



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Posgrado en Ciencias Químicas

**Estudio bioquímico de la interacción entre el inhibidor de serín-proteasas rHPI de
Hevea brasiliensis y la subtilisina Carlsberg**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:
Laura Pinzón Yaya

TUTOR PRINCIPAL
Tutora: Dra. Adela Rodríguez Romero

Instituto de Química

Ciudad de México, Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

“Todos mis descubrimientos han sido respuestas a mis oraciones. Tomo mi telescopio y veo en el espacio lo que se encuentra a millones de kilómetros de distancia. No obstante, entro a mi habitación y por medio de la oración puedo acercarme más a Dios y al cielo que si contara con todos los telescopios que hay en la Tierra.” *Isaac Newton*.

Para Dios siempre toda la gloria.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por abrirme las puertas de su laboratorio y por confiar en mi aún sin conocerme.

A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios.

A la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por su disposición a enseñar.

A la Dra. Annia Rodríguez Hernández por su constante apoyo y motivación.

Al Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas (LANEM-IQ-UNAM)

A la Dra. Patricia Cano por su ayuda en el área de biología molecular.

A la Quim. Eréndira García Ríos por su apoyo en espectrometría de masas MALDI-TOF

A los Dres. Alfredo Torres Larios y Enrique García Hernández por su apoyo en el uso de los equipos de BLI e ITC.

A la DGAPA-UNAM por el apoyo al proyecto IN208418.

A mis padres, abuelos y hermana. Aún en la distancia fueron incondicionales.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de biomacromoléculas 3.

A mis queridos amigos que han sido de apoyo en México; M. C. Rocio Elejalde, Dr. Efrén García Maldonado, Odont. Juan Felipe Jerez, QFB Frida Hernández y al M. C. Andrés Marmolejo.

Tabla de contenido

INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Generalidades del látex y la especie <i>Hevea brasiliensis</i>	3
1.2 Alérgenos del látex de <i>Hevea brasiliensis</i>	6
1.3 Inhibidores de proteasas y su papel en el mecanismo de defensa de las plantas	10
1.2 Serín-proteasas	14
1.5 Mecanismo de acción de las serín proteasas	16
1.6 Generalidades de la subtilisinas	17
1.7. Interacciones en los complejos inhibidor-serín proteasa	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	21
3. HIPÓTESIS	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo general	23
4.2 Objetivos específicos	23
5. METODOLOGÍA.....	24
5.1 Identificación del inhibidor de serín-proteasas Hev b 15 a partir del suero citoplasmático del látex de <i>H.brasiliensis</i>	24
5.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado (A), obtenido después de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, (0-65%) e identificación del inhibidor HPI (Hev b 15)	25
5.1.2 Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado B, obtenido después de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio (65-100 %) e identificación del inhibidor Hev b 15.....	26
5.2 Sobreexpresión y purificación del inhibidor de serín proteasas rHPI	26
5.4 Formación y purificación del complejo subtilisina Carlsberg e inhibidor rHPI	28
5.5 Espectrometría de masas	29

5.6	Cristalización	29
5.7.	Ensayo de interacción con interferometría de biocapa (BLI)	29
5.8	Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica	31
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
6.1	Identificación del inhibidor de serín-proteasas Hev b15 a partir del suero citoplasmático del látex de <i>H.brasiliensis</i>	33
6.1.2	Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado (B) e identificación del inhibidor HPI.....	38
6.2	Sobre-expresión del gen y purificación del inhibidor de serín proteasas rHPI	41
6.3	Formación y purificación del complejo subtilisina Carlsberg e inhibidor rHPI	45
6.4	Cristalización	50
6.5	Análisis de la interacción entre el inhibidor (rHPI) de <i>H. Brasiliensis</i> y la subtilisina Carlsberg	50
6.5.1	Ensayos de interacción subtilisina Carlsberg con el inhibidor de serín-proteasas rHPI, usando interferometría de biocapa (BLI)	50
6.4.2	Calorimetría de titulación isotérmica de la subtilisina Carlsberg con el inhibidor de serín proteasas rHPI.....	55
7.	CONCLUSIONES	62
8.	PERSPECTIVAS	63
	BIBLIOGRAFÍA	64

Índice de Figuras

Figura 1. Mecanismo de iniciación y polimerización de la biosíntesis del látex.	4
Figura 2. Obtención y separación del látex, a partir de <i>Hevea brasiliensis</i>	5
Figura 3. Clasificación de los inhibidores de proteasas	11
Figura 4. Diagrama de un sitio activo de una proteasa.	12
Figura 5. Diagramas de listón mostrando la triada catalítica	15
Figura 6. Mecanismo de reacción para las serín proteasas	16
Figura 7. Diagrama de listones de la subtilisina Carlsberg.	18
Figura 8. Sitio de clonación del vector HPI_pET-28-a	27
Figura 9. Diagrama esquemático del ensayo en la placa de 96 pozos.....	31
Figura 10. (A) SDS-PAGE al 15% de la precipitación A. (B), Ensayo de actividad inhibitoria de la precipitación (A) con sulfato de amonio (0-65%).....	34
Figura 11. Perfil de elución del precipitado (A) usando una columna de exclusión molecular Bio sec 3-150 Å.	34
Figura 12. Primer paso de purificación de la fracción A (0-65%) por cromatografía de exclusión molecular.....	35
Figura 13. Perfil cromatográfico la Fracción 3. Usando una columna de intercambio iónico (Mono Q 5/50 G/L).	36
Figura 14. Análisis de las fracciones N1 y N2 por SDS PAGE al 15%.	36
Figura 15. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción (N).....	37
Figura 16. Perfil de elución del precipitado (B) en una columna de intercambio iónico Mono Q GL50 (5/50).....	39
Figura 17. Fracciones eluidas en la columna de intercambio iónico Mono Q GL50 (5/50).	39
Figura 18. (A) Perfil de elución de la fracción LQN en una columna de exclusión molecular. (B) Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.	40
Figura 19. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción denominada Tubo (3-4)..	41
Figura 20. Purificación de rHPI con etiqueta de histidinas por cromatografía de afinidad	42

Figura 21. Fracciones eluidas de rHPI con etiqueta de histidinas en la columna de afinidad a Níquel..	42
Figura 22. Inhibidor rHPI después de la eliminación de su etiqueta de histidinas.....	43
Figura 23. Perfil de elución del inhibidor rHPI como último paso de purificación..	44
Figura 24. Análisis por electroforesis gel SDS-PAGE al 15 %..	44
Figura 25. Espectro de masas MALDI-TOF para el inhibidor de proteasas rHPI..	47
Figura 26. Purificación del complejo inhibidor rHPI- subtilisina Carlsberg.....	47
Figura 27. Perfil cromatográfico del inhibidor de serín-proteasas rHPI. ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 28. Purificación de la proteasa subtilisina Carlsberg. con una columna de exclusión molecular...	46
Figura 29. Espectro de masas MALDI-TOF para el inhibidor de proteasas rHPI..	44
Figura 30. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción "PICO 1C"	48
Figura 31. Espectro de masa MALDI-TOF para la fracción "PICO 2C".	49
Figura 32. Espectro de masas MALDI-TOF la fracción "PICO 3C"	49
Figura 33. Interferograma de la cinética de unión del inhibidor rHPI con subtilisina Carlsberg.....	52
Figura 34. Ampliación del interferograma de la cinética de unión del Inhibidor rHPI con la subtilisina Carlsberg.	53
Figura 35. Isotermas calorimétricas de unión del inhibidor rHPI con la subtilisina Carlsberg.....	57
Figura 36. Huella termodinámica de la interacción entre el inhibidor de serín proteasas rHPI y la subtilisina Carlsberg..	60

Índice de Tablas.

Tabla 1. Productos comunes que contienen látex. Tomado de (Mahmoudi, 2018).....	7
Tabla 2. Alérgenos del látex de <i>H. brasiliensis</i> registrados y reconocidos internacionalmente. Tomado de (Berthelotab <i>et al.</i> , 2014)	9
Tabla 3. Resultados de la cinética de unión de las diferentes concentraciones del inhibidor rHPI a la subtilisina Carlsberg por BLI	54

Resumen

Las interacciones proteína-proteína juegan un papel importante en la mayoría de los procesos bioquímicos de los seres vivos. Estas se involucran en mecanismos de transporte, regulación, defensa, nutrición, adaptativos, bioquímicos, entre otros. El correcto funcionamiento de los organismos depende de manera imprescindible de las interacciones proteína-proteína. En las plantas; por ejemplo, los mecanismos de defensa están asociados con procesos de regulación tanto de inhibidores como de enzimas, lo que le permite a la planta activar diversas moléculas que de manera controlada actúan en contra de factores adversos de su entorno. Gran parte de las plantas optimizan sus mecanismos de defensa acorde con su necesidad, lo que implica que están en un constante desarrollo evolutivo.

La finalidad de este trabajo fue estudiar bioquímicamente la interacción entre el inhibidor recombinante de serín proteasas rHPI (alérgeno Hev b 15) de *Hevea brasiliensis* y la subtilisina Carlsberg. Para ello se usaron ensayos de interferometría de biocapa y calorimetría de titulación isotérmica. En primer lugar, se evaluó la presencia del inhibidor HPI en la fracción sérica de la planta *H. brasiliensis*, precipitada con sulfato de amonio de 0-65% (**A**) y de 65 a 100% (**B**). Las dos fracciones fueron aplicadas a columnas de cromatografía de exclusión molecular e intercambio aniónico.

Principalmente se identificaron dos proteínas con masas moleculares de 14.4 kDa para (**A**) y 7.6 kDa para (**B**) mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y geles SDS PAGE. Ambas proteínas presentaron actividad inhibitoria sobre la subtilisina, con valores de 73 % para la proteína con una masa de 14.4 kDa y 53 % para la de 7.6 kDa. Para poder caracterizar la interacción con la subtilisina, se expresó y purificó al inhibidor recombinante rHPI de 7.74 kDa, debido a la poca cantidad de proteína obtenida de la fuente endógena.

Para medir la interacción inhibidor-subtilisina se usó una relación estequiométrica (1.2:1). La constante de disociación K_D obtenida mediante ensayos de interferometría de biocapa fue de 0.16 μM , muy similar a la calculada (K_D 0.28 μM), a partir de la constante afinidad K_a ($3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) determinada con los ensayos de calorimetría de titulación isotérmica.

Mediante esta misma técnica, también se determinó que la unión de estas dos proteínas se ajusta a un modelo con un solo sitio de unión, en donde una molécula del inhibidor interactúa con una molécula de subtilisina y que se trata de un proceso exotérmico y favorecido entrópicamente

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del látex y la especie *Hevea brasiliensis*

El árbol *Hevea brasiliensis* Muelle Erg., también llamado árbol del caucho o hule, siringa o siringueira pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y se cultiva en diversos países especialmente en América y en el Sudeste Asiático. *H. brasiliensis* es una de las principales fuentes de hule en el mundo, predominando sobre otras fuentes vegetales como el guayule (*Parthenium argentatum*), el árbol de la gutapercha (*Eucommia ulmoides*) y el diente de león (*Taraxacum sp.*) (Berthelot *et al.*, 2014).

En los últimos años, el hule se ha usado en distintas áreas casi de manera indispensable, éste puede ser obtenido de manera sintética o a través de fuentes naturales. El hule sintético está compuesto por polímeros de alquenos y dienos obtenidos de la industria petroquímica, mientras que el hule natural proviene de plantas y contiene biopolímeros de isopreno (Men *et al.*, 2018). El hule natural posee propiedades físicas que superan ampliamente al hule sintético, por ejemplo: mayor resiliencia, elasticidad, resistencia a la abrasión, eficiencia en la dispersión del calor y maleabilidad a bajas temperaturas (Cornish, 2001). Por lo tanto, el uso de hule natural es casi irremplazable en diversas áreas de la salud y la industria (neumáticos de alta resistencia, dispositivos médicos, guantes quirúrgicos, entre otros). Acorde con el informe del grupo internacional de estudios sobre el hule, el consumo global de látex de *H. brasiliensis* fue de 13.2 millones de toneladas con un valor correspondiente de 26 billones de dólares en el año 2017 (Men *et al.*, 2018).

El hule natural o látex, consiste principalmente en cis-1,4-poliisopreno, su monómero isopentenil pirofosfato (IPP) se sintetiza a partir de las vías del mevalonato (MVA) y posiblemente también del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) en plantas. Su biosíntesis es catalizada por la transferasa del hule [EC.2.5.1.20] e implica tres pasos: iniciación, polimerización y terminación (da Costa *et al.*, 2005). En el primer paso de la iniciación de la cadena de cis-1,4-poliisopreno, se necesita de un precursor oligomérico de pirofosfatos alílicos que puede ser: el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), el geranil pirofosfato (GPP), o el farnesil pirofosfato (FPP), o el geranilgeranil pirofosfato (GGPP) o pirofosfato cis alílico.

Sin embargo, se sugiere que el FPP es el principal iniciador in vivo. La síntesis comienza con una ionización asistida por un cofactor catiónico divalente del enlace carbono-oxígeno en el iniciador, produciendo un catión alílico y un contra anión de pirofosfato (Figura 1). Posteriormente, la polimerización se lleva a cabo por la incorporación continua del grupo vinilideno de IPP, que da como resultado la formación de moléculas de látex. La configuración cis del 1,4-poliisopreno se debe a la estereo regulación, la cual depende de las transferasas específicas de hule que generan el doble enlace, después de la adición de IPP y la eliminación de protones (Men *et al.*, 2018). El último paso, la terminación de la polimerización es poco clara. El látex natural presenta una amplia distribución de pesos moleculares en las diferentes especies de plantas. La diferencia de peso molecular puede relacionarse con la función específica de las proteínas reguladoras en el hule (Cornish *et al.*, 2000).

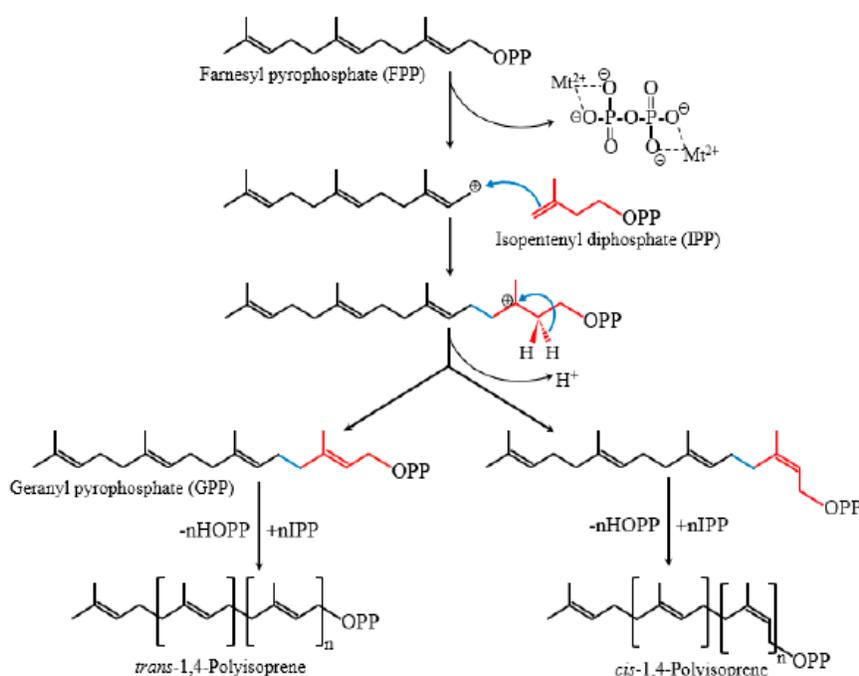


Figura 1. Mecanismo de iniciación y polimerización de la biosíntesis del látex. Tomado de Men *et al.*, 2018

La recolección del látex de *H. brasiliensis*, se realiza por medio de diversos cortes transversales sobre su corteza, el látex brota y al cabo del tiempo se coagula (Figura 2A). El

látex es una suspensión blanca coloidal que se almacena en las células laticíferas, las cuales presentan un complejo sistema citoplasmático. Este puede ser separado en tres fases mediante una centrifugación a alta velocidad, tal y como se muestra en la Figura 2B. Hasta la fecha, 1499 proteínas se han identificado en el látex, al menos 186 proteínas están presentes en las partículas de hule y 169 se han encontrado en la fracción de lutoides o suero B (Berthelot *et al.*, 2016). El tipo de clona del árbol y el proceso de extracción del látex, inciden en la abundancia o escases de proteínas en el látex. Las proteínas identificadas en la fracción del suero C y en la fracción de partículas de hule y Frey-Wyssling pueden ser separadas e identificadas en función de su movilidad electroforética; sin embargo, algunas de estas proteínas han sido poco estudiadas debido a su difícil obtención y caracterización. (Sansatsadeekul *et al.*, 2011).



Figura 2. Obtención y separación del látex, a partir de *Hevea brasiliensis*. (A) Obtención del látex de *H. brasiliensis* mediante cortes transversales en la corteza. Imagen obtenida de Zhang *et al.*, 2017. (B) Fases del látex después de la ultra centrifugación (1) Fracción cremosa, partículas de hule y Frey-Wyssling (2) Suero C (3) Fracción de lutoides o suero (B). Foto tomada en el Laboratorio de Química de Biomacromoléculas 3-IQ-UNAM.

El látex también contiene proteínas, péptidos y carbohidratos además del cis-1,4-poliisopreno. Varias de estas proteínas están asociadas a los mecanismos de defensa de la planta contra parásitos o patógenos, tales como: heveína, quitinasa, hevamina, glucosidasa, polifenoloxidasas, β -1,3 glucanasa, β galactosidasa, β -N-acetilglucosaminasa, polifenol oxidasa, e inhibidores de proteasas. (Havanapan *et al.*, 2016).

Havanapan y Bourchookarn, reportaron que la abundancia de ciertas proteínas en diferentes clonas del árbol de *H brasiliensis* influía en una mayor inhibición de algunas cepas de hongos. El suero del látex de la clona BPM24 de *H. brasiliensis* presentó una mayor cantidad de proteínas como inhibidores de proteasas, glucanasa y quitinasa, las cuales podrían estar implicadas en la alta actividad antifúngica de esta clona. Estos autores afirman que la purificación y estudio de estas proteínas pueden ser las bases para encontrar futuros compuestos que podrían ser usados con fines terapéuticos. Concluyen que el suero de látex, desechado en algunas ocasiones por la industria del caucho, se puede convertir en una fuente potencial de agentes bioactivos (Havanapan *et al.*, 2016).

1.2 Alérgenos del látex de *Hevea brasiliensis*

En las últimas décadas, los casos de alergia al látex han incrementado significativamente convirtiéndose en un problema de salud pública. Aunque en países industrializados estos casos de alergia al látex han disminuido, en otros países, denominados en vía de desarrollo industrial, la alta sensibilización al látex sigue estando latente (Heimsoth & Rihs, 2007).

El primer caso de una reacción alérgica al látex fue publicado en el año 1927, sin embargo, fue solo desde el año 1980 que se incrementó el número de casos médicos relacionados con graves reacciones anafilácticas por productos de látex de diversas plantas, predominando los casos relacionados con el uso de productos derivados del látex de *H. brasiliensis* (Mahmoudi, 2018).

Los productos de látex son comúnmente usados por trabajadores de la salud, empleados del sector farmacéutico, personal de aseo y cosmetología. Cabe resaltar, que el resto de la población también está expuesta a estos artículos; sin embargo, es el sector de la salud el que mayor riesgo tiene de adquirir reacciones alérgicas al látex. En la Tabla 1 se muestra una lista de productos que contienen látex, de uso cotidiano y que pueden llegar a ser detonantes de reacciones alérgicas. (Mahmoudi, 2018).

Tabla 1. Productos comunes que contienen látex. Tomado de *Mahmoudi, 2018*

Artículos médicos
Guantes
Jeringas
Tubo de estetoscopio
Torniquetes
Puños de presión arterial.
Tapones de goma (medicamentos inyectables)
Catéteres
Dispositivos de intubación
Artículos para el hogar
Guantes lavalozas
Mangueras de jardín
Biberones, tetinas, chupetes.
Suela de zapato
Neumáticos (automóviles, bicicletas)
Juguetes
Gafas de protección
Condomes
Vendas
Cosméticos, pestañas postizas. (etc.)

Algunas estrategias tales como la reducción del uso de productos manufacturados con látex, identificación de los alérgenos, y la fabricación de nuevos productos con una baja cantidad de sustancias que inducen una reacción de hipersensibilidad, han sido métodos efectivos de control del número de pacientes con alergia al látex. Sin embargo, se ha demostrado que la alergia al látex está asociada con enfermedades atópicas, incluyendo rinitis, alergias al polen y alimentos debido a la reactividad cruzada (Saleha *et al.*, 2018).

Para el año 2016, se habían identificado un total de 15 alérgenos en el látex de *H. brasiliensis*, (Hev b 1-15), los cuales fueron aprobados y registrados por la organización

mundial de la salud (OMS) y el Subcomité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Tabla 2) (Berthelot *et al.*, 2016).

De los 15 alérgenos reportados, algunos se han obtenido mediante técnicas convencionales de purificación, mientras que otros han sido producidos usando técnicas de clonación molecular. Las ventajas de producir las proteínas recombinantes, en contraste con la purificación de proteínas nativas, son que se logra una mayor producción de proteína y se obtiene una sola isoforma de alta homogeneidad. Muchos de los alérgenos recombinantes de látex se han expresado en células de *Escherichia coli* debido a que este sistema de expresión evita las modificaciones postraduccionales, sin embargo, estos deben ser validados contra las proteínas nativas y confirmar su bioequivalencia en términos de reactividad alérgica (Heimsoth & Rihs, 2007).

Algunos de estos 15 alérgenos, presentan modificaciones postraduccionales y todavía no es clara su función en el mecanismo de defensa de la planta. Por ejemplo, no se han logrado identificar los carbohidratos que son determinantes en la reactividad cruzada y como las glicosilaciones actúan como epítopos en la alergenidad del látex. (Heimsoth & Rihs, 2007). Estos alérgenos han impactado de manera negativa la industria del látex. Solo en los Estados Unidos se reportaron varios casos de muerte producto de graves cuadros anafilácticos mientras se realizaban enemas de bario (Yong *et al.*, 2019). Aunque las propiedades del hule natural de *H. brasiliensis* sobresalen sobre otras especies, e incluso predominan sobre el hule de origen sintético, su uso se ve opacado por la presencia de estos alérgenos, lo que afecta tanto al sector médico como a la economía de muchos países en desarrollo (Yong *et al.*, 2019).

Tabla 2. Alérgenos del látex de *H. brasiliensis* registrados y reconocidos internacionalmente. Tomado de (Berthelotab *et al.*, 2014)

Alérgeno	Nombre	Localización	kDa	pI	GLS ^a	Papel fisiológico	Nº de acceso GENBANK
Hev b 1	Factor de elongación del látex	Partículas de caucho	14.7	5.0	-	Biosíntesis del látex	P15252
Hev b 2	β-1,3-glucanasa	Lutoides	35.1	9.5	+	Defensa	Q7XJ83
Hev b 3	Proteína de partículas pequeñas de hule	Partículas pequeñas de hule	22.4	4.8	-	Biosíntesis del látex	O822803
Hev b 4	Enzima tipo lipasa	Lutoides	53-55	4.5	+	Componentes de microhélices	Q8WPJ2
Hev b 5	Proteína ácida del látex	Citoplasma	16	3.5	-	Proteína estructural	Q39967
Hev b 6 01, Hev b 6 02	Precursor y heveína	Lutoides	21	5.6	-	Coagulación del látex	P02877
Hev b 7	Homólogo de patatina	Citoplasma	42.9	4.8	+	Defensa	AAC27724
Hev b 8	Profilina	Citoplasma	15	4.9	-	Vinculada con el citoesqueleto	Y15402
Hev b 9	Enolasa	Citoplasma	47.7	5.6	-	Enzima glicolítica	AJ132581
Hev b 10	Superoxido dismutasa (MnSOD)	Mitocondria	26	6.3	-	Enzima de destrucción radical	P35017
Hev b 11	Quitinasa clase I	Lutoides	33	5.1	-	Defensa	AJ238579
Hev b 12	Proteína no específica de transferencia de lípidos	Membranas del látex	9.3	10.8	+	Defensa	AAL25839
Hev b 13	Esterasa	Lutoides	43	5.0	+	Defensa	Q7Y1X1
Hev b 14	Hevamina	Lutoides	33.7	8.7	-	Defensa	P23472
Hev b 15	Inhibidor de serín proteasa	Látex	7.5	4.8	SR ^b	Defensa	CCW27997

^a Gls*(Glicosilación)

^bSR (sin reportar)

1.3 Inhibidores de proteasas y su papel en el mecanismo de defensa de las plantas

El inhibidor Hev b 15 o HPI (Hevea protease inhibitor) es objetivo de estudio en este trabajo. Esta proteína, que inhibe a la subtilisina Carlsberg y débilmente a la tripsina, está relacionada con los mecanismos de defensa de *H. brasiliensis* y se clasifica como un inhibidor de la familia tipo I de papa (Sritanyarat *et al.*, 2006). Gracias a la evolución y a los diferentes cambios en los ecosistemas, las plantas han desarrollado mecanismos de protección que les permiten resistir diferentes tipos de condiciones desfavorables, por ejemplo: ataque de insectos, microorganismos fitopatógenos y cambios en su ecosistema (Valueva & Mosolov, 2004). Dentro estos mecanismos se encuentran los inhibidores de proteasas.

Los inhibidores de proteasas son bien conocidos por tener muchas aplicaciones en medicina y biotecnología, siendo las plantas una de las principales fuentes de estas moléculas. Los inhibidores de proteasas prolongan la vida útil de los algunos alimentos y son importantes candidatos para el manejo y control de plagas. Los insectos que se alimentan del material vegetal dependen predominantemente de proteasas para su digestión, por lo tanto, instintivamente el insecto evita alimentarse de ciertas plantas que contienen inhibidores de proteasas, por lo tanto, esta característica se consolida como una herramienta efectiva en el mecanismo de defensa en las plantas (Bijinaa *et al.*, 2011). Además, los inhibidores regulan la actividad proteolítica en las plantas, por lo que el estudio de su efecto en la regulación, en la embriogénesis vegetal y en el desarrollo celular en las plantas son un desafío para los investigadores (Fluhr *et al.*, 2012) (Hyun *et al.*, 2015).

Aunque las proteasas son fundamentales en diversos procesos bioquímicos de las plantas, éstas deben ser reguladas para evitar un exceso de su actividad, puesto que pueden ocasionar un daño en el organismo vegetal. La tarea de control y regulación se lleva a cabo por los inhibidores PIs (proteasa inhibitors). Estos PIs son específicos, por lo tanto, otros tipos de proteínas no se ven afectados por estas moléculas. Recientes estudios demostraron que los inhibidores de plantas son más efectivos que los inhibidores de origen sintético; ya

que, presentan una alta especificidad, un mecanismo de acción dirigido, un uso más seguro y menos toxicidad (Shamsi *et al.*, 2016).

Los inhibidores de proteasas son ubicuos, han sido aislados y estudiados ampliamente en los últimos años. Por lo general son moléculas pequeñas con una masa molecular entre 5-26 kD, éstos forman un complejo estable imitando la estructura del intermediario tetraédrico en las reacciones de las proteasas con su sustrato. Los inhibidores se pueden agrupar basados en la clase de proteasa que inhiben, de modo que se clasifican en: inhibidores de serín, cisteín, aspartil, glutamíl, treonín y metalo proteasas (Figura 3). Otra forma de clasificar a los inhibidores de proteasas es según el porcentaje de identidad en su secuencia. Actualmente en la base de datos MEROPS existen 85 familias, que considera la secuencia de aminoácidos de 17,451 inhibidores. Cada uno de estos PIs difieren en su masa molecular y en su mecanismo de acción (Marathe *et al.*, 2019). Estas familias se nombran con la letra "I" seguida por un número, por ejemplo, familia I3 que contiene inhibidores tipo Kunitz (Bendre *et al.*, 2018).

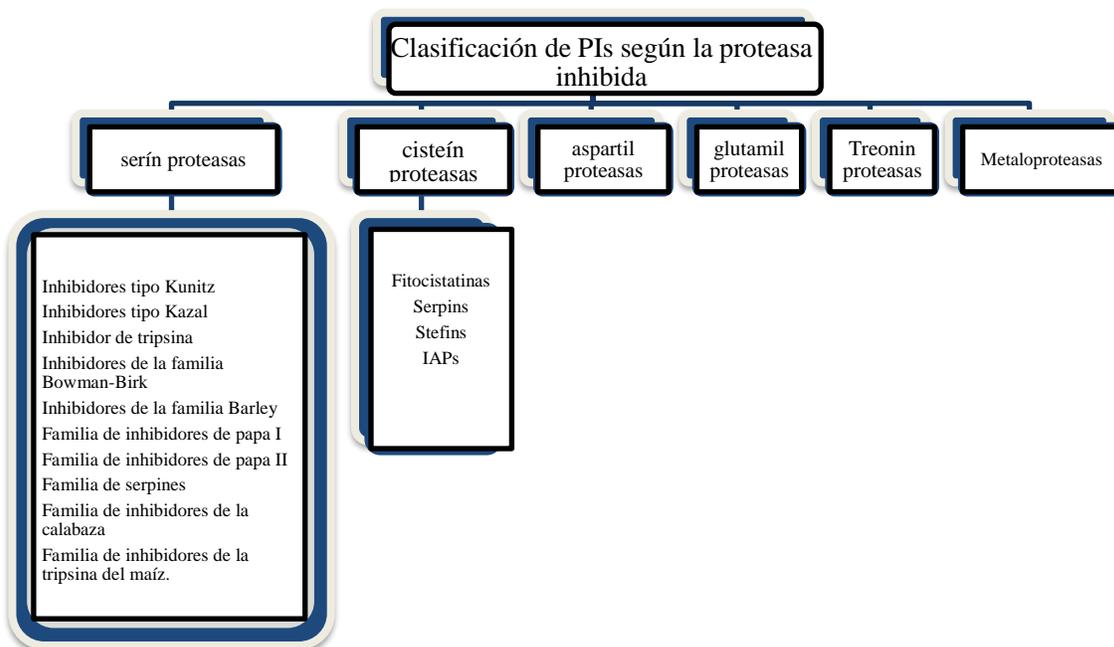


Figura 3. Clasificación de los inhibidores de proteasas según el tipo de proteasa que inhiben. Tomado de Shamsi, Parveen, & Fatima *et al.*, 2016.

Los inhibidores de serín proteasas se agrupan según su mecanismo de acción en canónicos, no canónicos y serpinas. Los inhibidores no canónicos se unen al sitio activo de la proteasa a través de su segmento N-terminal y pueden presentar dos áreas de interacción. Además, éstos interactúan con la proteasa de manera fuerte y específica. Las serpinas actúan mediante la formación de un complejo intermediario covalente tetraédrico acil-enzima irreversible y el inhibidor presenta importantes cambios conformacionales con la proteasa (Krowarsch *et al.*, 2003).

Los inhibidores canónicos representan el mayor grupo de inhibidores de serín proteasas. Estos interactúan con sus proteasas diana mediante un mecanismo estándar de inhibición (Otlewski *et al.*, 2005). Para describir la interacción entre un inhibidor y una proteasa se emplea una nomenclatura específica de los aminoácidos involucrados. Este sistema usa la letra **S** para los residuos que se encuentran en el sitio activo de la proteasa, y la letra **P** para los aminoácidos del sitio de unión en el inhibidor. La nomenclatura **P** y **P'** se utiliza según la posición de los aminoácidos, en el lado amino (**P**) o carboxilo terminal (**P'**) Figura 4 (Paiva *et al.*, 2013).

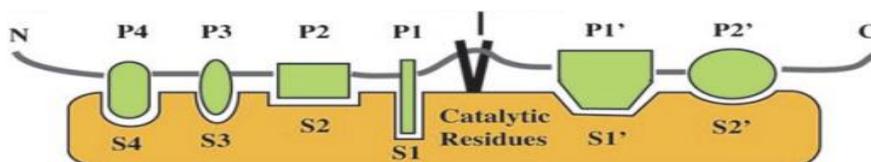


Figura 4 . Diagrama del sitio activo de una proteasa. Interacción entre las cadenas laterales de los aminoácidos (**P**) de un inhibidor o sustrato y el subsitio (**S**) del sitio activo de la proteasa. El residuo localizado en la posición **P1** usualmente determina la especificidad de la enzima y la del inhibidor, además le confiere al inhibidor su resistencia a la hidrólisis. (Farady & Craik, 2010)

El mecanismo estándar de inhibición para los inhibidores canónicos comprende la interacción entre la enzima y el inhibidor, que puede ser explicada como una reacción de hidrólisis del enlace peptídico de la proteasa con su sustrato.



Donde **E** es la proteasa, **I** corresponde al inhibidor, **I*** es el inhibidor liberado del sitio activo de la proteasa, ya sea con su estructura completa o con la pérdida de algunos péptidos, **EI** es el complejo estable, k_{ON} y k_{ON^*} son las constantes de velocidad de unión de segundo orden, k_{Off} , k_{Off^*} son las constantes de velocidad de liberación primer orden del complejo (Krowarsch *et al.*, 2003).

El inhibidor se une a la proteasa a través de un asa de unión, la cual es complementaria al sitio activo. Las asas de unión de diferentes inhibidores adoptan una llamada conformación canónica. El asa sirve como un simple motivo de reconocimiento, la cual depende de la secuencia de aminoácidos y es capaz de bloquear fuerte y específicamente el sitio activo de una enzima particular. Los efectos en la energía de asociación casi siempre involucran el residuo P1 (sistema de numeración de Schechter and Berger), el cual está localizado en el centro del asa y es reconocido por el motivo de especificidad S1 de la proteasa. El asa de unión a la enzima representa un modelo para estudiar diferentes aspectos de la conformación y reconocimiento del enlace proteína-proteína (Apostoluk & Otlewski, 1998)

Los inhibidores canónicos son tradicionalmente vistos como ejemplos clásicos de mecanismos de inhibición tipo "llave y bloqueo", en el cual el inhibidor libre puede ser rígido; no obstante, la formación del complejo da lugar a cambios conformacionales en el inhibidor. Esta idea se basa en el análisis de diversas diferencias en las estructuras cristalinas, tanto del inhibidor en su forma individual, como del complejo con las serín proteasas. Sin embargo, estudios de resonancia magnética nuclear han revelado que el sitio de interacción del inhibidor de proteasas canónico en complejo con la enzima es flexible en una escala de nanosegundos, lo que podría contradecir el modelo rígido de llave-bloqueo ampliamente aceptado para este tipo de inhibidores (Gáspári *et al.*, 2009).

Originalmente Laskowski y Kato (Laskowski & Kato, 1980) propusieron una clasificación para los inhibidores canónicos, basándose principalmente en sus puentes disulfuros, su

topografía, la localización del sitio de unión y la homología en la secuencia, pudiéndose clasificar a 8 familias. Actualmente son reconocidas 18 familias de inhibidores. Frecuentemente comprenden elementos de estructuras secundarias como: láminas beta o una mezcla de elementos de estructura secundaria alfa/beta; también pueden ser proteínas α -helicoidales o proteínas intrínsecamente desordenadas ricas en puentes disulfuro. Los inhibidores canónicos, se caracterizan porque son un ejemplo de la evolución de proteínas, pues tanto su función como el asa de unión canónico, se han conservado a través de la evolución, sin importar que no compartan una identidad en su secuencia, topografía y localización del sitio de unión (Krowarsch *et al.*, 2003).

Recientemente, los inhibidores de proteasas han sido de gran interés debido a su alta capacidad para prevenir la carcinogénesis. De hecho, se ha reportado que los inhibidores de serín proteasas de la papa y otras plantas tienen efectos inhibitorios en el crecimiento de células tumorales (Young *et al.*, 2009). Para que los inhibidores de proteasas puedan usarse en humanos deben tener una alta especificidad a la proteasa objetivo, no deben ser tóxicos y además su mecanismo de acción no debe afectar las otras rutas metabólicas en las que la función de las proteasas sea vital para el correcto funcionamiento del cuerpo. Muchos inhibidores de proteasas no tóxicos se han obtenido de plantas o bacterias, éstos se han purificado de semillas de cebada, hojas de repollo, entre otros. Se ha reportado que inhibidores de la familia de la papa, inhiben eficientemente las proteasas fecales humanas, lo que podría ser útil para el tratamiento de la dermatitis perianal (Young *et al.*, 2009).

1.2 Serín-proteasas

Las enzimas proteolíticas actúan como catalizadores que rompen enlaces peptídicos, los cuales favorecen o no procesos biológicos en los organismos (Hernández *et al.*, 2010). Acorde con la base de datos MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>), las proteasas están clasificadas por su estructura y evolución. Actualmente son 244 familias y 55 clanes denominadas de la siguiente manera; serín-proteasas, treonín proteasas, cisteín proteasas, aspartil proteasas, glutamil proteasa y metaloproteasas (Manzano *et al.*, 2017). Las serín y cisteín-proteasas forman un complejo covalente sustrato-enzima, mientras que

las aspartil y metaloproteasas no lo forman. Las primeras tienen un residuo nucleofílico en su sitio catalítico que ataca el grupo carbonilo del enlace peptídico, mientras que las aspartil y metaloproteasas se involucran en reacciones ácido-base en presencia de una molécula de agua (Bendre *et al.*, 2018)

Casi un tercio de todas las proteasas se pueden clasificar como proteasas serínicas, llamadas así porque en su triada catalítica se encuentra un residuo de serina nucleófilo. La triada catalítica de las proteasas serínicas consta de: histidina, aspártico y serina (Figura 5). Esta última se puede encontrar en al menos cuatro contextos estructurales diferentes, lo que indica, que esta maquinaria catalítica ha evolucionado de diversas maneras (Hedstrom, 2002).

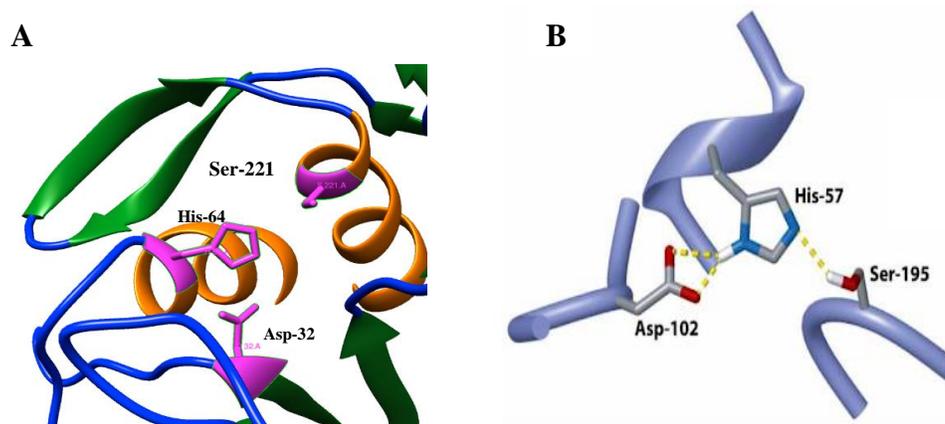


Figura 5. Diagramas de listón mostrando la triada catalítica en (A) subtilisina Carslberg PDB ID:1AF4 y en (B) quimotripsina PDB ID: 1CBW.

Cerca de 46 familias de serín-proteasas han sido identificadas y clasificadas según sus similitudes funcionales y estructurales, 5 de estas familias son las más importantes; quimotripsina, subtilisina, carboxipeptidasa, Clp (proteasas dependientes de ATP) y sedolisín-proteasas. La familia subtilisina consta de seis subfamilias que se clasifican de acuerdo con su función y origen. El término subtilasas abarca proteasas de todas las subfamilias, mientras que la subtilisina se refiere solamente a las subtilisinas bacterianas. Las subtilisinas se encuentran en las arqueobacterias, eubacterias, células eucariotas y virus (Van de Ven *et al.*, 1993).

1.5 Mecanismo de acción de las serín proteasas

El mecanismo por el cual las serín proteasas catalizan el rompimiento del enlace amida comienza con la unión al sustrato y la desprotonación del grupo hidroxilo de la serina por parte de la histidina (Bryan, 2000). La unión del sustrato en el sitio activo forma un complejo de Michaelis, exponiendo el grupo carbonilo del enlace amida a un ataque nucleofílico por parte del hidroxilo de la serina catalítica, en medio básico generado por el imidazol de la histidina (Figura 6) (Mansilla *et al.*, 2012).

El intermediario tetraédrico formado presenta una carga negativa en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo. Esta carga es estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos NH de los residuos de la cadena principal y con la cadena lateral de una asparagina. La reacción continua con la transferencia de un protón de la histidina cargada positivamente, actuando ahora como un ácido frente al nitrógeno del enlace peptídico, formando una amina protonada. La carga negativa del oxígeno en el enlace peptídico forma un intermediario acilo-enzima más estable. La histidina actúa como una base, después de haberse removido un protón y lleva a cabo el ataque nucleofílico al carbono del grupo carbonilo en el intermediario acilo, El colapso del intermedio tetraédrico se asocia con la donación de un protón de la histidina al oxígeno de la serina y la liberación del fragmento del péptido y restaura la enzima a su estado original. (Gamble *et al.*, 2011)

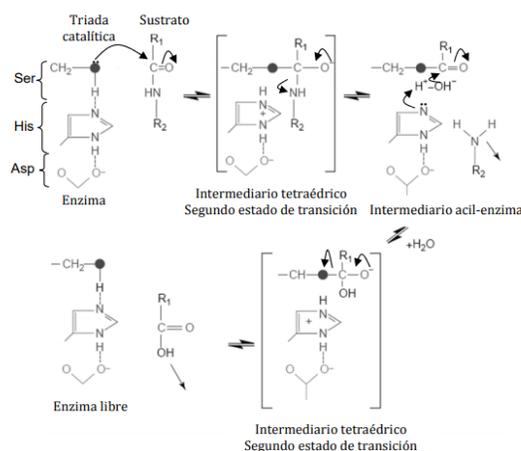


Figura 6 . Mecanismo de acción de las serín proteasas (Hernandez *et al.*, 2010)

1.6 Generalidades de la subtilisinas

Las subtilisinas o subtilasas son una familia de serín proteasas, extracelulares y alcalinas que están presentes en muchos organismos, principalmente en plantas (subtilasas) y bacterias (subtilisinas) y eucariotas superiores. Estas proteínas están involucradas en varias funciones biológicas de las plantas, por ejemplo: el desarrollo de frutos y semillas, modificaciones de la pared celular, factores de crecimiento y desarrollar una respuesta al estrés abiótico y biótico de las plantas (Figueiredo *et al.*, 2017).

La secuencia de aminoácidos de las subtilisinas Carlsberg y BPN' fueron determinadas por Emil L Smith en 1966 (Smith, 1966) y luego en 1969 se determinó la estructura tridimensional de la subtilisina BPN' (Wright Shubert, 1969). La subtilisina Carlsberg consta de una sola cadena polipeptídica de 274 aminoácidos. La identidad de estas dos proteasas, la subtilisina Carlsberg y la BPN' fue demostrada con estudios enzimáticos, estudios de secuenciación y cristalografía de rayos X (Svendsen, 1976).

El nombre de subtilisina se deriva del nombre de la bacteria que se obtiene, *Bacillus subtilis*. Según la clasificación MEROPS, las subtilisinas se clasifican dentro del clan SB, familia S8, y subfamilia S8A (Rawlings & Salvesen, 2013). La familia S8 es la segunda familia más grande dentro de las serín proteasas, las cuales presentan una secuencia conservada y se divide en dos subfamilias de subtilisinas, la subfamilia S8A, encabezada por la subtilisina (S8.001) y la subfamilia S8B, liderada por la kexina (S08.070) (Rawlings *et al.*, 2007).

La mayoría de los miembros de la familia de peptidasas S8, son endopetididasas. Estos son activos a pH a neutro o a un pH ligeramente alcalino. Muchas de estas endopetididasas son termoestables y por lo tanto tienen varias aplicaciones. Las subtilisinas son generalmente inhibidas por moléculas como: fluorofosfato de diisopropilo y fluoruro de fenilmetanosulfonio, entre otros. La estructura terciaria de la subtilisina S8 ha sido determinada en diversas condiciones y consiste en un plegamiento alfa/beta que contiene una hoja beta paralela de siete hebras (Figura 7) (Polaina & MacCabe, 2007).

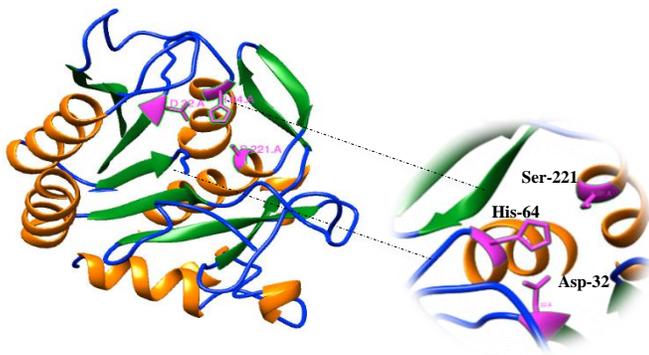


Figura 7. Diagrama de listones de la subtilisina Carlsberg. En la imagen de la derecha se muestra de manera ampliada la triada catalítica (Ser, Asp, His) en subtilisina Carlsberg. PDB ID: 1AF4

1.7. Interacciones en los complejos inhibidor-serín proteasa

Muchas de las interacciones proteína-proteína dan lugar a complejos transitorios, de manera que la asociación y disociación son procesos continuos. La naturaleza química de los aminoácidos involucrados en la formación de estos complejos transitorios es muy importante. Se ha comprobado que la mutación de dichos residuos compromete la afinidad de la interacción entre las proteínas involucradas, debido a que estos contribuyen a la energía de estabilización del complejo y a los denominados "hot spots" o puntos importantes de afinidad; sin embargo, aún no está clara la contribución de cada residuo en los sitios de unión, por lo que el estudio biofísico-estructural de los complejos proteína-proteína resulta de gran interés en la actualidad (Jayashree *et al.*, 2019).

Para determinar la energía de interacción y la afinidad entre una proteasa y un inhibidor se utilizan varias técnicas. El calor liberado o absorbido en un sistema proteasa-inhibidor es el resultado de varios eventos simultáneos que conducen a una respuesta global de interacción. La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) pone de manifiesto interacciones intermoleculares de indudable interés bioquímico como las asociaciones proteína-ligando, proteína-proteína y proteína-ADN/ARN. Si el efecto térmico neto de la interacción es lo suficientemente grande se puede caracterizar inequívocamente la termodinámica de un proceso de interacción (Miranda de la Rosa *et al.*, 2015).

Por otra parte, la interferometría de biocapa (BLI) es una técnica que mide las interacciones entre proteínas y otras biomoléculas en tiempo real. La técnica consiste en la inmovilización de un ligando a la punta de un biosensor que interacciona con una matriz en solución. La interacción entre el ligando inmovilizado y la molécula en solución produce un aumento en el grosor de la punta del biosensor que produce un cambio en la densidad óptica, y por lo tanto en la longitud de onda (Sultana & Lee, 2015).

Desde el punto de vista químico y estructural, el estudio de complejos proteína-proteína, contribuye a la identificación del tipo de interacciones que se presentan en el sitio de unión. Técnicas como la cristalografía de proteínas, la resonancia magnética nuclear y la criomicroscopía electrónica han sido determinantes en el estudio de complejos proteicos. Por ejemplo, la estructura cristalográfica del complejo greglina (inhibidor de proteasas) y la subtilisina Carlsberg reveló que este inhibidor se estabiliza por cuatro puentes disulfuro y el sitio de unión a la enzima es un asa que se estabiliza mediante 10 puentes de hidrógeno, de manera similar a la unión que se presenta con su sustrato. Los autores sugieren que la formación del complejo se debe a una combinación de modificaciones post-traduccionales, esencialmente fosforilaciones que le permiten tener una actividad biológica específica. (Derache *et al.*, 2012). En otro estudio cristalográfico se determinó la estructura del complejo entre el inhibidor eglina de sanguijuelas con la subtilisina Carlsberg. En la estructura se observa que la eglina C tiene forma de disco, con el sitio de unión a proteasa en un asa. Esta asa encaja dentro del sitio activo de la proteasa (McPhalen *et al.*, 1985).

Los inhibidores de serín proteasas de la especie *H. brasiliensis* han sido recientemente estudiados y aun se desconoce aspectos estructurales, bioquímicos y su mecanismo de inhibición. En estudios previos se logró identificar un posible inhibidor de serín proteasas extracelular (25 kDa) en un extracto celular y se determinó el efecto de éste en el crecimiento de hongos (*Phytophthora palmivora*). Además, el extracto presentaba una fuerte actividad inhibitoria contra subtilisina A, pero no frente a tripsina, quimotripsina y papaína. Además, reportan que es termo resistente y estable en un rango de pH de 2-10. (Bunyatang *et al.*, 2012).

Otros tres isoINHIBIDORES han sido aislados y purificados del suero C de la especie *H. brasiliensis*: HPI-1, HPI-2a, HPI-2b con masas moleculares de 14.9 kDa, 7.8 kDa y 7.6. Estos tres isoINHIBIDORES tienen una alta identidad en su secuencia de aminoácidos, pero difieren en su masa molecular. Los autores proponen que esta variación en la masa molecular se deben a dos posibles modificaciones postraduccionales, glutationalización y otra modificación aún sin identificar Al comparar la secuencia de aminoácidos entre los isoINHIBIDORES de *H. brasiliensis* y los reportados la base de datos MEROPS, se mostró que comparten de un 33% a un 55% de identidad con los miembros de la familia I de INHIBIDORES de la papa (Sritanyarat *et al.*, 2006).

Previamente en nuestro laboratorio se realizó la caracterización bioquímica del INHIBIDOR de serín proteasas Hev b 15 (Terrón Hernández, 2017). En este estudio se expresó y purificó al INHIBIDOR recombinante rHPI y se evaluó su actividad INHIBITORIA frente a tripsina, quimotripsina y subtilisina Carlsberg, usando N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida (SAAPF pNA) como sustrato, confirmando su actividad sólo frente a subtilisina e INHIBIENDO débilmente a tripsina. En cuanto a la estabilidad térmica de rHPI seguida por Dicroísmo Circular y Fluorometría diferencial de barrido, se determinó que es extremadamente resistente a la desnaturalización en un rango de 25 °C a 95 °C en un intervalo de pH 5.8 a 11. Finalmente se obtuvieron cristales del INHIBIDOR recombinante; sin embargo, aun no se ha determinado la estructura tridimensional. Por lo tanto, con el fin de darle continuación al estudio de rHPI, éste trabajo se enfocó en el análisis de la interacción del INHIBIDOR frente a la subtilisina Carlsberg. El INHIBIDOR rHPI podría ser usado como agente de control de plagas en la agricultura, conservante en la industria alimentaria o como aditivo en la industria de detergentes que controle la auto hidrólisis de la proteasa gracias a su alta resistencia a la desnaturalización.

2. JUSTIFICACIÓN

Las proteasas están involucradas en diversos procesos bioquímicos, naturales e industriales, por lo que su uso en la industria biotecnológica ha crecido casi exponencialmente. Un ejemplo de esto es el uso de proteasas como aditivos en detergentes para aumentar las cualidades del producto o como preservantes en la industria alimentaria. Sin embargo, éstas deben ser reguladas de manera eficaz y es ahí donde el papel de los inhibidores toma importancia.

Los inhibidores de serín proteasas presentes en el látex de *Hevea brasiliensis* han sido pobremente caracterizados y son pocos los estudios bioquímicos de los mismos. Se ha reportado que este tipo de moléculas están involucradas en los mecanismos de defensa de la planta cuando ésta es sometida a daños mecánicos, ataque de patógenos e insectos e inclusive cuando es expuesta a cambios ambientales. Al propiciar la formación de un complejo entre el inhibidor de *H. brasiliensis* y la subtilisina obtendríamos información sobre la afinidad y el tipo de interacción que se presenta con esta proteasa, la cual está presente en organismos patógenos. Este trabajo proporcionará datos termodinámicos sobre el tipo de unión que se presenta entre el inhibidor rHPI y la subtilisina Carlsberg; así como, las constantes de velocidad de unión y liberación obtenidas mediante interferometría de biocapa.

3. HIPÓTESIS

El inhibidor (*rHPI*) del árbol del hule *H. brasiliensis* interacciona molecularmente con las serín proteasas del tipo de la subtilisina Carlsberg formando un complejo inhibidor-enzima estable, y cuya interacción, que puede ser cuantificable mediante técnicas de interferometría de biocapa y calorimetría de titulación isotérmica, presenta una constante de afinidad cercana a las obtenidas para otros inhibidores de proteasas serínicas de plantas.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la interacción molecular entre el inhibidor de serín proteasas rHPI de *H brasiliensis* y la subtilisina Carlsberg.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar al inhibidor de serín proteasas *HPI* a partir del látex del árbol del hule *H brasiliensis*, y caracterizarlo por espectrometría de masas MALDI-TOF.
- Sobre-expresar el gen de rHPI y purificar a la proteína recombinante.
- Determinar la actividad inhibitoria del inhibidor HPI endógeno y recombinante sobre subtilisina Carlsberg.
- Evaluar la interacción entre el inhibidor de serín proteasas rHPI de *H brasiliensis* y la subtilisina Carlsberg, mediante técnicas como interferometría de biocapa (BLI) y calorimetría de titulación isotérmica (ITC).
- Intentar cristalizar el complejo rHPI-subtilisina. En caso de obtener cristales adecuados, determinar la estructura tridimensional del inhibidor de serín proteasas, en complejo con la subtilisina Carlsberg, mediante técnicas de difracción de rayos X

5. METODOLOGÍA

5.1 Identificación del inhibidor de serín-proteasas Hev b 15 a partir del suero citoplasmático del látex de *H.brasiliensis*

Con el fin caracterizar al inhibidor endógeno HPI (como alérgeno Hev b 15), se realizó la colecta del látex de árboles de las clonas GV-42 y IAN-710 en el campo experimental "El Palmar" ubicado en Tezonapa, Veracruz. El látex se centrifugó a $103,000 \times g$ por 45 minutos, lográndose tres fracciones (Figura 2B). La primera fase corresponde al hule (A), la segunda fase, denominada suero C o fracción sérica, contiene al citosol de las células laticíferas en el que predominan proteínas hidrosolubles, la última fracción, llamada basal o suero B contiene a los lutoides o vacuolas. La fracción sérica (110 mL) se centrifugó por 40 minutos a $103,000 \times g$ agregando PBS (Phosphate-buffered saline) (pH 8.0) a la muestra en una relación (3:1) para evitar la formación de hule y una mejor extracción de proteínas. Posteriormente se realizó una precipitación fraccionada de proteínas a 4°C usando sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para llevar la solución a diferentes porcentajes: de 0-65% y de 65-100%. Estas soluciones se centrifugaron y a los precipitados se les denominó (A) y (B) respectivamente. Estos precipitados se disolvieron en un amortiguador de fosfatos como se describe en la sección 5.1.1.

Con el fin de evaluar que fracción contenía al inhibidor se utilizó a la subtilisina Carlsberg (Sigma Aldrich) de *Bacillus licheniformis* y al N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p nitroanilida (Suc-AAPF-pNA) como sustrato. Los experimentos se realizaron a una temperatura de 25°C y se registró la liberación del grupo p-nitroanilida por la acción de la subtilisina a una longitud de onda de 412 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. La muestra fue preincubada por 15 minutos usando una concentración de 7 nM de subtilisina Carlsberg y una concentración de proteína total de 500 ug/mL de cada precipitado A y B. Después de este tiempo, se adicionó 0.5 mM de sustrato para un volumen final de 2 mL. El tiempo de reacción con el sustrato fue de 10 min, e inmediatamente se realizó la cuantificación del grupo p-nitroanilida a una longitud de onda de 412 nm.

Se usaron un control positivo y dos negativos. Como control positivo se usó solo a la proteasa reaccionando con el sustrato, mientras que los dos controles negativos se

realizaron de la siguiente manera, en uno de ellos usando solo al sustrato con el amortiguador de fosfatos 20 mM pH 8.0 y en el otro, se usó al inhibidor de proteasas recombinante HPI a una concentración final de 100 nM. Los controles positivos se consideraron como el 100% de la actividad producida por la proteasa en función del tiempo. Acorde con lo publicado por (Bunyatang *et al.*, 2012) la que se utilizó para el cálculo del porcentaje de inhibición fue:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \frac{A_{412} \text{ proteasa} - (A_{412} \text{ muestra} - A_{412} \text{ blanco})}{A_{412} \text{ proteasa}} \times 100$$

Donde: **A₄₁₂ Proteasa**= Absorbancia obtenida de la subtilisina Carlsberg.

A₄₁₂ muestra= Absorbancia obtenida de la muestra (**A** y **B**).

A₄₁₂ blanco= Absorbancia obtenida del amortiguador de fosfatos.

5.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado (A), obtenido después de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio, (0-65%) e identificación del inhibidor HPI (Hev b 15)

El botón de la precipitación con sulfato de amonio de 0-65%, precipitado (**A**), que se obtuvo a partir del sobrenadante de la fracción sérica, se re-suspendió en amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 20 mM pH 8.0 y posteriormente se dializó contra el mismo amortiguador utilizando una membrana Spectra/Por RC, MWCO 3.5 kDa, para eliminar el sulfato de amonio. El volumen total de amortiguador utilizado fue de 2 litros con varios recambios en intervalos de 4 horas, por 16 horas a 4 °C.

El extracto dializado se aplicó a una columna de exclusión molecular, en un equipo de cromatografía de alta eficiencia (HPLC) Hewlett Packard Serie 1100. La columna Bio Sec 3-150 Å se equilibró con amortiguador de fosfatos 20 mM, NaCl 200 mM pH 8.0 (Amortiguador A). La separación de las fracciones se realizó a un flujo de 1.0 mL/min usando el amortiguador A como eluyente. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante un gel de electroforesis SDS PAGE 15% y ensayos de actividad inhibitoria. Como segundo paso de purificación, las fracciones que presentaron la mayor actividad inhibitorias fueron aplicadas en una columna de intercambio iónico (Mono Q 5/50 G/L), en un equipo GE Amersham AKTA FPLC, previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH 8.0, a un flujo de 0.5 mL/min bajo un gradiente de NaCl (5 mM-1M). Las fracciones

obtenidas se analizaron mediante ensayos de inhibición de subtilisina Carlsberg, gel de electroforesis SDS-PAGE al 15% y espectrometría de masas MALDI-TOF.

5.1.2 Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado B, obtenido después de la precipitación fraccionada con sulfato de amonio (65-100 %) e identificación del inhibidor Hev b 15

El precipitado (B), es decir el botón de precipitación de (65-100%) con sulfato de amonio, fue dializado en un amortiguador de Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH 8.0 (Amortiguador B) usando una membrana de diálisis Spectra/Por[®] RC, MWCO 3.5 kDa, con diferentes recambios por 16 horas. Las muestras fueron aplicadas a una columna de intercambio aniónico (Mono Q 5/50 G/L) acoplada a un equipo de FPLC. Esta se equilibró usando el amortiguador B y la separación del precipitado (B) se llevó a cabo usando un gradiente de concentración de cloruro de sodio de 5 mM a 1M, con un flujo de 0.5 mL/min. Se colectaron y etiquetaron las fracciones eluidas en la columna. Después, mediante geles de electroforesis SDS PAGE al 15 % y ensayos de actividad inhibitoria se evaluó la presencia de la proteína objetivo en cada una de ellas. Con el fin de alcanzar una mayor pureza en la fracción eluida, ésta se aplicó a una columna de exclusión molecular (Superdex S75 10/300) acoplada a un equipo GE Amersham AKTA FPLC usando como fase móvil Tris-HCl 20 mM, NaCl 200 mM, pH de 8.0, a un flujo de 0.5 mL/min. Nuevamente se realizó el seguimiento del inhibidor Hev b15 mediante un gel de electroforesis SDS PAGE al 15% y ensayos de inhibición.

5.2 Sobreexpresión y purificación del inhibidor de serín proteasas rHPI

Previamente en nuestro laboratorio se sintetizó el gen a partir de la secuencia depositada en la base de datos del GenBank (No. Acceso DQ306763.1) correspondiente al inhibidor de serín-proteasas rHPI (Terrón Hernández, 2017), para este trabajo se usó la misma construcción y vector. La construcción del vector de sobreexpresión pET28a se muestra en la Figura 8, la región codificante fue clonada entre los sitios de clonación *NdeI-HindIII* (GenScript) (cuadro verde). La etiqueta de histidinas se une en el extremo amino terminal del inhibidor y la construcción se localiza río arriba del sitio de clonación *NdeI*. El sitio de

corte de la proteasa TEV (cuadro rojo) se ubica entre la etiqueta de histidina y el sitio de clonación *NdeI*. Las células competentes de *E. coli* Rosseta se transformaron con la construcción HPI_Pet-28a_His6, para expresar la proteína de estudio.

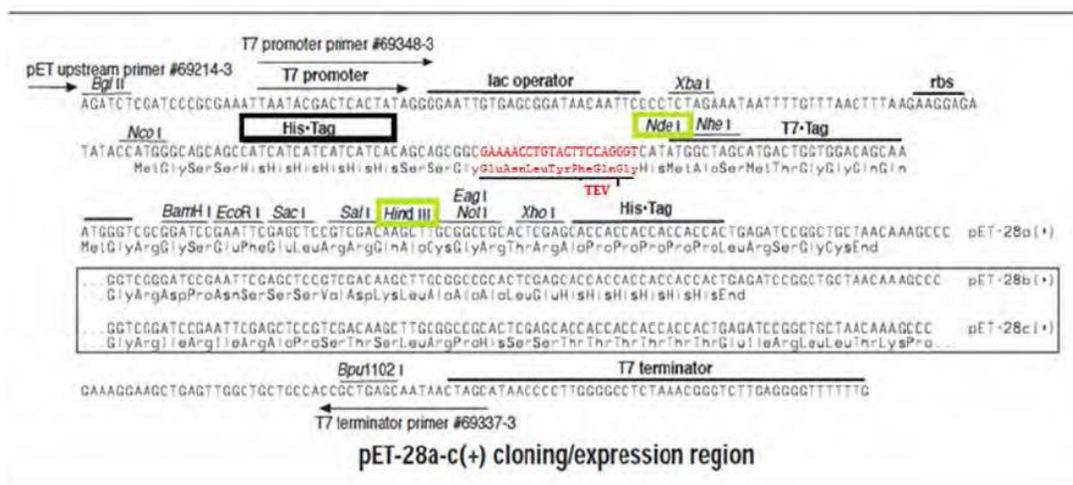


Figura 8. Sitio de clonación del vector HPI_pET-28-a y secuencia de aminoácidos del inhibidor rHPI Imagen tomada de Terrón Hernández, 2017

Para el crecimiento de las células competentes se utilizó medio Luria Bertani (LB), y los antibióticos kanamicina y cloranfenicol. El pre-inóculo (25 mL) se dejó toda la noche incubando a una temperatura de 37 °C y con una agitación de 200 rpm. La sobreexpresión se llevó a cabo hasta alcanzar una absorbancia de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm (OD)₆₀₀.

Para la inducción se utilizó isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 0.5 mM por 4 horas a 37 °C en agitación constante. El botón celular se re-suspendió en amortiguador de lisis, fosfatos 20 mM, pH 8.0 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF) y 1 mM ditioteitrol DTT. Las células se lisaron por sonicación, y posteriormente se centrifugó durante 40 minutos a 14,000 rpm, 4° C). El sobrenadante se

filtró usando una membrana Millipore de 0.22 μm y se aplicó a una columna de afinidad a Ni^{2+} His Trap (Invitrogen) de 5 mL, acoplada a un equipo FPLC AKTA Start y equilibrada con amortiguador fosfatos 20 mM, pH 8.0, a un flujo de 1 mL/min. La separación de la muestra se realizó con un gradiente de imidazol de 20 a 500 mM. El corte de etiqueta de histidinas para el inhibidor rHPI se realizó mediante una reacción proteolítica con la proteasa del virus del tabaco (TEV por sus siglas en inglés Tabacco Etch Virus). La reacción de corte se llevó a cabo por 24 horas, a una temperatura de 4 °C con una solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 8. La muestra digerida nuevamente se aplicó a la columna de afinidad a níquel con el fin de remover el exceso de la proteasa TEV, ya que gracias a su propia etiqueta de His_6 se adhiere a la resina de la columna de Ni^{2+} .

Como último paso de purificación, se usó una columna de intercambio aniónico Mono Q (Healthcare, Piscatawat, NJ, USA), usando el mismo amortiguador de fosfatos para equilibrarla. Las fracciones se eluyeron con un gradiente de NaCl (0-1 M) a un flujo de 1 mL/min, la elución del inhibidor de serín proteasas rHPI se evaluó mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 15% , ensayos de actividad inhibitoria frente a subtilisina Carlsberg (Ver apartado 6.1) y por espectrometría de masas MALDI-TOF (Terrón Hernández, 2017).

5.4 Formación y purificación del complejo subtilisina Carlsberg e inhibidor rHPI

Para la preparación del complejo se usó el liofilizado de subtilisina Carlsberg comercial de Sigma. La proteasa fue reconstituida en amortiguador de fosfatos 20 mM, 150 mM NaCl, pH 6.0 (amortiguador C) y purificada por cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 10/300 acoplada a un equipo GE Amersham AKTA FPLC empleándose como fase móvil el amortiguador C. Su concentración fue determinada a una longitud de onda (280 nm), con el coeficiente de extinción molar de $23,610 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y para el inhibidor rHPI, se usó el coeficiente de extinción molar de $5,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ambos coeficientes calculados con la herramienta ProtParam. El complejo inhibidor rHPI-subtilisina Carlsberg se formó en una relación (1.2:1), con un exceso de inhibidor. La mezcla se incubó por 24 horas, en agitación suave, a 4 °C.

Posteriormente el complejo fue aplicado a la misma columna exclusión molecular Superdex 75 10 /300 siguiendo la metodología propuesta por (Horn R & Ramaswamy, 2003). La

línea base se alcanzó usando el amortiguador C, con un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones obtenidas fueron concentradas y analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF.

5.5 Espectrometría de masas

El análisis de masas se realizó usando espectrometría de masas MALDI-TOF (Matriz Assisted Laser Desorption/ Ionization-time of flight), en un equipo Microflex Bruker Daltonics. Cada una de las fracciones obtenidas en los diferentes pasos de purificación se llevaron a concentraciones entre 1 y 3 mg/mL, utilizando como matriz el ácido sinapínico en 30% acetonitrilo/ 70 % agua/ 0.1% TFA. Las masas se determinaron usando diferentes controles de acuerdo con el rango de masas esperado. Estos controles son proteínas con una masa estandarizada, las cuales deben tener valores por arriba o debajo de la masa esperada. Los controles utilizados fueron; melitina (2,849 Da); citocromo C (13,000 Da); mioglobina (17,183 Da) y albumina de suero bovino (66,382 Da).

5.6 Cristalización

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo usando el método de difusión en fase vapor en la modalidad de gota colgante, a 18 °C con los kits comerciales; Crystal Screen I y II y additive screen de Hampton Research (98 condiciones diferentes). Cada una de las fracciones obtenidas en el paso de purificación del complejo inhibidor de proteasas y subtilisina Carlsberg se dializaron contra un amortiguador 20 mM Bis-Tris pH: 6.5 y se llevaron a una concentración de 3.06 mg/mL; 6.73 mg/mL y 10.03 mg/mL.

5.7. Ensayo de interacción con interferometría de biocapa (BLI)

La interferometría de biocapa (BLI) es una técnica que mide los cambios en un patrón de interferencia generado por la luz visible reflejada desde una capa óptica y una biocapa que contiene las proteínas de interés. Su principio físico se basa en monitorear la luz visible reflejada desde dos superficies en el biosensor. Por lo tanto, una proteína se fija al biosensor objetivo, y este se transfiere a un pozo en donde se encuentra el ligando o molécula de unión. Si se produce una unión el equipo compara la señal obtenida con la

proteína, versus la respuesta obtenida sólo con amortiguador. Por lo tanto, detecta un cambio de la longitud de onda para el patrón de interferencia (Wartchow et al.,2011). La tecnología del sistema equipo Octet (TheOctet® System (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) permite el análisis de interacciones como: Proteína-proteína, proteína-ligando, anticuerpo-antígeno, entre otros. Existen diversos tipos de biosensores los cuales son elegidos teniendo en cuenta las afinidades de la proteína objetivo.

Para este ensayo se utilizaron los biosensores con amina de segunda generación (ARG2), y siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante (Technical Note 26 *FortéBio*), el ensayo se realizó usando amortiguador de acetato de sodio 10 mM, pH de 6.0 (Amortiguador D). Para la activación de los biosensores se usó 1-etil-3-[3 dimetilaminopropil] hidrocloreuro de carbodiimida (EDC) y N-hidroxisulfosuccinimida (s-NHS), éstos generan ésteres de NHS altamente reactivos. Los ésteres reaccionan rápidamente con las aminas primarias de biomoléculas como las proteínas o péptidos y forman enlaces amida altamente estables. La reacción se detiene con etanolamina (pH:8.5). La subtilisina Carlsberg fue inmovilizada en una concentración de 12 μM y se evaluó su interacción con el inhibidor usando seis concentraciones diferentes de inhibidor (rHPI) (14.4; 7.2; 3.6; 1.8; 0.9 y 0.45 μM) teniendo en cuenta que la concentración debe ser 10 veces mayor a la K_d esperada.

En primer lugar, los biosensores fueron equilibrados con agua por 60 seg. La activación de los biosensores se realizó con EDC durante 400 seg, seguido de la inmovilización de la subtilisina Carlsberg por 1000 seg. El paso número 3, denominado "quenching" o finalización de la interacción se realizó por 300 seg y a continuación se realizó un lavado con agua por 60 seg. La línea base es nuevamente generada usando el (Amortiguador D) por 100 seg.

Finalmente, los pasos de asociación y disociación con las diferentes concentraciones de rHPI se realizaron durante 250 seg cada una. Los datos obtenidos son procesados en el software FortéBio Data Acquisition. A partir de las mediciones cinéticas se calcula la constante de velocidad de unión (k_{on} o k_a) y la constante de liberación (k_{off} o k_d). La constante de disociación K_D es calculada a partir de la relación de (k_d/k_a) (Wallner,

Gabriele, Jeschek, & Alexander, 2012). En la Figura 9, se muestra el esquema del ensayo y los pozos utilizados.

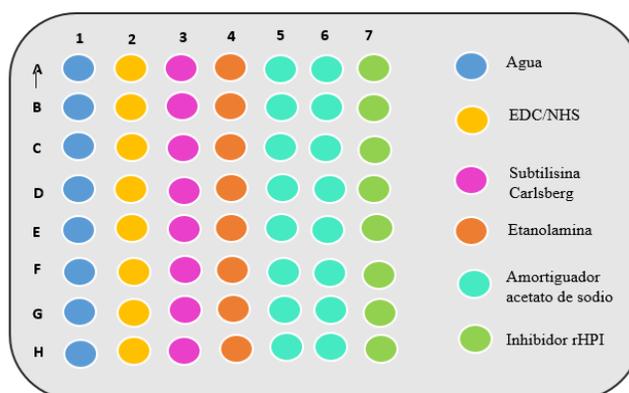


Figura 9. Diagrama esquemático del ensayo en la placa de 96 pozos. Distribución del ensayo de interferometría de biocapa usando biosensores ARG2 en un equipo Octet (TheOctet® System (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)

5.8 Ensayo de Calorimetría de Titulación Isotérmica

La calorimetría de titulación isotérmica se basa en una titulación en tiempo real, en donde el microcalorímetro busca conservar la misma temperatura en la celda de reacción y en la celda de referencia (agua) mientras que se agrega una determinada cantidad de ligando en un intervalo de tiempo preestablecido. Por lo tanto, esta técnica no mide la variación de la temperatura, sino que se enfoca en la variación del potencial que se debe aplicar para conservar una temperatura determinada en el experimento (Leavitt & Freire, 2001). El inhibidor rHPI se dializó usando una membrana Spectra/Por® Dialysis Membrane Standard MWCO 3.5 kDa por 24 horas a 4 °C, contra amortiguador de acetato de sodio 10 mM a un pH 6.0. Se realizaron 4 recambios de amortiguador, cada recambio de seis horas. El último recambio realizado de 500 mL se filtró usando una membrana 0.22 µm millipore y se usó tanto para establecer la línea base en el equipo de calorimetría de titulación isotérmica, como para la preparación de la subtilisina Carlsberg. El ensayo se realizó usando un microcalorímetro VP-ITC₂₀₀ instrument GE HealthCare a 20 °C, con una celda de muestra de 250 µl.

Para seguir la interacción proteína-proteína en el calorímetro, la jeringa se cargó con 40 μL del inhibidor rHPI a una concentración de 180 μM determinada usando el coeficiente de extinción molar de 5500 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ calculado con ProtParam a partir de la secuencia aminoácidos. En la celda de muestra se introdujo a la subtilisina Carlsberg en una concentración de 24 μM (coeficiente de extinción molar 23,610 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ambas soluciones se desgasificaron previamente por 10 minutos. Las titulaciones se realizaron usando un volumen de 3 μL del inhibidor por inyección, para un total de 13 puntos con un intervalo de tiempo entre cada inyección de 180 segundos, en agitación constante. Origin 7.0 se usó para obtener los parámetros calorimétricos a partir de la desconvolución de los 13 puntos y la resta del calor de dilución del inhibidor.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Identificación del inhibidor de serín-proteasas Hev b15 a partir del suero citoplasmático del látex de *H.brasiliensis*

La presencia de proteínas con una significativa actividad inhibitoria contra la subtilisina Carlsberg fue corroborada con ensayos espectrofotométricos, usando como sustrato al N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p nitroanilida (Suc-AAPF-pNA) como se describe la metodología. A partir de mediciones a una longitud de onda de 412 nm, se confirmó que el extracto de proteína total presentaba una actividad inhibitoria alta (99.6 %) antes de ser precipitada con sulfato de amonio. A continuación, se mostrarán los resultados obtenidos para las fracciones **A** y **B**.

6.1.1 Evaluación de la actividad inhibitoria en el precipitado (A) obtenido con sulfato de amonio (0-65%) e identificación del inhibidor HPI (Hev b 15)

El porcentaje de inhibición calculado para el precipitado con sulfato de amonio de (0-65%) o precipitado (**A**) fue del 91.1 % para una concentración de 500 µg/mL de proteína total. La actividad proteolítica es medible gracias a la liberación del grupo p-nitroanilida del sustrato N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p nitroanilida (Suc-AAPF-pNA) que produce una coloración amarilla. Como se observa en la Figura 10, la falta de coloración en la muestra indica la presunta presencia de una proteína inhibidora de serín proteasas en el precipitado (A). Sin embargo, al analizar el extracto en un gel SDS-PAGE al 15%, no se observó la banda correspondiente a la masa esperada (7.7 kDa) (Figura 10). Cabe resaltar que la información sobre la purificación de este inhibidor es muy escasa y por lo tanto se buscó plantear una metodología alternativa.

Previamente en nuestro grupo de investigación se intentó el aislamiento de HPI a partir del látex de *H. brasiliensis* siguiendo la metodología propuesta por el grupo de Sritanyarat (Sritanyarat *et al.*, 2006); no obstante, no se logró obtener al inhibidor con la masa

molecular de 7.7 kDa. A pesar de la posible ausencia de este inhibidor, pero con un resultado positivo en cuanto a inhibición de la proteasa, se realizaron dos pasos adicionales de purificación usando cromatografía de exclusión molecular y cromatografía por intercambio iónico.

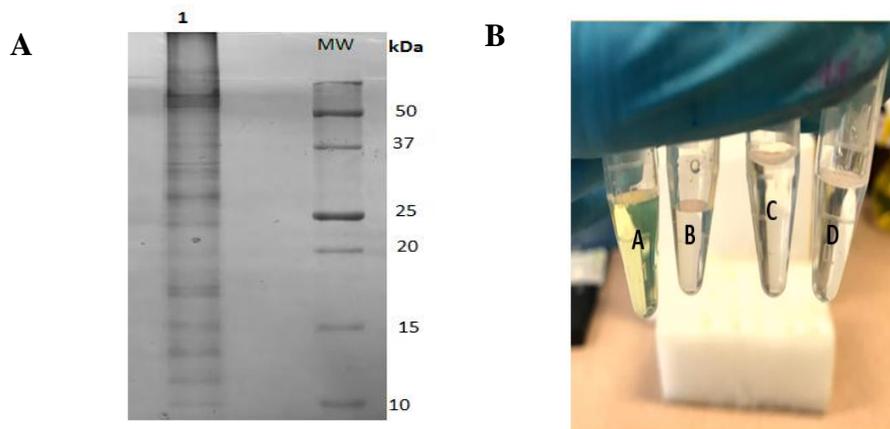


Figura 10. (A) Electroforesis SDS-PAGE al 15% de la precipitación A. (B), Ensayo de actividad inhibitoria de la precipitación (A) con sulfato de amonio (0-65%). Se usó como sustrato N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p nitroanilida (Suc-AAPF-pNA). (A) control positivo, (B) control negativo, (C) y (D) Ensayo realizado con 500 ug/mL de proteína total.

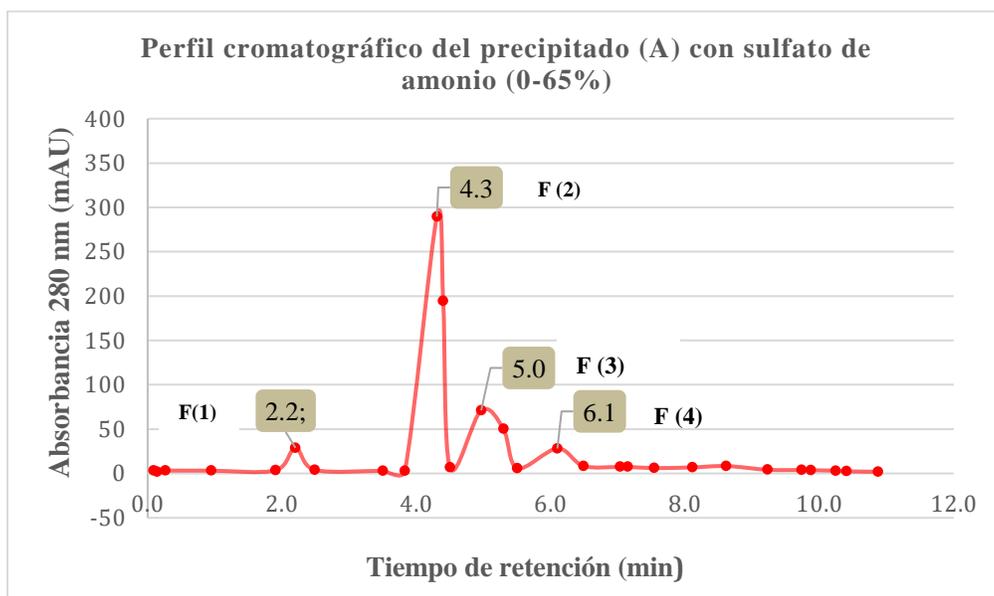


Figura 11. Perfil de elución del precipitado (A) usando una columna de exclusión molecular BIO SEC 3-150 Å equilibrada con amortiguador fosfatos 20 mM, NaCl 200 mM, pH 8.0.

Como se puede observar en la Figura 11, se obtuvieron 4 fracciones con diferentes tiempos de retención. De estas fracciones, sólo dos presentaron actividad inhibitoria, estas corresponden a los tiempos de retención; 4.3 minutos, fracción **F (2)** y 5.0 minutos, fracción **F (3)**. De acuerdo con los ensayos de actividad enzimática, el porcentaje de inhibición presentado por las dos fracciones fue del 96.4% para la **F (2)** y del 95 % para la **F (3)**.

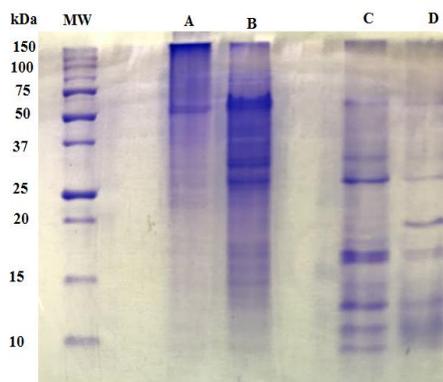


Figura 12. Primer paso de purificación de la fracción A (0-65%) por exclusión molecular. Gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%. El carril (A), fracción 1 **F (1)**. Carril (B), fracción 2 **F (2)**. Carril (C), fracción 3 **F (3)** y fracción 4 **F (4)** (D).

El análisis de la masa molecular mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15 % (Figura 12) sugiere la presencia de alguna proteína cuya masa es próxima a los 7 kDa. Los resultados mostrados por (Sritanyarat *et al.*, 2006) confirman la presencia del inhibidor en 3 diferentes isoformas, con la misma secuencia de aminoácidos, pero con diferentes masas moleculares debido a modificaciones postraduccionales (7.6 kDa, 7.8 kDa, y 14.8 kDa). Por lo tanto, se buscó identificar alguna de las isoformas reportadas. Las fracciones; (2) y (3), se aplicaron a la columna de intercambio iónico. Sin embargo, la fracción (2) en la cual se logra ver una banda que podría corresponder a una de las isoformas (7.8 ó 7.5 kDa), sufrió un proceso de agregación al inyectarse en la columna de intercambio iónico perdiendo su actividad biológica.

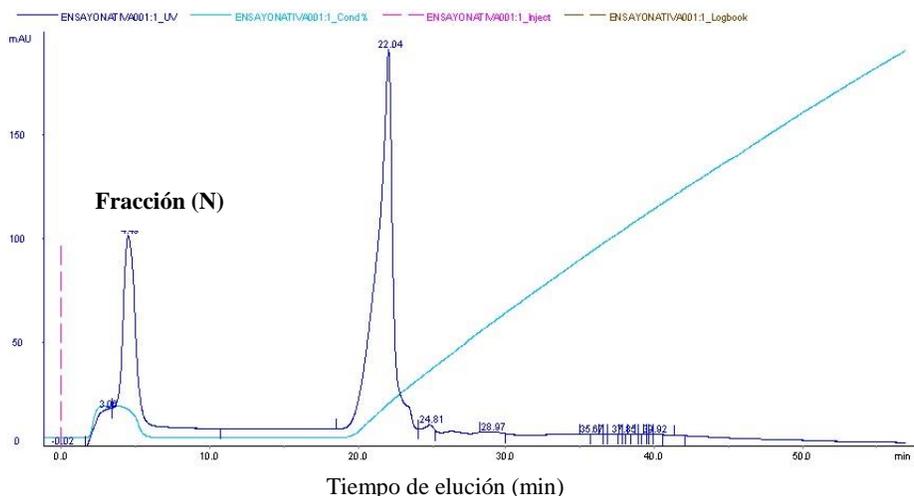


Figura 13. Perfil cromatográfico la Fracción 3. Usando una columna de intercambio iónico (Mono Q 5/50 G/L), previamente equilibrada con Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH 8.0, a un flujo de 0.5 mL/min bajo un gradiente de NaCl (5 mM-1 M) (línea celeste).

La Figura 13 corresponde al perfil cromatográfico de la fracción 3, la cual conservó su actividad sin experimentar algún proceso de agregación. De esta purificación, sólo la fracción (N) mostro actividad inhibitoria del 73 % y no interaccionó con la resina de la columna de intercambio iónico. Su pureza fue evaluada mediante un gel de electroforesis SDS-PAGE al 15%, en el que se puede observar una banda a la altura de 14 kDa (Figura 14). Al parecer, la proteína con una masa esperada de 7 kDa se pierde en este último proceso de purificación y solo se logra identificar la isoforma cuya masa es de 14 kDa. Debido a la poca cantidad de proteína se decidió realizar un ensayo de espectrometría de masas MALDI TOF (Figura 15)

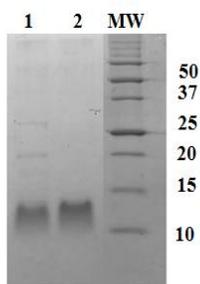


Figura 14. Análisis de las fracciones N1 y N2 por electroforesis SDS PAGE al 15%. En el carril (1) fracción que no interacciona con la resina de la columna de intercambio iónico sin calentar. En el carril (2) la misma fracción, pero calentada por 15 min a 105°C.

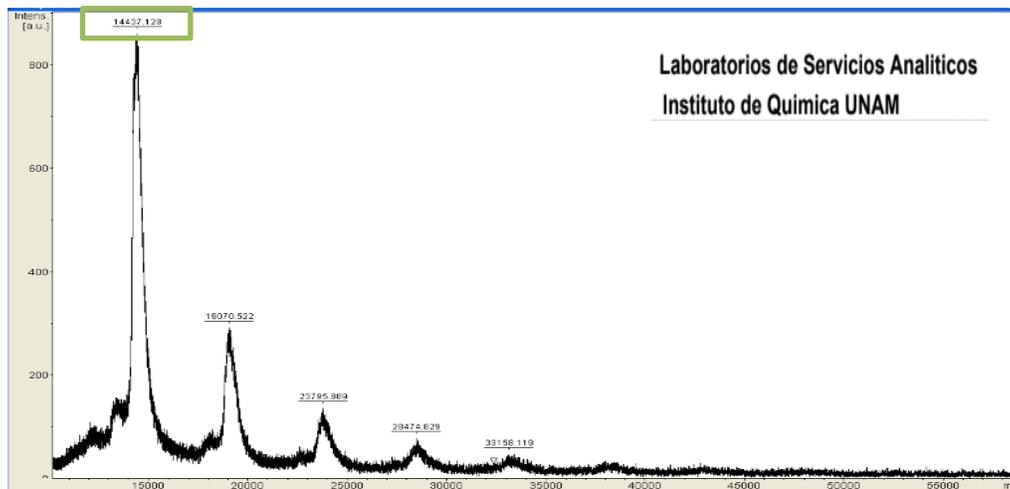


Figura 15. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción (N). Se observa un pico mayoritario de 14.4 kDa, el cual coincide con la banda observada en el gel de electroforesis de la Figura 14.

El gel de electroforesis SDS PAGE de la denominada fracción N (Figura 14) presentó una sola banda, indicando que corresponde a una de las isoformas reportadas por Sritanyarat y colaboradores. Esta isoforma fue nombrada como HPI-1 y obtenida a partir de la extracción con acetona en la fracción 80-95%. Según sus estudios de secuenciación, este inhibidor presenta un residuo de cisteína libre lo que provoca la formación de un puente disulfuro, explicando así su masa (14 kDa) como un resultado de dimerización. Al someter la muestra a un análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 15) se observa una señal predominante con una masa de 14.4 kDa, lo que confirma la masa determinada por el gel de electroforesis (Figura 14). Sin embargo, en el espectro de masas se puede apreciar la presencia de varias señales con masas de 19 kDa, 23.8 kDa, 28.5 kDa y 33.2 kDa, con una diferencia entre cada una de las masas de aproximadamente 4.7 kDa.

En base a esta diferencia podemos sugerir la presencia de posibles modificaciones postraduccionales en la muestra. La identificación de modificaciones postraduccionales es uno de los principales desafíos en la investigación proteómica. La actividad de una proteína no solo es controlada por sus velocidades de biosíntesis y degradación, sino que también por un proceso covalente específico y selectivo llamado modificación postraduccional. El

número de modificaciones post traduccionales aumenta rápidamente. Existen más de 300 tipos de modificaciones postraduccionales, dentro de las cuales se destacan las glicosilaciones, fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones y la glutationalización. Sin embargo, la masa de estas modificaciones postraduccionales es baja, entre (80-150 Da) se descarta que corresponda a la masa esperada (4.7 kDa) (Jensen Norregaard, 2004).

Debido a la gran cantidad de modificaciones postraduccionales, se sugiere realizar un estudio de secuenciación a partir de la banda de 14 kDa, (Figura 14), de esta manera, se puede determinar el tipo de modificación postraduccional e inclusive realizando un blast o alineamiento con la secuencia reportada de las isoformas (Sritanyarat *et al.*, 2006) evaluar si se trata de la misma modificación postraduccional (glutationalización) o del aducto que no lograron identificar los autores.

6.1.2 Evaluación de la actividad inhibitoria del precipitado (B) e identificación del inhibidor HPI

El botón obtenido de la precipitación (**B**) con sulfato de amonio de 65-100 % fue resuspendido y dializado contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH 8.0 (muestra **B**). El porcentaje de inhibición presentado para el extracto de proteína total fue de: 23.1% para una concentración de 0.5 mg/mL de proteína total, 50.0 % para una concentración de 1.0 mg/mL y 55 % para 1.5 mg/mL. El porcentaje de inhibición del precipitado (**B**) es menor si se compara con el presentado por el precipitado (**A**) que es de 91.1, %; sin embargo, al ser la muestra una mezcla de proteínas, otras pudieran estar involucradas en la inhibición de la enzima.

El precipitado (**B**) se aplicó a una columna de intercambio aniónico, el perfil cromatográfico se muestra en la Figura 16. Cada una de las fracciones obtenidas fueron analizadas por un gel de electroforesis SDS PAGE al 15 % y se observa que solo en el carril 1 se presentan bandas por debajo del marcador de 10 kDa, lo que indicaría la presencia del inhibidor de serín proteasas HPI (7.5 ó 7.7 kDa) en esta fracción (Sritanyarat *et al.*, 2006). Esta fracción corresponde a la que no interaccionó con la resina, la cual se etiquetó con las siglas LQN. Se realizó un ensayo de actividad inhibitoria a todas las fracciones obtenidas, no obstante, solo la fracción del carril 1 inhibió a la subtilisina en un

52%. Se observó una tendencia, tanto para el precipitado (A) como para el precipitado (B) presentándose el mayor porcentaje de inhibición para las fracciones que no interaccionaron con la resina en la cromatografía de intercambio aniónico. Si se compara con el inhibidor tipo recombinante éste también se obtiene de la fracción que no interacciona con la columna de intercambio aniónico Mono Q en el último paso de purificación. Por lo tanto, se plantea que el inhibidor tanto en su forma nativa como recombinante en un amortiguador de pH 8.0, se encuentra cargado positivamente.

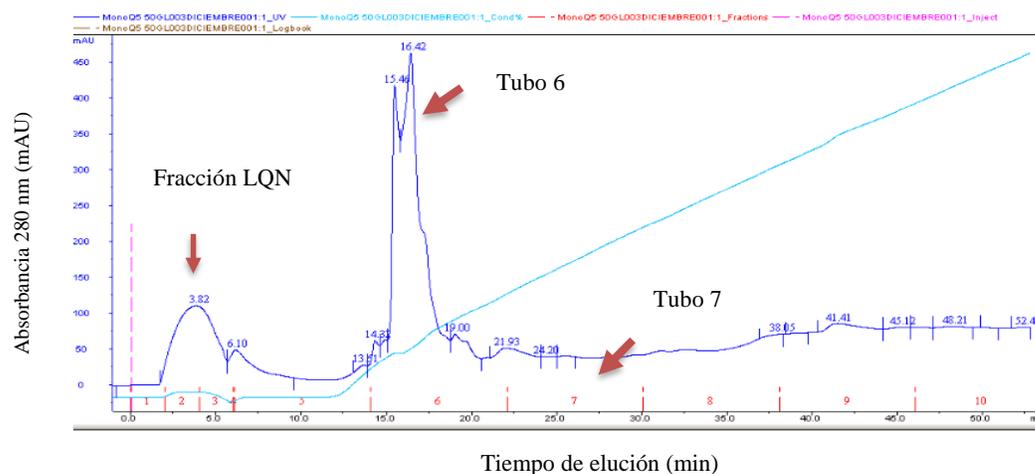


Figura 16. Perfil de elución del precipitado (B) en una columna de intercambio iónico Mono Q GL50 (5/50). La columna se equilibró con Tris-HCl 20 mM, NaCl 5 mM, pH 8.0 a un flujo de 0.5 mL/min y el gradiente se realizó con NaCl de 5 mM a 1 M.

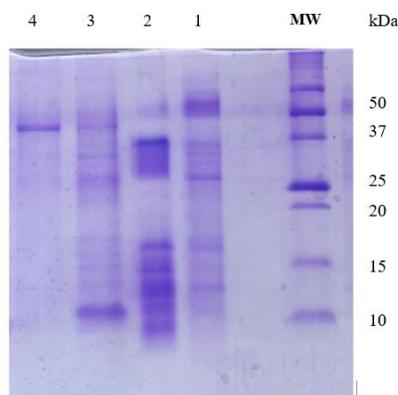


Figura 17. Fracciones eluidas en la columna de intercambio iónico Mono Q GL50 (5/50). Carril MW, marcador de peso molecular. **Carril (1)** Muestra antes de ser aplicada a la columna de intercambio iónico. **Carril (2)** fracción que no interaccionó con la resina de la columna (LQN). **Carril (3)** Tubo 6. **Carril (4)** Tubo 7.

Como segundo paso de purificación se realizó una cromatografía de exclusión molecular, obteniéndose el perfil cromatográfico mostrado en la Figura 18A. Finalmente se evaluaron todas las fracciones obtenidas en un gel de electroforesis SDS PAGE al 15%. (Figura 18B). En el carril 1 vemos 2 bandas con masas aproximadas de 35 y 7 kDa correspondientes a la muestra antes de ser aplicada a la columna de exclusión molecular, una de estas masas (7.6 kDa) se identificó por espectroscopía de masas (Figura 19) y se espera corresponda al inhibidor HPI, mientras que la otra masa que se observa por debajo del marcador de 37 kDa, puede corresponder a la proteína. Hev b 2 o β -1,3-glucanasa cuya masa se reporta de 35.1 kDa (Berthelot *et al.*, 2016). En los siguientes carriles (2 y 4), no se logró una buena separación de las fracciones. El carril 3 que corresponde al tubo 3 y 4 presentó las mismas bandas de 35 y 7 kDa. Por lo tanto, se sugiere que este último paso de no fue el más adecuado para obtener una mayor purificación. El uso de una columna de fase reversa podría ser útil para obtener al inhibidor HPI, no obstante, sin el debido cuidado la muestra podría sufrir de agregación y pérdida de actividad en el transcurso de la purificación

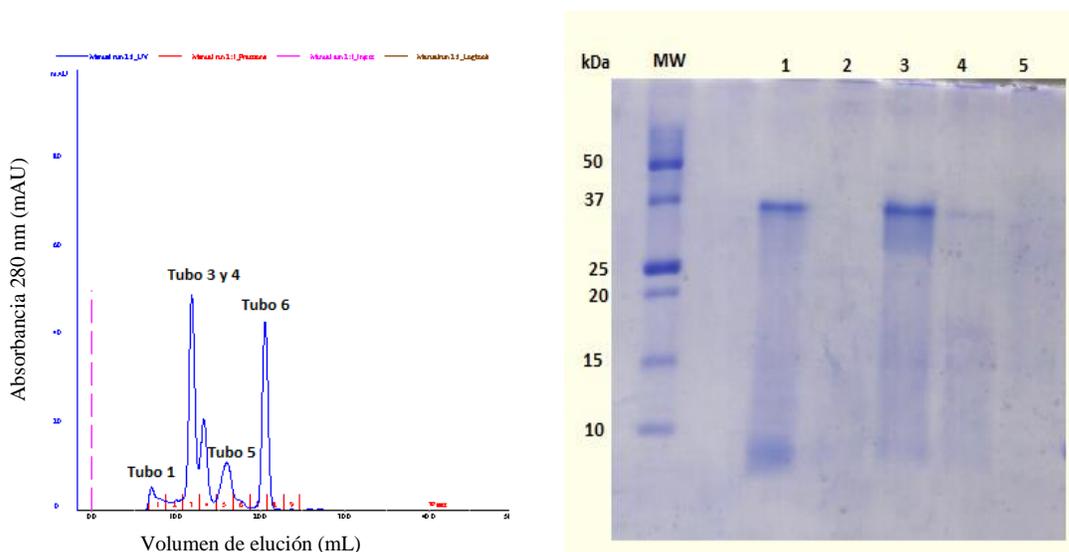


Figura 18. (A) Perfil de elución de la fracción LQN en una columna de exclusión molecular. (B) Análisis de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Carril MW (marcador de peso molecular). Carril 1 Fracción LQN antes de ser aplicada en la columna. Carril (2) Tubo 1. Carril (3) Tubo 3 y 4. Carril (4) tubo 5. Carril (5) Tubo 6.

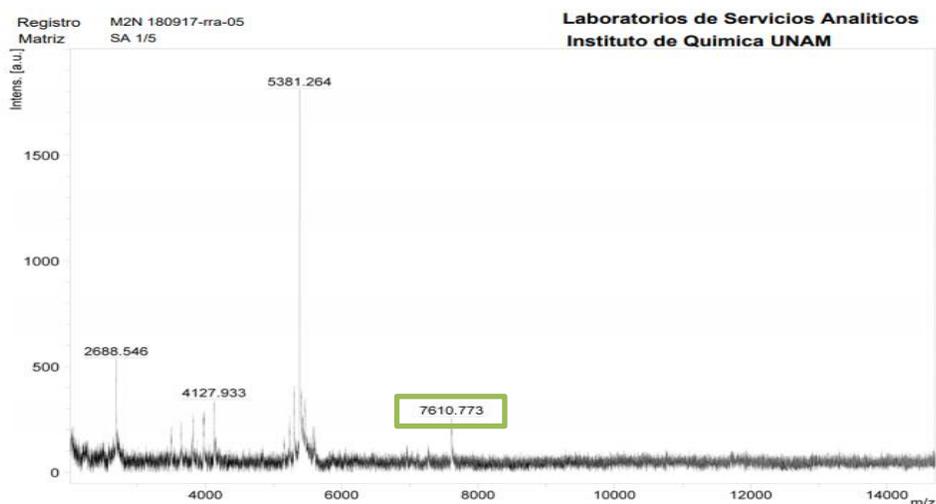


Figura 19. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción denominada Tubo 3 y 4 (carril 3 Figura 18) Se observa una masa de 7.6 kDa que podría corresponder al inhibidor HPI.

6.2 Sobre-expresión del gen y purificación del inhibidor de serín proteasas rHPI

A pesar de haberse logrado identificar algunas de las isoformas reportadas por (Sritanyarat *et al.*, 2006) de la fuente endógena, no se logró obtener la pureza y una cantidad de proteína adecuada para evaluar su interacción con la subtilisina Carlsberg. Por lo tanto, se decidió utilizar al inhibidor de forma recombinante.

La sobreproducción del inhibidor de proteínas rHPI con la etiqueta de histidinas (rHPI_*His*₆) se llevó a cabo usando el vector pET_28a en células competentes de *E.coli Rossetap.cam*. Con solo 4 horas después de la inducción se obtuvo una buena expresión del inhibidor. El botón celular obtenido en el proceso de inducción fue lisado y posteriormente bajo un gradiente de imidazol se aplicó a una columna de afinidad a Ni^{+2} , (Figura 20). Se evaluó la presencia del inhibidor en las fracciones obtenidas mediante una electroforesis SDS-PAGE al 15% tal y como se presenta en la Figura 21. Acorde con la banda más abundante se juntaron las fracciones (1-7), las cuales presentaron una banda mayoritaria localizada debajo del marcador de masa molecular de 10 kDa, correspondiendo a la masa esperada (9.58 kDa) que incluye la cadena polipeptídica del HPI más la etiqueta de histidinas.

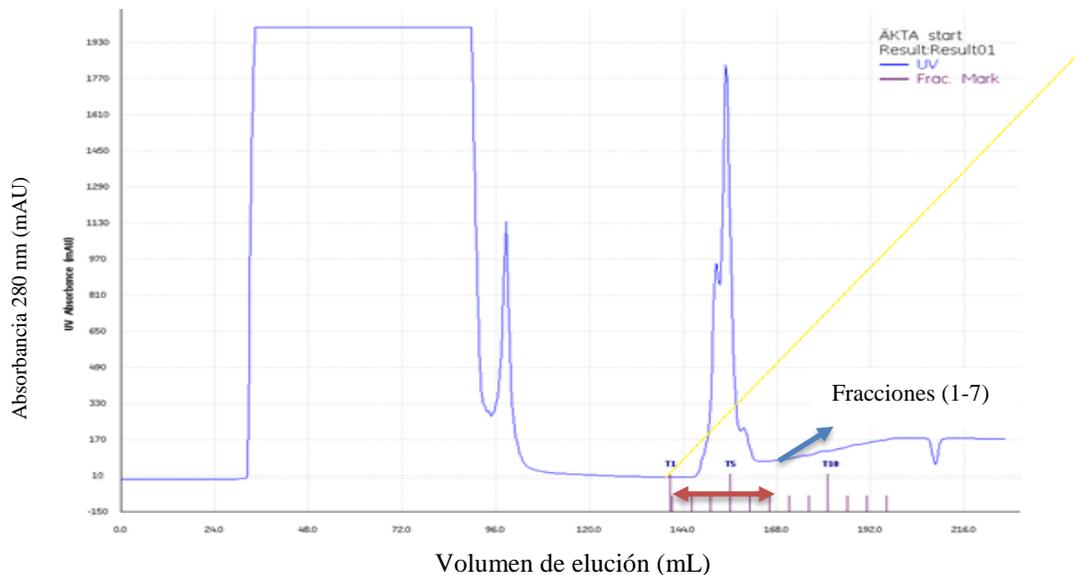


Figura 20. Purificación de rHPI con etiqueta de histidinas por cromatografía de afinidad a Ni^{+2} . Se usó un gradiente de imidazol (20 mM-500 mM línea amarilla). Flujo: 1.0 mL/min. Amortiguador: fosfatos 20 mM, NaCl 20 mM pH 8.0.

Se pudo determinar que el inhibidor eluye bajo una concentración de 250 a 300 mM de imidazol. Esto facilitó el proceso de purificación, ya que se usó una alta cantidad del inhibidor para estandarizar los procesos de incubación con la subtilisina Carlsberg y los estudios en los equipos de interferometría de biocapa (BLI) y la calorimetría de titulación isotérmica.

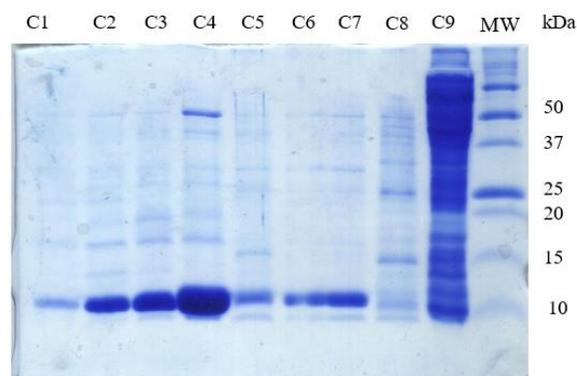


Figura 21. Fracciones eluidas de rHPI con etiqueta de histidinas en la columna de afinidad a Níquel, usando un gradiente de imidazol. Carriles del (1) al (7) Fracciones del (1-7). Carril 8 los primeros lavados de la columna de afinidad a Ni^{+2} y carril 9 extracto inicial de proteína total.

La etiqueta de histidinas fue removida usando una digestión proteolítica. Las fracciones (1-7) señalizadas con flecha roja en la Figura 20 y evaluadas por un gel SDS 15 % Figura 21, fueron dializadas junto con la proteasa TEV. Después de 24 horas, la muestra fue aplicada nuevamente a una columna de afinidad a Ni^{+2} para eliminar el exceso de proteasa TEV, y algunos otros contaminantes (Ver Figura 22).

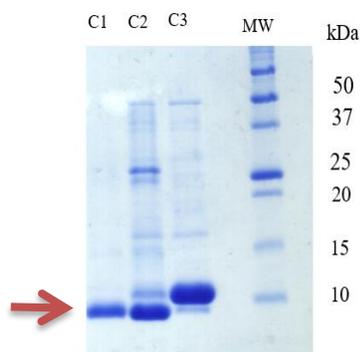


Figura 22. Inhibidor rHPI después de la eliminación de su etiqueta de histidinas. **Carril (1)** Fracción obtenida después del corte con TEV y eluida en la columna de afinidad a Níquel. **Carril (2)** Muestra después del corte con TEV y antes de eluir en la columna de afinidad a Níquel. **Carril (3).** Fracciones que se juntaron, antes de realizarse el proceso de digestión con TEV.

Con el propósito de obtener un mayor grado de pureza, se aplicó la muestra a una columna de intercambio aniónico (Figura 23), finalmente se pudo evaluar por medio de electroforesis SDS PAGE al 15 % (Figura 24) la pureza del inhibidor de proteasas en la fracción que no interacciona con la resina. La masa esperada para este inhibidor es de 7.74 kDa. El espectro de masa obtenido (Figura 25) señala una masa 7.74 kDa y se reporta otra masa de 15.4 kDa que correspondería a su dímero, otras masas allí señaladas corresponden a la matriz utilizada en el ensayo. El porcentaje de inhibición presentado contra subtilisina Carlsberg fue de 99 % y se obtuvo 17.2 mg de proteína por litro de cultivo. Este resultado es congruente con el reportado previamente en nuestro grupo de investigación (Terrón Hernández, 2017).

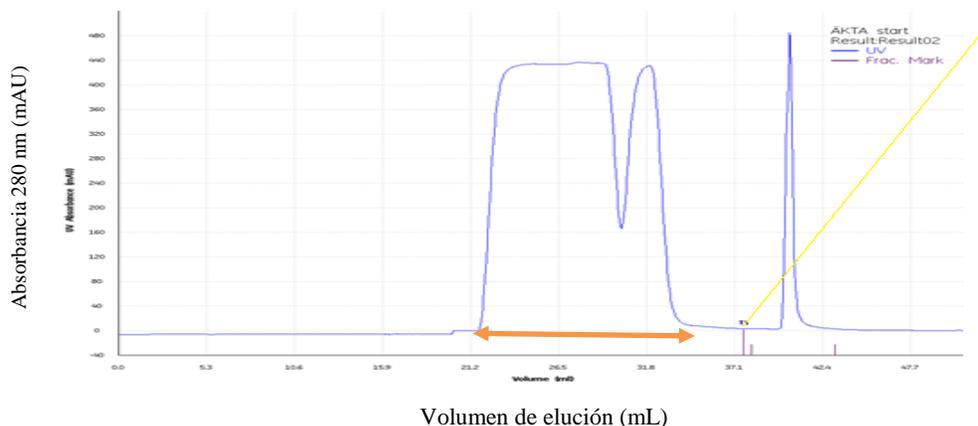


Figura 23. Perfil de elución del inhibidor rHPI como último paso de purificación. Muestra aplicada a una columna de intercambio aniónico Mono Q, con un gradiente de NaCl (0-1 M) a un flujo de 1,0 mL/min. Las fracciones que no interactúan con la resina de la columna Mono Q se señalan por la flecha naranja.

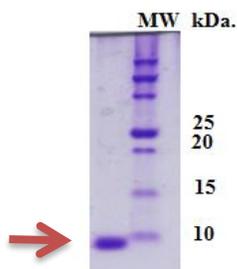


Figura 24. Análisis por electroforesis gel SDS-PAGE al 15 %. Carril (MW), marcador de peso molecular. Carril (1) Fracción que no interactuó con la columna de intercambio aniónico Mono Q.

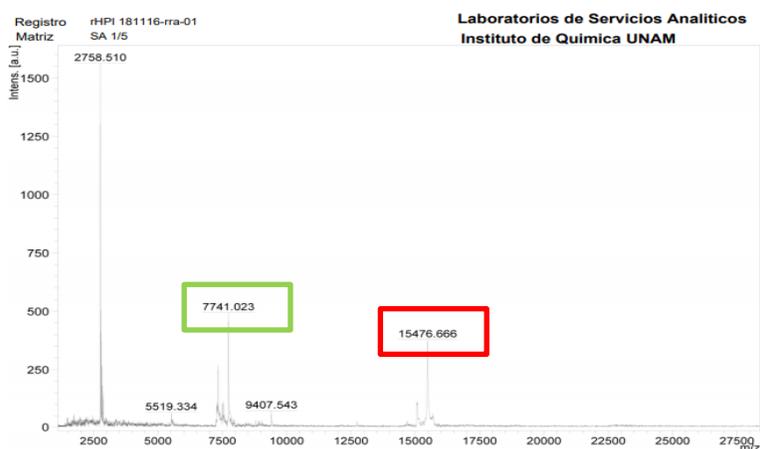


Figura 25. Espectro de masas MALDI-TOF para el inhibidor de proteasas rHPI. En el cual se muestra un pico correspondiente a su masa (m/z 7.74 kDa) recuadro verde que correspondería a la masa esperada para este inhibidor. La segunda masa del recuadro rojo corresponde a su forma dimérica.

6.3 Formación y purificación del complejo subtilisina Carlsberg e inhibidor rHPI

Si bien el proveedor (SIGMA) indica que la subtilisina Carlsberg tiene un alto grado de pureza, ésta se aplicó a una cromatografía de exclusión molecular para eliminar los productos de degradación de bajo peso molecular, así como las sales presentes en el liofilizado. Se obtuvo a la subtilisina Carlsberg pura en el mismo amortiguador del inhibidor de proteasas rHPI, y su concentración fue calculada a partir de la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 280 nm, esta concentración es importante para la formación estequiométrica del complejo.

La relación que se usó para la formación del complejo fue (1.2:1) del inhibidor rHPI y la subtilisina Carlsberg, el exceso de inhibidor se usó con el fin de asegurar una completa interacción de las dos proteínas y evitar la posible auto hidrólisis de la subtilisina. La interacción se llevó a cabo a un pH bajo (6.0) con el fin de reducir la actividad hidrolítica de la subtilisina Carlsberg y el proceso de purificación se desarrolló teniendo en cuenta otros trabajos reportados de complejos inhibidor-subtilisina de otras familias como Kunitz y Bowman Birk (Horn *et al.*, 2003),

El perfil cromatográfico obtenido en la Figura 26, presentó volúmenes de elución diferentes a los presentados por el inhibidor rHPI (Figura 27), y la subtilisina Carlsberg (Figura 28) de manera individual, lo que indica la formación de una nueva especie.

Con el fin de corroborar la formación del complejo entre el inhibidor de proteasas rHPI y la subtilisina Carlsberg, cada una de los picos señalados en la Figura 26, fueron concentrados a 2 mg/mL y analizados mediante ensayos de espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Figura 29 se muestra la masa esperada para la subtilisina Carlsberg (27 kDa) junto con otros posibles contaminantes de menor masa molecular, producto del proceso de autohidrólisis de la enzima.

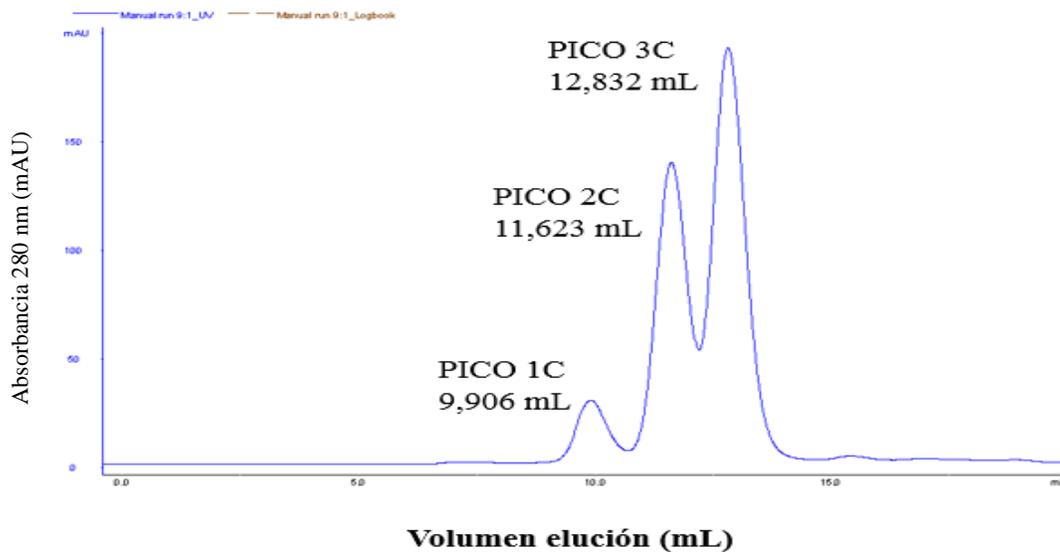


Figura 26. Purificación del complejo inhibidor rHPI- subtilisina Carlsberg. Después de la incubación, el complejo fue aplicado a una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300. Con un flujo de 0.5 mL/min y una solución tampón de fosfatos 20 mM, 150 mM de NaCl, pH 8.

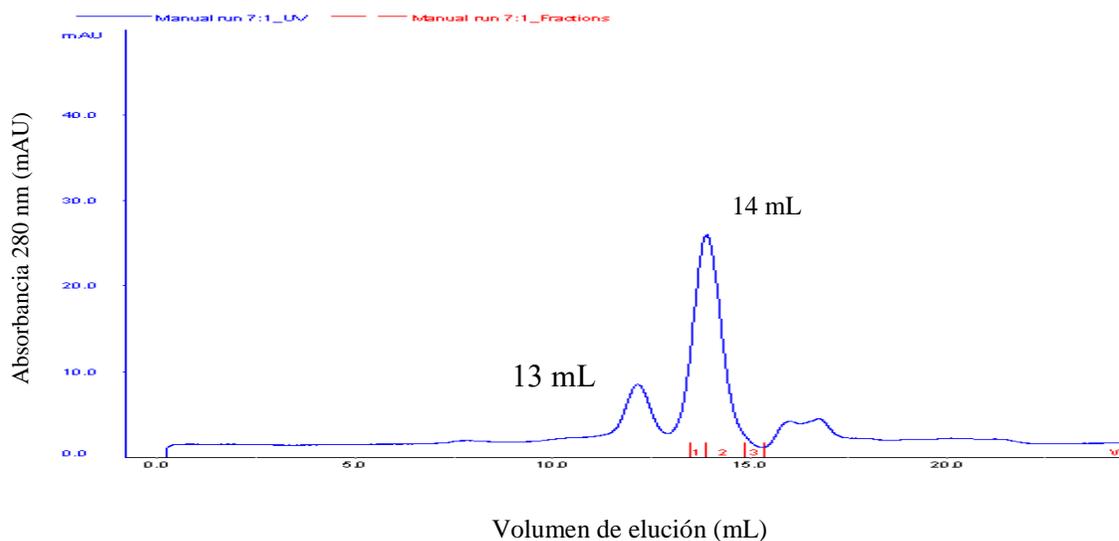


Figura 27. Perfil cromatográfico del inhibidor de serín-proteasas rHPI. Usando una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300. Con un flujo de 0.5 mL/min y una solución tampón de fosfatos 20 mM, 150 mM de NaCl, pH 8.0

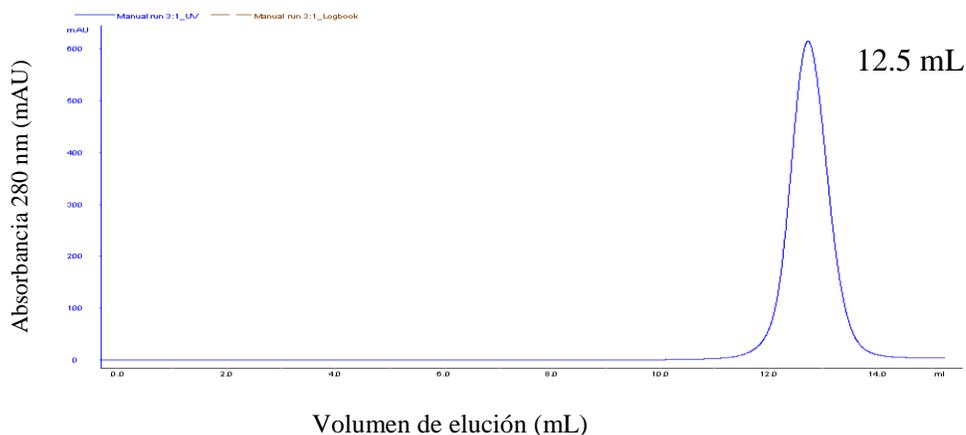


Figura 28. Purificación de la proteasa subtilisina Carlsberg. con una columna de exclusión molecular. Eliminación de contaminantes presentes en la enzima subtilisina Carlsberg usando una columna de exclusión molecular Superdex 75 10/300, con un flujo de 0.5 mL/min y una solución tampón de fosfatos 20 mM, 150 mM de NaCl, pH 8.0.

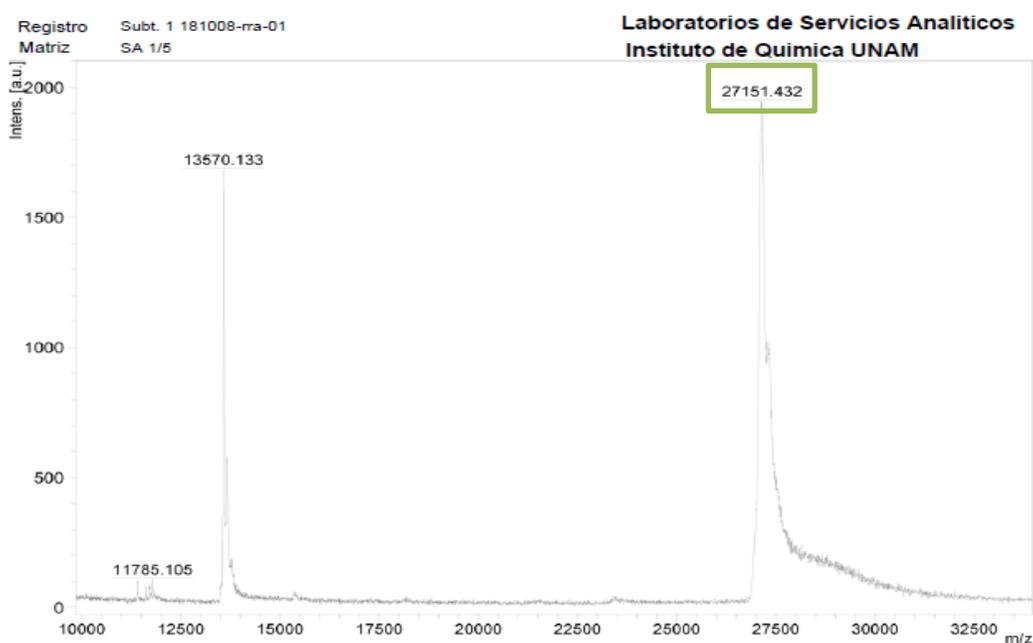


Figura 29. Espectro de masas MALDI-TOF de la subtilisina Carlsberg. Se corroboró la masa esperada (27 kDa).

El inhibidor de proteasas rHPI fue igualmente evaluado mediante espectro de masas MALDI-TOF y presentó una masa de 7.74 kDa (Figura 25). Los procesos de purificación se realizaron en diversas ocasiones, cada ensayo por triplicado y así se evaluó la reproducibilidad del volumen de elución de las muestras tanto en su forma ligada y desligada.

La masa del inhibidor y la masa de la subtilisina Carlsberg se identifican en los dos espectros de masas MALDI-TOF de las fracciones denominadas PICO 1C y PICO 2C obtenidas de la purificación por exclusión molecular de la reacción entre estas dos proteínas (Figura 30 y Figura 31). Se plantea en base a sus espectros de masas que estos dos picos (9.9 y 11.6 mL), correspondan a una la misma especie o complejo. En el espectro de masa MALDI-TOF de la otra fracción obtenida PICO 3C (Figura 32), se identifica la masa del inhibidor (7.9 kDa) y (14.4 kDa) lo que correspondería al exceso de inhibidor utilizado en relación estequiométrica (1.2:1).

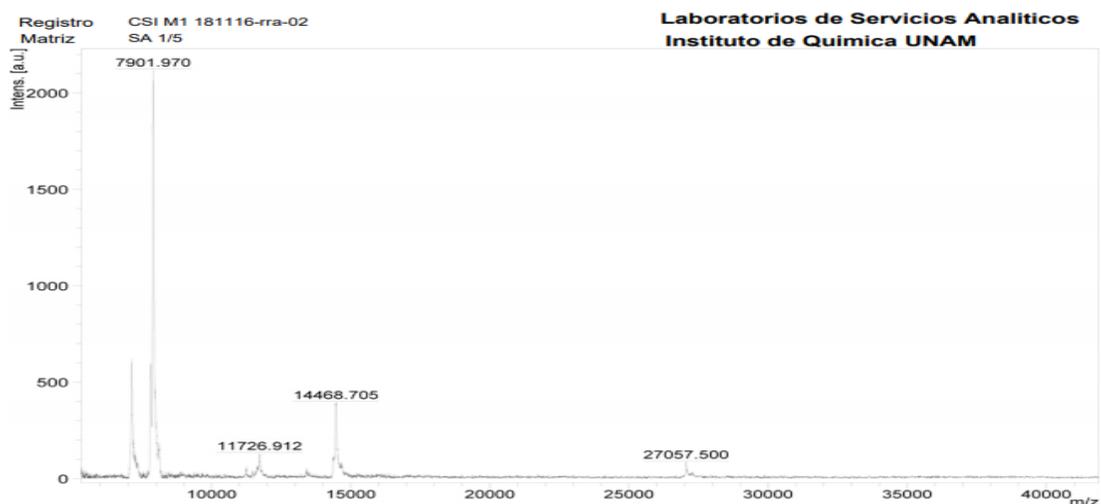


Figura 30. Espectro de masas MALDI-TOF para la fracción "PICO 1C" en el cual se muestran los picos correspondientes a la subtilisina Carlsberg (27 kDa), una masa de 7.9 kDa que se sugiere corresponde al inhibidor rHPI y finalmente dos masas, una de 11.7 kDa que también se identifica en el espectro de la subtilisina Carlsberg (Figura 25) y otra masa de 14.4 kDa que correspondería al dímero del inhibidor.

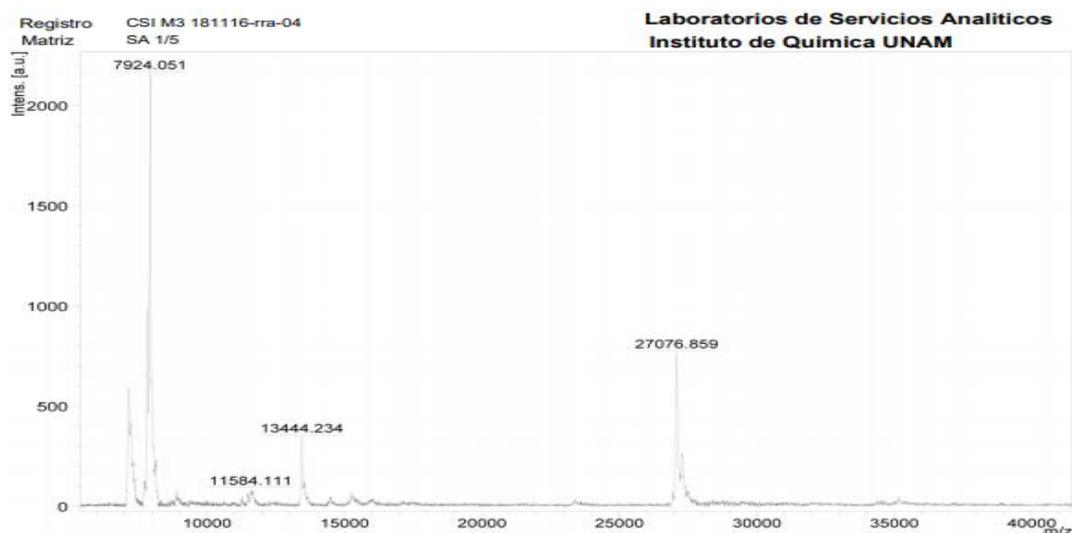


Figura 31. Espectro de masa MALDI-TOF para la fracción "PICO 2C". Se observan picos muy similares al espectro de masa del PICO 1C, correspondientes al inhibidor rHPI (7.9 kDa) y la subtilisina Carlsberg (27 kDa) por lo tanto, se espera que estas dos fracciones correspondan a la misma molécula.

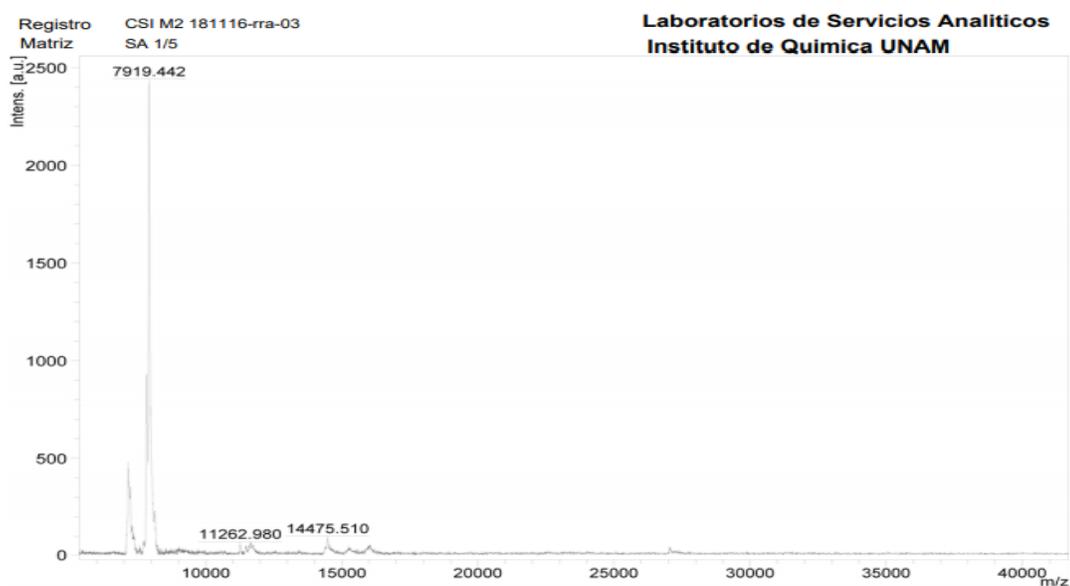


Figura 32. Espectro de masas MALDI-TOF la fracción "PICO 3C". No se observa una masa correspondiente a la subtilisina Carlsberg (27 kDa) y solo se identifica la masa del inhibidor (7.9 kDa).

Como se mencionó previamente y en base a los espectros de masas, se espera que las muestras denominadas PICO 1C y PICO 2C correspondan a una misma molécula química. Para las pruebas de cristalización se decidió concentrar cada una de las muestras de forma separada y usando diferentes pozos, con el fin de evaluar los posibles cristales formados y confirmar con bases estructurales que sí corresponden a la misma molécula.

6.4 Cristalización

Las tres fracciones denominadas; PICO 1C, PICO 2C y PICO 3C se dializaron usando un amortiguador de 20 mM Bis-TRIS pH 6.5 y se llevaron a una concentración de 3.06 mg/mL, 6.738 mg/ mL y 10.035 mg/mL respectivamente. Las pruebas de cristalización fueron realizadas usando los kits comerciales; Crystal Screen I y II y additive screen de Hampton Research (98 condiciones diferentes) a 18 °C. Esas pruebas fueron realizadas hace 6 meses; sin embargo, hasta la fecha no se ha obtenido algún cristal de proteína.

6.5 Análisis de la interacción entre el inhibidor (rHPI) de *H. Brasiliensis* y la subtilisina Carlsberg

El análisis de la interacción inhibidor de proteasas rHPI y la subtilisina Carlsberg se llevó a cabo con el fin de evaluar sus constantes de afinidad y disociación. Usando dos tipos de técnicas; calorimetría de titulación isotérmica e interferometría de biocapa. La finalidad de estos ensayos fue sustentar la hipótesis de que la interacción molecular del inhibidor de proteasas rHPI con la subtilisina Carlsberg da lugar a la formación de un complejo. Estos dos ensayos se realizaron bajo las mismas condiciones de pH, solución amortiguadora y temperatura. Sin embargo, las concentraciones de inhibidor y subtilisina utilizadas para cada uno de los ensayos fue diferente, teniendo en cuenta el principio fisicoquímico de cada técnica.

6.5.1 Ensayos de interacción subtilisina Carlsberg con el inhibidor de serín-proteasas rHPI, usando interferometría de biocapa (BLI)

El ensayo en tiempo real de la interacción inhibidor (rHPI) con subtilisina Carlsberg se realiza con el fin de determinar la constante de afinidad o disociación. Usando biosensores con amina de segunda generación ARG2, en un equipo Octet, se logró optimizar

parámetros de concentración, pH, y amortiguador, con el propósito de obtener datos estadísticos adecuados de las constantes de asociación y disociación. Además, se usó el pH 6.0 para la cromatografía de exclusión molecular y para los ensayos de la interacción inhibidor- subtilisina, con el fin de reducir las variables que podrían afectar el resultado final. El principio de esta técnica es medir el índice de refracción de la luz en una superficie debida a la interacción del inhibidor rHPI con la subtilisina Carlsberg.

Mediante los experimentos de BLI se determinaron los parámetros de la cinética de unión: k_a (constante de velocidad de asociación) y k_d (constante de velocidad de disociación) y con estos valores se calcula la K_D (constante de disociación). La subtilisina Carlsberg fue inmovilizada, a una concentración de 12 μM , y se evaluó frente a 6 diferentes concentraciones del inhibidor rHPI.

Como se puede observar en la Figura 33, las seis diferentes concentraciones (14.4; 7.2; 3.6; 1.8; 0.9; 0.45 μM) tuvieron un comportamiento ideal, ya que se logra apreciar una adecuada activación e inmovilización de los biosensores ARG2 con la subtilisina Carlsberg. El paso de "Quenching" o desactivación de la reacción con etanolamina y la nueva línea base se obtuvo de manera adecuada, manteniendo a la subtilisina Carlsberg unida a los biosensores. Posteriormente, se logró obtener señales que permitieron la medición de los pasos de asociación y disociación.

En la Tabla 4, se muestran los parámetros cinéticos obtenidos del ensayo con BLI. Los valores de K_D obtenidos están en el orden de 0.16 μM , lo que nos indica una buena afinidad en la interacción inhibidor-enzima. La Figura 33, es el interferograma obtenido para la interacción inhibidor rHPI y la subtilisina Carlsberg, cada una de las curvas se comportó de manera ideal y a fin a las concentraciones de inhibidor usadas. Ninguna de las curvas mostró alguna señal negativa en el cambio de longitud de onda (eje y), lo que nos corrobora que el amortiguador usado no presentó ruido en las señales.

La curva G1 corresponde al control de la unión no específica del rHPI al biosensor sin subtilisina. La poca señal cuantificada nos confirma que no se presentó alguna interacción

entre este inhibidor y los biosensores ARG2. Se concluye que las condiciones finales del experimento resultaron adecuadas.

Los pasos de asociación y disociación de las curvas A1, B1, C1, D1 y F1 (Figura 32) no presentan algún tipo de unión heterogénea no ideal. Esto quiere decir, que en la asociación hay un aumento monofásico de la señal en el BLI, y esta curva se mantiene en una meseta estable en función del tiempo. Luego, el paso de disociación llega casi al mismo punto de la línea base (LB) inicial. Cabe también destacar que uno de los factores que provocan la unión heterogénea no ideal son la agregación y la impureza de las proteínas, por lo tanto, gracias a este resultado confirmamos la pureza de estas dos proteínas (rHPI-subtilisina Carlsberg) (Sultana & Lee, 2015).

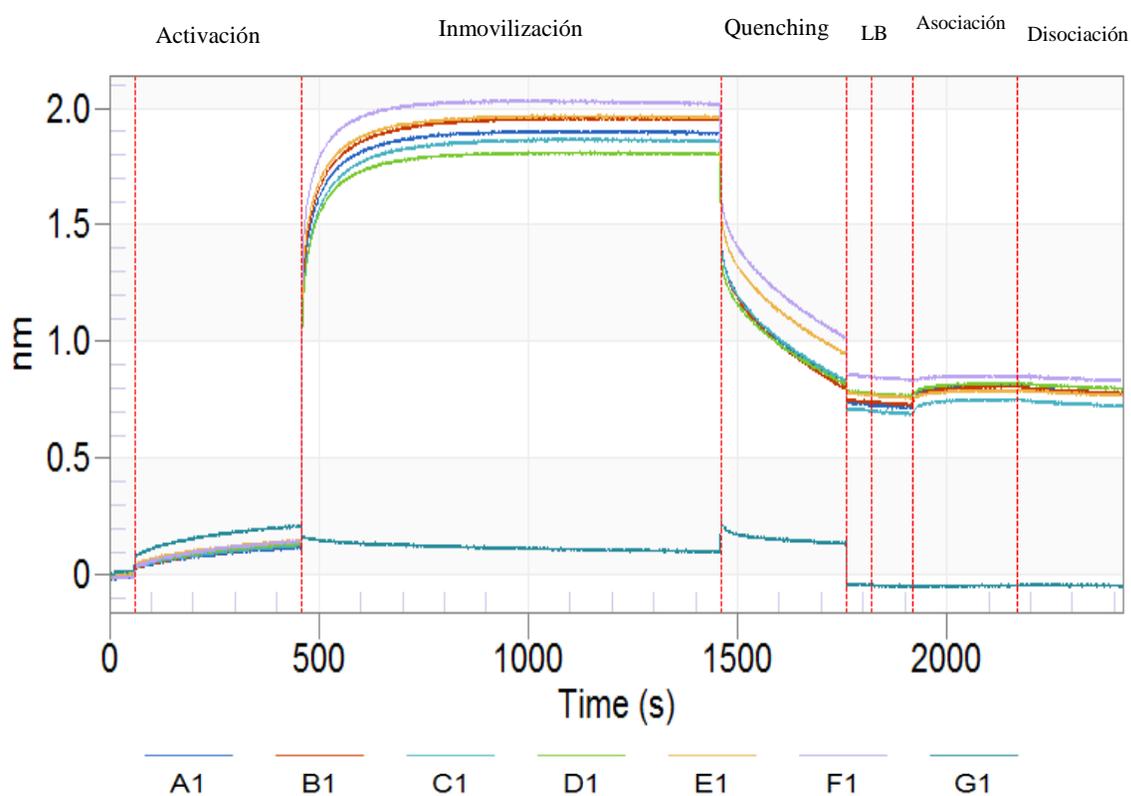


Figura 33. Interferograma de la cinética de unión del inhibidor rHPI con subtilisina Carlsberg. Donde cada una de las líneas: [A1(azul)], [B1(roja)], [C1(azul claro)], [D1(verde)], [E1(naranja)], [F1(gris)], corresponden respectivamente a las seis diferentes concentraciones del inhibidor (14.4, 7.2, 3.6, 1.8, 0.9, 0.45 μ M). La línea G1 (azul oscuro),

corresponde al control negativo, con el fin de evaluar una posible unión no específica del inhibidor con el biosensor sin la subtilisina Carlsberg.

En la Figura 34 se muestra de forma ampliada las regiones de “asociación” y “disociación” de la Figura 33. El perfil de las curvas obtenidas a partir de las diferentes concentraciones nos muestra que el ensayo se ajusta a un modelo 1:1, ya que gradualmente en la asociación se alcanza una saturación y equilibrio (meseta) conforme aumenta las concentraciones del inhibidor (14.4; 7.2; 3.6; 1.8; 0.9; 0.45 μM) con la subtilisina Carlsberg (12 μM). En la disociación la señal decae lentamente de manera consecuente al patrón de asociación y se mantiene estable durante el tiempo, se sugiere que esta tendencia se debe a la afinidad (0.16 μM) que presentó el inhibidor rHPI por la subtilisina Carlsberg. En la Figura 34B se presenta la gráfica después del tratamiento de datos de asociación y disociación ajustados a un modelo 1:1 usando el software FortéBio Data Acquisition.

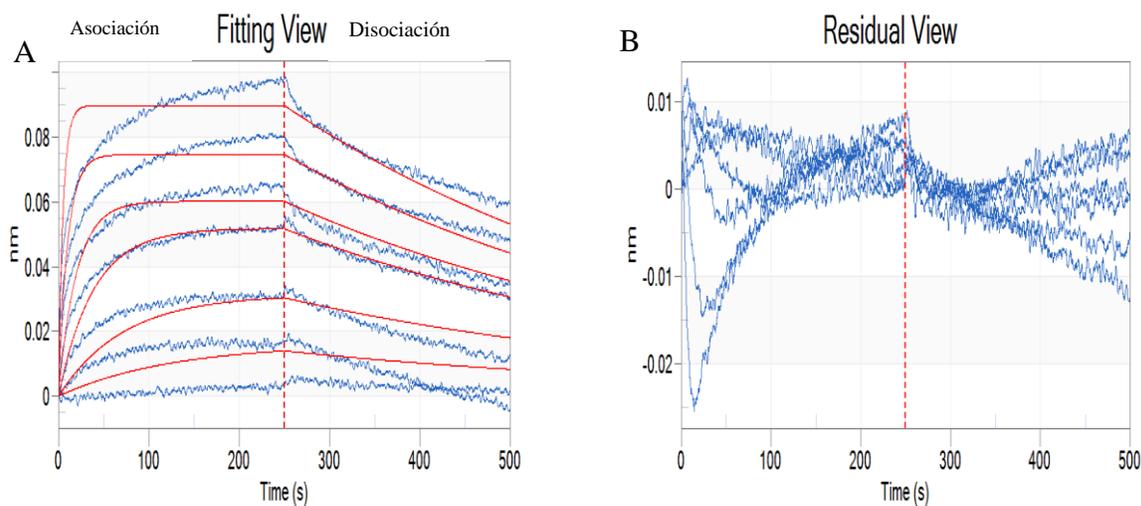


Figura 34. Ampliación del Interferograma de la cinética de unión del Inhibidor rHPI con la subtilisina Carlsberg. (A) Se muestra de manera ampliada la unión del inhibidor a la subtilisina Carlsberg, esta grafica presenta los resultados sin realizar el tratamiento de datos en el software FortéBio Data Acquisition. (B) Interferograma obtenido después del tratamiento de datos y acoplado el análisis a un modelo de unión (1:1).

Tabla 3. Resultados de la cinética de unión de las diferentes concentraciones del inhibidor rHPI a la subtilisina Carlsberg por BLI.

Conc rHPI. (μM)	K_D (μM)	$k_a(\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$k_d(\text{s}^{-1})$	χ^2	R^2
14.4	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96
7.2	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96
3.6	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96
1.8	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96
0.9	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96
0.45	0.16	1.32E+04	2.10E-03	0.07	0.96

$K_D = k_d/k_a$, $R^2 =$ variación de la respuesta (mayor al 0.95, índice de confianza de los ajustes),

χ^2 Comparación de la distribución observada con una distribución esperada de los datos

Los datos cinéticos de la Tabla 4, sirvieron como datos preliminares para realizar los ensayos de titulación isotérmica (ITC). Teniendo en cuenta la K_D obtenida, se realizaron diversos ensayos con el fin de establecer las concentraciones adecuadas de ligando (inhibidor rHPI) y de la subtilisina Carlsberg.

En la actualidad existen escasos reportes de constantes de disociación entre inhibidores proteicos y proteasas determinadas usando interferometría de biocapa o ITC. Se han realizado estudios de caracterización cinética de algunos inhibidores de la familia de la papa I, como el inhibidor de semillas de cebada CI-2 y de eglina c. La eglina c presentó una K_i de 1×10^{-10} M frente a cathepsina G y elastasa, mientras que el inhibidor CI-2 tiene una K_i de 1.6×10^{-9} M con quimotripsina (Longstaff *et al.*, 1990) (Seemüller *et al.*, 1980). Estos valores muestran que ambos inhibidores presentan una afinidad alta por sus proteasas objetivo, mientras que la afinidad determinada en este trabajo para el complejo rHPI y la subtilisina Carlsberg es menor (Tabla 3), aun cuando pertenecen a la misma familia de inhibidores. Para comprender a fondo la diferencia en la afinidad de estos inhibidores es necesario contar con estudios de rayos X o resonancia magnética nuclear, los cuales permitirían reconocer si estas diferencias en la afinidad se deben a un mecanismo de inhibición diferente al mecanismo estándar de inhibición canónico que presentan los inhibidores de la familia tipo 1 de la papa.

6.4.2 Calorimetría de titulación isotérmica de la subtilisina Carlsberg con el inhibidor de serín proteasas rHPI

La calorimetría de titulación se realizó a una temperatura de 25° C, en amortiguador de acetato de sodio 10 mM, pH 6.0. Bajo estas mismas condiciones se desarrollaron los experimentos de interferometría de biocapa (ver sección 6.4.1). En la celda de reacción se usó a la subtilisina Carlsberg a una concentración de 24 μM , mientras que el inhibidor rHPI se utilizó como ligando a una concentración de 180 μM .

Estas concentraciones fueron las ideales para obtener la isoterma (Figura 35). Al estandarizar el ensayo se pudo observar que el aumento en la concentración del inhibidor afectaba considerablemente el cálculo de los parámetros termodinámicos, posiblemente como una consecuencia del calor de dilución del inhibidor en la jeringa con el amortiguador de la celda de referencia que enmascaraba los cambios en el potencial de la titulación de la subtilisina Carlsberg con rHPI. Aunque no se alcanzó una total saturación de la subtilisina Carlsberg, los puntos alcanzados fueron suficientes para la integración de cada uno de ellos mediante el uso de la herramienta Origin 7.0.

La técnica de calorimetría de titulación isotérmica es una herramienta poderosa para estudiar la interacción entre dos moléculas. No obstante, esta puede verse limitada por su sensibilidad. En el ámbito de reacciones biológicas, solo algunas presentan fuertes o relativas capacidades caloríficas que pueden ser analizadas. Para obtener una completa y buena isoterma de unión ligando-proteína se requiere que su constante de asociación sea igual o mayor de 10^4 M^{-1} (Freire *et al.*, 1990).

En la Figura 34, se observa la isoterma de la interacción obtenida del inhibidor rHPI y la subtilisina Carlsberg. La constante de asociación obtenida con Origin 7.0 es de $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o K_D 0.28 μM . Para las interacciones proteína-proteína, la constante de asociación del orden de 10^8 M^{-1} (K_D 10 nm) se consideran de alta afinidad, 10^6 M^{-1} (K_D 1 μM) se categoriza de afinidad moderada y como de afinidad baja en el orden de 10^4 M^{-1} (K_D 100 μM). Por lo tanto, la constante de asociación obtenida se considera de afinidad moderada (Campoy Velazquez *et al.*, 2004).

A la fecha aún existen interrogantes sobre el mecanismo y tipo de interacción en complejos proteasa/inhibidor. La familia de inhibidores más estudiada es la del tipo Kunitz, Bowman-Birk y Kazal, mientras que la familia de inhibidores de papa I, a la cual pertenece el inhibidor HPI ha sido poco caracterizada. En este trabajo aportamos información de gran importancia para enriquecer el estado del arte de esta familia.

En 1985, McPhalen (Mc Phalen *et al.*, 1985) reportaron la estructura cristalina del inhibidor de cebada (CI-2), en complejo con la subtilisina Novo. Este también es miembro de la familia de inhibidores de papa I y carece de puentes disulfuro, como HPI. Sin embargo, CI-2 presenta interacciones no covalentes que estabilizan al asa de interacción con la enzima y tiene una constante de inhibición menor que la del complejo inhibidor de pavo (OMTKY3) quimotripsina (Mc Phalen *et al.*, 1985). Éste muestra una mayor inhibición debido a la presencia de dos puentes disulfuros que estabilizan el asa que interacciona con el sitio activo de la enzima. El inhibidor HPI no establece puentes disulfuro intramoleculares, ya que solo tiene una cisteína libre en su extremo amino terminal (Cys5), lo que podría aumentar su flexibilidad disminuyendo su afinidad con la subtilisina Carlsberg.

Los inhibidores tipo Kazal y los tipos Bowman-Birk, presentan afinidades altas, es decir en el rango nano molar e inclusive pico molar. Para el inhibidor OMTYK3 se reporta una constante de asociación K_a de $3.4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ o una K_D de 29.4 pM con subtilisina Carlsberg (Horn *et al.*, 2003). Otro reporte de una afinidad alta es la del inhibidor hirudina con trombina con una de K_D de 10^{-14} M (Grutter *et al.*, 1990).

Uno de los ejemplos de familia tipo Kazal es el inhibidor de serín proteasas CrSPI del hepatopáncreas del cangrejo *Carcinoscorpius*, el cual presenta un mecanismo dual de inhibición cuando está en complejo con la Subtilisina Carlsberg; esta interacción presentó una K_D 500 μM , considerada como una afinidad mediana a baja (Shenoy *et al.*, 2011). Aunque hay una tendencia de afinidades altas en las interacciones inhibidor-proteasas, éstas dependen de variaciones en temperatura, pH, y la composición de aminoácidos en el inhibidor, así como la presencia de puentes de disulfuro e interacciones con el disolvente. De acuerdo con lo reportado por (Brand *et al.*, 2017) la oligomerización también afecta la

estequiometría, cinética y termodinámica de la interacción de un inhibidor tipo Bowman Birk con tripsina o quimotripsina. Los autores reportan que al usar una concentración del inhibidor de guisantes (BTCI) en el rango μmolar , la afinidad (K_D) es de 115 nM y 6.5 nM, respectivamente. Mientras que al usar concentraciones nanomolares, determinaron una K_D de 0.41 nM y 0.42 nM, respectivamente.

En la Figura 35 se muestra la isoterma de la unión entre la subtilisina Carlsberg y el inhibidor rHPI. El parámetro n , que hace referencia al punto de inflexión de la isoterma es de 0.890, esto quiere decir que la estequiometria de la interacción es del orden de 1.

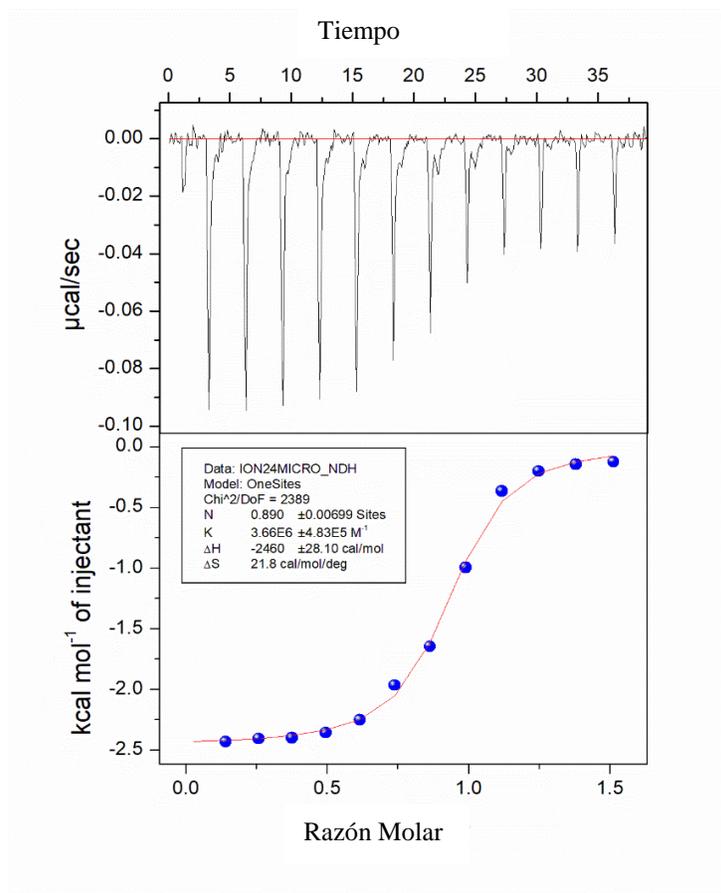


Figura 35. Isotherma calorimétrica de la unión del inhibidor rHPI con la subtilisina Carlsberg. Las mediciones fueron realizadas a 25 °C, con acetato de sodio 10 mM, pH 6.0

Por lo tanto, la constante de unión se ajusta a la siguiente ecuación:

$$K_a = \frac{[ML]}{[M][L]}$$

Donde K_a es la constante de afinidad, $[ML]$ corresponde a la concentración del complejo. $[M]$ y $[L]$ corresponden a las concentraciones de las macromoléculas y del ligando sin unir (Stolarski *et al.*, 2003).

Al calcular la K_D a partir la constante de afinidad obtenida por ITC ($K_a=1/K_D$) se obtiene un valor de 0.28 μM . Este valor es del mismo orden de magnitud que el determinado por la técnica de interferometría de biocapa (0.16 μM Tabla 4), lo que indica que aun cuando la enzima esta inmovilizada no se afecta su interacción con rHPI.

Termodinámicamente hablando, la espontaneidad en la formación de un complejo está dada por la diferencia de la energía libre de Gibbs entre el complejo y la de sus formas individuales. La abundancia relativa del complejo en el estado de equilibrio se expresa en función de la constante de equilibrio (K_a):

$$\Delta G = -RT \ln K_a \quad (1)$$

Donde, T es la temperatura absoluta en Kelvin y R es la constante ideal de los gases. De la misma manera ΔG puede ser expresada en términos de cambios de entalpía ΔH y entropía ΔS .

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2)$$

ΔH es aproximadamente igual al cambio de energía interna provocado por los cambios en las interacciones electrostáticas y de van der Waals. Por otro parte, ΔS es el resultado de los cambios de grados de libertad del soluto en el solvente (Pulido *et al.*, 2008).

Usando la ecuación (1) a una temperatura de 298.15 K (25 °C), la energía libre de Gibbs (ΔG) para la interacción entre el inhibidor de serín-proteasas rHPI y la subtilisina Carlsberg fue de -8.95 Kcal mol⁻¹, mientras que la entalpía $\Delta H = -2.46$ Kcal mol⁻¹ y la contribución entrópica en función de la temperatura fue de 6.49 Kcal mol⁻¹ K⁻¹. En la Figura 36 se muestra que la interacción entre el inhibidor de serín-proteasas rHPI y la subtilisina

Carlsberg es una reacción espontánea ($\Delta G < 0$) y exotérmica ($\Delta H < 0$) y se ve favorecida entrópicamente. Los efectos de hidratación están relacionados con el cambio en la entropía de un complejo en comparación con las moléculas no ligadas. Estos efectos provocan un aumento en la entropía de hidratación de los grupos polares y apolares del sitio de unión, por lo tanto, se reduce la superficie accesible al solvente. La formación de un complejo implica un cambio en la entropía del sistema, por lo general es grande y positivo. Por esta razón, se plantea que la interacción entre el inhibidor rHPI y la subtilisina da lugar a la formación de un complejo, debido a una energía libre de Gibbs negativa. Una entropía positiva ($6.49 \text{ Kcal.mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) es un fuerte indicio del desplazamiento de las moléculas de agua en la interfaz del complejo (*Jelesarov & Bosshard, 1999*).

Para el inhibidor eglina se han reportado valores termodinámicos de su interacción con la elastasa a un pH de 8.0: K_a de $1.0 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, $\Delta G = -13.4 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H = 1.8 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ y una contribución entrópica de $52 \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$, y con α quimotripsina: K_a de $5.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, un ΔG de $-13.0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H = 2.0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ y una contribución entrópica de $51 \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$. Finalmente, con la subtilisina Carlsberg las constantes termodinámicas son: K_a de $6.6 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, un ΔG de $-13.1 \text{ Kcal.mol}^{-1}$, $\Delta H = 2.0 \text{ Kcal.mol}^{-1}$ y una contribución entrópica de $51 \text{ Kcal.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ (*Ascenzi et al., 1988*). Los valores de estas constantes termodinámicas no difieren entre las proteasas usadas, al parecer una mayor K_a presenta grandes cambios entálpicos positivos y un cambio entrópico positivo. Para la interacción entre el inhibidor rHPI y subtilisina Carlsberg observamos que también se presenta una mayor contribución entrópica que entálpica. En el caso rHPI /subtilisina, los valores obtenidos para la entropía son casi 10 órdenes de magnitud menores que los reportados para la eglina c. No obstante, Ascenzi reporta que, a un pH bajo, la K_a disminuye para las tres proteasas, de modo que se puede sugerir que la diferencia entre las constantes termodinámicas de estos dos inhibidores (rHPI y eglina c) se debe a el pH usado para el experimento (pH 6.0).

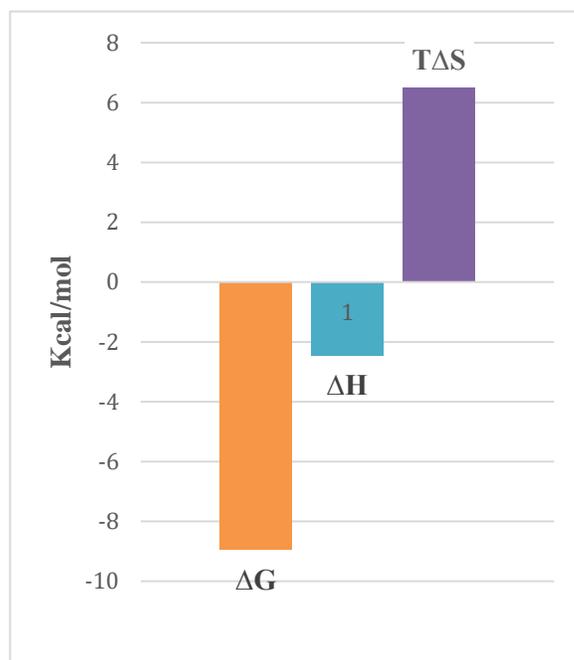


Figura 36. Huella termodinámica de la interacción entre el inhibidor de serín proteasas rHPI y la subtilisina Carlsberg. La interacción se ve favorecida entrópicamente.

Generalmente, las interacciones biomoleculares involucran la reorganización de las moléculas del solvente que incluyen solvatación, desolvatación, y la formación de los enlaces no covalentes durante la conformación del complejo. En un proceso exotérmico ($\Delta H < 0$) predomina la formación de enlaces no covalentes, interacciones electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrogeno e interacciones π - π). Por tanto, se espera la formación de enlaces no covalentes en el complejo rHPI- subtilisina Carlsberg, ya que se trata de un proceso exotérmico (Figura 36), los cuales superan el costo entálpico asociado a la desolvatación de las superficies interactuantes (Huang & Lau, 2016).

El hecho de que el proceso de unión rHPI- subtilisina Carlsberg sea favorecido entrópicamente, implica que los grados de libertad ganados por la liberación de moléculas de agua es mayor que la pérdida de grados conformacionales que experimentan la proteasa y su inhibidor. Se ha demostrado que los cambios en la entropía conformacional tienen una alta relación con la alta afinidad en los complejos en diversas interacciones proteína-proteína y proteína ligando de manera casi universal. La conexión entre estructura, entropía y entalpía y los

movimientos internos en el sitio de unión es el recurrente desafío para entender la termodinámica de las interacciones proteína-proteína (Caro, Harpole, Kasinath, & Lim, 2017).

Una contribución entrópica positiva implica la pérdida de moléculas de agua de unión y un aumento de la flexibilidad en la cadena polipeptídica (Dragan *et al.*, 2017), por lo tanto, se sugiere que la puede presentar una alta flexibilidad en rHPI. Para entender a profundidad la interacción del inhibidor de serín proteasas rHPI con la subtilisina Carlsberg en términos de termodinámica estructural sería necesario varios análisis calorimétricos mutando el residuo P₁ o usando un amplio intervalo de pH.

7. CONCLUSIONES

Se identificaron dos proteínas en la fracción sérica de *H. brasiliensis* con una importante actividad inhibitoria sobre subtilisina Carlsberg de 73 % y 52 %, con masas de 14.4 kDa y 7.6 kDa, respectivamente. Estas se evaluaron mediante geles SDS-PAGE al 15 % y espectrometría de masas MALDI-TOF. Se sugiere que estas masas corresponden al inhibidor de serín-proteasas Hev b 15 o HPI con posibles modificaciones postraduccionales o en su forma dimérica.

El inhibidor rHPI se obtuvo de forma recombinante y presentó una actividad inhibitoria sobre subtilisina Carlsberg del 99 %, superior a la que mostraron los inhibidores endógenos, debido posiblemente a la pureza de la proteína recombinante. Éste interactuó con la subtilisina Carlsberg formando un complejo que presentó un volumen de elución diferente al obtenido por sus formas individuales en la cromatografía de exclusión molecular.

En BLI el valor de K_D obtenido para la interacción rHPI con la subtilisina Carlsberg ,a pH 6.0, fue de 0.16 μM , que se considera como una afinidad media y los datos se ajustaron apropiadamente a un modelo 1:1. Mediante ITC la constante de asociación K_a fue de $3.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ o una K_D de 0.28 μM y en ambos casos se confirma que la interacción se comporta como un modelo de unión 1:1.

La formación del complejo inhibidor rHPI- subtilisina Carlsberg es un proceso exotérmico, favorecido entrópicamente, lo que implica un aumento en los grados de libertad de las moléculas involucradas en la interacción. A la fecha no se ha logrado cristalizar al complejo rHPI-subtilisina Carlsberg, probablemente debido al predominio entrópico global del sistema, ya que aparentemente existe una gran flexibilidad en la cadena polipéptica del inhibidor debido a la ausencia de puentes disulfuro que estabilicen el asa de interacción o el extremo N-terminal.

8. PERSPECTIVAS

Optimizar los procesos de obtención y purificación del inhibidor HPI a partir del suero C de *H brasiliensis*, para caracterizar posibles modificaciones postraduccionales y fenómenos de oligomerización.

Desarrollar una estrategia para aumentar la estabilidad del complejo inhibidor rHPI-subtilisina Carlsberg y así lograr obtener cristales del mismo.

Realizar ensayos de interacción de HPI con otras subtilisinas o subtilasas, como subtilisina Novo y BPN o subtilasas de plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Apostoluk, W., & Otlewski, J. (1998). Variability of the Canonical Loop Conformations in Serine Proteinases Inhibitors and Other Proteins. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 32(4), 459-474.
- Ascenzi, P., Amiconi, G., Menegatti, E., Guarneri, M., Bolognesi, M., & Schnebli, H. P. (1988). Binding of the Recombinant Proteinase Inhibitor Eglin C from *Leech Hxrudo Medzcznalzs* to Human Leukocyte Elastase, Bovine α -Chymotrypsin and Subtilisin Carlsberg: Thermodynamic Study. *Journal of enzyme inhibition*, 2(3), 167-172.
- Bendre, A. D., Ramasamya, S., & Suresha, C. (2018). Analysis of Kunitz inhibitors from plants for comprehensive structural and functional insights. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 933-943.
- Berthelot, K., Peruch, F., & Lecomte, S. (2016). Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro)hevein proteins. *Biochimie*, 127, 258-270.
- Berthelotab, K., Lecomtecd, S., Estevez, Y., & Peruch, F. (2014). *Hevea brasiliensis* REF (Hev b 1) and SRPP (Hev b 3): An overview on rubber particle proteins. *Biochimie*, 106, 1-9.
- Bijinaa, B., Chellappana, S., .Basheera, S. M., Elyas, K., Bahkali, A. H., & Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. *Process Biochemistry*, 46(12), 2291-2300.
- Brand, G., Pires, D., & Furtado Jr, J. (2017). Oligomerization affects the kinetics and thermodynamics of the interaction of a Bowman-Birk inhibitor with proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 618, 9-14.
- Bryan, P. N. (2000). Protein engineering of subtilisin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 203-22.
- Bunyatang, O., Chirapongsatonkul, N., & Churngchow, N. (2012). Purification of a Protease Inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and its effect on the growth of *Phytophthora palmivora*. *J.Plant Biochem. Biotechnol*, 2(22), 185-192.

- Bunyatang, O., Chirapongsatonkul, N., & Churngchow, N. (2013). Purification of a Protease Inhibitor from *Hevea brasiliensis* cell suspension and its effect on growth of *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22(2), 185-192.
- Campoy Velazquez, A., Leavitt A, S., & Freire, E. (2004). Characterization of Protein–Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry. *Protein-Protein Interactions*, 261, 35-54.
- Caro, J. A., Harpole, K. W., Kasinath, V., & Lim, J. (2017). Entropy in molecular recognition by proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(25), 6563-6568.
- Laskowski, M., & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Biochem*, 49(1), 593-626.
- Leavitt, S., & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in structural biology*, 11(5), 560-566.
- Cornish, K. (2001). Similarities and differences in rubber biochemistry. *Phytochemistry*, 57(7), 1123-1134.
- Cornish, K., Castellón, J., & Scott, D. J. (2000). Rubber Molecular Weight Regulation, in Vitro, in Plant Species. *Biomacromolecules*, 1, 632-641.
- da Costa, B. M., Keasling, J. D., & Cornish, K. (2005). Regulation of Rubber Biosynthetic Rate and Molecular Weight. *Biomacromolecules*, 6, 279-289.
- Derache, C., Epinette, C., Roussel, A., Gabant, G., Cadene, M., & Korkmaz, B. (17 de Octubre de 2012). Crystal structure of greglin, a novel non-classical Kazal inhibitor, in complex with subtilisin. *The FEBS Journal*, 279, 4466-4478.
- Dragan, A., M. Read, C., & Robinson, C. C. (2017). Enthalpy–entropy compensation: the role of solvation. *European Biophysics Journal*, 46(4), 301-308.
- Fluhr, R., Lampl, N., & Roberts H, T. (2012). Serpin protease inhibitors in plant biology. *Physiologia Plantarum*, 145, 95-102.
- Farady, C. J., & Craik, C. S. (2010). Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. *ChemBiochem*, 11(17), 2341-2346.

- Figueiredo, J., Sousa Silva, M., & Figueredo, A. (2017). Subtilisin-like proteases in plant defence: the past, the present and beyond. *Molecular Plant Pathology*, *19*(4), 1017-1028.
- Freire, E., Mayorga, O. L., & Straume, M. (1990). Isothermal Titration. *Analytical Chemistry*, *62*(18).
- Gáspári, Z., Várnai, P., Szappanos, B., & Perczel, A. (October de 2009). Reconciling the lock-and-key and dynamic views of canonical serine protease. *FEBS Letters*, *584*, 203-206.
- Gamble, M., Künze, G., Dodson, E. J., Wilson, K. S., & Jones, D. D. (2011). Regulation of an intracellular subtilisin protease activity by a short propeptide sequence through and original combined dual mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(9), 3536-3541.
- Grutter, M., Priestle, J. P., & Rahuel, J. (1990). Crystal structure of the thrombin - hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *The EMBO Journal*, *9*(8), 2361-2365.
- Havanapan, P. O., Bourchookarn, A., Ketterman, A. J., & Krittanai, C. (2016). Comparative proteome analysis of rubber latex serum from pathogenic fungi tolerant and susceptible rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Journal of Proteomics*, *131*, 82-92.
- Hedstrom, L. (2002). Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical reviews*, *102*(12), 4501-4524.
- Heimsoth, M. R., & Rihs, H.-P. (2007). Quantitative analysis of immunoglobulin E reactivity profiles in patients allergic or sensitized to natural rubber latex (*Hevea brasiliensis*). *Clinical and experimental allergy*, *37*(11), 1657-1667.
- Hernandez R, P., Hernandez, R., Arroyo, R., & Alderete, J. F. (2010). Identification and characterization of a surface-associated, subtilisin-like serine protease in *Trichomonas vaginalis*. *Parasitology*, *137*(11), 1621-1635.
- Horn, J. R., Ramaswamy, S., & Murphy, K. (2003). Structure and Energetics of Protein-Protein interactions. The role of conformational heterogeneity in OMTKY3 binding to serine protease. *Journal of Molecular Biology*, *331*(2), 497-508.

- Huang, R., & Lau, B. L. (2016). Biomolecule–nanoparticle interactions: Elucidation of thermodynamics by isothermal titration calorimetry. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1860, 945-936.
- Hyun Kim, N. K., & Byung. (2015). Pepper pathogenesis-related protein 4c is a plasma. *The plant Journal*, 81-94.
- Jayashree, S., Pavalam, M., Sowdhamini, R., & Srinivasan, N. (2019). Interface residues of transient protein-protein complexes have extensive intra-protein interactions apart from inter-protein interactions. *Biology direct*, 14(1).
- Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal Molecular Recognition*, 3-18.
- Jensen Norregaard, O. (2004). Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Current opinion in chemical biology*, 33-41.
- Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (Octubre de 1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in plant science*, 2(10), 379-384.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 60, 2427-2444.
- Longstaff, C., Campbell, A. F., & Fersht, A. R. (1990). Recombinant chymotrypsin inhibitor 2: expression, kinetic analysis of inhibition with. alpha.-chymotrypsin and wild-type and mutant subtilisin BPN', and protein engineering to investigate inhibitory specificity and mechanism. *Biochemistry*, 29(31), 7339-7347.
- McPhalen, C., Schnebli, H., & James, M. (19 de Agosto de 1985). Crystal and molecular structure of the inhibitor eglin from leeches in complex with subtilisin Carlsberg. *FEBS Letters*, 188(1), 55-58.
- Mahmoudi, M. (2018). Latex Allergy. *Allergy and Asthma: The Basics to Best Practices*, 1-12.
- Mansilla, Y. A., Segarra, C. I., & Conde, R. D. (2012). Structural and Functional Features of a Wheat Germin-Like Protein that Inhibits Trypsin. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(3), 624-632.

- Manzano Mazamorra, M., Ramírez, S., J.C, Yada, & Y, R. (2017). Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(13), 2147-2163.
- Marathe, K. R., Patil, R., Vishwakarma, K. S., Chaudhari, B, A., & Maheshwari, V. L. (2019). Chapter 6 - Protease Inhibitors and Their Applications: An Overview. 62, 211-242.
- McPhalen, C. A., Svendsen, I., Jonassen, I., & James, M. N. G. (1985). Crystal and molecular structure of chymotrypsin inhibitor 2 from barley seeds in complex with subtilisin Novo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(21), 7242-7246
- Men, X., Wang, F., Guao-Qiang, C., Hai-Bo, Z., & Mo, X. (2018). Biosynthesis of Natural Rubber: Current State and Perspectives. *International Journal of Molecular Science*, 20, 50.
- Miranda de la Rosa, A., De León, A., & Velazquez, E. F. (2015). Host-Guest Interactions Between Cyclophane and Arginine-Methyl Ester: A Theoretical Study. *Asian Journal of Chemistry*, 28(3).
- Otlewski, J., Jelen, F., Malgorzata, Z., & Olesksy, A. (2005). The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *The EMBO Journal*, 24, 1303-1310.
- Paiva, P. M., Pontual, E. V., Coelho, L. C., & Napoleao, T. H. (2013). Protease inhibitors from plants: Biotechnological insights with emphasis. *Microbial pathogens and strategies for combating them: Science, Technology and Education*, 1, 641-649.
- Polaina, J., & MacCabe, A. (2007). *Industrial Enzymes- Structure, Function and Applications*. Dordrecht: Springer.
- Pulido, N., Chavelas, E., Torner, F., & Garcia Hernandez, E. (2008). Current applications of isothermal titration calorimetry to the study of protein complexes. *Transworld Research Network*, 37(661), 116-138.
- Rawlings, N. D., & Salvesen, G. (2013). *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Vol. 135). Londres: El Sevier, Amsterdam: Academic press.
- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., & Kong, J. B. (s.f.). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 36, 320-325.

- Saleha, M. M., Forkela, S., Schöna, M. P., Fuchs, T., & Buhl, T. (2018). Profile Shift in Latex Sensitization over the last 20 years. *International Archives of Allergy and Immunology*, *178*(1), 83-88.
- Sansatsadeekul, J., Sakdapipanich, J., & Rojruthai, P. (2011). Characterization of associated proteins and phospholipids in natural rubber latex. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *111*(6), 628-634.
- Seemüller, U., Eulitz, M., Fritz, H., & Strobl, A. (1980). Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis*. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, *361*(12), 1841-1846.
- Shamsi, N. T., Parveen, R., & Fatima, S. (2016). Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *91*, 1120-1133.
- Shenoy, R. T., Thangamani, S., & Velazquez Campoy, A. (2011). Structural Basis for Dual-Inhibition Mechanism of a Non- Classical Kazal- Type Serine Protease Inhibitor from Horseshoe Crab in. *Plos one*, *6*(4).
- Smith, E. L. (1966). The complete aminoacid sequence of two types of subtilisin, BPN' and Carlsberg. *Journal of Biological Chemistry*, *241*(24), 5974-5976.
- Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W., & Ryan, C. (2006). Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, *67*(15), 1644-1650.
- Sultana, A., & Lee, J. E. (2015). Measuring Protein-Protein and Protein-Nucleic Acid Interactions by Biolayer Interferometry. *Current protocols in protein science*, *79*(1), 19-25.
- Stolarski, R. (2003). Thermodynamics of specific protein-RNA interactions. *Acta Biochimica Polonica*, *50*(2), 297-318.
- Svendsen, I. (1976). Chemical modifications of the subtilisins with special reference to the binding of large substrates. A review. *Springer Link*, *41*(5), 237.
- Terrón Hernández, J. (2017). “*Caracterización estructural y determinación de la alergenicidad del inhibidor de proteasas rHPI de Hevea brasiliensis*. Ciudad de Mexico: Repositorio UNAM.

- Valueva, T., & Mosolov, V. (2004). Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense. *Biochemistry (Moscow)*, 69(11), 1600-1606.
- Van de Ven, W., Roebroek, A., & Van Duijnhoven, H. (1993). Structure and function of eukaryotic proprotein processing enzymes of the subtilisin family of serine proteases. *Critical reviews in oncogenesis*, 4(2), 115-136.
- Wallner, J., Gabriele, L., Jeschek, D., & Alexander, M. (2012). Application of Bio-Layer Interferometry for the analysis of protein/liposome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 150-154.
- Wartchow, C. A., Podlaski, F., Li, S., Rowan, K., & Zhang, X. (2011). Biosensor-based small molecule fragment screening with biolayer interferometry. *Journal of Computeraided Molecular Design*, 25(7), 669.
- Wright Shubert, C. (1969). Structure of Subtilisin BPN' at 2,5 Å Resolution. *Nature*, 221(5177), 235.
- Yong Yewa, G., Chai Tham, T., Lim Law, C., & Chu, D.-T. (2019). Emerging crosslinking techniques for glove manufacturers with improved. *Materials Today Communications*, 19, 39-50.
- Young, J., Seong-Cheol, K., Hawang, P., Cheong, I., & H. S, J. W. (2009). Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 330(3), 2860-2872.
- Zhang, Y., Leclercq, J., & Montoro, P. (2017). Reactive oxygen species in *Hevea brasiliensis* latex and relevance to Tapping Panel Dryness. *Tree Physiology Review*, 37, 261-269.