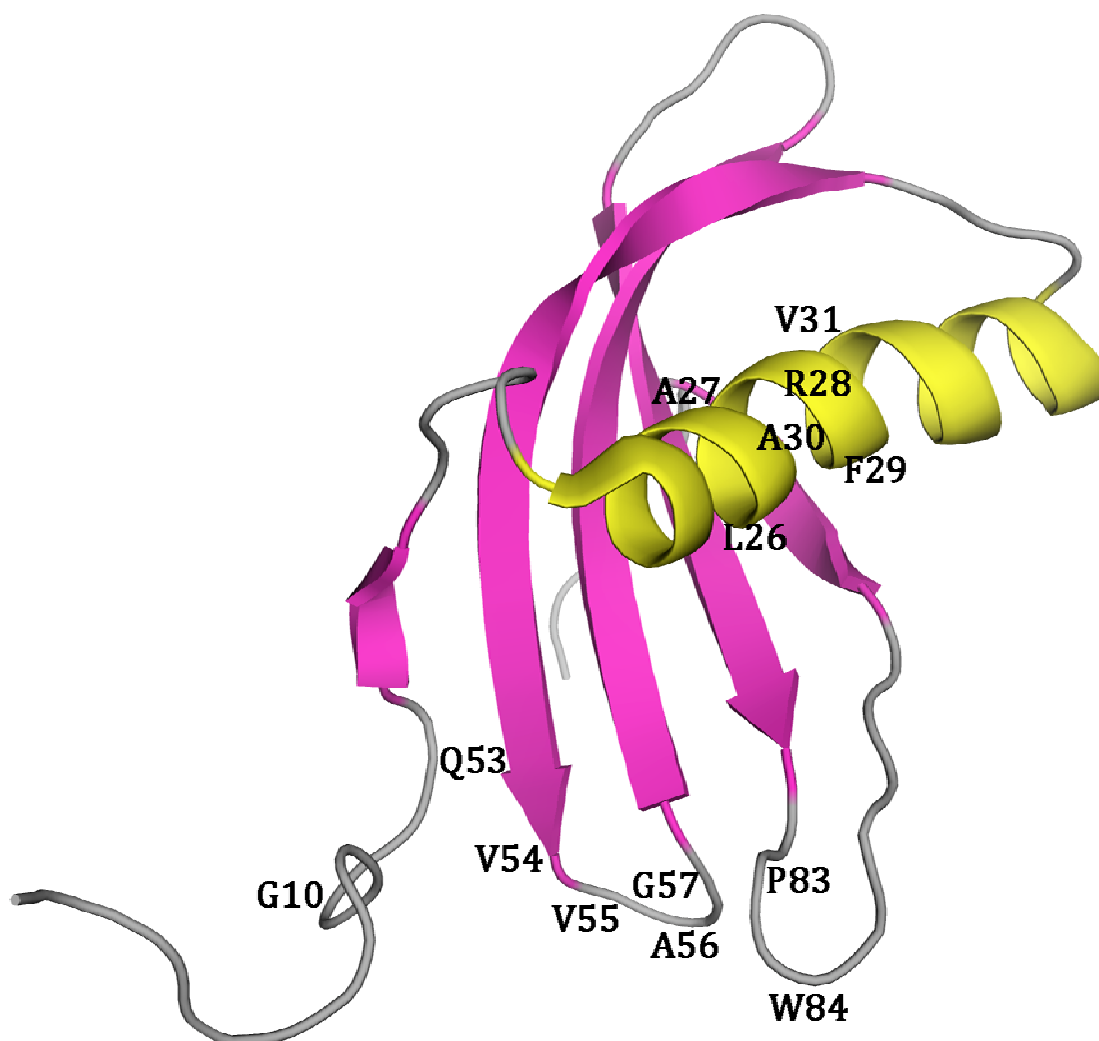


Fig. 2 Estructura tridimensional de la orizacistatina 1 de *Oryza sativa*(25).

En la figura 2 se muestra la presencia de un alfa hélice en la región N-terminal donde se encuentra el motivo de secuencia LARFAV (residuos 26 a 31) característico de las fitocistatinas. Se muestran también otros tres de los motivos característicos descritos para estas proteínas: el motivo QXVXG, una Glicina (G10) en el extremo N-terminal y un Triptófano en el extremo opuesto (W84).

La actividad de las fitocistatinas depende principalmente de estos tres motivos de secuencia, los cuales participan en la interacción con el sitio activo de la cisteín-proteasa. La primera región la constituye el asa formada por 5 residuos del motivo QXVXG (residuos Q53 a G57), donde X corresponde a cualquier aminoácido. El segundo motivo lo conforman los residuos P83 y W84, localizados en la región carboxilo terminal de la proteína y finalmente el tercer motivo lo constituye el residuo de glicina localizado en el extremo amino terminal que aún

cuando no interactúa directamente con el sitio activo, participa en la unión con la proteasa y por tanto en la especificidad de las cistatinas (26).

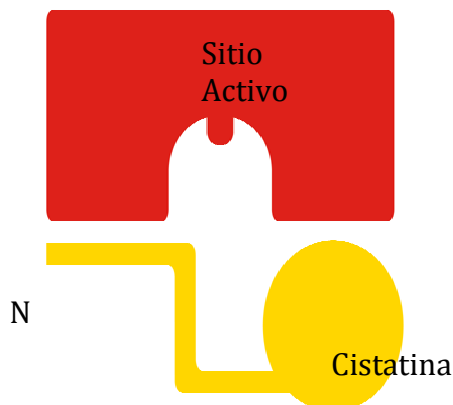


Fig.3. Representación del tipo de inhibición de las cistatinas sobre las cisteín-proteasas (27).

Con base en el análisis realizado sobre la estructura del complejo formado entre la estefina B y la papaína, se han descrito los residuos que participan en el mecanismo de inhibición de las cistatinas sobre las proteasas. Dos de las asas típicas de las cistatinas(LARFAV y QXVXG) interactúan con la superficie de la enzima, mientras que la región N-terminal se une a la proteasa en forma no covalente y adyacente al sitio activo de la enzima (Fig. 3), de esta forma lo bloquea al prevenir la interacción con el sustrato (27).

## **METODOLOGÍA.**

### **DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO.**

Para la obtención de la secuencia de la cistatina consenso se desarrolló la siguiente metodología:

Se realizó una búsqueda por Psi-Blast en bases de datos no redundantes utilizando como semilla la secuencia de la cistatina 1 de caña de azúcar (*S. officinarum*), de esta búsqueda se obtuvieron 106 secuencias de fitocistatinas de distintas bases de datos.

Se construyó un alineamiento múltiple con las secuencias encontradas, con los parámetros *default* del programa Muscle (41).

La secuencia consenso se definió con el programa Cons del servidor de EMBOSS (42), especificando un punto de corte de 30% de identidad entre las secuencias del alineamiento. Este porcentaje de identidad se ha reportado como un parámetro eficiente para obtener un consenso de mayoría simple(10). Entre más astringente se establece el porcentaje de identidad entre las secuencias del alineamiento, esto es arriba del 40%, más difícil resulta definir el aminoácido consenso.

### **DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.**

Se ha demostrado que el diseño de la secuencia de nucleótidos en la construcción de un gen sintético es importante para asegurar la expresión correcta de la proteína resultante, pues en diversos estudios se ha demostrado que utilizar codones raros puede resultar en una expresión deficiente, de la misma forma tampoco resulta conveniente utilizar los codones de máxima frecuencia de uso, debido al posible secuestro de los aminoacil tRNAs óptimos que podría afectar el crecimiento de la bacterias (32).

Por los antecedentes de estudios previos (34, 41, 43) sabíamos que la expresión de la cistatina 1 de caña en *E. coli* es factible pues no presentaba algún problema metodológico y aunado a la idea de expresar posteriormente el gen de la cistatina consenso en plantas de caña, se mimetizó la frecuencia de utilización de codones que presenta caña de azúcar (*S. officinarum*) para el gen de la cistatina 1 (44). Por ejemplo para la sustitución de Valina 16 por Isoleucina: el codón que utiliza *S. officinarum* en la cistatina 1 para Val16 es GUC con una frecuencia de 0.30; este fue sustituido por el codón de Ile ATT con una frecuencia de 0.34. De esta forma a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína consenso se determinó la secuencia en nucleótidos del gen.

El diseño de los oligonucleótidos para la síntesis del gen consenso, fue realizado utilizando el programa PRIMO de Chang Bioscience (42). Este programa se emplea para el diseño de oligonucleótidos con los cuales se sintetizarán genes completos para un hospedero específico, se seleccionan parámetros de temperatura de hibridación, el número de bases que aparean entre oligos y la longitud de cada uno de los mismos. Los parámetros del programa están optimizados para evitar la formación de estructuras secundarias que impidan el correcto ensamblado de la construcción.

Después de haber alimentado el programa con la secuencia consenso se obtuvieron 8 oligonucleótidos, siete de 60 pb y uno de 52 pb. Estos fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del IBT.

Oligo(5'->3') 1: Tamaño 60

GAGGAATTCC ATATGGAAGA AGCGCATAAC GGCCGTCGTA TGGCGATGCT GGGCGGCATT

Oligo(5'->3') 2: Tamaño 60

TTCAATAATT TCCAGGCTGT TTTCATGGCC GCCCGGCACA TCACGAATGC CGCCCAGCAT

Oligo (5'->3') 3: Tamaño 60

AGCCTGGAAA TTATTGAACT GGCGCGTTTT GCGGTGGATG AACATAACAA AAAAGAAAAC

Oligo (5'->3') 4: Tamaño 60

GTTCTTTCGC TTTCACCACA CGTTCAAATT CCAGCAGCGC GTTTTCTTTT TTGTTATGTT

Oligo (5'->3') 5: Tamaño 60

GGTGAAGCG AAAGAACAGG TGGTGGCGGG CACCCTGTAT TATCTGACCC TGGAAGCGAA

Oligo (5'->3') 6: Tamaño 60

ACCCACACTT TCGCTTCATA CAGTTTTTTTT TTGCCGCCCG CATCTTTCGC TTCCAGGGTC

Oligo (5'->3') 7: Tamaño 60

AAGCGAAAGT GTGGGTGAAA CCGTGGCTGA ACTTTAAAGA ACTGCAGGAA TTAAACCGG

Oligo (5'->3') 8: Tamaño 52

CAAGCTTTAC AGCGGACGGC TGCCCGCATC GCCCACCGGT TTAAATTCCT GC

### **SÍNTESIS DEL GEN DE LA CISTATINA CONSENSO.**

Purificación de Oligonucleótidos.

Antes de realizar la reacción para sintetizar el gen de la proteína consenso, fue necesario purificar los oligonucleótidos para eliminar subproductos de la reacción de síntesis de los mismos, de esta manera se reduce la posibilidad de generar construcciones incompletas o con secuencias distintas a la diseñada. La purificación se realizó mediante PAGE 12% 7 M de Urea.

Solución de Acrilamida al 12% y 7M de Urea:

TBE 5X:

Para 1 L.

54g Tris Base

27.5g Ácido Bórico

20 ml 0.5 M EDTA pH 8

Se mezcló en un vaso de precipitados:

11.4g de Acrilamida

0.6g de Bisacrilamida

42g de Urea

20mL de Buffer TBE 5X  
36mL de Agua mQ

Se preparó un gel mezclando 40mL de la solución de acrilamida al 12%, 280 $\mu$ L de Persulfato de Amonio al 10% y 14 $\mu$ L de TEMED.

Se precorrió el gel durante 15min a 350V, previo a cargar el gel se lavaron los pozos, se cargaron 50 $\mu$ g de oligo crudo por carril.

Se corrió el gel a 350V hasta que el colorante salió por el borde inferior del gel.

Se visualizó el gel sobre una placa de sílica fluorescente con luz UV de onda corta y se cortó la banda correspondiente a la longitud del oligo.

La banda se colocó en un tubo eppendorf de 1.5mL se agregó 1mL de Agua mQ estéril hasta cubrir el trozo de gel. Se incubó a 37°C durante 12 h.

Se retiró el sobrenadante y se concentró hasta 200 $\mu$ L en un Savant por un lapso de 2 h aproximadamente.

Se agregó 1.0mL de nButanol y se agitó en un vortex durante 30seg. Se centrifugó a 13000rpm durante 1min. Se eliminó la fase superior y se repitió una vez mas la extracción con nButanol.

Se agregó 1mL de etanol absoluto, se agitó en un vortex y se centrifugó 3 min. Se eliminó el sobrenadante por decantación.

Se secó el pellet en Savant, para posteriormente disolverlo en 115 $\mu$ L de agua mQ estéril se tomó una muestra y se midió la absorbancia a 260nm para obtener la concentración en  $\mu$ g/ $\mu$ L.

#### Ensamblado del gen.

Con los oligos puros se ensambló el gen de la siguiente manera: Los oligos corren en dirección antiparalela. El oligonucleótido número uno aparea 10 pb con el oligonucleótido número 2 en la región 3'. Por lo que posterior al apareamiento de las bases complementarias en ambos oligos, la polimerasa sintetiza la cadena que hace falta en las regiones en donde no hibridaron terminando con un segmento del gen que también aparea en 10 pb con el siguiente y así sucesivamente. En los ciclos sucesivos se amplifica el producto ensamblado, en los primeros ciclos. La reacción para sintetizar el gen de la proteína consenso se realizó en reacciones de PCR, con dos concentraciones distintas de oligos externos como única variante:

10  $\mu$ L de Buffer  
10  $\mu$ L de dNTPs  
10 pmol de oligo 1 y 20 pmol para la reacción 2  
10 pmol de oligo 8 y 20 pmol para la reacción 2  
1 pmol de oligos 2 al 7  
1  $\mu$ L de enzima Taq DNA polymerase (Roche®)  
1  $\mu$ L de enzima Pfu (Fermentas®)  
70  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O

La reacción de ensamblado se favorece utilizando una concentración menor de los oligos internos esto es del 2 a 7 y una concentración mayor de los oligos externos 1 y 8, pues en los primeros ciclos de la reacción se pretende ensamblar el gen y en los ciclos finales solo amplificar el producto ensamblado. En este caso se probaron dos concentraciones distintas 1:10 y 1:20 de los oligos internos respecto de los oligos externos.

Se utilizó un termociclador iCycler (Bio-Rad®), el programa de ciclado fue el siguiente:

1 ciclo 94°C 2min

5 ciclos 94°C 20seg (Rampa 2min) 45°C 30seg 72°C 1:30min

20 ciclos 94°C 20seg (Rampa 2min) 50°C 30seg 72°C 1:30 min

1 ciclo 72°C 10min

El producto de PCR final se analizó en un gel de agarosa (Bio-Rad®) al 1.2%. Posteriormente la reacción de ensamblado se purificó utilizando High Pure PCR Product Purification Kit (Roche®).

El producto de PCR y el vector de expresión se cortaron con las enzimas NdeI y BamHI (NEBiolabs®). Las reacciones de digestión se corrieron en un gel preparativo, del cuál se purificaron los fragmentos digeridos de vector e inserto.

El producto de PCR se clonó en el vector pBC CAT entre los sitios NdeI y BamHI de forma que queda fusionado al reportero de plegamiento, el gen de la Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT) (Fig. 9). La reacción de ligación fue transformada en células competentes *E. coli* XL1BlueMRF y plateada en cajas con medio LB y concentraciones crecientes de cloranfenicol [10, 15, 20, 30 y 40 µg/ml]. Si el producto de PCR corresponde a productos completos que a su vez resultan en la obtención de proteínas plegadas, el reportero de plegamiento la Cloranfenicol Acetil Transferasa estaría plegada también y permitiría a las bacterias transformadas con el plásmido pBC-CAT crecer en presencia de Cloranfenicol.

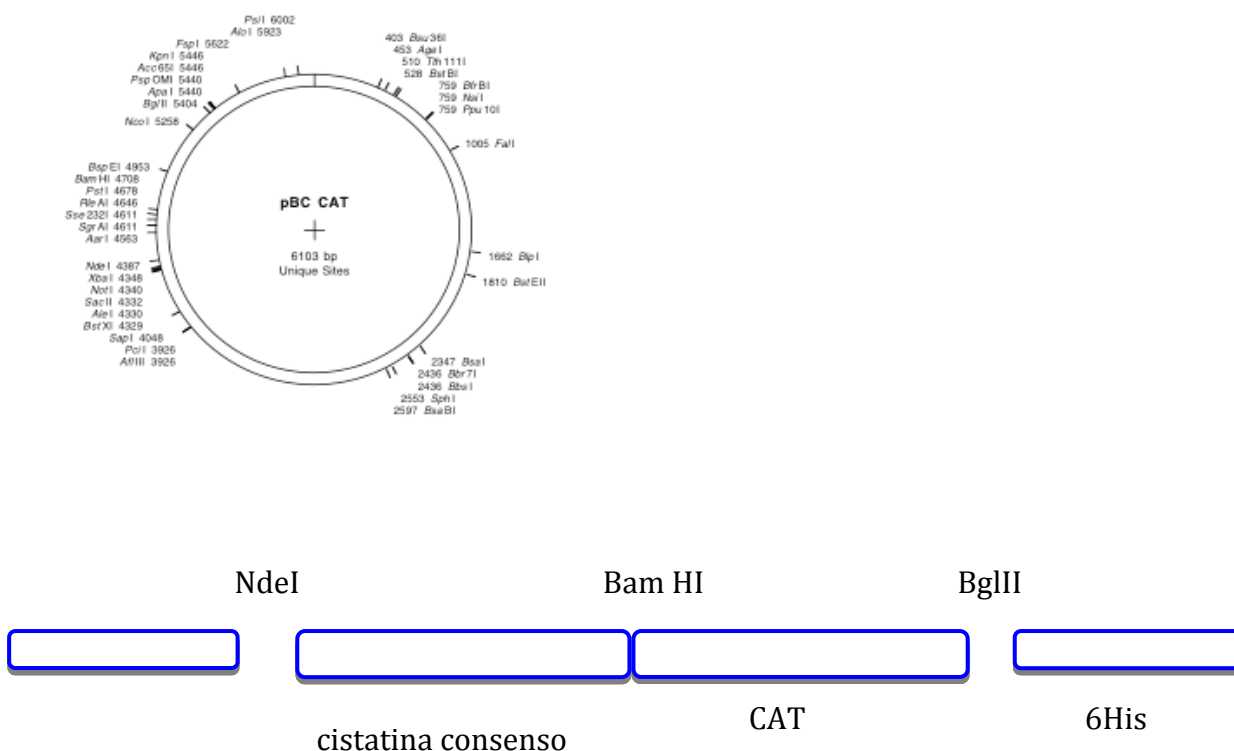


Fig 9. Diseño de la construcción cistatina consenso-CAT, en el plásmido pBC. Los sitios BamHI y BglIII permiten remover el reportero de plegamiento y fusionar a la cistatina consenso a una etiqueta de 6His.

Se secuenciaron 2 construcciones de colonias aisladas de una caja de LB con cloranfenicol 15 µg/ml. Una de las dos construcciones presentaba la secuencia exacta que se diseñó para la cistatina consenso.

### **EXPRESIÓN DE LA CISTATINA CONSENSO.**

El siguiente paso fue cortar el vector pBC con la construcción Cistconsenso-CAT con las enzimas BamHI y BglII, de esta forma se removió el reportero de plegamiento, el vector se ligó sobre sí mismo y de esta manera el gen de la proteína consenso quedó fusionado a una etiqueta de 6His.

Este plásmido se transformó en células competentes *E.coli*XL1BlueMRF y se procedió a realizar cultivos para evaluar la expresión de la proteína consenso sola y fusionada a CAT.

Los cultivos se incubaron a 30°C se utilizó medio LB adicionado con Espectinomicina (100 µg/ml), una vez que los cultivos alcanzaron 0.4 DO a A600nm se adicionó IPTG [0.2 mM]. Se incubaron 3 h más ó hasta llegar a una A600nm de 1.

Se centrifugaron los cultivos a 4000 revoluciones por minuto por 5 min.

Se eliminó el sobrenadante.

Se resuspendió 1 ml de solución Tris 0.01 M pH 8.

Se sonicó 1min por 3 veces.

Se centrifugó a 6000 rpm 20 min.

Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, se tomó una muestra y se analizó por SDS-PAGE.

Se observó una banda de proteína que correspondía al tamaño esperado para la proteína consenso soluble, sola y fusionada al reportero de plegamiento.

Para corroborar la expresión de la cistatina consenso se realizó un ensayo tipo Western utilizando un anticuerpo monoclonal anti-His (Anti poly Histidine SIGMA<sup>®</sup>) conjugado a Fosfatasa alcalina.

Se preparó un gel de acrilamida al 12.5% se corrieron los extractos proteicos correspondientes y a continuación se realizó una transferencia semiseca con una cámara SemoPhor (Hoefer<sup>®</sup>). La transferencia se realizó a 0.8 mA/cm<sup>2</sup> durante 1.5 h. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa Hybond-C Extra (Amersham Biosciences<sup>®</sup>). La inmunodetección se realizó de la siguiente manera:

Se incubó la membrana por 12 h con una solución al 5% de leche descremada diluída en TBST.

TBST

TBS (Tris 10mM, NaCl 150 mM)

Tween 20 (0.05%)

Se lavó 2 veces por 15 minutos con TBST 1X. Se incubó la membrana durante 1 h con agitación constante en presencia del anticuerpo anti-His en una dilución de 1:10000 en TBST

y leche descremada al 0.1%. Se lavó la membrana 2 veces por 15 min con TBST 1X. Se reveló utilizando los reactivos BCIP/NBT (Zymed<sup>®</sup>).

TBST

TBS (Tris 10mM, NaCl 150 mM)

Tween 20 (0.05%)

### **PURIFICACIÓN DE LA CISTATINA CONSENSO Y LA CISTATINA 1 DE CAÑA DE AZÚCAR.**

El siguiente paso consistió en la purificación de las proteínas consenso y silvestre, esta nos servirá como referencia en los ensayos para evaluar la estabilidad y actividad de la proteína consenso.

Se inoculó con una colonia un cultivo de 3 ml se dejó creciendo por 12 h a 37°C y agitación constante, este cultivo se transfirió a un matraz con 300 ml de LB. La cistatina 1 de caña se encuentra clonada en el vector pET-28a (donado por el Dr. F.H. Silva), este presenta un marcador de resistencia a kanamicina, para su expresión se utiliza la cepa *E. coli* BL21DE3. La cistatina consenso está clonada en el vector pBC este tiene un marcador de resistencia a espectinomicina, para su expresión se utiliza la cepa de *E. coli* XL1 BlueMRF.

Los cultivos de 3 ml se utilizaron como inóculo para cultivos de 300 ml, estos se mantuvieron a 30°C y agitación constante hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.4 A<sub>600nm</sub>, se indujeron con IPTG [0.2 mM] y se mantuvieron por 4 h más bajo las condiciones descritas de temperatura y agitación.

El cultivo se centrifugó a 4000 rpm por 20 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 30 ml de solución de lisis y se sonicó durante 1 min por 8 veces con intervalos de 1 min entre cada pulso. Se centrifugó por 20 minutos a 6000 rpm, se recuperó el sobrenadante para pasarlo por la columna.

La purificación se realizó utilizando una columna cargada con Ni-NTA Agarosa (Qiagen<sup>®</sup>).

Se utilizaron las siguientes soluciones.

Solución de lisis.

pH 8

10mM Tris

100mM NaCl

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

10mM Imidazol

10% Glicerol

Solución 2.

pH 8

10mM Tris

100mM NaCl

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

30mM Imidazol



## Solución 3.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
50mM Imidazol

## Solución 4.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
70mM Imidazol

## Solución 5.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
100mM Imidazol

## Solución 6.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
200mM Imidazol

## Solución 7.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
250mM Imidazol

## Solución 8.

pH 8  
10mM Tris  
100mM NaCl  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300mM Imidazol

Se empacaron 2 ml de resina Ni-NTA, se equilibró con solución amortiguadora 1 (10 volúmenes de columna) y se pasó el lisado clarificado. Se lavó con 10 volúmenes de solución 2, posteriormente 5 volúmenes de solución 3 y 5 volúmenes de solución 4. La proteína se eluyó en 4 fracciones con 1 ml de las soluciones 5, 6, 7 y 8. Finalmente la columna se lavó con 10 volúmenes de la solución 8, 10 volúmenes de ácido acético 200 mM, glicerol 30% y agua mQ.

Las fracciones colectadas se analizaron en un SDS-PAGE para evaluar su pureza. En algunas fracciones de la purificación de la proteína consenso se observaron bandas de proteína que no correspondían al tamaño esperado, por lo que se elevó el volumen de las soluciones de lavado 3 y 4 a 15 volúmenes de cada una.

La presencia de las bandas que no correspondían al tamaño esperado disminuyó significativamente, pero no se eliminaron totalmente por lo que se modificó la composición de las soluciones 2 y 3 a las cuales se les agregó 5% de glicerol. De esta forma se resolvió una sola banda en la mayoría de las fracciones colectadas con un tamaño que corresponde a la proteína consenso.

Las fracciones de proteína pura se dializaron por 12h a 4°C utilizando la membrana Spectra/Por (Spectrum®) MWCO 3500 en 1 litro de solución amortiguadora filtrada y degasificada.

Solución de diálisis.

10 mM Tris-HCl

100mM NaCl

50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Las fracciones dializadas se recuperaron y se analizaron por SDS-PAGE 15%. Las soluciones de proteína fueron filtradas en un filtro Millex de 0.22 micras (Millipore®).

La concentración de ambas proteínas se evaluó por el método de Bradford (Bio Rad Protein Assay®), una vez determinado las concentraciones para cada proteína, se procedió a realizar un ensayo de actividad con ambas proteínas.

### ENSAYO DE ACTIVIDAD.

Para corroborar la actividad inhibitoria de la proteína consenso se procedió a realizar el siguiente ensayo según Vilela *et al*(43). Se evaluó la actividad hidrolítica residual de la cisteín-proteasa Papaína (Sigma®) después de incubar durante 10 min una cantidad determinada de esta proteasa con cistatina consenso y silvestre, que previamente habían sido incubadas por 20 min a 37°C, 42°C, 62°C, 90°C. A cada una de las cuatro muestras de proteasa+inhibidor se les agregó el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA (Carbobenzoxicarbonil-Phe-Arg-7-amido-4-metilcoumarina Sigma®). Bajo el siguiente esquema:

	Cistatina consenso (1.5nM)	Papaína (1.5 µM)	Z-Phe-Arg-MCA (0.5 mM)
37°C x 20 min		√√	
42°C x 20 min	√√		
62°C x 20 min		√√	
90°C x 20 min		√√	

Cistatina1 silvestre (1.5nM)	+	Papaína (1.5 µM)	+	Z-Phe-Arg-MCA (0.5 mM)
37°C x 20 min	√√			
42°C x 20 min		√√		
62°C x 20 min		√√		
90°C x 20 min	√√			

Solución Amortiguadora de la reacción:

0.4M Fosfato de SodiopH 6.8  
10mM EDTA  
2mM DTT

Se procedió a medir la señal de fluorescencia, que sería visible sólo si la proteasa actuaba sobre el sustrato fluorogénico. La medición se hizo por triplicado en una placa de 96 pozos (Costar<sup>®</sup>) en el equipo TECANy se siguió por 20 min. Los parámetros de excitación y emisión se determinaron como 380 y 460 nm respectivamente.

La actividad inhibitoria de las cistatinas fue determinada como el % que corresponde, a la diferencia entre la actividad de la Proteasa en ausencia de las cistatinas y la actividad residual en presencia de estos inhibidores (45).

$$I\% = \frac{(F-F^*)}{F} \times 100\%$$

I% Actividad inhibitoria

F Lectura de fluorescencia en ausencia de cistatinas

F\* Lectura de fluorescencia en presencia de cistatinas

### DICROÍSMO CIRCULAR.

Las muestras de proteína fueron disueltas en solución amortiguadora a una concentración de 200µg/ml. El espectro fue obtenido en celdas de 1mm en un espectropolarímetro JASCO equipado con un portacelda rectangular con controlador de temperatura tipo Peltier.

En un primer análisis el espectro para la proteína consenso se obtuvo a 20°C. Posteriormente se obtuvieron los valores de Tm para la proteína consenso y para la proteína silvestre, realizando una curva de desnaturalización de 20°C a 90 °Csiguiendo el cambio de elipticidad a 222nm y en presencia de Urea como agente caotrópico. El cambio de temperatura se realizó a velocidad constantecontrolado por el sistema Peltier.

Solución Amortiguadora:

10mM Tris-HCl pH8  
50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
100mM NaCl  
7.85 M Urea

Mediante las curvas de desnaturalización térmica, se obtuvo la representación gráfica de la  $T_m$ . Los valores de elipticidad medidos por dicroísmo circular se normalizaron para obtener el valor correspondiente a la fracción de proteína nativa, estos valores se graficaron posteriormente vs la temperatura como podemos ver en la Fig. 10.

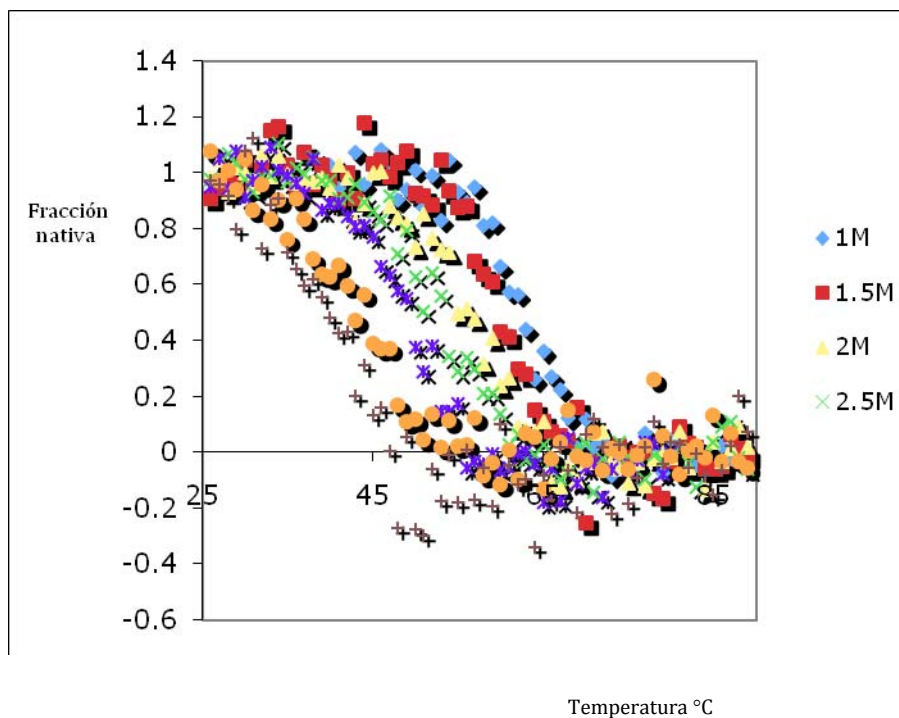


Fig. 10. Espectro de dicroísmo circular.

Posteriormente se determinó la  $T_m$  para cada concentración de Urea graficando los puntos que correspondían al espectro donde se observaba la pérdida de la estructura y con la ecuación de la recta que corresponde a cada línea (Fig. 11).

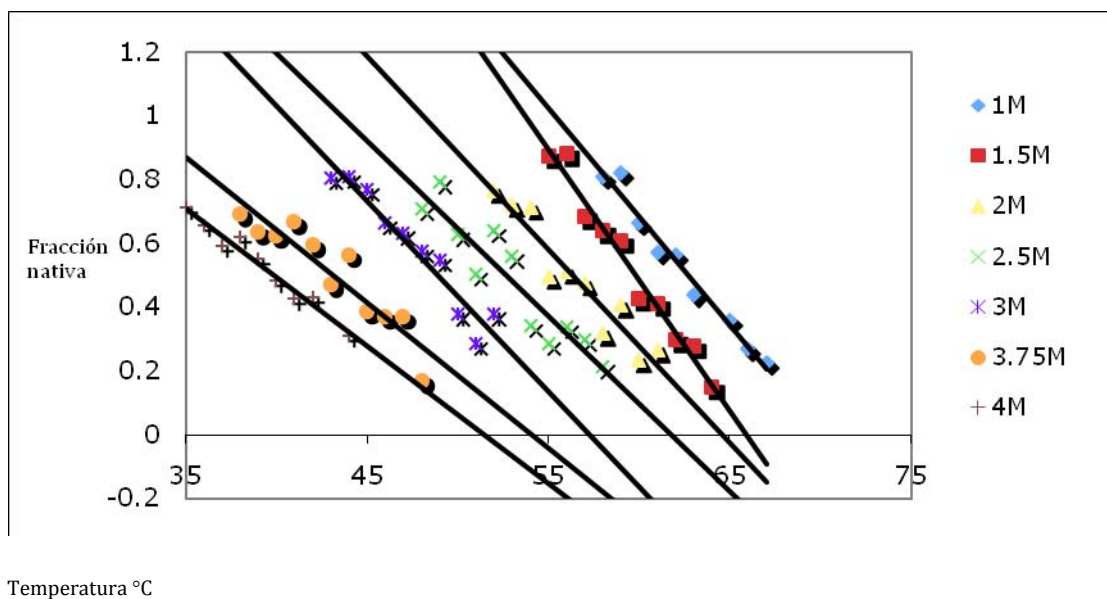


Fig. 11. Fracción nativa de la proteína vs Temperatura.

Para determinar el valor de  $T_m$ :

$$y = mx + b$$

$$y = 0.5$$

$m$  = la pendiente de la recta

$b$  = la ordenada al origen

$x$  = el valor de  $T_m$

$$\text{Despejando: } T_m = (0.5 - b) / m$$

Los valores de  $T_m$  obtenidos para cada concentración se enlistan a continuación:

Cistatina Consenso

Cistatina 1 de caña

Urea [M]  $T_m$

Urea [M]  $T_m$

	4	78.01°C		1	62.70°C
	4.25	76.99°C		1.5	59.82°C
4.75	73.56°C	2	56.34°C		
	5	74.16°C	2.5	52.69°C	
5.5	71.34°C	3	48.95°C		
	6	69.75°C	3.75	43.14°C	
4	39.87°C				

Estos valores se graficaron y sobre la recta que se obtuvo, con la ecuación anterior se consideró la ordenada al origen como el valor de  $T_m$  en ausencia de Urea. Los cálculos se hicieron de la misma forma para la cistatina consenso y la cistatina 1 de caña.

## RESULTADOS.

### DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA CONSENSO.

Con base en el alineamiento de 106 secuencias de cistatinas de plantas, se determinó la secuencia de la cistatina consenso, (Pág. 45).

Sabemos que no hay un número de secuencias idóneo para determinar un consenso. En la bibliografía podemos encontrar que se han determinado consensos, con base en solo 23 secuencias (28) ó en más de 200(11).

Si bien debe considerarse que ante un mayor número de secuencias puede ser más difícil establecer el residuo consenso, el porcentaje de identidad al cuál se determine, es relevante para resolverlo en forma más simple. En este caso la cistatina consenso se determinó con un 30% de identidad, de acuerdo a un reporte previo (10), entre el 30 y 40% de identidad resulta el punto de corte más apropiado, ya que el consenso no resulta sumamente estricto ó laxo, además a estos porcentajes puede obtenerse una mejor proporción de mutaciones estabilizantes/desestabilizantes que permitan mantener la flexibilidad necesaria para no perder la actividad de la proteína (Fig. 12). Cuando no fue posible establecer el residuo consenso, se consideró el residuo presente en la secuencia de la cistatina 1 de caña para esa posición.

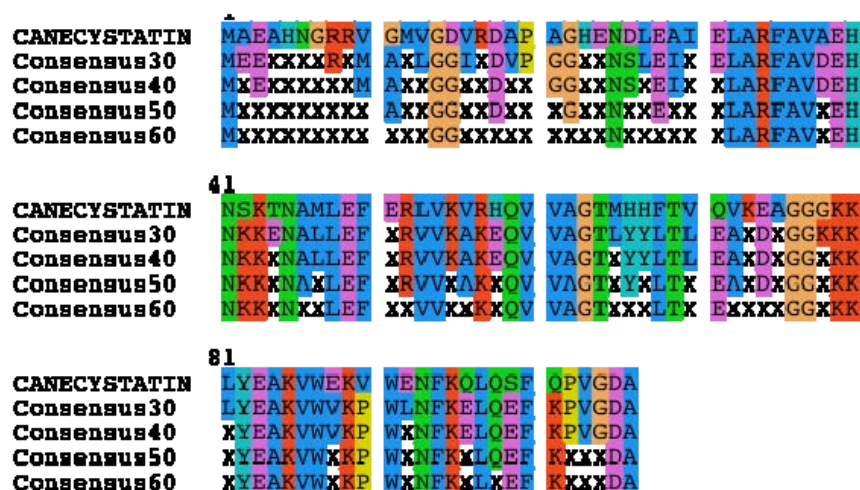


Fig. 12. Diferentes consensos obtenidos a distintos porcentajes de identidad.

La proteína consenso comparte un 70% de identidad en residuos de aminoácidos con respecto a la secuencia de la cistatina 1 de caña, se cambiaron 32 de 106 aminoácidos a lo largo de todo el polipéptido (Fig. 13). Los residuos que participan en la interacción de este inhibidor con el sitio activo de las cisteín-proteasas se conservan.



Fig. 13 La secuencia de la cistatina consenso alineada con la cistatina de caña, 1ª. y 2ª línea respectivamente.

## DISEÑO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.

Previo al diseño de los oligos para sintetizar el gen, se obtuvo la secuencia nucleotídica sobre la secuencia de aminoácidos de la proteína consenso, valiéndonos del uso de codones de caña de azúcar (*S. officinarum*) para la cistatina 1 (Fig. 14) (46). Si bien en algunos casos el expresar un gen heterólogo con un uso de codones muy distinto al hospedero, puede resultar en una expresión deficiente. Para este trabajo contamos con los antecedentes del trabajo del grupo del Dr. Silva, los cuáles no indicaban alguna dificultad para expresar la cistatina de caña en *E. coli*, por lo tanto respetamos el uso de codones de la cistatina silvestre, con la idea también de que en futuros experimentos la cistatina consenso se exprese en plantas de caña (43).

El codón que codifica para cada aminoácido de la proteína consenso se eligió tratando de igualar la frecuencia que presentara el codón correspondiente a esa posición en la cistatina de caña.

gag gaa ttc **cat atg** gaa gag gca cac aac ggg cgg cgc atg gct atg ctg ggc ggc att cgg gac gtt ccg ggc ggc cac gag aac tcc ctc gag att atc gag ctc gcg cgc ttc gcc gtc gat gag cac aac aaa aag gaa aac gcg ctg ctg gag ttc gag agg gtc gtg aag gcc aaa gag cag gtg gtg gcc ggg acc ctg tac tac ctg acc ctg gag gcc aag gac gcc ggc ggc aaa aag aag ctg tac gag gcc aag gtg tgg gtg aag ccg tgg ctg aac ttc aag gag ctg cag gaa ttc aag ccg gtc ggg gac gcc **gga tcc** cgg cca ctg tag agc ttg

Fig. 14. Secuencia de nucleótidos de la cistatina consenso, en negritas se indican los sitios *Nde I* y *BamHI*.

## SÍNTESIS DEL GEN DE LA CISTATINA CONSENSO.

Los oligonucleótidos para la síntesis del gen, fueron diseñados mediante el programa PRIMO de Chang Bioscience (44).

El programa se alimentó con la secuencia de nucleótidos, el tamaño y la temperatura de hibridación de los oligos se determinó como un máximo de 60 pb y temperatura de alineamiento de 50°C. El utilizar una temperatura de hibridación similar para todos los oligonucleótidos permitió establecer las condiciones adecuadas en la reacción de PCR para ensamblar el gen.

Después de haber alimentado el programa con la secuencia consenso se obtuvieron 8 oligonucleótidos, siete de 60pb y uno de 52pb. Estos oligos se ensamblaron en una reacción de PCR, con las condiciones apropiadas para favorecer la síntesis del gen en los primeros 5 ciclos y la amplificación del producto en los ciclos sucesivos. Se utilizaron dos concentraciones distintas (1:10 y 1:20) de los oligos internos respecto de los oligos de los extremos del gen. La relación 1:10 permitió obtener un ensamblado más eficiente. El producto de la reacción coincidió con el tamaño esperado para el gen completo (340 pb) como podemos ver en la figura 15.

1 2 M 3 4

340 pb

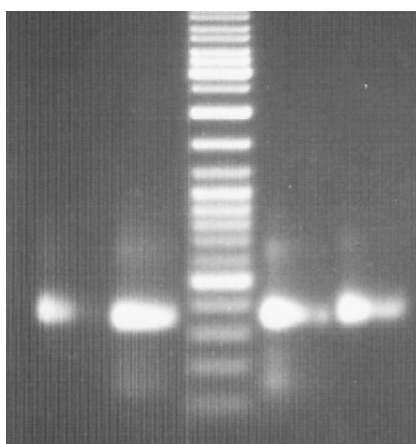


Fig. 15. Análisis de la reacción de PCR para ensamblar el gen de la cistatina consenso. Los carriles 1 y 4 corresponden a reacciones donde el ensamble del gen se realizó con una relación 1:10 de los oligos internos respecto de los oligos de los extremos, los carriles 2 y 3 corresponden a una relación 1:20.

El producto de PCR se clonó en el vector de expresión pBC-CAT, fusionado a un reportero de plegamiento que permitió seleccionar proteínas plegadas, se secuenciaron 2 construcciones, una de las cuáles coincidió exactamente con la secuencia consenso diseñada.

### **EXPRESIÓN DE LA CISTATINA CONSENSO.**

Posteriormente se realizaron cultivos con ambas construcciones; es decir con y sin fusión al reportero de plegamiento. Dado que necesitábamos corroborar que la proteína se expresara en la fracción soluble, por experimentos previos sabíamos que el reportero favorece la solubilidad de las proteínas a las que se fusiona, por ello se verificó que la proteína consenso se encontrara en la fracción soluble sin estar fusionada al reportero. La construcción estaba diseñada para remover el gen reportero y al mismo tiempo fusionar al gen de la cistatina consenso a un etiqueta de 6 Histidinas, que posteriormente, fuera útil para purificar esta proteína.

Se analizaron los extractos obtenidos correspondientes a la fracción soluble por SDS-PAGE, donde se observó una expresión adecuada de proteína soluble, sola (Fig. 16) y en fusión al reportero de plegamiento.



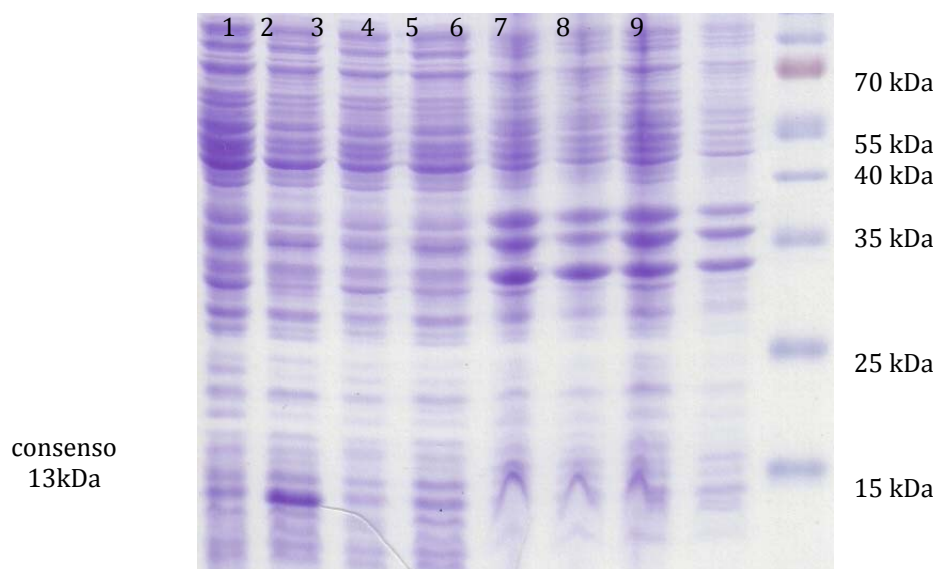


Fig. 16. SDS-PAGE de extractos totales de cultivos en la cepa XL1Blue.

En la figura 16 tenemos en el siguiente orden:

Carril 1. Cepa XL1Blue, (cultivo inducido con IPTG).

2. Cepa XL1Blue transformada con el plásmido pBC Cistatina Consenso-His (cultivo inducido con IPTG), en este carril podemos ver una banda de proteína mayoritaria, de un tamaño que corresponde a 13 kDa aproximadamente, el tamaño que corresponde a la cistatina consenso.

3. Cepa XL1Blue, (cultivo sin inducir).

4. Cepa XL1Blue transformada con el plásmido pBC Cistatina Consenso-6His (cultivo sin inducir).

5. Fracción insoluble cepa XL1Blue sin transformar (cultivo inducido con IPTG).

6. Fracción insoluble cepa XL1Blue transformada con el plásmido pBC Cistatina Consenso-His (cultivo inducido con IPTG).

7. Fracción insoluble cepa XL1Blue sin transformar (cultivo sin inducir).

8. Fracción insoluble cepa XL1Blue transformada con el plásmido pBC Cistatina-6His (cultivo sin inducir).

9. Marcador de peso molecular.

Posterior al análisis por SDS-PAGE se hizo un ensayo tipo Western blot con un anticuerpo anti-His que confirmó la presencia de la proteína consenso en la fracción soluble (Fig. 17).

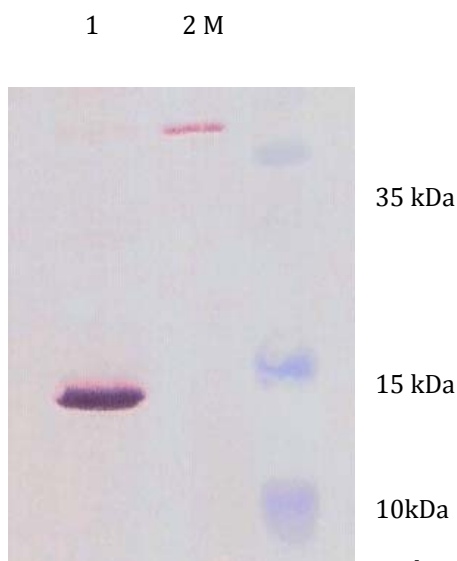


Fig. 17. Inmunoensayo tipo carril 1 corresponde a la 2 corresponde a una proteína

Western blot anti-His. El proteína consenso, el carril utilizada como marcador positivo, el carril 3 corresponde al marcador de peso molecular.

### **PURIFICACIÓN DE LA CISTATINA CONSENSO Y LA CISTATINA 1 DE CAÑA DE AZÚCAR.**

El paso siguiente fue la purificación la proteína consenso y de la cistatina 1 de caña de azúcar, sirvió como referencia para posteriormente evaluar el incremento en la estabilidad de la proteína consenso.

La purificación de ambas proteínas se realizó utilizando una columna de níquel utilizando Ni-NTA Agarosa (Qiagen®). Las fracciones de proteína pura fueron recuperadas eluyendo con concentraciones crecientes de Imidazol.

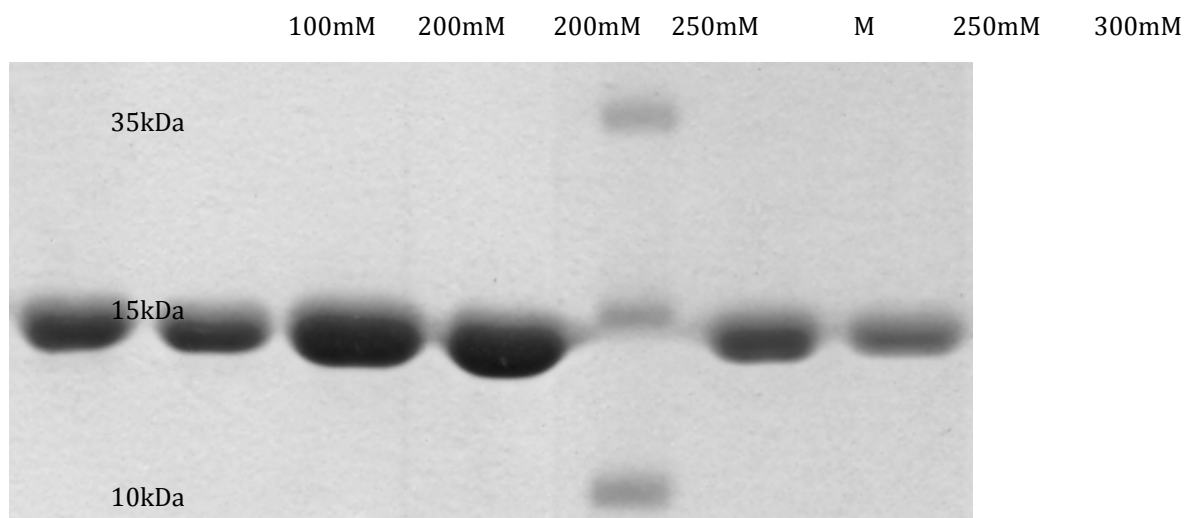


Fig. 18. SDS-PAGE 15%. Purificación de cistatina 1 de caña de azúcar. Se utilizaron concentraciones de 100, 200, 250 y 300 milimolar de Imidazol para eluir las fracciones de proteína pura.

La purificación de la cistatina 1 resolvió una sola banda de proteína con un tamaño que corresponde al esperado. Las banda que vemos en la figura 18 corresponden a fracciones de esta proteína, obtenidas al eluir con concentraciones de 100, 200 (2), 250 (2) y 300 mM de Imidazol.

La purificación de la proteína consenso resolvió fracciones de proteína que presentaban una banda de menor tamaño próxima a la proteína consenso, esto podría deberse a un proceso de degradación ó al pegado de otra proteína a la cistatina consenso (Fig. 19).

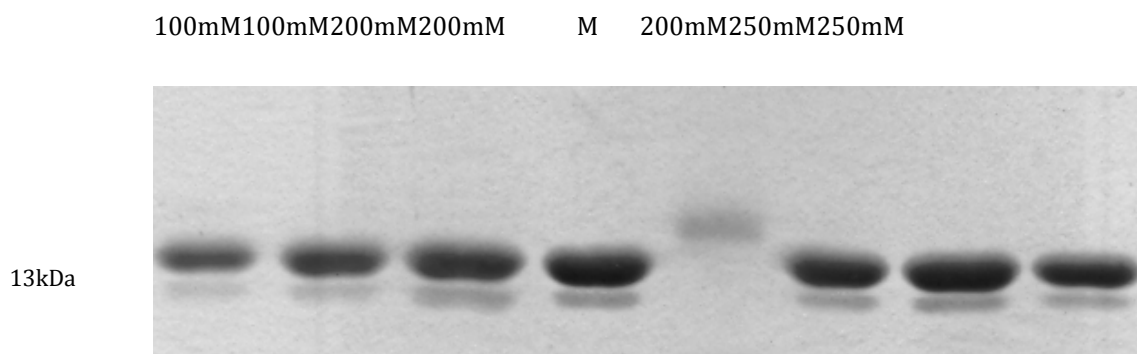


Fig. 19. SDS-PAGE 15%. Purificación de la cistatina consenso. Se utilizaron concentraciones de 100, 200 y 250 mM de Imidazol

Para mejorar la calidad de la purificación se variaron las condiciones de lavado. Se aumentó el volumen de solución utilizado para este fin, con lo que se buscaba eliminar la fracción de proteína que aparece junto a la consenso.

Se agregó glicerol al 5% a las soluciones de lavado 2 y 3, esta medida favoreció la calidad de la purificación, ya que fue posible obtener la proteína consenso sin la presencia de otras

proteínas en las fracciones colectadas como sucedió en la purificación anterior. En la figura 20 podemos ver como se presenta una sola banda en el análisis por SDS-PAGE.

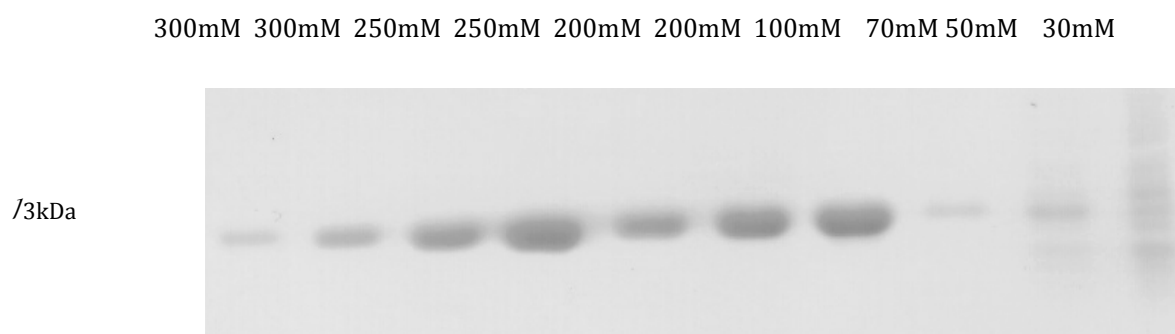


Fig.20. SDS-PAGE 15%. Purificación de la cistatina consenso eluída con distintas concentraciones milimolares de Imidazol.

## ENSAYO DE ACTIVIDAD.

Una vez que las condiciones de purificación de las proteínas consenso y silvestre fueron resueltas. Se procedió a evaluar la actividad como inhibidor de la proteína consenso. Los residuos responsables de la interacción con el sitio activo de las cisteín-proteasas no fueron cambiados, pero si se cambiaron los residuos adyacentes a ellos por lo que podría verse afectada la distancia entre ellos y repercutir en la afinidad por la proteasa.

El ensayo de inhibición se realizó midiendo la actividad proteolítica residual después de incubar la proteasa en este caso papaína con los inhibidores, la cistatina consenso y la cistatina 1 de caña de azúcar. La reacción se midió en un espectrofluorómetro en función de la señal de fluorescencia, que se genera cuando la proteasa actúa sobre el sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA.

Con el fin de realizar un análisis previo sobre el incremento en la estabilidad de la cistatina consenso respecto de la proteína silvestre, concentraciones equimolares de ambas proteínas se incubaron por 20min, a 37°C, 42°C, 62°C y 90°C. Posteriormente una muestra de cada una de las 4 condiciones se mezcló en una solución amortiguadora que contenía a la proteasa, la mezcla de ambas proteínas se incubó por 5 min a 37°C, por último se adicionó el sustrato a esta mezcla y se procedió a medir la señal de fluorescencia.

De esta manera esperábamos ver si la temperatura afectaba la estabilidad de las cistatinas, con la idea de que si había un efecto sobre el plegamiento en alguna de las dos, se reflejara como una disminución en actividad sobre la proteasa, lo cual se corroboraría con una señal de fluorescencia más baja, cuando se comparara con los datos correspondientes al medir la actividad de la proteasa sin tener al inhibidor presente.

La actividad inhibitoria de las cistatinas fue determinada como el porcentaje que corresponde a la diferencia entre la actividad de la proteasa en ausencia de las cistatinas y la actividad residual en presencia de estos inhibidores según se describe en la metodología.

Los resultados mostraron que hay un efecto inhibidor mayor sobre la actividad de la proteasa de la cistatina consenso respecto a la cistatina silvestre. La actividad como inhibidor de la cistatina consenso, se ve afectada en menor grado por efecto de la temperatura, a diferencia de la cistatina silvestre que mostró una disminución mayor sobre su actividad como inhibidor (Fig. 21).

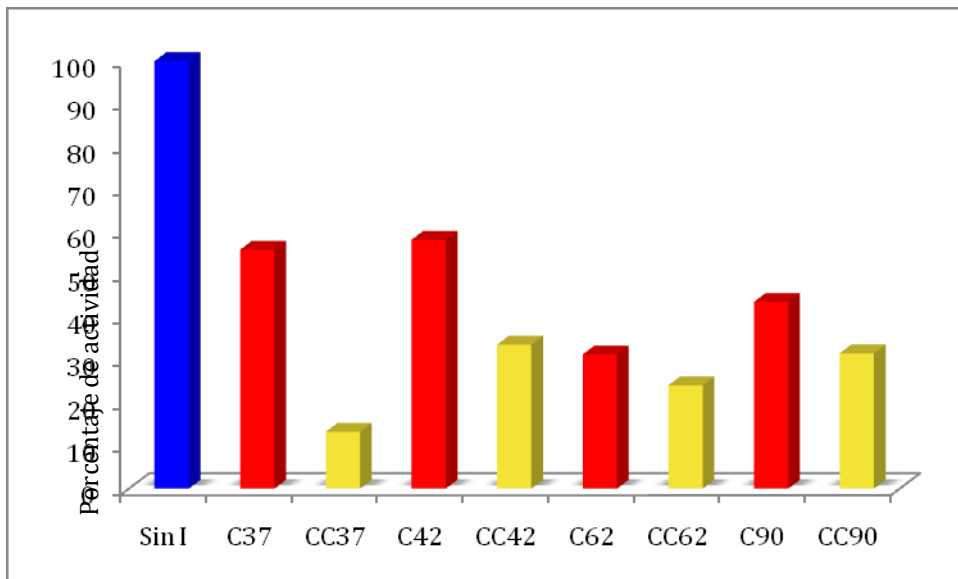
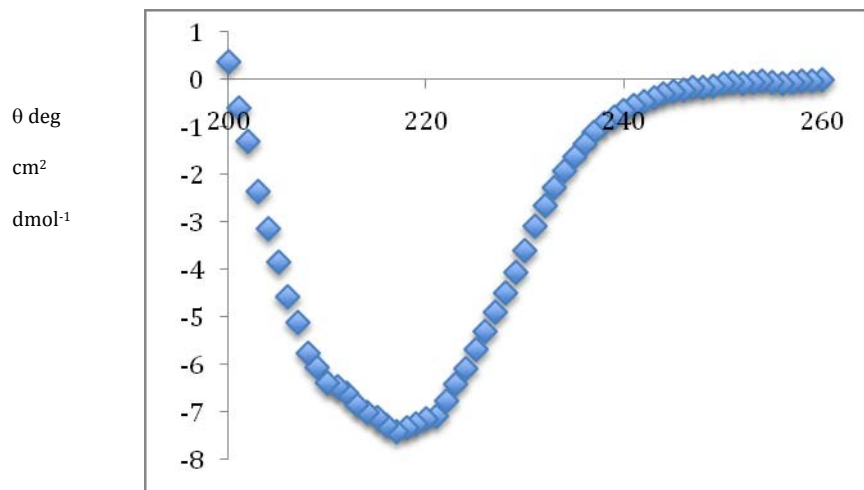


Fig 21. Porcentaje de la Actividad proteolítica residual de la cisteína-proteasa papaína, en presencia de la cistatina consenso y silvestre después de incubarse a diferentes temperaturas.

### DICROÍSMO CIRCULAR.

Se determinó el espectro de Dicroísmo Circular de la cistatina consenso a 20°C. El espectro coincide con datos publicados anteriormente sobre el espectro característico de la cistatina 1 de caña de azúcar, según se describe en Soares-Costa *etal* (42).

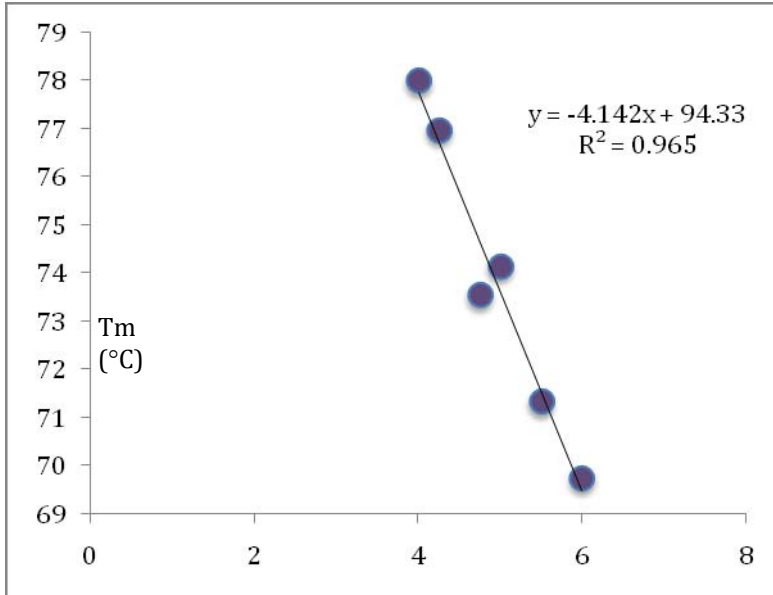


Longitud de onda (nm).

Fig.22. Espectro de Dicroísmo Circular de la cistatina consenso.

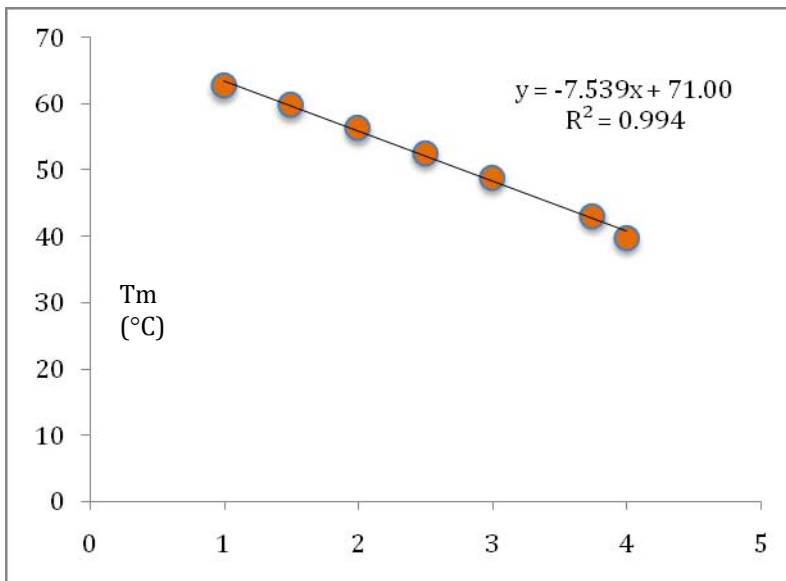
### DETERMINACIÓN DE Tm.

Para determinar el valor de la Temperatura media de desnaturalización, se hizo una curva de desnaturalización, monitoreada por Dicroísmo Circular, en presencia de Urea como agente caotrópico. En las siguientes gráficas (Figs. 23 y 24) podemos ver la temperatura a la cuál corresponde la Tm para la cistatina consenso y la silvestre, en función de distintas concentraciones de Urea, la Tm absoluta se determinó extrapolando estos datos pero considerando como 0 la concentración de urea, según se describe en la metodología.



Urea [M]

Fig. 23. Valores de Tm sobre concentraciones crecientes de Urea para la cistatina consenso.



Urea [M]

Fig. 24. Valores de Tm sobre concentraciones crecientes de Urea para la cistatina 1 de caña de azúcar.

La Tm de la cistatina consenso es de 94.3°C, para la cistatina 1 de caña de azúcar la Tm es de 71°C. Esto nos indica un aumento de 23°C, en el valor de Tm de la proteína consenso.

## RESULTADOS ANEXOS.

En la siguiente tabla se encuentran los valores de Ki sobre la actividad proteolítica de las catepsinas B y L, para un inhibidor sintético (A10PL3), la orizacistatina(OC-I), 4 cistatinas de caña y la cistatina consenso obtenida en este trabajo, sobre la actividad proteolítica de las catepsinas B y L. Estos valores fueron determinados por el grupo del Dr. F. Henrique-Silva.

Inhibidor	Catepsina B	Catepsina L
(Ki)	(Ki)	
A10PL3	16nM	9.8nM
OC-I	112nM	4.4nM
Canacistatina 1	125nM	0.6nM
Canacistatina 2	0.47µM	0.17nM
Canacistatina 3	2.44µM	0.6nM
Canacistatina 4	0.83nM	0.021nM
Cistatina Consenso	10nM	1nM

Tabla 2. Constantes de inhibición sobre las proteasas catepsina B y catepsina L. Los valores de Ki indican la concentración de inhibidor necesaria para disminuir 50%, la velocidad de proteólisis de la enzima sobre el sustrato

Las catepsinas B y L son dos cisteín-proteasas de importancia medica, debido a su participación en la formación de tumores y metástasis. El evaluar la actividad inhibitoria de las cistatinas sobre estas proteasas resulta por ello de particular interés. La cistatina 4 de caña de azúcar es la cistatina que presenta la mejor actividad inhibitoria sobre estas proteasas. Sin embargo poder expresar y purificar cistatina 4 resulta sumamente complicado debido a su naturaleza insoluble.

La cistatina consenso presenta los valores de Ki más cercanos a los de la cistatina 4 y a diferencia de esta puede expresarse y purificarse en forma mucho más sencilla y eficiente, de manera que se dispone de cantidades de proteína pura, suficientes para continuar con estudios de este tipo.



## DISCUSIÓN.

Sobre la estabilidad de la cistatina consenso:

El diseño con base en la información que nos proporcionó un alineamiento con 106 secuencias de cistatinas de plantas, nos permitió utilizar la ingeniería de consensos para obtener una proteína con un incremento de 23°C en su Temperatura media de desnaturalización.

La secuencia consenso para un grupo de proteínas homólogas resulta más estable que cualquiera de las proteínas incluidas en el alineamiento, puesto que las proteínas silvestres no corresponden a la secuencia consenso de todas las posiciones estructuralmente importantes, esto se debe a que las proteínas son estables sólo para cumplir su función biológica; las proteínas con estabilidades superiores a un cierto umbral no tienen una ventaja de selección adicional por presentar esta característica. Por lo tanto reemplazar un residuo con el aminoácido consenso correspondiente puede incrementar la estabilidad ó la eficiencia de plegamiento para una proteína de interés.

Utilizar un enfoque semiracional como la Ingeniería de consensos permite incrementar la estabilidad en las proteínas sin tener que recurrir al análisis de una gran cantidad de información estructural ó a la generación de bancos de miles de variantes, como sería el caso para la Ingeniería de proteínas y la Evolución dirigida. En el caso específico de las cistatinas de plantas solo se dispone de información sobre la estructura de la orizacistatina 1, por lo que recurrir a una estrategia racional como la ingeniería de proteínas, resulta muy complicado y por otra parte recurrir a experimentos de evolución dirigida implicaría adicionalmente, desarrollar un método adecuado de selección ó tamizaje que nos revelara las variantes más estables.

Para poder referirnos claramente al efecto de los 32 cambios de aminoácido que presenta la proteína consenso respecto de la cistatina de caña, se requiere llevar a cabo un análisis detallado que permita responder de que forma pueden estar contribuyendo estos cambios al incremento en el valor de la T<sub>m</sub>. La estabilidad de la proteína consenso, bien puede deberse al aumento de residuos con cadenas laterales más pequeñas que permiten una estructura más compacta ó a un incremento en la red de puentes de hidrógeno.

Uno de los cambios que resulta de particular interés es el de la V90P, el residuo P90 corresponde a un residuo consenso pues está presente en la mayoría de las cistatinas de plantas, como pudimos ver en el alineamiento, sin embargo no está presente en la cistatina de caña. Este residuo ha sido descrito como uno de los aminoácidos responsables de la interacción de las cistatinas con las proteasas. El cambio de Valina por Prolina reduce la flexibilidad de la cadena polipeptídica, algunos autores han propuesto la idea de que las proteínas más estables tienen menos fluctuaciones (46), por lo que un cambio de este tipo puede favorecer el incremento en la estabilidad de la proteína consenso.

Sobre la actividad como inhibidor:

El incremento en la estabilidad de la proteína consenso fue observado en un ensayo donde se midió la capacidad de la cistatina consenso para inhibir cisteín-proteasas, en este caso con papaína como proteasa modelo. En un primer paso (37°C), la inhibición

de la cistatina consenso sobre la actividad de la papaína, disminuyó el 86% la actividad proteolítica sobre el sustrato, en comparación la cistatina 1 de caña que solo permitió una reducción del 44% sobre la actividad de la proteasa. Esto nos indicaba que aún sin un reto de temperatura, la actividad como inhibidor de la cistatina consenso era mayor respecto de la cistatina 1 de caña. Cuando esta prueba se repitió después de incubar a la cistatina consenso y a la cistatina de caña a distintas temperaturas (42°C, 62°C y 90°C), la actividad inhibitoria de la cistatina consenso se mantuvo por encima de la actividad de la cistatina de caña, aunque no en la misma proporción que se observó a 37°C.

Después de incubarse a 42°C la actividad de la cistatina consenso reduce el 66% de la actividad de la papaína y la cistatina de caña solo la reduce un 41%.

Cuando se incubó a 62°C la cistatina consenso incrementó su porcentaje de inhibición reduciendo la actividad de la proteasa un 75%, la cistatina silvestre incrementó también su porcentaje de inhibición a un 68%. Esto sugiere que a 62°C la actividad como inhibidor se favorece para ambas cistatinas, aunque siempre se mantiene un porcentaje más alto para la consenso. En varios reportes (15,22,47) se ha mencionado que las cistatinas presentan una temperatura de actividad óptima entre los 60°C y los 65°C, lo cual podemos comprobar con estos datos.

Finalmente cuando se incubaron a 90°C, el porcentaje de inhibición de la consenso sobre la proteasa es de 68% y el porcentaje de la cistatina silvestre es de 56.3%. El efecto de esta temperatura sobre la estabilidad de ambas cistatinas se manifestó, como un decremento en su actividad inhibitoria, afectando en mayor grado la estabilidad de la cistatina silvestre y en menor grado la estabilidad de la consenso.

En cuanto a los resultados que indican un incremento en el perfil inhibitorio de la cistatina consenso sobre la actividad proteolítica de proteasas como las catepsinas B y L podemos decir que si bien la afinidad de cada fitocistatina por distintas proteasas es específica y diferencial, como consecuencia de un proceso evolutivo, cuya finalidad es ampliar el espectro de inhibición (25). En este caso la cistatina consenso presentó un valor de  $K_i$ , superior al de otras cistatinas para inhibir a las catepsinas B y L, aunque este valor de  $K_i$  no es tan alto como el que presenta la cistatina 4 de caña, si permite proponer a la cistatina consenso como candidato para emplearse en estudios sobre inhibición de proliferación de células tumorales, proceso en el cuál las catepsinas tienen una participación importante. Y es que si bien la cistatina 4 de caña tiene un valor de  $K_i$  más alto sobre estas proteasas, la dificultad para disponer de cistatina 4 pura y en cantidad suficiente, dado su carácter hidrofóbico, es en este momento una limitante para su aplicación en este tipo de experimentos. En cambio la metodología para expresar y purificar a la cistatina consenso no presenta alguna complicación de este tipo.

Por último debe mencionarse que es necesario también continuar con los estudios, que permitan evaluar la posible aplicación de la cistatina consenso, para incrementar la resistencia de plantas de caña contra plagas y enfermedades. Para ello se puede recurrir a los datos de diferentes trabajos (38,39,40), en los que se han utilizado fitocistatinas como transgenes insecticidas y en los cuales se ha demostrado que las plantas establemente transformadas con estos genes, presentan un aumento de la resistencia contra insectos, nemátodos y virus nocivos, aunado a los estudios que

sostiene el hecho, de que no hay efectos negativos sobre los organismos que mantienen algún tipo de interacción con las plantas, sin representar un riesgo de convertirse en plagas.

## CONCLUSIONES.

La Ingeniería de consensos es un enfoque semirracional que permite el diseño de proteínas más estables. En este trabajo utilizamos la Ingeniería de consensos, para obtener de *novouna* cistatina más estable.

La cistatina consenso que se obtuvo presenta un incremento de 23°C en su temperatura media de desnaturalización (94.3°C) respecto de la cistatina 1 de caña de azúcar (71°C) contra la cuál se comparó.

La cistatina consenso obtenida resultó no solo más estable, pues además presenta un aumento en su perfil de inhibición sobre la actividad proteolítica de cisteín-proteasas, como lo indica:

Su actividad como inhibidor, sobre papaína tras ser incubada a altas temperaturas, respecto de las cistatina 1 de caña de azúcar.

Los valores de  $K_i$  determinados para la cistatina consenso sobre las proteasas catepsina B y L, respecto de las cistatinas 1,2 y 3 de caña de azúcar.

## PERSPECTIVAS.

Realizar mediante un modelado *in silicoun* análisis comparativo entre los cambios de aminoácidos que presenta la cistatina consenso respecto de la canacistatina 4, de forma que pudiera identificarse los cambios responsables, del aumento en estabilidad y de su actividad como inhibidor de proteasas.

Determinar la ruta apropiada y los experimentos necesarios para poder analizar el potencial como mecanismo de defensa de la cistatina consenso en plantas de caña de azúcar, realizando los ensayos correspondientes que permitan evaluar la propiedad de la cistatina consenso para inhibir el crecimiento de insectos nocivos, virus y hongos.

Continuar con los estudios pertinentes que permitan evaluar la posible aplicación de la cistatina consenso, para inhibir la proliferación de células tumorales, con base en su actividad sobre la actividad proteolítica de las catepsinas B y L.

Determinar mediante cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de la cistatina consenso y de la cistatina 1 de caña de azúcar.

## ALINEAMIENTO







## REFERENCIAS.

1. Adams M. y Kelly R.M. (1998). "Finding and using hyperthermophilic enzymes". *Trends Biotechnol.*16(8):329-332.
2. Arnold F., Wintrode P., Miyazaki K. y Gershenson A. (2001). "How enzymes adapt: lessons from directed evolution". *Trends Biochem Sci.* 26(2):100-106.
3. Giver L., Gershenson A., Freskgard P. y Arnold F.(1998). "Directed evolution of a thermostable esterase". *PNAS.* 95(22):12809-13.
4. Boris Steipe. (1999). "Evolutionary Approaches to Protein Engineering".*Current Topics in Microbiology and Immunology: Combinatorial Chemistry in Biology.* 56-80
5. Steipe B. (2004). "Consensus-Based Engineering of Protein Stability: From Intrabodies to Thermostable Enzymes. Applications: Optimization and Screening". *Methods in Enzymology.* 388:176-186.
6. Lehmann M., Loch C., Middendorf A., Studer D., Lassen S., Pasamontes L., van Loon A. y Wyss M. (2002). "The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof. of concept". *Protein Eng.* 15(5):403-11.
7. Wallgren M., Adén J., Pylypenko O., Mikaelsson T., Johansson L.B., Rak A. y Wolf-Watz M. (2008). "Extreme Temperature Tolerance of a Hyperthermophilic Protein Coupled to Residual Structure in the Unfolded State". *J.Mol.Biol.* 379:845-858.
8. Ohage E. y Steipe B. (1999). "Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability". *J. Mol. Biol.* 291(5):1119-28
9. Dai Mingha, Fisher H., Temirov J., Kiss C., Phipps E., Pavlik P., Werner J. y Bradbury A. (2007). "The creation of a novel fluorescent protein by guided consensus engineering". *Protein Engineering Design & Selection.* 1-11.
10. Wang Q., Bucle A., Foster N., Johnson C. y Fersht A. (1999). "Design of highly stable functional GroEL minichaperones". *Protein Sci.* 8(10):2186-93.
11. Rath A. y Davidson A. R. (2000). "The design of a hyperstable mutant of the Abp1p SH3 domain by sequence alignment analysis". *Protein Science.* 9:2457-2469.
12. 15. Lehmann M., Kostrewa D., Wyss M., Brugger R., D'Arcy A., Pasamontes L.y van Loon A.P. (2000). "From DNA sequence to improved functionality: using protein sequence comparisons to rapidly design a thermostable consensus phytase". *Protein Eng.* 13(1):49-57.
13. Lehmann M., Loch C., Middendorf A., Studer D., Lassen S., Pasamontes L. y van Loon A.P. (2002). "The consensus concept for thermostability engineering of proteins: further proof of concept". *Protein Eng.* 15(5)403:11.
14. Oliveira A., Xavier-Filho, J. y Sales M. (2003). "Cysteine Proteinases and Cystatins". *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 46(1):91-104.



15. Ohtsubo S., Hitoshi K., Noro W., Taniguchi M. y Sayito E. (2005). "Molecular cloning and characterization of Oryzacystatin-III, a Novel Member of Phytocystatin in Rice (*Oryzasativa* L. japónica)". *J. Agric Food Chem.* (53):5218-5224.
16. Ryan C.(1990). "Protease inhibitors in plants-genes for improving defenses against insects and pathogens". *Annu Rev Phytopathol.* (28):425-449.
17. Valdés-Rodríguez S., Guerrero-Rangel A., Melgoza-Villagómez C., Chagolla-López A., Delgado-Vargas F., Martínez-Gallardo N., Sánchez-Hernández C. y Délano-Frier J. (2007). Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry.* 45:790-798.
18. Girard C., Rivard D., Kiggundu A., Kunert K., Gleddie S., Cloutier C. y Michaud D. (2007). "A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*". *New Phytologist.* 173:841-851.
19. Martínez M., Rubio-Somoza Ignacio., Fuentes R., Lara P., Carbonero P. y Díaz I. (2005). "The barley cystatin gene (lcy) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination". *Journal of Experimental Botany.* 56 (412):547-556.
20. Ndack N., Kidric M., Repellin A., Gareil M., d'Arcy-Lameta A., Thu Pham Thi A. y Zuily-Fodil Z. (2004). A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. *FEBS Letters.* 577:545-550.
21. Koiwa H., Bressan R., y Hasegawa P. (1997). "Regulation of protease inhibitors and plant defense". *Trends in Plant Science.* 2(10):379-384.
22. Arai S., Matsumoto I., Emori Y. y Abe K. (2002). "Plant Seed Cystatins and their Target Enzymes of Endogenous and Exogenous Origin". *J Agric Food Chem.* (50):6612-6617.
23. Aguiar J., Franco O., Rigden D., Bloch C., Monteiro A., Flores V., Jacinto T., Filho J.X., Oliveira A., Grossi-de-Sa M. y Fernández K. (2006). "Molecular modeling and inhibitory activity of Cowpea cystatin against Bean Bruchid Pests". *Proteins: Structure, Fuction and Bioinformatics.* (63):662-670.
24. Martínez M., Abraham Z., Carbonero P. y Díaz I. (2005). "Comparative phylogenetic analysis of cystatin gene families from arabidopsis, rice and barley." *Mol Gen Genomics* (273):423-432.
25. [www.biojournal.net](http://www.biojournal.net). Díaz I. y Martínez M. "Fitocistatinas: Función Biológica y Aplicaciones Biotecnológicas".
26. Kiggundu A., Goulet M.C., Goulet C., Dubuc J.F. Rivard D., Benchabane M., Pepin G., Vyer C., Kenort, K. y Michaud D. (2006). "Modulating the proteinase inhibitory profile of a plant cystatin by single mutations at positively selected aminoacid sites". *The Plant Journal.* 48: 403-413.
27. Rzychon M., Chmiel D. y Stec-Niemczk J. (2004). "Modes of inhibition of cysteine proteases". *Acta Biochemica Polonica.* 51(4):861-873.

28. Nikolova P.V., Henckel J., Lane D.P. y Fersht A.R. (1998). "Semirational design of active tumor supresor p53 DNA binding domain with enhanced stability". *Protein Sci.* 95:14675-14680.
29. Gao F., Weaver E.A., Lu Z., Li Y., Liao H-X., Ma B., Alam S.M., Sccarce R.M., Sutherland L., Yu J., Decker J., Shaw G. M., Montefiori D.C., Korber B., Hahn B. y Haynes B. (2005). "Antigenicity and Immunogenicity of a Synthetic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Group M Consensus Envelope Glycoprotein". *Journal of Virology.* 79:2 1154-1163.
30. Farías, J.A. 2005. Generación de una andamiaje estable: Diseño de un barril TIM consenso. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
31. Kohl A., Binz H.K., Forrer P., Stumpp M.T., Plückettum A. y Grütter M. (2003). "Designed to be stable: Crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein". *PNAS.* 100(4):1700-105.
32. Polizzi KM., Chaparro-Riggers J.F., Vazquez-Figueroa E. y Bomarius A.S. (2006). "Structure-guided consensus approach to crate a more thermostable penicillin G acylase". *Biotechnology Journal.* 1:531-536.
33. Parmeggiani F., Pellarin R., Larsen P., Varadamsetty G., Stumpp M., Zerbe O., Caflisch A. y Plucktun A. (2008). "Designed Armadillo Repeat Proteins as General Peptide-Binding Scaffolds: Consensus Design and Computational Optimization of the Hydrophobic Core". *J. Mol. Biol.* 376:1282-1304.
34. Gianotti A., Ríos W., Soares-Costa A., Nogaroto V., Carmona A., Oliva M., Andrade S. y Henrique-Silva F. (2006). "Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*)". *Protein Expression and Purification.* 47(2):483-9.
35. Inanaga H., Kobayasi D., Kouzuma., Aoki-Yasunaga C., Iimaya K. y Kimura M. (2001). "Protein Engineering of novel proteinase inhibitors and their effects on the Growth of *Spodoptera exigua* Larvae". *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65(10):2259-2264.
36. Outchkourov N.S., Jan de Kogel W., Wiegeus G., Abrahamson M. y Jongsma M. (2004). "Engineered multidomain cystein protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials". *Plant Biotechnology Journal.* 2:449-458.
37. Koiwa H., Bressan R. y Hasegawa P. (1997). "Regulation of protease inhibitors and plant defense". *Trends in Plant Science.* 2(10):379-38.
38. Urwin P., Atkinson H., Waller D. y McPherson M.(1995). "Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy rotos confers resistance to *Globodera pallida*". *The Plant Journal.* 8(1):121-131.
39. Urwin P., Lilley C., McPherson M. y Atkinson H. (1997). "Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin". *The Plant Journal.* 12(2):455-461.
40. Urwin P., Troth K., Zubko E. y Atkinson H. (2001). "Effective transgenic resistance to *G. pallida* in potato field trials". *Molecular Breeding.* 8:95-101.

41. [www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html](http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html)
42. [www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons](http://www.emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/cons)
43. Soares-Costa, A., Beltramini L.M., Thiemann O.H. y Henrique-Silva F. (2002). "A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification and antifungal activity". *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 296:1194-1199.
44. [www.changbioscience.com/primio/primom.html](http://www.changbioscience.com/primio/primom.html)
45. Vilela M.L., Carmona A., Andrade S., Cotrin S., Soares-Costa A. y Henrique-Silva F. (2004). "Inhibitory selectivity of canecystatin: a recombinant cystein peptidase inhibitor from sugarcane". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320:1082-1086.
46. [www.kasuga.or.jp/codon](http://www.kasuga.or.jp/codon)
47. Yang, A.H. y Yeh K.W. (2005). "Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no.1)". *Planta*. 221:493-501.
48. Tang K. y Dill K. (1998). "Native protein fluctuations: the conformational-motion temperature and the inverse correlation of protein flexibility with protein stability". *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16(2):397-411.
49. Gianotti A. 2008. Produção recombinante e estudos funcionais de tres novas cistatinas da cana-de açúcar sua utilização em estudos de inibição da adesão, proliferação, migração e invasão celular. Tesis de Doctorado. Sao Carlos FUScar.