

## CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA EN EL LÁTEX DE *Mandevilla veraguasensis*

## CHARACTERIZATION OF THE PROTEOLYTIC ACTIVITY IN THE LATEX FROM *Mandevilla veraguasensis*

Barbara Huber, Juan Luis Concepción y Luisana Avilán

Laboratorio de Fisiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela.  
e-mail: avilan@ula.ve

### RESUMEN

El látex de la especie *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. (Apocynaceae) fue analizado con respecto a su actividad proteolítica. Se encontró una proteasa con actividad colagenolítica, un pH óptimo alrededor de 7.5 y una actividad termoestable con temperatura óptima de 38 °C. La enzima, denominada mandevilina, fue inhibida por *fenil-metil-sulfonil-fluoruro* (PMSF) indicando que es una serina-proteasa. Esta proteasa constituye el 35 % de las proteínas totales de la fase acuosa del látex y posee un peso molecular aparente de 77 kDa, determinado por electroforesis en geles de poliacrilamida. Mandelivina podría ser una proteasa con utilidad biotecnológica especialmente por su resistencia a altas temperaturas.

### ABSTRACT

The latex from *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. (Apocynaceae) was analyzed regarding its proteolytic activity. A protease with collagenolytic activity, optimum pH around 7.5, and a thermo-stable activity with an optimum temperature of 38 °C, was found. This enzyme named mandevilina, was exclusively inhibited by phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) indicating that it belongs to the serin-protease class. In addition, it was found that this protease is around 35% of the total protein of the aqueous phase of the latex and has 77 kDa of molecular mass as determined by polyacrylamide gel electrophoresis. Mandelivina could be a useful protease for biotechnology, especially for its resistance to high temperatures.

**Palabras clave:** Látex, proteasa, serina-proteasa, *Mandevilla veraguasensis*, Apocynaceae.  
**Keywords:** Latex, proteasa, serin-protease, *Mandevilla veraguasensis*, Apocynaceae.

## INTRODUCCIÓN

El látex de plantas laticíferas es un fluido lechoso que contiene una mezcla compleja de moléculas tales como lípidos, carbohidratos, terpenos, aminoácidos libres, polímeros de isoprenoides o caucho y enzimas, entre otras. A su vez presenta organelas celulares debido a que el látex representa el citoplasma de las células de los tubos laticíferos los cuales pueden ser articulados o no articulados; estos últimos también denominados continuos (El Moussaoui *et al.* 2001). En el látex de numerosas plantas se ha detectado actividad lipasa, quitinasa y proteasas (Kramer y Whitaker 1964, Moulin *et al.* 1994, Arima *et al.* 2000, Azarkan *et al.* 1997). Varias proteasas del latex de algunas plantas laticíferas han sido bien caracterizadas y tienen aplicación médica, biotecnológica y en la

industria de alimentos. Tal es el caso de la papaina de *Carica papaya* y la ficina de *Ficus spp.* (Monter *et al.* 1991, El Moussaoui *et al.* 2001).

Las proteasas de la clase cisteina-proteasa son las que han sido aislada mayoritariamente de látex de varias especies vegetales. Sin embargo en látex de plantas pertenecientes a la familia Euphorbiaceae se han aislado serina-proteasas, como las hevinas del látex de *Hevea brasiliensis* (Lynn y Clevette-Radford 1986) y la milina de *Euphorbia milii* (Yada *et al.* 2006). En el caso del látex de la familia Apocynacea se han descrito principalmente proteasas de la clase de cisteina-proteasas. Entre ellas tenemos las calotropinas de *Calotropis procera* (Dubey y Jagannadham 2003), las araujiainas purificadas a partir de *Araujia hortorum* (Priolo *et al.* 2000, Obregón *et al.* 2001) y

la asclepaina c I de *Asclepia curassavica* (Liggieri *et al.* 2004). En esta familia se han descrito solo dos serina-proteasas, la criptolepaina proveniente del látex de *Cryptolepis buchanani* (Pande *et al.* 2006) y la wrightin del latex de *Wrightia tinctoria* (Tomar *et al.* 2008). La presencia de proteasas en el látex de plantas ha sido involucrada en procesos de defensa de plantas, principalmente contra herbívoros, ya sea directamente o por estar envueltas en el proceso de coagulación del látex (Silva *et al.* 1997).

A pesar del esfuerzo en la caracterización de actividades proteolíticas de látex de plantas, quedan numerosas especies por estudiar, las cuales se encuentran en ambientes pocos explorados y que albergan una alta diversidad de especies vegetales los cuales, a su vez pueden poseer una diversidad en propiedades moleculares. Tal es el caso de la selva nublada andina (delimitada por encima de los 1700 m.s.n.m y con un límite superior definido por el paramo entre 2700 a 3000 m.s.n.m) (Ataroff y Sarmiento 2004). En este ecosistema están presentes algunas especies laticíferas pertenecientes a las familias Caricaceae, Apocynaceae, Campanulaceae, Clusiaceae, Pavaveraceae y Moraceae. En esta investigación se estudio la actividad proteolítica de una liana laticífera de la especie *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Hemsl. de la familia Apocynaceae y proveniente de la selva nublada andina, con el objeto de caracterizar sus propiedades enzimáticas e identificar tipo de proteasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El latex de *M. veraguasensis* se extrajo por incisión de tallos con diámetro delgado (0.2-0.5 cm), se colectó en tubos de microcentrifuga y se transporto en hielo para su procesamiento en el laboratorio. El material fue colectado en Monte Zepa en la sierra de la Culata a 2000 msnm. El látex se diluyó 1:1 en tampon A (Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, pH 7.5) y se centrifugó a 13.400 x g durante 10 minutos. Después de la centrifugación se formó una fase acuosa (inferior) y una fase sólida (superior) conteniendo el polímero de isoprenoides o caucho. Se colectó la fase acuosa y se centrifugó dos veces más hasta eliminar

completamente los restos de caucho en la muestra. Se determinó la concentración de proteína de la fase acuosa por el método de Bradford (Bradford 1976). Las proteínas fueron visualizadas por electroforesis en poliacrilamida en presencia de SDS (Laemmli 1970) en presencia y ausencia de  $\beta$ -mercaptoetanol. Los geles fueron coloreados con azul de Coomassie R250 al 0.1% y decolorados con una solución de metanol 30% y ácido acético al 10%. Para la detección de proteasas se utilizaron zimografías. Para esta técnica, geles de poliacrilamida fueron copolimerizados con 0.2% de diferentes sustratos (caseína, gelatina, fibrinógeno y hemoglobina). Las muestras fueron preparadas en el mismo tampón de electroforesis con SDS pero en ausencia de agentes reductores. Una vez corrido (100 V constantes), el gel fue sometido a lavados con Triton X-100 2.5 % y posteriormente incubados en tampón A durante 12 horas a 37 °C. Los zimogramas fueron coloreados y decolorados como fue especificado anteriormente. Las proteasas fueron visualizadas como una banda translúcida. En diferentes experimentos se variaron el pH, la fuerza iónica del tampón de incubación y la temperatura. Para la determinación del tipo de proteasa se incubaron los zimogramas con diferentes inhibidores de proteasas específicos para cada tipo de proteasa: para serina-proteasas, *fenil-metil-sulfonil-fluoruro* (PMSF); para metaloproteasas, ácido etilendiamintetracético (EDTA); para cisteina-proteasas, E-64 y para aspártico-proteasas, pepstatina. El pH de la fase acuosa del látex fue determinada usando indicadores de pH en papel. La actividad en zimogramas pudo ser semicuantificada por densitometría utilizando el programa Image J.

## RESULTADOS

El látex de *M. veraguasensis* fue analizado por zimografía utilizando diferentes sustratos. Una actividad proteasa fue revelada en presencia de gelatina (Figura 1A), independientemente de la concentración de proteína cargada en el gel. Ninguna o muy poca actividad fue revelada usando caseína, albúmina, fibrinógeno y hemoglobina como sustrato (datos no mostrados), indicando

que el látex de *M. veraguasensis* posee una proteasa con actividad colagenolítica. Esta actividad es mayor cuando el látex es extraído de tallos delgados (0.2-0.5 cm) comparado con tallos medianos (0.7-1.5 cm) y gruesos (2-3.5 cm) (Figura 1B). La proteasa posee mayor actividad a pH 7.5 reduciéndose su actividad en un 70% a pH ácido (Figura 2). El pH del látex resultó ser ácido (~5.5). El efecto de la temperatura sobre la actividad proteasa también fue determinada encontrándose una temperatura óptima de alrededor de 38 °C (Figura 3). Sin embargo, a 70 °C la proteasa conserva el 80% de su actividad, indicando que la proteasa del látex de *M. veraguasensis* es resistente a altas temperaturas. Esta proteasa no fue activada por el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol (datos no mostrados) sugiriendo que ésta no posee un residuo de cisteína en su sitio activo tal como el caso de la papaina, bromelina y ficina. Varios inhibidores fueron probados sobre la actividad proteasa en zimografías. Como es mostrado en la Figura 4, solo se obtuvo inhibición por el PMSF (inhibidor de serina-proteasas). No se observó inhibición con EDTA (inhibidor de metalo-proteasas) ni con E64 (inhibidor de cisteína-proteasas) ni con pepstatina A (inhibidor de aspártico-proteasas). Este resultado sugiere que la proteasa del látex de *M. veraguasensis* es una serina-proteasa. Siguiendo la nomenclatura utilizada para otras proteasas de látex de plantas hemos denominado mandevilina a la proteasa del látex de *M. veraguasensis*.

La abundancia de la proteasa en la fase acuosa del látex con respecto a la proteína total se determinó comparando la movilidad electroforética de la proteasa en el zimograma con respecto a la movilidad en un gel de electroforesis corrido bajo las mismas condiciones que el zimograma pero sin sustrato proteico. La Figura 5 muestra ambas corridas electroforéticas. Un análisis densitométrico de las bandas en el gel sin sustrato indica que la proteasa constituye el 35% de la proteína total de la fase acuosa del látex. Utilizando una curva de calibración se determinó que el peso molecular de la enzima es de 77 kDa. La concentración de proteínas de esta fase fue 1.8 mg/ml, por lo tanto considerando el peso molecular de la proteína y asumiendo una estructura monomérica, se puede estimar que la

concentración de esta proteasa en la fase acuosa del látex es de 8.2  $\mu$ M.

## DISCUSIÓN

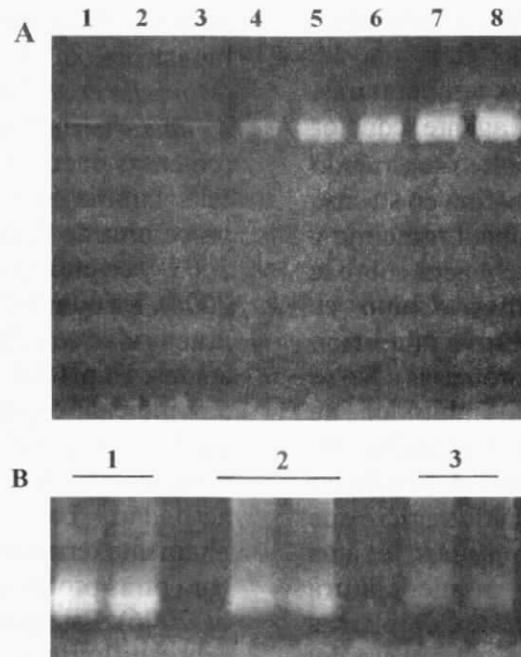
El látex de la liana *M. veraguasensis* contiene una proteasa de la clase serina-proteasas y denominada mandevilina en este trabajo. Esta proteasa mostró una especificidad de sustrato hacia gelatina. En el látex de otras especies de la familia Apocynaceae se han encontrado proteasas con especificidad hacia caseína, tal es el caso de la carneína de *Ipomoea carnea* (Patel *et al.* 2007), funastrina cI y cII de *Funastrum clausum* (Morcelle *et al.* 2004) y las araujianias hII y hIII de *A. hortorum* (Obregón *et al.* 2001). Varias otras proteasas encontradas en el látex de miembros de esta familia son de amplio espectro como la proceraina de *C. procera* (Dubey y Jagannandham 2003) y criptolepaina de *C. buehneri* (Pande *et al.* 2006). La mandevilina mostró una dependencia de la actividad con el pH, decayendo su actividad a pH ácidos. El pH del látex de *M. veraguasensis* es de 5.5, indicando que esta enzima tiene baja actividad en los tubos laticíferos siendo éste un posible mecanismo de regulación intracelular de la actividad. La proteasa estudiada resultó ser altamente termoestable, hecho que se ha reportado para otras proteasas de fuentes vegetales (Yadav *et al.* 2006). Esta propiedad la hace útil para procesos biotecnológicos en donde se requiere una estabilidad a altas temperaturas.

Un análisis electroforético del látex mostró pocas proteínas indicando que, aunque el látex es una fracción citoplasmática de los tubos laticíferos, solo algunas proteínas se encuentran en abundancia. De estas pocas proteínas, la proteasa estudiada representa un 35% de las proteínas totales de la fase acuosa del látex que corresponde a una concentración de 8.2  $\mu$ M. Este valor es alrededor de 100 veces menor que la concentración de proteasas de *C. papaya* (1mM) (Obergh *et al.* 1998). A pesar de que el contenido de proteasa en *M. veraguasensis* es mucho menor que el de *C. papaya*, el hecho de corresponder al 35% de las proteínas totales indica una abundancia relativamente alta de la proteasa en este látex. Esta abundancia sugiere una función importante en el látex. Varias funciones han sido atribuidas a las

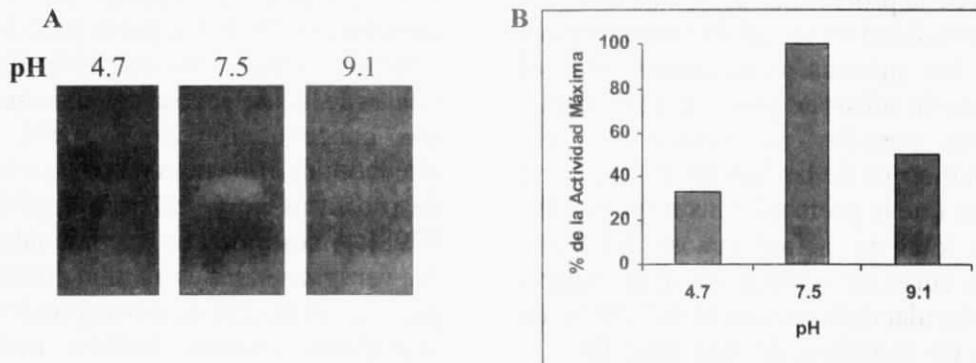
proteasas del látex relacionadas a mecanismos de defensa contra predadores y patógenos. Entre estas funciones está la de la coagulación del látex (El Moussaoui *et al.* 2001).

A la fecha se han determinado proteasas en el látex de varias especies de la familia Apocynaceae, perteneciendo la mayoría al grupo de la cisteína-proteasas. Las enzimas del látex de *M. veraguasensis*, *W. tinctoria* y *C. buchanani* (Thomar *et al.* 2008, Pande *et al.* 2006) serían las

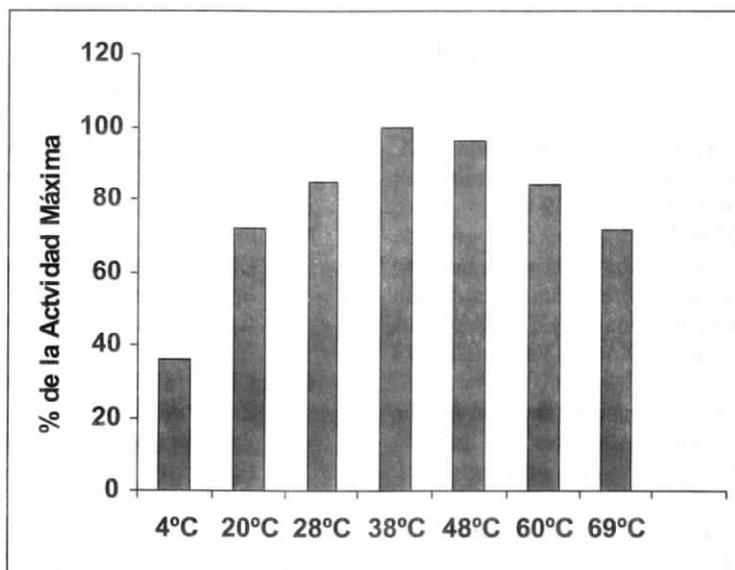
únicas serina-proteasas estudiadas dentro de esta familia. Todas las especies con cisteína-proteasas de esta familia pertenecen a la sub-familia Asclepiadoideae, en cambio *M. veraguasensis* y *W. tinctoria* pertenecen a las subfamilia Apocynoideae, y *C. buchanani* a la familia Periplocoideae. Sería interesante entonces conocer el tipo de proteasas que poseen otras especies de estas mismas sub-familias para comprobar si el tipo de proteasa del látex puede tener utilidad taxonómica.



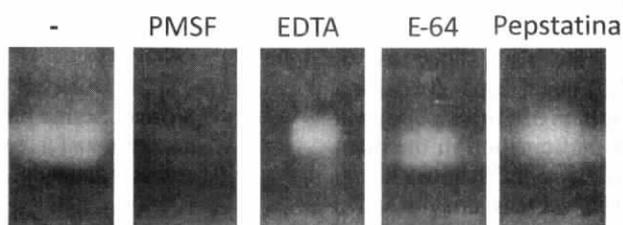
**Figura 1.** Zimografía de látex de *M. veraguasensis*. **A.** Fase acuosa a diferentes concentraciones de proteínas (1, 0.045  $\mu\text{g}$ ; 2, 0.23  $\mu\text{g}$ ; 3, 0.45  $\mu\text{g}$ ; 4, 0.9  $\mu\text{g}$ ; 5, 2.25  $\mu\text{g}$ ; 6, 4.5  $\mu\text{g}$ , 7, 6.75  $\mu\text{g}$  8, 9  $\mu\text{g}$ ). **B.** Muestras de fase acuosa del látex extraído de tallos delgados (1), medianos (2) y gruesos (3). Cada muestra por duplicado.



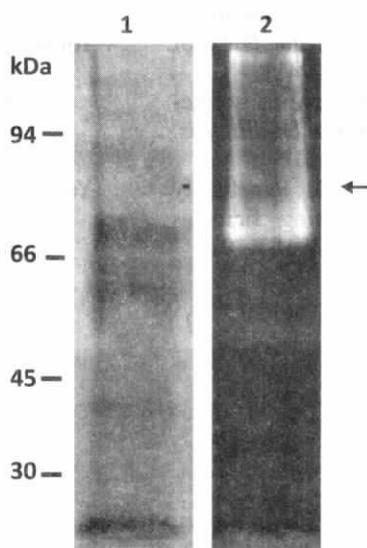
**Figura 2.** Zimografía de látex de *M. veraguasensis* a diferente pHs. **A.** Zimogramas a los pHs especificados. **B.** Análisis de los zimogramas por densitometría.



**Figura 3.** Dependencia con la temperatura de la actividad proteasa del látex de *M. veraguasensis*.



**Figura 4.** Zimografía de látex de *M. veraguasensis* en presencia de inhibidores de proteasas. -, ausencia de inhibidor; PMSF, inhibidor de serina-proteasas; EDTA, inhibidor de metaloproteasas; E-64, inhibidor de cisteína-proteasas y pepstatina, inhibidor de aspártico-proteasas.



**Figura 5.** Electroforesis en gels de poliacrilamida (10%) en presencia de SDS (1) y zimograma (2) de látex de *M. veraguasensis*. Las movilidades de los marcadores de peso molecular son señaladas. Las muestras fueron corridas en ausencia de agentes reductores. La flecha indica la proteasa en los dos gels.

## LITERATURA CITADA

- Arima, K., T. Uchikoba, H. Yonezawa, M. Shimada y M. Kaneda. 2000. Cucumisin-like protease from the latex of *Euphorbia supine*. *Phytochem.* 53: 639-644.
- Ataroff, M. y L. Sarmiento. 2004. Las unidades ecológicas de los Andes de Venezuela. In: La Marca, E. y P.J. Soriano (Eds.) Reptiles de los Andes de Venezuela. Fundación Polar, Conservación Internacional, CODEPRE-ULA Fundacite-Mérida, BIOGEOS, Mérida, Venezuela. 173 p.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248254.
- Azarkan, M., A. Amrani, M. Nijs, A. Vandermeers, S. Zerhouni, N. Smolders, y Y. Looze. 1997. *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. *Phytochem.* 46: 1319-1325.
- Dubey, V.K. y M.V. Jagannadham. 2003. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. *Phytochem.* 62: 1057-1071.
- El Moussaoui, A., M. Nijs, C. Paul, R. Wintjens, J. Vincentelli, M. Azarkan y Y. Looze. 2001. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 556-570.
- Kramer D.E y J.R. Whitaker. 1964. Ficus enzymes. II. Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* variety *kadota*. *J. Biol. Chem.* 239: 2178-2183.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Liggieri, C., M.C. Arribére, S.A. Trejo, F. Canals, F.X. Avilés y N.S. Priolo. 2004. Purification and biochemical characterization of asclepain c I from the latex of *Asclepias curassavica* L. *Protein J.* 23,403-411.
- Lynn, K.R. y N.A. Clevette-Radford. 1986. Hevains: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. *Phytochem.* 25, 2279-2282.
- Monter, B., B. Herzog, P. Stehle y P. Fürst. 1991. Kinetically controlled synthesis of dipeptides using ficin as biocatalyst. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 14: 183-191.
- Morcelle, S.R., N.O. Caffini y N. Priolo. 2004. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. *Fitoterapia* 75: 480-493.
- Moulin, A., M. Teissère, C. Bernard y G. Piéroni. 1994. Lipases of the euphorbiaceae family: purification of a lipase from *Euphorbia characias* latex and structure-function relationships with the B chain of ricin *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91: 11328-11332.
- Oberg, K.A., J.M. Ruyschaert, M. Azarkan, N. Smolders, S. Zerhouni, R. Wintjens, A. Amrani y Y. Looze, Y. 1998. Papaya glutamine cyclase, a plant enzyme highly resistant to proteolysis, adopts an all-beta conformation. *Eur. J. Biochem.* 258: 214-222.
- Obregón, W.D., M.C. Arribére, S. Morcelle del Valle, C. Liggieri, N. Caffini y N. Priolo. 2001. Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* 20: 317-325.
- Patel, A.K., V.K. Singh y M.V. Jagannadham. 2007. Carnein, a serine protease from noxious plant weed *Ipomoea carnea* (morning glory). *J. Agric. Food Chem.* 55: 5809-5818.
- Pande, M., V. Dubey, S.C. Yadav y M.V. Jagannadham. 2006. A novel Serine protease cryptolepain from *Cryptolepis buchmanani*: purification and biochemical characterization. *J. Agric. Food Chem.* 54: 10141-10150.
- Priolo, N., S. Morcelle del Valle, M.C. Arribére, L. López y N. Caffini. 2000. Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.* 19: 39-49.
- Silva, L.G., O. Garcia, M.T. Lopes. y C.E. Salas. 1997. Changes in protein profile during coagulation of latex from *Carica papaya*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 615-619.
- Tomar R, R. Kumar y M.V. Jagannadham. 2008. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1479-1487.
- Yadav, S.C., M. Pande y M.V. Jagannadham. 2006. Highly stable glycosylated serine protease from the medicinal plant *Euphorbia milii*. *Phytochem.* 67: 1414-1426.