

## ESTUDIO DE UNA SERIN PROTEASA TIPO QUIMOTRIPSINA AISLADA DEL INSECTO *Prostephanus truncatus* Horn.

Aguirre Mancilla C.L.<sup>1</sup>, Castro Guillen J. L.<sup>2</sup>, Mendiola Olaya E.<sup>2</sup>, Contreras Rivera L.<sup>2</sup>, González de la Vara L.<sup>2</sup>, Blanco Labra A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Roque, Coordinación de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 8 Carretera Celaya-Juventino Rosas, C.P. 38110, Celaya, Gto. <sup>2</sup>Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Km 9.6 libramiento norte carretera Irapuato-León, C.P. 36820, Irapuato, Gto.

### RESUMEN

Se purificó y caracterizó una proteasa tipo quimotripsina de larvas de tercer instar del barrenador mayor de los granos (*Prostephanus truncatus*), insecto plaga muy destructivo de maíz y yuca. La purificación de esta proteasa se llevó a cabo mediante precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de líquidos de alta resolución en una columna de FPLC superosa 12. La enzima purificada mostró un peso molecular aparente de 31 kDa, un pH óptimo de 7.0 y un rango de actividad entre pH 6 y 8, en tanto su temperatura óptima fue de 60 °C. Las constantes cinéticas de Km para el sustrato sintético N-Succinil Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilida (559 μM) fue 16 veces más alto que el mostrado para quimotripsina bovina (35.11 μM). La kcat (Vmax/[E]<sub>T</sub>) para la proteasa del insecto 3533 s<sup>-1</sup> fue mucho más alta que la correspondiente kcat de la quimotripsina bovina (315 s<sup>-1</sup>), aunque sus eficiencias (kcat/Km) 6.3X10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para la enzima del insecto y 9X10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> para la quimotripsina bovina fueron similares.

### INTRODUCCIÓN

Para digerir las proteínas, los insectos usan diversas enzimas proteolíticas en un amplio rango de pH que va de lo ácido a lo alcalino (Terra y Ferreira, 1994; Nation, 2002). Ambos tipos han sido reportados en Coleópteros. En el caso de intestinos de *P. truncatus* se presenta un gradiente de pH que va de 4.2 a 6.2 (Vázquez-Arista, 1999). Se han reportado diferentes tipos de proteasas en el intestino de este insecto (Vázquez-Arista, 1999; Brioschi et al. 2007).

La diversidad de proteasas digestivas relacionada con un estrecho gradiente de pH es característico de un tipo de digestión no especializada de esta plaga cosmopolita de granos almacenados, sirviendo como mecanismo para una eficiente incorporación de una amplia variedad de dietas con diferentes proteínas de almacenamiento e inhibidores. Además, debido a que las larvas de los insectos crecen en dietas variadas que contienen diversidad en inhibidores de proteasas, también existen diferentes proteasas digestivas como una respuesta adaptativa (Oppert et al. 2005), Brioschi et al. (2007). Esto implica que los insectos tienen un gran repertorio de enzimas digestivas que les permite su adaptación a los alimentos que ellos consumen

Por otro lado, los inhibidores de proteasas juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de insectos, reduciendo su capacidad digestiva por la inhibición específica de algunas proteasas, reduciendo el crecimiento y desarrollo del insecto (Broadway and Duffey, 1986). De tal forma, que los inhibidores de proteasas pueden ser usados como una alternativa para el control de insectos plaga. (Elden, 1995). En el caso de

del inhibidor de tripsina de chan (*Hyptis suaveolens*) (HSTI), se conocía su capacidad de inhibir a la gran mayoría de las proteasas tipo tripsina, excepto una de tipo quimotripsina presente en el intestino de *P. truncatus* (Aguirre et al. 2004). El objetivo de este trabajo fue purificar y caracterizar esta enzima.

## MATERIALES Y METODOS

Las larvas de tercer instar del insecto *P. truncatus* fueron extraídas de granos de maíz infestados, producidos en insectario y posteriormente congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su posterior utilización.

Extracción enzimática.

Se realizó un extracto inicial con las larvas de tercer instar del insecto con buffer Tris-HCl 0.01 M, pH 7.5, 1:4 (p/v) a  $4^{\circ}\text{C}$  por un periodo de 1 h. El material insoluble fue eliminado por centrifugación a  $18000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Este extracto fue precipitado al 70% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . El precipitado fue separado y dializado contra agua. Esta solución (extracto enzimático), se utilizó para las posteriores etapas de purificación.

Cromatografía de exclusión molecular en gel (Sephadex G-75).

El extracto enzimático (15 mg de proteína, aproximadamente) se aplicó a una columna de Sephadex G-75 (167 X 2.25 cm) equilibrada con bicarbonato de amonio 0.02M pH 7.8. Se colectaron fracciones de 4 ml a las cuales se les determinó absorbencia a 280 nm y actividad tipo quimotripsina. Las fracciones que presentaron actividad fueron colectadas y concentradas por ultrafiltración.

Cromatografía de intercambio iónico.

Las fracciones activas de la etapa anterior se aplicaron a una columna de intercambio aniónico (Econo-Pac® High Q, 1 x 5 cm) equilibrada con Tris 0.01 M, pH 8.5. La proteína adsorbida por la matriz fue eluída con un gradiente de concentración lineal desde 0 a 0.2M de NaCl en Tris 0.01M (pH 8.5). A estas fracciones se les midió absorbencia a 280 nm y actividad tipo quimotripsina. Las fracciones con actividad fueron concentradas y desaladas por ultrafiltración.

Cromatografía de filtración en columna de FPLC

Las fracciones con actividad tipo quimotripsina obtenidas por intercambio iónico, se sometieron por separado a cromatografía a través de una columna de filtración FPLC Superose 12 (Amersham) utilizando un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) modelo 1050 de Hewlett-Packard. La proteína fue eluída en buffer Tris-HCl 0.02 M pH 8, a una velocidad de flujo de 0.4 ml/min, monitoreándose la absorbencia a 220 nm. El pico con actividad fue congelado y liofilizado. Las fracciones fueron sometidas a electroforesis para evaluar su pureza y posterior caracterización.

## RESULTADOS

Se purificó a homogeneidad una proteasa tipo quimotripsina presente en el intestino de larvas de tercer instar del insecto *P. truncatus*. Esta enzima mostró un peso molecular aparente de 31 kDa en gel de poliacrilamida al 10%, fue purificada con un factor de 12.8, para la purificación se usó primeramente precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión molecular, y cromatografía de intercambio iónico, esta muestra posteriormente fue purificada a través de una columna de FPLC acoplado a un equipo de HPLC. La enzima purificada tuvo un pH óptimo de actividad de 7.0 y una temperatura óptima de  $60^{\circ}\text{C}$ . Su punto isoelectrico fue de 3.5

Las constantes cinéticas para la enzima del insecto muestran una  $K_m$  de 559  $\mu\text{M}$  usando SAAPFpNA como sustrato. Sin embargo, esta enzima no fue capaz de hidrolizar BTEE y BTpNA, los cuales se conoce que son sustratos específicos para quimotripsina bovina. Usando el valor de  $V_{max}$ , se encontró que la  $K_{cat}$  de la enzima fue de  $3533 \text{ s}^{-1}$  y su eficiencia ( $k_{cat}/K_m$ ) fue de  $6.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , en tanto que la  $k_{cat}$  de la quimotripsina bovina para el mismo sustrato fue de  $315 \text{ s}^{-1}$  y su eficiencia fue de  $9 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Esta enzima no fue reconocida por el inhibidor de proteasas de Chan, el cual fue capaz de inhibir a la mayoría de las enzimas intestinales tipo tripsina de *P. truncatus*. Finalmente, resulta importante la caracterización de las enzimas digestivas de los insectos, particularmente si se propone la utilización de inhibidores de proteasas específicos para su posible control.

#### Bibliografía.

Aguirre, C., Valdés-Rodríguez, S., Mendoza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A. Blanco-Labra, A. 2004. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 138, 81-89.

Brioschi, D., Nadalini L.D., Bengtsonb M.H., Sogayarb M.C., Moura D.S., Silva-Filho M.C. 2007. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37, 1283–1290

Broadway, R.M., and Duffey, S.S. 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 32, 827-833.

Elden, T.C. 1995. Selected proteinase inhibitor effects on alfalfa weevil (Coleoptera:Curculionidae) growth and development. *Journal of Economic Entomology* 88, 1586-1590.

Nation, J.L., 2002. Digestion. *Insect Physiology and Biochemistry*. In CRC Press, Boca Raton, pp. 27-63.

Oppert, B., Morgan. T.D., Culbertson, C., Kramer, K.J. 1993. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 105, 379-385.

Terra, W.R., Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 109, 1-62.

Vázquez-Arista M., Smith, R.H., Martínez-Gallardo, N.A., Blanco-Labra, A. 1999. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Stored Products Research* 35, 167-174.