

POLIMORFISMO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INHIBIDORES BOWMAN-BIRK EN LEGUMINOSAS



Tesis Doctoral

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN
Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS



MARÍA DEL CARMEN ARQUES MENGUAL

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: María del Carmen Arques Mengual

ISBN: 978-84-9163-303-7

URI: <http://hdl.handle.net/10481/47431>

Ilustración de portada:

“Las leguminosas como fuente de inhibidores de proteasas de la familia Bowman-Birk, cuyos dominios de inhibición están indicados en verde y rojo”

Por Ariel Disabato

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)

DPTO. DE FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA DE LA NUTRICIÓN ANIMAL

Y

UNIVERSIDAD DE GRANADA (UGR)

FACULTAD DE FARMACIA

**POLIMORFISMO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE LOS INHIBIDORES BOWMAN-BIRK
EN LEGUMINOSAS**

MARÍA DEL CARMEN ARQUES MENGUAL

Granada, 2017

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

ESTACIÓN EXPERIMENTAL DEL ZAIDÍN (EEZ)

DPTO. DE FISIOLÓGIA Y BIOQUÍMICA DE LA NUTRICIÓN ANIMAL

Y

UNIVERSIDAD DE GRANADA (UGR)

FACULTAD DE FARMACIA

POLIMORFISMO Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INHIBIDORES BOWMAN-BIRK EN LEGUMINOSAS

Tesis Doctoral presentada por:

MARÍA DEL CARMEN ARQUES MENGUAL

Realizada bajo la dirección de los doctores:

Alfonso Clemente Gimeno

José Ángel Rufián Henares

PROGRAMA OFICIAL DE DOCTORADO EN NUTRICIÓN

Y CIENCIA DE LOS ALIMENTOS



Estación Experimental del Zaidín
Dpto. de Fisiología y Bioquímica
de la Nutrición Animal



Consejo Superior de
Investigaciones Científicas



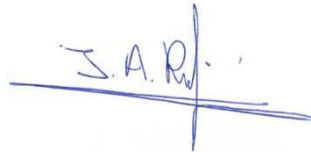
Universidad de Granada
Facultad de Farmacia

La doctoranda, María del Carmen Arques Mengual, y los directores de tesis, Alfonso Clemente Gimeno y José Ángel Rufián Henares, garantizamos, al firmar esta Tesis Doctoral, titulada “Polimorfismo y actividad biológica de los inhibidores Bowman-Birk en leguminosas”, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 01 abril de 2017.

Directores de la Tesis

Doctoranda



**Alfonso
Clemente Gimeno**

**José Ángel
Rufián Henares**

**María del Carmen
Arques Mengual**

El trabajo expuesto forma parte del proyecto “Propiedades anti-proliferativas de los inhibidores Bowman-Birk de leguminosas en modelos celulares de colon. Identificación de serín proteasas como dianas terapéuticas (AGL2011-26353)”, concedido por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

La dirección de esta Memoria de Tesis Doctoral la han llevado a cabo los doctores Alfonso Clemente Gimeno y José Ángel Rufián Henares, del Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ, CSIC) y del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada (UGR), respectivamente.

Los resultados que recoge esta Tesis Doctoral forman parte de las siguientes publicaciones científicas:

- **Arques, M.C.**; Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Clemente, A.; Rufián-Henares, J.A. Relationship between glycation and polyphenol content and the bioactivity of selected commercial soymilks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2016**, *64* (8), 1823-1830. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00181.
- Clemente, A.; **Arques, M.C.**; Dalmais, M.; Le Signor, L.; Chinoy, C.; Olías, R.; Rayner, T.; Isaac, P.G.; Lawon, D.L.; Bendahmane, A.; Domoney, C. Eliminating anti-nutritional plant food proteins: the case of seed protease inhibitors in pea. *PLOS ONE* **2015**, *10* (8), e0134634. doi: 10.1371/journal.pone.0134634.
- Clemente, A.; **Arques, M.C.** Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology* **2014**, *20* (30), 10305-10315. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10305.
- Soria, A.; Porras, P.; Moya, F.J.; Sánchez, N.; Rodríguez, B.; Ruiz, M.L.; Alché, J.D.; **Arques, M.C.**; Castro, A.J.; Clemente, A. Internalization of the anti-carcinogenic IBB1, a major Bowman-Birk isoinhibitor from soybean (*Glycine max*), in HT29 colon cancer cells. *High School Students for Agricultural Science Research* **2014**, Vol. III, 59-67.
- **Arques, M.C.**; Marín-Manzano, M.C.; Brito da Rocha, L.C.; Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Clemente, A. Quantitative determination of active Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, in commercial soymilks. *Food Chemistry* **2014**, *155*, 24-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.024.
- Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes in disease prevention and therapy. In: *Bioactive food peptides in health and disease* (ISBN 980-953-307-472-1) **2013**, Chapter 2, 23-44. doi: 10.5772/51262.

➤ Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; Jiménez, E.; **Arques, M.C.**; Domoney, C. The anti-proliferative effects of TI1B, a major Bowman-Birk iso inhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells are mediated through protease inhibition. *British Journal of Nutrition* **2012**, *108*, S135-S138. doi: 10.1017/S000711451200075X.

En preparación:

➤ Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Olías, R.; Castro, A.J.; Alché, J.D.; Domoney, C.; Clemente, A. The anti-proliferative properties of Bowman-Birk inhibitors from pea (*Pisum sativum*) on HT29 colon cancer cells is associated to both trypsin- and chymotrypsin-like protease inhibition.

Así mismo, han sido presentados los resultados de esta Tesis Doctoral en los siguientes congresos nacionales e internacionales:

➤ Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Olías, R.; Rubio, L.A.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and mammalian gut health. Oral communication. *2nd International Legume Society Conference* (11th-14th Oct **2016**, Troia, Portugal).

➤ Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Olías, R.; Rubio, L.A.; Domoney, C. Beneficial effects of Bowman-Birk inhibitors from legumes in gut health. Oral communication. *1st International Conference on Food bioactives & Health* (13th-15th Sep **2016**, Norwich, Reino Unido).

➤ Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Olías, R.; Rubio, L.A.; Domoney, C.; Clemente, A. What makes Bowman-Birk inhibitors from legumes indigestible? Poster communication. *4th International Conference on Food Digestion* (17th-19th Mar **2015**, Nápoles, Italia).

➤ Cruz-Huerta, E.; Fernández-Tomé, S.; **Arques, M.C.**; Amigo, L.; Recio, I.; Clemente A.; Hernández-Ledesma, B. Behaviour of soybean peptide lunasin under simulated gastrointestinal digestion: protective effect of Bowman-Birk protease inhibitor. Poster communication. *4th International Conference on Food Digestion* (17th-19th Mar **2015**, Nápoles, Italia).

- **Arques, M.C.**; Marín-Manzano, M.C.; Domoney, C.; Clemente, A. Association between protease inhibitory activity of Bowman-Birk inhibitors and anti-proliferative effect in colon cancer cells. Oral communication. *XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas* (24th- 26th Sep **2014**, Granada, España).

- Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Domoney, C. The anti-proliferative effect of Bowman-Birk inhibitors on HT29 colon cancer cells is associated with the inhibition of serine proteases. Oral communication. *20th International Congress of Nutrition* (15th - 20th Sep **2013**, Granada, España).

- Clemente, A.; **Arques, M.C.**; Chinoy, C.; Dalmais, M.; LeSignor, C.; Bendahmane A.; Domoney, C. Induced mutations in the TII1 gene encoding a major double-headed protease inhibitor in *Pisum sativum* L. can reduce significantly the inhibition of target enzymes. Poster communication. *1st Legume Society Conference: a legume odyssey* (9th-11th May **2013**, Novi Sad, Serbia).

- **Arques, M.C.**; Marín-Manzano, M.C.; Clarissa Brito da Rocha, L.C.; Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Clemente, A. Quantitative determination of active Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, in commercial soymilks. Poster communication. *2nd International Conference on Food Digestion* (6th-8th Mar **2013**, Madrid, España).

- Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Brito da Rocha, L.C.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes in disease prevention and therapy. Poster communication. *2nd International Conference on Food Digestion* (6th-8th Mar **2013**, Madrid, España).

- Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Rubio, L.A.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors can survive mammalian digestion and exert an anti-proliferative effect on colon cancer cells. Poster communication. *1st International Conference on Food Digestion* (19th-21st Mar **2012**, Cesena, Italia).

A Granada

AGRADECIMIENTOS

Es complicado saber por dónde empezar a agradecer cuando, si echas la vista atrás, recuerdas que todo empezó como una locura. Gracias Estefanía y Laura por cometerla. Gracias al resto del grupo del 8.5, Arantxa, Amparo, Marta, Martesca, Bea, Gustavo, en donde incluyo sin dudarle a Fu y Sabud, porque no pudimos formar un grupo de máster mejor, creando nuestra *Villaparra* particular con alcaldesa incluida, más pipas transgénicas con las que trasnochar. Pero sin duda, gracias a mi director de tesis Alfonso, por confiar en mí aun cuando ninguna beca lo hacía. Gracias por todos estos años en los que me he llevado muchísimo de ti, a nivel profesional, pero sobre todo personal. Porque han sido muchas horas de trabajo, correcciones e imprevistos, que hoy demuestran que todo mereció la pena. Gracias por cada una de las etapas que hemos pasado y por esta bonita sensación de que nunca me iré del todo. Gracias a mi tutor y director de tesis José Ángel por no dejarme flaquear, porque tus palabras de ánimo han sido constantes en estos últimos años.

Quiero agradecer a toda la gente de Armilla por abrirme los brazos desde el principio. En especial a Mamen y Eli, porque esta tesis también es vuestra. Gracias Mamen por enseñarme a trabajar con elegancia, por nuestras charlas y porque las puertas de tu casa siempre estuvieron abiertas. Gracias Eli por mi forma de trabajar a día de hoy, nadie dijo que llevar cinco *timers* sería fácil... Simplemente gracias por quererme como lo haces. Gracias Raquel Olías por tu llegada, porque poco a poco me fuiste llenando con tu apoyo y tu cariño. A Leti, por nuestras conversaciones interminables, por hablarme como a una adulta aunque aún fuera “muy pequeña” y porque sé lo orgullosa que estás de verme batallar con ingleses. Gracias Rafa por estar siempre ahí, porque tu amistad es de las cosas más bonitas que me llevo de esta tesis. *A Clarissa, um muito obrigada por tudo o que me tem ensinado nesta jornada.* Gracias María Jesús por ser una compañera de despacho excepcional, porque nos secamos más de una lágrima, pero aprendimos a ser fuertes juntas.

Gracias a Mariluz y Lucre por las risas en cada comida, así como a Eva y Thays, por estar siempre pendientes de mí aunque esté lejos. Gracias Anita por tu eterna sonrisa y Raquel Ruíz por tu cariño. Y gracias al resto de “chanclas”, Gonzalo, Jose, Isa, Patri, Migue, Alfonso, Pablo, Silvia, Isabel, Ana Haro, Julia, Eva Cristina, Rosa, Irene... Aún echo de menos nuestros viernes de Piyayo. Gracias al resto de científicos titulares de la EEZ, en especial a David, porque imagino que me está editando el video de la tesis en compensación por su cumple, ¡yo también quiero rock! Gracias también a Cristina, por toda su ayuda, y a Ignacio Martín, Luis Rubio, Rosa, Edu, Ignacio

Fernández, Manolo, Luis Lara e Isabel, porque cada vez que vuelvo al centro solo recibo muestras de cariño. Gracias a Lourdes y Ana Esteban, a Juan por su sentido del humor y a Paco. Gracias a Mari, M^a Ángeles y María por mirarme preocupadas cada vez que pasaba con cubos llenos de agua, así como a Antonio, Ricardo y Pedro, por darme los primeros y últimos saludos de cada día.

Gracias a mi familia por oírme hablar de la tesis sin rechistar. A mi abuela, por enseñarme que ser positiva es más que una forma de vida. Pero en especial a mis padres, porque me enseñaron a ser constante y a luchar por lo que quiero. Sé el esfuerzo que habéis hecho durante muchos años por mi futuro profesional y, aunque este país no me deje recompensaros teniéndome cerca, creerme cuando os digo que merecí la pena. Gracias a mi hermano, que me admira sin saber que él vale mucho más que yo, y a Mari Carmen, por la forma en que nos cuida. Gracias a mi familia Disabato, en especial a Ariel, el artista de la portada de esta tesis, y a Nati, que lleva llamándome doctora desde hace años. Gracias Donato y Regina por entenderme y darme ánimos siempre. Gracias a todos mis amigos, en especial a Ana y Belén, porque no tengo hermanas pero las tengo a ellas. Gracias por fingir entender a lo que me dedico y por hacerme sentir siempre cerca aun llevando fuera de Murcia lo que parece una eternidad. No quiero olvidarme de ninguno de los que habéis estado ahí siempre. Gracias Javi por conseguir que jamás me sintiera sola y Juanpe, por esas charlas científicas tan interesantes. A Vicky, Inma, Marga, Isa, Merijous, mis amigos de Bolnuevo y mi pequeña Cris, porque nadie como tú ha sufrido el proceso de escritura de esta tesis. Pero sobre todo a mi prima Ana, porque no hace falta hablar para saber lo que pensamos, y a Jesús por ser el niño de mis ojos.

I also want to thank all of my colleagues from the Institute of Genetic Medicine. Special thanks to my supervisor Drew Rowan for the opportunity to continue learning and developing my scientific career. To David Wilkinson, thank you very much for your help from the beginning, you do not realise how much I have learnt from you. Adrian Falconer *Something*, cheers for the banter and the continuous laughs. This also applies to David Hodgson; he is *canny* good. Thanks to Hua Lin for all our conversations. Thank you Nick Europe-Finner for entertaining us with your stories and chat. In general, thanks you to all Skeletal Research Group for making me feel at home. Pero sobre todo gracias a Amanda, porque sin esos ratitos en español nada sería lo mismo.

Por último, y más importante, darte las gracias a ti, Javi. Hiciste que mi estancia en Granada fuera la que siempre había soñado y, cuando las cosas se complicaron, me enseñaste a ser valiente y no tener miedo al cambio. Transformaste las tapas de Granada por los *fish & chips*, y las cañas por las pintas. Y no me has dejado tirar la toalla. Me faltarán vidas para agradecértelo. Te quiero.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIATURAS.....	27
LISTA DE TABLAS.....	31
LISTA DE FIGURAS.....	35
CLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS.....	41
RESUMEN/ABSTRACT.....	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1	SERÍN PROTEASAS.....	49
1.1.1	Serín proteasas y homeostasis celular.....	51
1.2	INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PLANTAS.....	52
1.2.1	Funciones fisiológicas de los inhibidores de proteasas en plantas.....	54
1.3	INHIBIDORES DE SERÍN PROTEASAS DE LA FAMILIA BOWMAN-BIRK...	55
1.4	POLIMORFISMO DE LA FAMILIA DE INHIBIDORES BOWMAN-BIRK.....	59
1.4.1	Variación de secuencia.....	59
1.4.2	Modificaciones postraduccionales.....	65
1.4.3	Oligomerización.....	67
1.5	PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE LOS INHIBIDORES BOWMAN-BIRK.....	69
1.5.1	Propiedades anti-nutricionales.....	69
1.5.2	Propiedades quimiopreventivas.....	71
1.6	INHIBIDORES BOWMAN-BIRK: SISTEMAS DE EXPRESIÓN Y VARIACIÓN INDUCIDA.....	79
1.6.1	Sistemas de expresión eucariotas para la producción de proteínas Bowman-Birk.....	79
1.6.2	Variación inducida en la secuencia de aminoácidos.....	81
1.7	INHIBIDORES BOWMAN-BIRK PRESENTES EN LECHEs DE SOJA COMERCIALES.....	82

2. OBJETIVOS

2.1	OBJETIVOS.....	87
-----	----------------	----

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	MICROORGANISMOS.....	91
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	91
3.1.2	<i>Pichia pastoris</i>	91
3.2	VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9.....	91
3.3	OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES.....	92
3.4	MEDIOS DE CULTIVO.....	94
3.4.1	Medio de cultivo de <i>E. coli</i>	94
3.4.2	Medios de cultivo de <i>P. pastoris</i>	94
3.4.2.1	Medios de crecimiento y selección de transformantes.....	94
3.4.2.2	Medios utilizados para la producción de proteína recombinante.....	94
3.5	MATERIAL VEGETAL.....	95
3.6	LÍNEAS CELULARES.....	95
3.7	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE PCR.....	96
3.8	MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR SOLAPANTE.....	98
3.9	ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ADN EN GELES DE AGAROSA.....	100
3.10	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	100
3.11	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE ADN.....	101
3.12	DIGESTIONES ENZIMÁTICAS DE FRAGMENTOS DE ADN.....	101
3.13	REACCIONES DE LIGACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9.....	101
3.14	TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. coli</i> MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO.....	102
3.14.1	PCR de colonia.....	102
3.14.2	Aislamiento de ADN plasmídico.....	103

3.15	SECUENCIACIÓN DE ADN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.....	103
3.16	TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GS115 DE <i>Pichia pastoris</i> MEDIANTE ELECTROPORACIÓN.....	104
	.	
3.16.1	Preparación de células electrocompetentes GS115.....	104
3.16.2	Electroporación de la cepa GS115.....	105
3.17	PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK RECOMBINANTES EN <i>Pichia pastoris</i>	105
3.17.1	Producción a pequeña escala.....	105
3.17.2	Producción a gran escala.....	106
3.18	METODOLOGÍA TILLING.....	107
3.19	PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK.....	109
3.19.1	Purificación de proteínas BBI recombinantes expresadas en <i>P. pastoris</i>	109
3.19.2	Purificación de proteínas BBI de semillas de guisante	110
3.19.3	Purificación de IBB1 e IBBD2, isoformas BBI mayoritarias de soja.....	111
	3.19.3.1 Separación de isoformas IBB1 e IBBD2 en preparaciones comerciales.....	111
	3.19.3.2 Purificación de proteínas BBI presentes en leches de soja comerciales y cuantificación de isoformas.....	112
3.20	OLIGOMERIZACIÓN DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK DE SEMILLAS DE GUISANTE	113
3.21	DETERMINACIÓN DE FUROSINA E HIDROXIMETILFURFURAL EN LECHES DE SOJA COMERCIALES.....	115
3.21.1	Cuantificación de furosina.....	115
3.21.2	Cuantificación de hidroximetilfurfural.....	116
3.22	SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CÍCLICOS QUE IMITAN A LOS DOMINIOS DE INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK.....	117
3.23	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	119
3.24	CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA.....	120
3.24.1	Actividad inhibidora de tripsina.....	120
	3.24.1.1 Ensayo semicuantitativo.....	120

3.24.1.2	Ensayo cuantitativo.....	121
3.24.2	Actividad inhibidora de quimotripsina.....	122
3.24.2.1	Sustrato BTEE.....	122
3.24.2.2	Sustrato BTPNA.....	123
3.24.3	Cinética enzimática.....	125
3.24.3.1	Determinación de K_m de las enzimas tripsina y quimotripsina	125
3.24.3.2	Determinación de K_i de proteínas BBI recombinantes y péptidos sintéticos derivados.....	125
3.25	GELES DE ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK...	126
3.26	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO.....	127
3.27	IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE HUELLA PEPTÍDICA.....	128
3.28	DETERMINACIÓN DE MASA MOLECULAR.....	128
3.29	ENSAYOS CELULARES.....	129
3.29.1	Análisis de proliferación celular en líneas celulares humanas (HT29 y CCD18-Co).....	129
3.29.2	Marcado con fluorescencia e internalización celular de proteínas BBI recombinantes en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.....	130
3.30	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	132

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK EXPRESADAS EN LA LEVADURA <i>Pichia pastoris</i>	135
4.1.1	Clonación de <i>TII</i>	135
4.1.2	Obtención de mutantes derivados de <i>TII</i> mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante.....	137
4.1.2.1	Mutante derivado rTII _{inactivo}	137
4.1.2.2	Mutante derivado rTII _{TrypTryp}	141
4.1.2.3	Mutante derivado rTII _{Chym-Chym}	144

4.1.3	Transformación de <i>P. pastoris</i> con <i>TII</i> y sus mutantes derivados.....	147
4.1.4	Producción de rTII y sus mutantes derivados en <i>P. pastoris</i>	149
4.1.5	Purificación de rTII y sus mutantes derivados mediante cromatografía de intercambio catiónico.....	150
4.1.6	Autenticación de rTII y sus mutantes derivados mediante análisis de huella peptídica y masa molecular.....	152
4.1.7	Caracterización funcional de rTII y sus mutantes derivados.....	155
4.1.8	Internalización de rTII y sus mutantes derivados en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.....	158
4.1.9	Actividad anti-proliferativa de rTII y sus mutantes derivados en líneas celulares humanas de colon.....	160
4.1.9.1	Propiedades anti-proliferativas de rTII y sus mutantes derivados en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.....	160
4.1.9.2	Propiedades anti-proliferativas de rTII y su mutante derivado rTII _{inactivo} en células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co.....	162
4.2	PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK EN SEMILLAS DE GUISANTE OBTENIDAS MEDIANTE METODOLOGÍA TILLING.....	165
4.2.1	Caracterización funcional de proteínas BBI en semillas de guisante obtenidas mediante metodología TILLING.....	167
4.2.2	Identificación de isoformas BBI en líneas silvestres de guisante.....	169
4.2.3	Identificación de isoformas BBI en líneas mutantes (C77Y, S85F y E109K) de guisante.....	171
4.2.3.1	Mutación C77Y.....	171
4.2.3.2	Mutación S85F.....	173
4.2.3.3	Mutación E109K.....	174
4.2.3.3.1	Perfil de oligomerización de las líneas silvestre y mutante E109K de guisante.....	176
4.3	PÉPTIDOS CÍCLICOS SINTÉTICOS QUE IMITAN A LOS DOMINIOS DE INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK.....	181
4.3.1	Síntesis de péptidos cíclicos y lineales que imitan a los dominios de inhibición de proteínas BBI.....	181
4.3.2	Caracterización funcional de péptidos sintéticos cíclicos y lineales que imitan a los dominios de inhibición de proteínas BBI.....	181

4.3.3	Propiedades anti-proliferativas de péptidos cíclicos sintéticos en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.....	185
4.4	PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK PRESENTES EN LECHEs DE SOJA COMERCIALES.....	189
4.4.1	Purificación de proteínas BBI mediante cromatografía de intercambio catiónico.....	189
4.4.2	Identificación de proteínas BBI y KTI de soja mediante análisis de huella peptídica.....	190
4.4.3	Caracterización funcional de proteínas BBI de soja.....	192
4.4.4	Cuantificación de proteínas BBI en leches de soja comerciales.....	193
4.4.5	Determinación de indicadores de la reacción de Maillard en seis leches de soja comerciales.....	197

5. CONCLUSIONES

5.1	CONCLUSIONES.....	203
-----	-------------------	-----

6. BIBLIOGRAFÍA

6.1	BIBLIOGRAFÍA.....	209
-----	-------------------	-----

7. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

7.1	Arques, M.C. ; Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Clemente, A.; Rufián-Henares, J.A. Relationship between glycation and polyphenol content and the bioactivity of selected commercial soymilks. <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> 2016 , 64 (8), 1823-1830. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00181.....	231
7.2	Clemente, A.; Arques, M.C. ; Dalmais, M.; Le Signor, L.; Chinoy, C.; Olías, R.; Rayner, T.; Isaac, P.G.; Lawon, D.L.; Bendahmane, A.; Domoney, C. Eliminating anti-nutritional plant food proteins: the case of seed protease inhibitors in pea. <i>PLOS ONE</i> 2015 , 10 (8), e0134634. doi: 10.1371/journal.pone.0134634.....	239
7.3	Clemente, A.; Arques, M.C. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. <i>World Journal of Gastroenterology</i> 2014 , 20 (30), 10305-10315. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10305.....	263
7.4	Soria, A.; Porras, P.; Moya, F.J.; Sánchez, N.; Rodríguez, B.; Ruiz, M.L.; Alché, J.D.; Arques, M.C. ; Castro, A.J.; Clemente, A. Internalization of the anti-carcinogenic IBB1, a major Bowman-Birk isoinhibitor from soybean (<i>Glycine max</i>), in HT29 colon cancer cells. <i>High School Students for Agricultural Science Research</i> 2014 , Vol. III, 59-67.....	275

- 7.5 **Arques, M.C.**; Marín-Manzano, M.C.; Brito da Rocha, L.C.; Hernández-Ledesma, B.; Recio, I.; Clemente, A. Quantitative determination of active Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, in commercial soymilks. *Food Chemistry* **2014**, *155*, 24-30. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.024..... 285
- 7.6 Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; **Arques, M.C.**; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes in disease prevention and therapy. In: *Bioactive food peptides in health and disease* (ISBN 980-953-307-472-1) **2013**, Chapter 2, 23-44. doi: 10.5772/51262..... 293
- 7.7 Clemente, A.; Marín-Manzano, M.C.; Jiménez, E.; **Arques, M.C.**; Domoney, C. The anti-proliferative effects of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells are mediated through protease inhibition. *British Journal of Nutrition* **2012**, *108*, S135-S138. doi: 10.1017/S000711451200075X..... 315

ABREVIATURAS

°C	Grado Celsius	BTCI	Del inglés <i>Black-Eyed Pea Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor</i>
µg	Microgramo	BTEE	<i>N</i> -Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester
µL	Microlitro	BTPNA	<i>N</i> -Benzoyl-L-tyrosine <i>p</i> -nitroanilide
µM	Micromolar	CAID	Coefficiente de digestibilidad ileal de aminoácidos
µm	Micrómetro	CCK	Colecistoquinina
µF	Microfaradio	CCR	Cáncer colorrectal
AB-I	Del inglés <i>Azuki Bean Inhibitor</i>	CIA	Actividad inhibidora de quimotripsina
ADAMs	Proteasas con dominio metaloproteasa y desintegrina	CIU	Unidad inhibidora de quimotripsina
ADN	Ácido desoxirribonucleico	DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
ADNc	ADN complementario	DDC	Diciclohexilcarbodiimida
AEP	Actividad endógena de proteasas	DMEM	Medio esencial mínimo Dulbecco con elevados niveles de glucosa
Amp	Marcado de selección de ampicilina	DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
ANOVA	Análisis de la varianza	DMH	Dimetilhidracina
AOX	Alcohol oxidasa	DMSO	Dimetilsulfóxido
ARN	Ácido ribonucleico	dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
BAPNA	<i>N</i> - α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride	DO	Densidad óptica
BBI	Inhibidores Bowman-Birk	DSS	Dextrano sulfato sódico
BBIC	Extracto proteico de soja enriquecido en inhibidores BBI	DTT	Ditiotreitol
BCA	Ácido bicinconínico	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
BMG	Medio mínimo de glicerol	EMS	Metanosulfonato de etilo
BMM	Medio mínimo de metanol	[Et]	Concentración total de enzima
BSA	Albúmina de suero bovino	FBS	Suero fetal bovino

FDA	Administración estadounidense de Alimentos y Medicamentos (USA)	KTI	Inhibidor de tripsina tipo Kunitz
FITC	Isocianato de fluoresceína	L	Litro
Fmoc	9-fluorenilmetoxicarbonilo	LB	Medio Luria-Bertani
FPLC	Cromatografía líquida rápida de proteínas	LDS	Dodecil sulfato de litio
g	Gramo	M	Molar
h	Hora	mAbs	Miliabsorbancia
HF	Fluoruro de hidrógeno	MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
HGGI	Del inglés <i>Horsegram Germinated Inhibitor</i>	MBI	Del inglés <i>Mung Bean Inhibitor</i>
HGI	Del inglés <i>Horsegram Inhibitor</i>	MD	Medio mínimo con dextrosa
HIS4	Gen de la histidina deshidrogenasa	MES	2-N-morfolina-etano sulfónico
HMF	Hidroximetilfurfural	mg	Miligramo
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia	MKP	MAP quinasa fosfatasa
IAA	Ácido indolacético	min	Minuto
IBB1	BBI mayoritario de soja	mL	Mililitro
IBBD2	BBI mayoritario de soja	mM	Milimolar
IC₅₀	Concentración del inhibidor requerida para alcanzar una inhibición del 50%	MMPs	Metaloproteasas de matriz
IP	Inhibidores de proteasas	MS	Espectrofotometría de masas
IU	Unidades de inhibición	MsTI	Del inglés <i>Medicago scutella Trypsin Inhibitor</i>
Kb	Kilobase	MTI2	Del inglés <i>Mustard Trypsin Inhibitor 2</i>
KDa	Kilodalton	MT-SP1	Matriptasa
KEX2	Proteasa kexin	ND	No detectado
K_i	Constante de inhibición	nm	Nanometro
K_m	Constante de Michaelis-Menten	nM	Nanomolar

p/v	peso / volumen	TI1	BBI mayoritario de guisante
PAGE-SDS	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico	TI2	BBI mayoritario de guisante
PAR	Receptor activado por proteasas	TFA	Ácido trifluoroacético
pb	Pares de bases	TGI	Tracto gastrointestinal
pBR322	Origen de replicación de <i>E. coli</i>	TIA	Actividad inhibidora de tripsina
PBS	Tampón fosfato salino	TIU	Unidad inhibidora de tripsina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa	TILLING	Lesiones Locales Dirigidas Inducidas en el Genoma (del inglés <i>Targeting Induced Local Lesions IN Genome</i>)
PSA	Antígeno específico de próstata	TOF	Tiempo de vuelo
PsTI	Del inglés <i>Pisum sativum Trypsin Inhibitor</i>	TRITC	Isotiocianato de tetrametilrodamina
R	Resistencia	TT	Región de terminación
RbTI	Del inglés <i>Rice bean Trypsin Inhibitor</i>	U	Unidades
RM	Reacción de Maillard	ufc	Unidades formadoras de colonias
RN	Rojo neutro	uPA	Activador de plasminógeno del tipo uroquinasa
rpm	Revoluciones por minuto	UPLC	Cromatografía líquida de ultra eficacia
[S]	Concentración de sustrato	V	Voltaje
S	Factor- α de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	v/v	volumen / volumen
SEC	Cromatografía de exclusión molecular	V_{max}	Velocidad máxima
seg	Segundo	YNB	Base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos
SFTI	Del inglés <i>Sunflower Trypsin Inhibitor</i>	YPD	Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa
SNPs	Polimorfismo de nucleótido simple		
SPE	Extracción de fase sólida		
STE13	Dipeptidil aminopeptidasa A		
TAE	Tris-Acetato-EDTA		
TI	Inhibidor de tripsina		

LISTA DE TABLAS

TABLA 1	49
Clasificación de endoproteasas en función del residuo que participe en su centro activo	
TABLA 2	52
Serán proteasas involucradas en procesos patológicos como posibles dianas terapéuticas de inhibidores de proteasas.	
TABLA 3	53
Familias de inhibidores de proteasas de plantas.	
TABLA 4	60
Secuencia de aminoácidos del dominio de inhibición N-terminal de proteínas de la familia Bowman-Birk presente en distintas especies de leguminosas.	
TABLA 5	61
Secuencia de aminoácidos del dominio de inhibición C-terminal de proteínas de la familia Bowman-Birk presentes en distintas especies de leguminosas.	
TABLA 6	73
Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> que demuestran las propiedades quimiopreventivas de los inhibidores Bowman-Birk.	
TABLA 7	78
Ensayos clínicos en humanos utilizando un extracto proteico de soja enriquecido en inhibidores Bowman-Birk (BBIC).	
TABLA 8	93
Cebadores específicos utilizados para (A) la clonación de <i>TII</i> , (B) llevar a cabo mutaciones de aminoácidos localizados en distintas posiciones (P ₁ , P ₂ y/o P ₅ del dominio de inhibición N- y/o C-terminal) para la obtención de mutantes derivados de rTII y (C) la verificación de la presencia del gen de interés en el vector de expresión pPIC9.	
TABLA 9	97
Protocolo general de PCR.	
TABLA 10	97
Secuencia peptídica de rTII y sus mutantes derivados rTII _{inactivo} , rTII _{Tryp-Tryp} y rTII _{Chym-Chym} .	
TABLA 11	100
Parejas de cebadores utilizadas para la obtención de mutantes derivados de <i>TII</i> .	

TABLA 12.....	109
Semillas de guisante de la variedad Cameor, líneas silvestre y mutante, obtenidas mediante la metodología TILLING.	
TABLA 13.....	111
Secuencia peptídica de IBB1 e IBBD2, isoformas Bowman-Birk mayoritarias de soja.	
TABLA 14.....	118
Péptidos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas Bowman-Birk, TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente.	
TABLA 15.....	137
Secuencia peptídica de los dominios de inhibición de rTI1 y sus mutantes derivados rTI1 _{inactivo} , rTI1 _{Tryp-Tryp} y rTI1 _{Chym-Chym} .	
TABLA 16.....	154
Determinación de masa molecular y secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las proteínas recombinantes rTI1 y sus mutantes derivados, expresadas en <i>Pichia pastoris</i> .	
TABLA 17.....	156
Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibidora específica frente a las enzimas tripsina y quimotripsina de rTI1 y sus mutantes derivados.	
TABLA 18.....	167
Cambio de aminoácidos en la proteína TI1 de semillas de guisante de la variedad Cameor debido a mutaciones inducidas en <i>TII</i> mediante la metodología TILLING.	
TABLA 19.....	170
Determinación de la secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las formas procesada y no procesada de las proteínas TI1 y TI2 de semillas de guisante de la variedad Cameor obtenidas mediante la metodología TILLING.	
TABLA 20.....	182
Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibidora específica frente a tripsina (T) y quimotripsina (C) de péptidos sintéticos cíclicos y lineales derivados de los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental TI1 de guisante.	
TABLA 21.....	183
Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibidora específica frente a tripsina (T) y quimotripsina (C) de péptidos sintéticos cíclicos derivados de los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental IBB1 de soja.	

TABLA 22.....	191
Identificación de los inhibidores Bowman-Birk de soja mayoritarios, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja.	
TABLA 23.....	192
Determinación de la secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las isoformas Bowman-Birk de soja, IBB1 e IBBD2.	
TABLA 24.....	193
Actividad inhibidora específica frente a las enzimas tripsina (TIA) y quimotripsina (CIA) de los inhibidores Bowman-Birk de soja mayoritarios, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja.	
TABLA 25.....	196
Actividad inhibidora de tripsina (TIA) y quimotripsina (CIA), y determinación cuantitativa de los iso-inhibidores Bowman-Birk de soja, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) en seis leches de soja comerciales (SM1-SM6).	
TABLA 26.....	197
Presencia de los indicadores de la reacción de Maillard (RM), furosina e hidroximetilfurfural (HMF), en leches de soja comerciales (SM1-SM6).	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	50
Mecanismo catalítico general de las serín proteasas.	
FIGURA 2	56
Estructura de la proteína Bowman-Birk procedente de semillas de judías pintas (<i>Vigna unguiculata</i>) en complejo con la enzima β -tripsina (código PDB 2g81).	
FIGURA 3	57
Secuencia de aminoácidos y mapa de puentes disulfuro de la proteína TI1 de guisante.	
FIGURA 4	58
Representación esquemática del sitio activo de una enzima e interacción con su inhibidor, mediante la nomenclatura de Schechter y Berger (1967).	
FIGURA 5	62
Péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas Bowman-Birk (Adaptado de la página web del laboratorio del Prof. Robin Leatherbarrow del Imperial College, Reino Unido).	
FIGURA 6	63
Representación esquemática de un péptido cíclico sintético unido a una resina mediante un espaciador de pentaglicina.	
FIGURA 7	66
Análisis de actividad inhibidora <i>in gel</i> de la fracción de albúminas de guisante de la variedad Birte.	
FIGURA 8	68
Modelo de dimerización del inhibidor Bowman-Birk, HGI-III, procedente de semillas de <i>Dolichos biflorus</i> .	
FIGURA 9	69
Mecanismo de acción de los inhibidores Bowman-Birk de soja en el páncreas.	
FIGURA 10	76
Posible mecanismo de acción de las proteínas Bowman-Birk en la cascada de señalización de progresión tumoral mediante la inhibición de la actividad proteosómica.	
FIGURA 11	80
Metabolismo del metanol en la levadura <i>Pichia pastoris</i> .	
FIGURA 12	81

Efecto del etil metano sulfonato (EMS) a nivel molecular, utilizado para generar mutaciones al azar en el genoma de plantas.

FIGURA 13.....92

Diagrama del vector de expresión, pPIC9, utilizado en la producción de proteínas Bowman-Birk recombinantes en la levadura *Pichia pastoris*.

FIGURA 14.....95

Diversidad de semillas de guisante.

FIGURA 15.....96

Células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.

FIGURA 16.....98

Esquema de PCR solapante utilizada para introducir mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos de *TII*.

FIGURA 17.....104

Diagrama esquemático del cassette de expresión pPIC9-TI1 en el genoma de *Pichia pastoris*.

FIGURA 18.....108

Protocolo empleado para la metodología TILLING.

FIGURA 19.....110

Perfil de elución de las proteínas Bowman-Birk procedentes de semillas de guisante de la variedad Cameor mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.

FIGURA 20.....114

Diagrama de separación de las fracciones de albúminas y globulinas de guisante.

FIGURA 21.....115

Recta de calibrado para la determinación de pesos moleculares por cromatografía de exclusión molecular (SEC) mediante columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR.

FIGURA 22.....117

Síntesis química de péptidos sobre un soporte polimérico insoluble.

FIGURA 23.....119

Recta de calibrado para la cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) utilizando las proteínas albúmina de suero bovino (BSA, en azul) y Bowman-Birk (BBI, en rojo).

FIGURA 24.....120

Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de tripsina (TIA) de manera semicuantitativa.

FIGURA 25.....121

Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de tripsina (TIA) de manera cuantitativa.

FIGURA 26.....123

Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de quimotripsina (CIA), utilizando BTEE como sustrato específico.

FIGURA 27.....124

Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de quimotripsina (CIA), utilizando BTPNA como sustrato específico.

FIGURA 28.....125

Cálculo de la K_i de inhibidores competitivos del tipo tight-binding.

FIGURA 29.....130

Diagrama del ensayo de proliferación celular mediante tinción vital con objeto de evaluar las propiedades anti-proliferativas de las proteínas Bowman-Birk recombinantes, utilizando la línea celular HT29 procedente de adenocarcinoma colorrectal humano.

FIGURA 30.....135

Secuencia de aminoácidos de la proteína TI1 de guisante.

FIGURA 31.....136

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de clonación de *TI1*.

FIGURA 32.....138

Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado $rTI1_{inactivo}$ obtenido mediante la sustitución de los residuos P_1 , responsables de la especificidad dentro de los dominios de inhibición, por el aminoácido glicina.

FIGURA 33.....139

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TI1* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en la posición P_1 , con el fin de obtener el mutante derivado $rTI1_{inactivo}$, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 34.....140

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TI1* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en la posición P_1 , con el fin de obtener el mutante derivado $rTI1_{inactivo}$, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 35.....141

Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp} obtenido mediante la sustitución de los residuos P₂, P₁ (responsable de la especificidad dentro de los dominios de inhibición) y P₅, en el dominio de inhibición C-terminal.

FIGURA 36.....142

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en las posiciones P₂ y P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 37.....143

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en la posición P₅, con el fin de obtener el mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 38.....144

Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} obtenido mediante la sustitución de los residuos P₂, P₁ (responsable de la especificidad dentro de los dominios de inhibición) y P₅, en el dominio de inhibición N-terminal.

FIGURA 39.....145

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en las posiciones P₂ y P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 40.....146

Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en la posición P₅, con el fin de obtener el mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*.

FIGURA 41.....147

Linealización del vector de expresión pPIC9 mediante la acción de la enzima *Sall*.

FIGURA 42.....148

PCR de colonia utilizando los cebadores AOX con objeto de demostrar la transformación efectiva de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*.

FIGURA 43.....151

Perfil de elución de rTI1 (A), rTI1_{inactivo} (B), rTI1_{Tryp-Tryp} (C) y rTI1_{Chym-Chym} (D) mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.

FIGURA 44.....152

PAGE-SDS bajo condiciones desnaturalizantes de rTI1 y sus mutantes derivados.

FIGURA 45.....157

Análisis de actividad inhibidora *in gel* de rTI1 y sus mutantes derivados.

FIGURA 46.....158

Internalización de las proteínas Bowman-Birk recombinantes en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.

FIGURA 47.....161

Efecto de las proteínas rTI1 (A) y sus mutantes derivados rTI1_{inactivo} (B), rTI1_{Tryp-Tryp} (C) y rTI1_{Chym-Chym} (D) sobre el crecimiento *in vivo* de células cancerígenas HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.

FIGURA 48.....163

Efecto de las proteínas rTI1 (barras negras) y su mutante derivado rTI1_{inactivo} (barras blancas) sobre el crecimiento *in vivo* de células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co.

FIGURA 49.....166

Mutaciones de la proteína TI1, inhibidor Bowman-Birk mayoritario de semillas de guisante, obtenidas mediante la metodología TILLING.

FIGURA 50.....168

Actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina de las líneas silvestre y mutante de semillas de guisante obtenidas mediante metodología TILLING.

FIGURA 51.....172

Perfil de actividad inhibidora de las líneas silvestre y mutante C77Y tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.

FIGURA 52.....174

Perfil de actividad inhibidora de las líneas silvestre y mutante S85F tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.

FIGURA 53.....175

Perfil de actividad inhibidora de las líneas silvestre y mutante E109K tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.

FIGURA 54.....177

Perfil de oligomerización de las isoformas TI en las líneas silvestre y mutante E109K mediante cromatografía de exclusión molecular en columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR.

FIGURA 55.....	178
Perfil de actividad inhibidora de las formas oligoméricas (A-B-C) obtenidas tras cromatografía de exclusión molecular de las líneas silvestre y mutante E109K, mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL.	
FIGURA 56.....	186
Efecto de la proteína rTII (A) y sus péptidos derivados (B), que imitan a los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina, sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.	
FIGURA 57.....	187
Efecto de la proteína IBB1 de soja (A) y sus péptidos derivados (B), que imitan a los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina, sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano.	
FIGURA 58.....	189
Perfil de elución de una mezcla de isoINHIBIDORES Bowman-Birk, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL.	
FIGURA 59.....	190
PAGE-SDS bajo condiciones desnaturizantes de la mezcla de IBB1, IBBD2 y KTI (calle 2) y los picos cromatográficos I (calle 3), II (calle 4) y III (calle 5) obtenidos tras cromatografía de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL.	
FIGURA 60.....	194
Perfil de elución de inhibidores de proteasas procedente de leches de soja comerciales (SM1-SM6) en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL.	
FIGURA 61.....	195
PAGE-SDS bajo condiciones desnaturizantes de SM4 (calle 2) y los picos cromatográficos I _{SM} (calle 3), II _{SM} (calle 4) y III _{SM} (calle 5) que contienen inhibidores de serín proteasas.	
FIGURA 62.....	199
Correlación lineal entre el contenido de furosin y la actividad inhibidora de tripsina (▲) y quimotripsina (Δ) en leches de soja comerciales (A) y sistemas modelo de BBI sometidos a tratamiento térmico a 120 °C durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos en presencia de glucosa (B).	

CLASIFICACIÓN DE AMINOÁCIDOS

Alifático	Aromático	Ácido	Básico	Hidrofílico	Sulfurado	Amida	No esencial	Esencial							
<p>Estructura química Código de una letra</p> <p>A</p> <p>Nombre Código de tres letras Codones</p>	<p>ALANINA <i>Ala</i> GCT, GCC, GCA, GCG</p>	<p>GLICINA <i>Gly</i> GGT, GGC, GGA, GGG</p>	<p>ISOLEUCINA <i>Ile</i> ATT, ATC, ATA</p>	<p>LEUCINA <i>Leu</i> CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG</p>	<p>PROLINA <i>Pro</i> CCT, CCC, CCA, CCG</p>	<p>VALINA <i>Val</i> GTT, GTC, GTA, GTG</p>	<p>FENILALANINA <i>Phe</i> TTT, TTC</p>	<p>TRIPTOFANO <i>Trp</i> TGG</p>	<p>TIROSINA <i>Tyr</i> TAT, TAC</p>	<p>TRONINA <i>Thr</i> ACT, ACC, ACA, AGC</p>	<p>SERINA <i>Ser</i> TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC</p>	<p>CISTEINA <i>Cys</i> TGT, TGC</p>	<p>METIONINA <i>Met</i> ATG</p>	<p>ASPARAGINA <i>Asn</i> AAT, AAC</p>	<p>GLUTAMINA <i>Gln</i> CAA, CAG</p>
<p>FENILALANINA <i>Phe</i> TTT, TTC</p>	<p>TRIPTOFANO <i>Trp</i> TGG</p>	<p>TIROSINA <i>Tyr</i> TAT, TAC</p>	<p>ASPARTATO <i>Asp</i> GAT, GAC</p>	<p>GLUTAMATO <i>Glu</i> GAA, GAG</p>	<p>ARGININA <i>Arg</i> CGT, CGC, CGA, CCG, AGA, AGG</p>	<p>HISTIDINA <i>His</i> CAT, CAC</p>	<p>LISINA <i>Lys</i> AAA, AAG</p>	<p>TRIPTOFANO <i>Trp</i> TGG</p>	<p>TIROSINA <i>Tyr</i> TAT, TAC</p>	<p>TRONINA <i>Thr</i> ACT, ACC, ACA, AGC</p>	<p>SERINA <i>Ser</i> TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC</p>	<p>CISTEINA <i>Cys</i> TGT, TGC</p>	<p>METIONINA <i>Met</i> ATG</p>	<p>ASPARAGINA <i>Asn</i> AAT, AAC</p>	<p>GLUTAMINA <i>Gln</i> CAA, CAG</p>

Adaptado de <http://compoundchem.com/2014/09/16/aminoacids/>

RESUMEN

Los inhibidores de la familia Bowman-Birk (BBI) son inhibidores de proteasas de plantas que se encuentran en concentraciones elevadas en leguminosas tales como soja, guisante, lenteja y garbanzo, y que presentan la capacidad de inhibir una o varias serín proteasas, incluyendo las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. Estos inhibidores interactúan con el sitio activo de la enzima en forma canónica mediante la exposición de sus dominios de inhibición. BBI es capaz de resistir tanto las condiciones ácidas como la acción de enzimas proteolíticas en el estómago e intestino delgado, permitiendo que cantidades significativas lleguen al intestino grueso en forma activa, con el fin de ejercer sus propiedades anti-cancerígenas y anti-inflamatorias en el tracto gastrointestinal de mamíferos. La familia BBI presenta polimorfismo a nivel inter- e intraespecífico. Un número limitado de aminoácidos presentes en el dominio de inhibición es responsable de las actividades funcionales y biológicas de las proteínas BBI. Sin embargo, variaciones en la secuencia de los dominios de inhibición, modificaciones postraduccionales en los extremos N- y C-terminal, así como diferencias en la naturaleza multimérica de los inhibidores, pueden influir en las propiedades funcionales y el papel fisiológico de las proteínas BBI.

En esta tesis doctoral, una forma recombinante de TI1, iso-inhibidor BBI mayoritario en guisante, y mutantes derivados del mismo obtenidos mediante mutagénesis dirigida, con dos dominios de inhibición idénticos frente a la enzima tripsina o quimotripsina, han demostrado influir negativamente en el crecimiento de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano *in vitro*. Sin embargo, un mutante inactivo derivado de TI1, obtenido mediante la sustitución de la posición P₁ por glicina, no mostró efecto alguno en la proliferación de células HT29, sugiriéndose que el efecto anti-proliferativo que ejercen las proteínas BBI en células cancerígenas de colon es consecuencia de su capacidad intrínseca de inhibir las actividades proteolíticas de serín proteasas. Como consecuencia, tanto las enzimas de tipo tripsina como las enzimas del tipo quimotripsina involucradas en etapas iniciales de procesos cancerígenos colorrectales deberían ser consideradas como dianas potenciales de las proteínas BBI. Mediante síntesis química, el uso de péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas BBI puede facilitar la manipulación, el screening y la selección de variantes con potencial terapéutico. Sin embargo, los resultados obtenidos con péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente, indicaron un descenso

significativo de actividad inhibidora respecto a las proteínas parentales y, probablemente como consecuencia, no tuvieron efecto alguno en la proliferación de células HT29.

La leche de soja es una bebida beneficiosa para la salud, cuyo consumo está creciendo considerablemente en la población española. Los productos de soja se han asociado con parámetros tales como capacidad antioxidante, propiedades anti-inflamatorias y disminución en el riesgo de desarrollar procesos cancerígenos, debido a su contenido en polifenoles e inhibidores de proteasas, entre otros compuestos bioactivos. El contenido en proteínas BBI de soja ha sido analizado mediante métodos enzimáticos e inmunológicos, con los cuales no se consigue cuantificar isoformas activas. Dado que las propiedades preventivas y terapéuticas de los inhibidores BBI están directamente relacionados con su capacidad inhibidora, en esta tesis doctoral se ha cuantificado la cantidad de los isoformas BBI, IBB1 e IBBD2, presentes en forma activa en leches de soja comerciales, que pudieran ejercer efectos beneficiosos en los consumidores. Las concentraciones de IBB1 e IBBD2 varían entre 0.44-5.20 y 0.27-4.6 mg por cada 100 mL de leche de soja, respectivamente. Estos datos sugieren que las leches de soja comerciales presentan cantidades fisiológicamente relevantes de BBI activos, pudiendo ejercer efectos beneficiosos para la salud.

La actividad inhibidora de tripsina asociada a las proteínas BBI de leguminosas afecta a la digestibilidad proteica y, por tanto, limita el uso de semillas en nutrición animal. Mediante metodología TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genome*), hemos analizado tres mutaciones puntuales en TI1 con las que podemos concluir que (1) la eliminación de uno de los puentes disulfuro cercano al dominio de inhibición de quimotripsina (C⁸-C¹²) es crítico para la inhibición de ambas enzimas, tripsina y quimotripsina; (2) la sustitución del aminoácido serina, presente en la posición P₁ del dominio de inhibición de quimotripsina, por fenilalanina reduce la inhibición de esta enzima y presenta un ligero aumento en la inhibición de tripsina, probablemente debido a cambios conformacionales de la proteína; y (3) el cambio en la carga del extremo C-terminal, como consecuencia de la sustitución de glutámico por lisina, no afecta a las propiedades inhibidoras de la proteína pero podría modificar su capacidad de formar oligómeros, estando este hecho asociado a la estabilidad proteica de los BBI.

ABSTRACT

Bowman-Birk inhibitors (BBI) from legumes, such as soybean, pea, lentil and chickpea, are naturally occurring plant protease inhibitors which have the capacity to inhibit one or more of a range of serine proteases, including the digestive enzymes trypsin and chymotrypsin. They interact with the active sites of serine proteases in a 'canonical' manner *via* exposed reactive site loops of conserved conformation within the inhibitor. BBI can survive both acidic conditions and the action of proteolytic enzymes within the stomach and small intestine, permitting significant amounts to reach the large intestine in active form to exert their reported anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties within the mammalian gastrointestinal tract. Multiple BBI variants can be found within and among species. A limited number of amino acids located within the inhibitory domain is responsible for the primary functional and biological activities of BBI-like proteins. However, sequence variation in binding loops, post-translational modifications at the amino- and carboxi-terminal ends, as well as differences in the multimeric nature of the inhibitors may act in combination to influence the functional properties and the physiological role of BBI-like proteins.

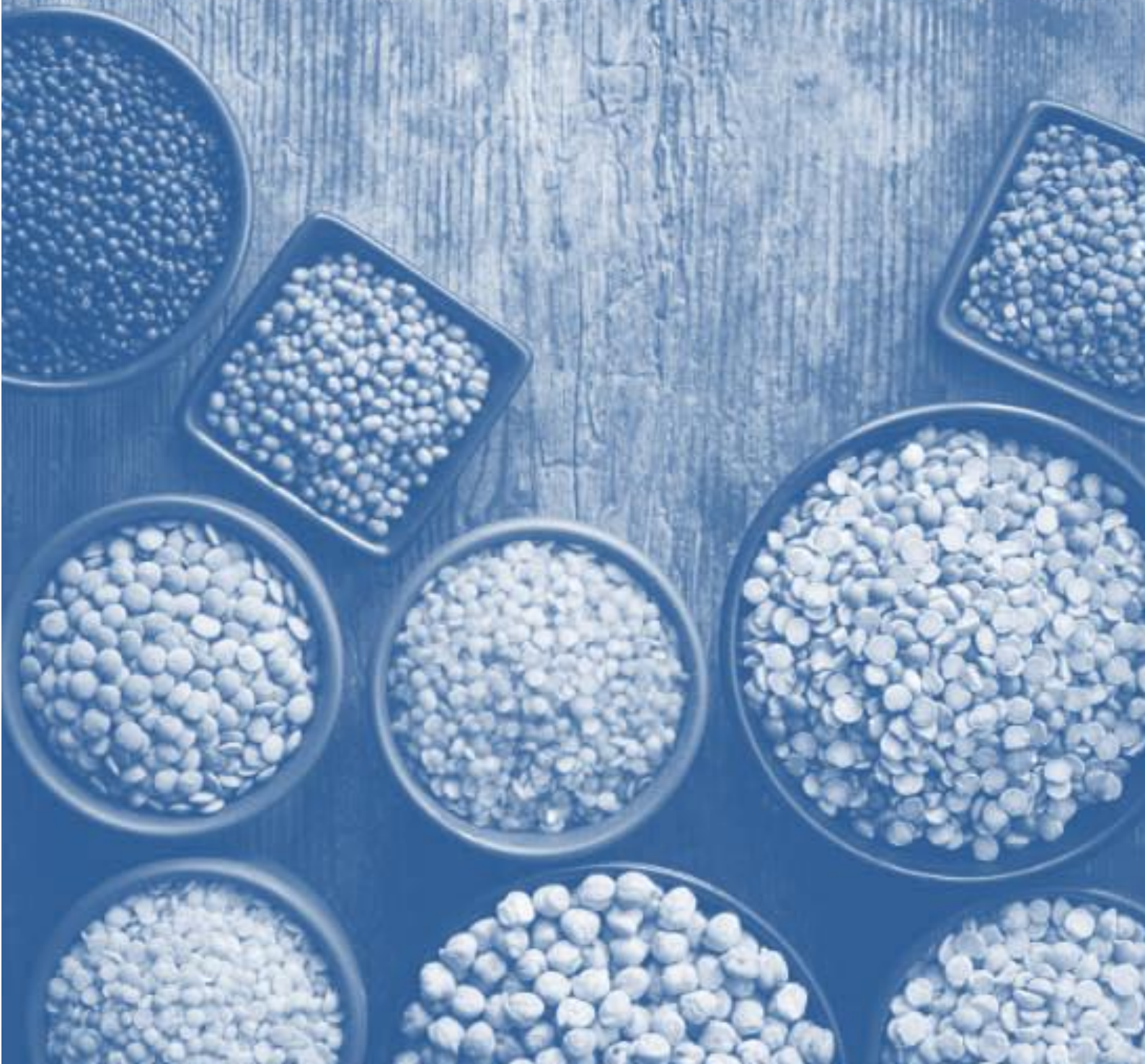
In this thesis, a recombinant form of TI1, representing a major BBI isoinhibitor from pea, and related mutants obtained by site-directed mutagenesis that have identical inhibitory domains against trypsin or chymotrypsin only, have shown to influence negatively the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells *in vitro*. However, inactive mutant obtained by substitution of P₁ position for glycine showed a non-significant effect on the proliferation of HT29 cells suggesting that their anti-proliferative effect in colorectal cancer cells is a consequence of their intrinsic ability to inhibit the proteolytic activities of serine proteases. Both trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in early stages of carcinogenesis should be considered as potential targets of BBI-like proteins. The use of synthetic cyclic peptides that mimic the inhibitory domains of BBI-like proteins can facilitate the manipulation, screening and selection of appropriate variants through biotechnology. However, cyclic peptides mimicking the inhibitory domains of TI1 and IBB1, from pea and soybean, respectively, showed less inhibitory activity than parental proteins and, as a probably consequence, non-effect on the growth of HT29 cells.

Soymilk is a health-promoting beverage of which human consumption is steadily expanding. Different bioactivities have been considered with soy products such as antioxidant capacity, anti-inflammatory properties or decrease of cancer development risk. These activities have been related

to the presence of several compounds, including polyphenols and serine protease inhibitors such as Bowman-Birk inhibitors. In order to quantify BBI in soy food, enzymatic and immunological assays have been developed; however, no comprehensive information on the concentration of BBI in soy foods is currently available. The emerging evidence suggests that soybean BBI exert their preventive and therapeutic properties *via* protease inhibition. In this study, we have quantified the amount of active BBI isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, present in commercial soymilks that could exert potential health benefits to consumers. IBB1 and IBBD2 concentrations ranged from 0.44 to 5.20 and 0.27 to 4.60 mg/100 mL of soymilk, respectively. These data show that physiological relative amounts of active BBI are present in commercial soymilk and may exert potential health-promoting effects.

In animal nutrition, the use of several classes of seed proteins are limited, often leading to a requirement for heat-treatment of seed products during processing for feed uses. Reduction or removal of these proteins could greatly enhanced seed protein quality and various strategies have been used to try to achieve this with limited success. A TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genome*) mutagenized resource has yielded a number of alleles for fundamental studies and provides insights into the structure-function relationships of the targeted protein. Using this approach, we have analysed three mutations in TI1 and we can conclude that (1) the disruption of one of the disulphide bridges closed to the chymotrypsin inhibitory domain is critical for the inhibition of both enzymes, trypsin and chymotrypsin; (2) the substitution of the amino acid present in the P₁' position of chymotrypsin domain reduces the inhibition of this enzyme with a slightly increase in the trypsin inhibition; and (3) the change in the charge of the carboxy- terminal end does not affect the inhibitory properties of the protein but can modifies their ability to form oligomers, probably due to the role of the aspartate in the dimer formation of BBI proteins.

1. INTRODUCCIÓN



1.1 SERÍN PROTEASAS

Las enzimas proteolíticas, también denominadas proteasas, son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos covalentes específicos (1). En 1967, se estableció un sistema de nomenclatura para ocho posiciones dentro de la secuencia de una enzima (2), entre las cuales se incluye el sitio activo, denominándose S₁-S₄ a las posiciones más cercanas al extremo N-terminal, y S_{1'}-S_{4'} a las posiciones más cercanas al extremo C-terminal. De forma complementaria, los sustratos capaces de unirse al sitio activo de la enzima presentan residuos en posiciones P₁-P₄ o P_{1'}-P_{4'}, en función de la posición que ocupen. Según su mecanismo de acción, las enzimas proteolíticas pueden clasificarse en endoproteasas, que actúan en el interior de la cadena peptídica, y exoproteasas, que rompen enlaces peptídicos en los extremos N- y/o C-terminal de la proteína. A su vez, las endoproteasas se clasifican en cinco clases principales (aspartato, metalo-, cisteín, serín y treonín proteasas) (1), en función del residuo que presenten en su centro activo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación de endoproteasas en función del residuo que participe en su centro activo.

Proteasa	Residuo involucrado en el centro activo	Ejemplos
Aspartato proteasa	Aspártico	Proteasa HIV, renina
Metaloproteasa	Histidina o glutámico unido a un metal (zinc, ocasionalmente cobalto)	MMPs, ADAMs
Cisteín proteasa	Cisteína	Caspasas
Serín proteasa	Serina	Tripsina, quimotripsina
Treonín proteasa	Treonina	Proteosoma

MMPs: metaloproteasas de matriz; ADAMs: proteasas con dominio metaloproteasa y desintegrina.

Las serín proteasas presentan el aminoácido serina en su centro activo, el cual consiste en una triada catalítica de serina, histidina y aspártico (Ser¹⁹⁵/His⁵⁷/Asp¹⁰²). Mediante la formación de un complejo de Michaelis, la enzima se une al sustrato exponiendo el grupo carbonilo del enlace amida a un ataque nucleofílico con el grupo hidroxilo de la Ser¹⁹⁵ de la triada catalítica, en medio básico generado por el grupo imidazol de la His⁵⁷ (**Figura 1A**). El intermediario tetraédrico que se forma se estabiliza por un puente de hidrógeno entre el NH de la Ser¹⁹⁵ -numeración de aminoácidos de la quimotripsina- y la Gly¹⁹³, que forma el agujero oxianión. El protón de la His⁵⁷ se transfiere a la amina del intermediario para facilitar la expulsión del fragmento C-terminal del sustrato, generando un complejo acilo (**Figura 1B**). El agua actúa sobre este complejo acil-enzima,

formando un nuevo intermediario tetraédrico (**Figura 1C**) con la consecuente ruptura vía catálisis ácida de la His⁵⁷ para dar el fragmento N-terminal del sustrato y regenerar la Ser¹⁹⁵ (**Figura 1D**) (3).

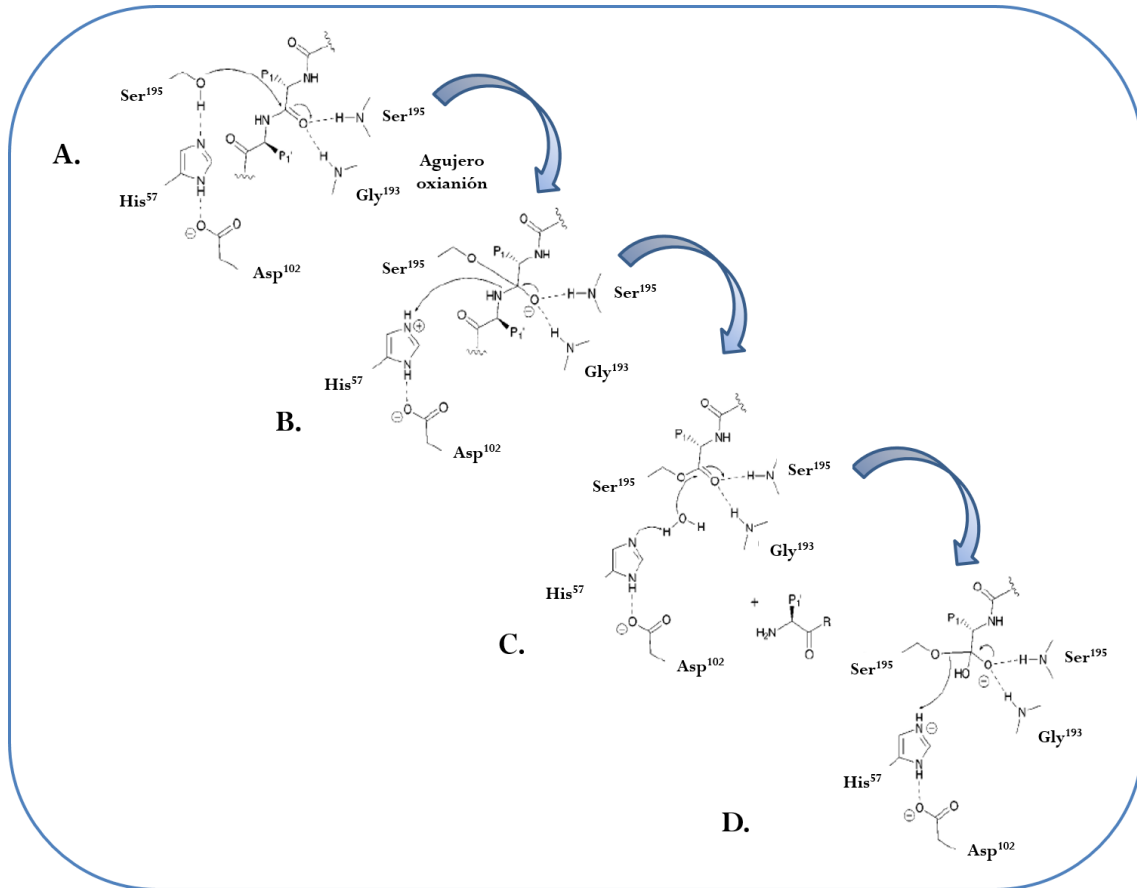


Figura 1. Mecanismo catalítico general de las serín proteasas. A) Interacciones por puente de hidrógeno con la His⁵⁷ y el Asp¹⁰² de la triada catalítica, activando el grupo hidroxilo de la Ser¹⁹⁵ para el ataque nucleofílico al enlace peptídico, formando el primer intermediario tetraédrico hemiacetalico. B) Transferencia del protón de la His⁵⁷ a la amina del intermediario lo que facilita la expulsión del fragmento C-terminal del sustrato para dar el complejo covalente acilo. C) Ataque del agua al complejo para formar el segundo intermediario tetraédrico D) que colapsa por catálisis ácida de la His⁵⁷ para regenerar la Ser¹⁹⁵ y el extremo N-terminal del sustrato (3).

Según su especificidad por el sustrato, las serín proteasas se dividen a su vez en tres grupos según el tipo de aminoácido del sitio de ruptura (P₁) y la estructura que presenta la cavidad de la enzima donde se aloja el sustrato junto al sitio activo (S₁). Así, las serín proteasas del tipo tripsina presentan una cavidad muy abierta con carga negativa del aspártico (Asp¹⁸⁹), por lo que tienen preferencia por la hidrólisis de enlaces peptídicos situados a continuación de aminoácidos cargados positivamente, tales como arginina y lisina. Las proteasas del tipo quimotripsina también presentan cavidades muy abiertas pero la serina presente en el fondo (Ser¹⁹⁸) hace que la cavidad no tenga

carga e hidroliza enlaces peptídicos que se encuentran a continuación de aminoácidos grandes e hidrofóbicos, sin carga, como triptófano, fenilalanina, tirosina o leucina. La cavidad junto al sitio activo de la elastasa es muy diferente; la mayor parte está ocupada por residuos grandes como valina (Val²¹⁶) y treonina (Thr²²⁶), por lo que solo se pueden acoplar aminoácidos pequeños, hidrofóbicos y sin carga como alanina y valina (3,4). Algunas de las serín proteasas más destacadas son las enzimas tripsina, quimotripsina, elastasa, quimasa, catepsina G, plasmina, trombina y subtilisina (5).

1.1.1 Serín proteasas y homeostasis celular

El control de la homeostasis celular y del organismo, así como una amplia gama de procesos fisiológicos y patológicos, tienen lugar gracias a reacciones en las cuales las proteínas son degradadas y/o procesadas mediante enzimas proteolíticas. Las serín proteasas son esenciales en procesos biológicos tales como el crecimiento celular y desarrollo, coagulación sanguínea, fibrinólisis, activación del tripsinógeno durante la digestión, liberación de hormonas a partir de moléculas precursoras, apoptosis y activación del complemento (6). Sin embargo, tal y como se muestra en la **Tabla 2**, el comportamiento aberrante de ciertas serín proteasas también puede dar lugar a desórdenes fisiológicos y patológicos, tales como procesos cancerígenos e inflamatorios, angiogénesis, artritis reumatoide, enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares, entre otras (1,7,8,9).

Por tanto, se necesita un elevado control de las actividades proteolíticas de estas enzimas, el cual se consigue gracias a mecanismos reguladores, entre los que se incluye la regulación de la expresión génica y secreción proteica, la activación de precursores de proteasas inactivos (zimógenos) mediante proteólisis específica y limitada, la localización diferencial de enzima y sustrato, la unión del cofactor, y la interacción con otras proteínas y/o mediante la inhibición de la proteólisis por parte de inhibidores de proteasas (IP) específicos, los cuales pueden formar complejos estables con estas enzimas (10,11,12). Este último mecanismo normalmente implica la competición con el sustrato para acceder al sitio activo de la enzima (13). Un mayor conocimiento acerca del papel que juegan las serín proteasas, así como sus inhibidores específicos, naturales o sintéticos, como moduladores de sus actividades proteolíticas, daría lugar a nuevas oportunidades para la prevención y/o intervención terapéutica (14). En la actualidad, existe un gran interés en la identificación y caracterización de inhibidores de serín proteasas que presenten un alto grado de especificidad frente a serín proteasas involucradas en enfermedades humanas.

Tabla 2. Serín proteasas involucradas en procesos patológicos como posibles dianas terapéuticas de inhibidores de proteasas (15,16).

Serín proteasa	Función	Procesos patológicos	Referencia
Triptasa	Fagocitosis, degradación de los componentes de la matriz extracelular, regulación de la respuesta inflamatoria, coagulación sanguínea	Aterosclerosis, asma, desórdenes inflamatorios	(17,18)
Catepsina G	Degradación de la matriz extracelular, migración, regulación de desórdenes inflamatorios	Inflamación, metástasis	(19)
Matriptasa	Degradación de la matriz, regulación de la barrera intestinal, metabolismo del hierro	Patogénesis de tejidos epiteliales, crecimiento y progresión tumoral	(20)
Elastasa humana	Eliminación de patógenos, degradación de la matriz extracelular, desórdenes inflamatorios	Enfermedad pulmonar, inflamación	(19,21)
Quimasa	Degradación de componentes de la matriz extracelular, regulación de procesos inflamatorios	Inflamación, asma, cáncer gástrico	(22)
Proteosoma	Degradación proteica, proliferación celular, diferenciación, angiogénesis y apoptosis	Carcinogénesis, inflamación, procesos neurodegenerativos	(23,24,25)

1.2 INHIBIDORES DE PROTEASAS DE PLANTAS

Los inhibidores de proteasas (IP) vegetales son proteínas de bajo peso molecular, generalmente presentes a elevadas concentraciones en tejidos de almacenamiento, tales como tubérculos y semillas, pudiendo alcanzar hasta un 10 % del contenido proteico (26). También pueden detectarse en partes aéreas de la planta, como hojas, tallos y flores (27), donde puede ser inducida su expresión como respuesta al ataque de insectos, hongos y microorganismos patógenos (26). Los IP de plantas son capaces de formar complejos estables con sus enzimas diana, mediante

la competición con el sustrato para acceder al sitio activo de la enzima, pudiéndose inhibir de manera irreversible sus actividades proteolíticas. Estos son capaces de inhibir proteasas de distintas fuentes, incluyendo proteasas digestivas de mamíferos e insectos, y enzimas de bacterias y hongos, estando también involucrados en la regulación de proteasas endógenas de la planta (28,29,30,31).

Existen diez familias de IP en plantas, clasificadas de acuerdo a su homología de secuencia, naturaleza del sitio activo y mecanismo de interacción con las proteasas a las que inhiben (32), tal como queda reflejado en la base de datos PLANT-PI (<http://plantpis.ba.itb.cnr.it>) (Tabla 3), la cual proporciona información sobre la secuencia proteica, fuente vegetal y actividad inhibidora de un gran número de IP de plantas superiores (33). A diferencia de las proteasas, las familias de inhibidores de proteasas no pueden ser agrupadas según el tipo catalítico de las enzimas que inhiben, dado que algunas familias contienen inhibidores que actúan sobre distintas clases de proteasas (34).

Tabla 3. Familias de inhibidores de proteasas de plantas (32,33)

Familia de inhibidores de proteasas de plantas	Principales proteasas diana	Distribución en familias de plantas
Inhibidores de serín proteasas Bowman-Birk	Tripsina, quimotripsina, elastasa	Leguminosas, Gramíneas
Inhibidores de α-amilasa y tripsina de cereal	Amilasa, tripsina	Gramíneas
Inhibidores de cisteín proteasas	Papaína, catepsina	Gramíneas, Brasicáceas, Leguminosas, Compositáceas
Inhibidores de metalocarboxipeptidasas	Carboxipeptidasas	Solanáceas
Inhibidores de tripsina de mostaza	Tripsina, quimotripsina	Brasicáceas
Inhibidores tipo I de patata	Tripsina, quimotripsina, subtilisina	Solanáceas, Gramíneas, Leguminosas
Inhibidores de proteasas tipo II de patata	Tripsina, quimotripsina	Solanáceas
Serpinas	Tripsina, quimotripsina	Gramíneas
Inhibidores de tripsina de soja (Kunitz)	Tripsina, quimotripsina	Leguminosas
Inhibidores de proteasas Squash	Tripsina	Cucurbitáceas

La interacción de los IP de plantas con sus proteasas diana es objeto de estudio por parte de la comunidad científica en áreas tan diversas como la nutrición animal y humana, protección de las plantas frente al ataque de insectos y hongos y, más recientemente, en medicina terapéutica y/o preventiva. Se han purificado y caracterizado numerosos IP de origen vegetal, determinándose su secuencia de aminoácidos, especificidad enzimática, estructura tridimensional y naturaleza de los complejos formados con sus proteasas diana. En concreto, se ha prestado especial atención a los inhibidores de serín proteasas del tipo Bowman-Birk (BBI) (**apartado 1.3**), dado su potencial como agentes quimiopreventivos y/o propiedades terapéuticas en enfermedades humanas, incluyendo distintos tipos de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes inflamatorios (16).

1.2.1 Funciones fisiológicas de los inhibidores de proteasas en plantas

Los inhibidores de proteasas, además de tener propiedades nutricionales y funcionales como componentes de la dieta, juegan un papel importante en la fisiología de las plantas (30,35). Estos sirven como almacenamiento de aminoácidos azufrados que son utilizados durante la germinación y posterior desarrollo de la semilla, pudiendo además actuar como reguladores de enzimas endógenas de la planta, jugando un importante papel protector frente al ataque de insectos, hongos y microorganismos (36,37,38,39). Numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han demostrado la capacidad de los IP de inhibir la actividad de algunas enzimas proteolíticas presentes en el tracto digestivo de insectos (26,40), afectando de manera significativa a su crecimiento, desarrollo y reproducción (35,41,42). El papel de los IP frente al ataque de insectos se ha demostrado mediante el uso de plantas transgénicas. Así, un gen que codifica a un IP de la familia Bowman-Birk de judías pintas (*Vigna unguiculata*) ha sido expresado en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), disminuyendo como consecuencia sus tasas de infección por larvas de gusano (*Heliothis virescens*) (43). Sin embargo, su uso se ve dificultado debido a la rápida respuesta adaptativa de los insectos frente a la presencia de IP, dando lugar a la aparición de nuevas proteasas con funciones similares que no son inactivadas por el IP (44).

Además de proteger a la planta frente al ataque de insectos, los IP juegan un papel protector frente al ataque de hongos, como en el caso de hongos filamentosos del género *Fusarium* (45). Mediante el uso de plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa*), se ha demostrado que IP pertenecientes a la familia Bowman-Birk confieren resistencia al ataque de hongos patógenos (*Pyricularia oryzae*) *in vivo* (46). Por otra parte, también se ha descrito la participación de las proteínas

BBI frente a situaciones de estrés abiótico (47,48,49). La sobreexpresión de inhibidores de tripsina en plantas de trigo (*Triticum aestivum*) mejora la tolerancia a la salinidad de las plantas (49), de manera similar a lo que ocurre en hojas de cacahuete (*Arachis hypogaea*) (50).

1.3 INHIBIDORES DE SERÍN PROTEASAS DE LA FAMILIA BOWMAN-BIRK

Las proteínas Bowman-Birk son inhibidores de serín proteasas que presentan un mecanismo canónico, también denominado estándar o de Laskowski, y cuyo nombre viene dado tras su identificación y caracterización por parte de los científicos Bowman y Birk (51,52). Se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, estando presentes a elevadas concentraciones en semillas de leguminosas en comparación con otros órganos vegetativos y familias botánicas. Su miembro más estudiado procede de semillas de soja (*Glycine max*), aunque existen proteínas homólogas aisladas y caracterizadas en otras leguminosas, tales como el garbanzo (*Cicer arietinum*), la judía común (*Phaseolus vulgaris*), la lenteja (*Lens culinaris*) y el guisante (*Pisum sativum*), y en cereales como el trigo, el arroz y la cebada (*Hordeum vulgare*).

Los BBI de leguminosas son proteínas de bajo peso molecular (6-9 kDa) y presentan una estructura simétrica de dos dominios tricíclicos; cada dominio comprende una región nonapeptídica unida mediante un puente disulfuro en el que participan dos moléculas de cisteína. Ambos dominios de inhibición están muy expuestos, por lo que son fácilmente accesibles por parte de las enzimas proteolíticas, presentando una conformación similar a la del sustrato (**Figura 2**) (53,54). Esta estructura permite la interacción de forma simultánea e independiente con dos proteasas diana, no necesariamente idénticas, sin ningún cambio conformacional sustancial (55), formando complejos estequiométricos estables con enzimas digestivas tales como tripsina, quimotripsina, elastasa, catepsina G o duodenasa. En presencia de una mezcla de tripsina y quimotripsina, BBI es capaz de formar una estructura terciaria con ambas enzimas (56). La estructura tridimensional de las proteínas BBI se ha descrito tanto en su forma libre (53,55,57,58,59,60,61,62,63) como formando complejos con las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina (64,65,66,67,68,69).

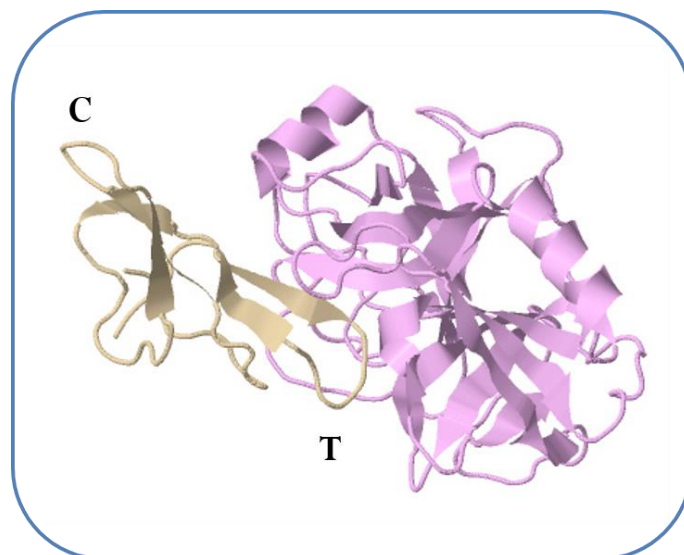


Figura 2. Estructura de la proteína Bowman-Birk procedente de semillas de judías pintas (*Vigna unguiculata*) en complejo con la enzima β -tripsina (código PDB 2g81) (69). Los dominios de inhibición de tripsina (T) y quimotripsina (C) están indicados en la figura. La representación estructural se generó utilizando el programa Jmol de RCSB PDB (70).

Las proteínas BBI presentan catorce cisteínas involucradas en siete puentes disulfuro intramoleculares (71), de los cuales cuatro se encuentran cercanos al dominio de inhibición N-terminal (C^1 - C^{14} , C^2 - C^6 , C^3 - C^{13} , C^4 - C^5) y tres al dominio de inhibición C-terminal (C^7 - C^9 , C^8 - C^{12} y C^{10} - C^{11}) (**Figura 3**). Tanto el número como la distribución de las cisteínas que participan en la red de puentes disulfuro de las proteínas BBI juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la estabilidad estructural de los dominios de inhibición (72,73), consiguiendo mantener su capacidad de inhibir proteasas bajo condiciones extremas de temperatura y pH (74,75). La disrupción de uno de los puentes disulfuro cercano al dominio de inhibición C-terminal (C^3 - C^{13}), en la isoforma BBI mayoritaria de *Dolichos biflorus* (HGI-III), parece desestabilizar la proteína, afectando tanto a su estabilidad térmica como a la capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina (73).

Al igual que otros IP, el reconocimiento molecular de serín proteasas por parte de los inhibidores BBI viene determinado por el aminoácido de la posición P_1 (2), el cual se inserta en la cavidad S_1 de la enzima formando un complejo enzima-inhibidor (**Figura 4**) (67). En general, el dominio de inhibición cercano al extremo N-terminal en los inhibidores BBI de semillas de leguminosas presenta un aminoácido con carga positiva, arginina o lisina, en la posición P_1 , inhibiendo proteasas del tipo tripsina. El dominio de inhibición cercano al extremo C-terminal presenta una mayor variación en cuanto al aminoácido situado en la posición P_1 ; la presencia de arginina determina especificidad frente a serín proteasas del tipo tripsina mientras que los

aminoácidos fenilalanina, tirosina o leucina determinan inhibición frente a serín proteasas del tipo quimotripsina (32,76). Por tanto, en semillas de leguminosas, podemos encontrar inhibidores BBI del tipo tripsina/tripsina y tripsina/quimotripsina, los cuales han demostrado ser potentes inhibidores de ambas enzimas, mostrando constantes de inhibición (K_i) a nivel nanomolar en distintas especies de leguminosas, tales como soja (77), guisante (78), lenteja (37) y altramuz (*Lupinus albus*) (79).

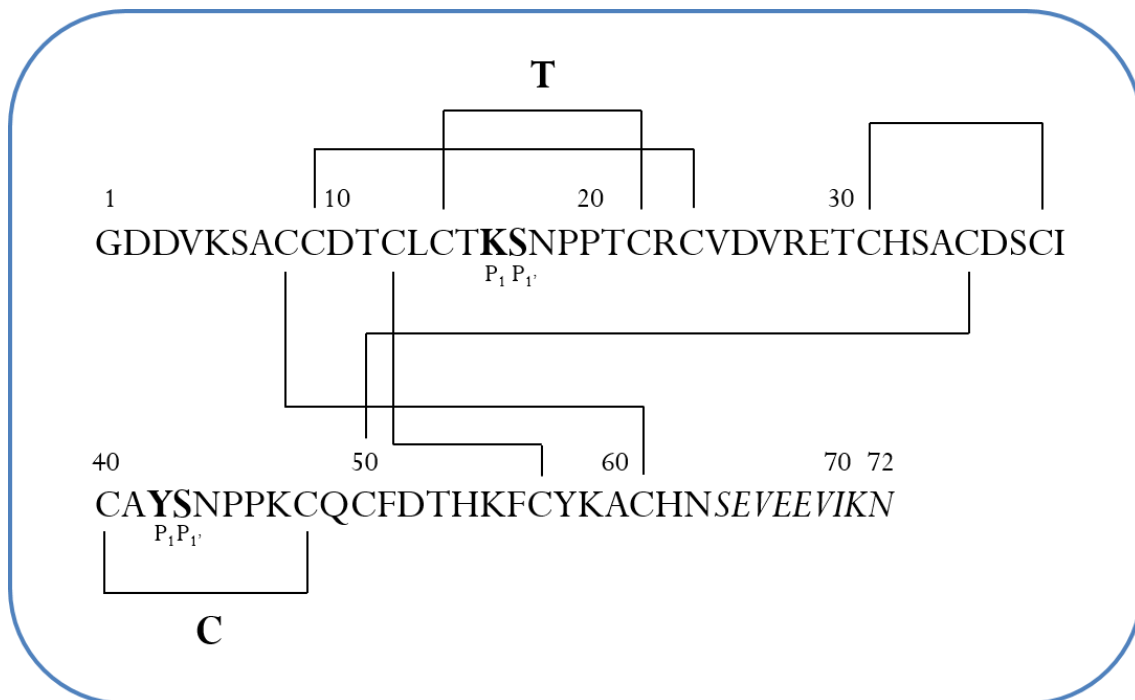


Figura 3. Secuencia de aminoácidos y mapa de puentes disulfuro de la proteína TI1 de guisante. Los dominios de inhibición de tripsina (T) y quimotripsina (C) presentan la secuencia CT**K**SNPPTC y CAYSNPPKC, respectivamente, mostrándose los siete puentes disulfuro mediante líneas conectadas. Las posiciones P₁ y P₁' (en negrita) constituyen el sitio de unión con la enzima diana. La proteólisis limitada de TI1 mediante la eliminación de nueve aminoácidos en el extremo C-terminal, que ocurre *in vivo* durante el periodo de desecación de la semilla, se indica en cursiva (15).

El aminoácido serina en la posición P₁' (**Figura 3**) se encuentra muy conservado en ambos dominios de inhibición. Este residuo está implicado en uniones de hidrógeno intramoleculares a lo largo del dominio de inhibición (65), contribuyendo a la afinidad por la enzima, pero sin jugar un papel esencial en la integridad estructural de la proteína (80). El aminoácido prolina que se encuentra de forma muy conservada en la posición P₃' (**Figura 3**) es esencial para la actividad inhibidora de ambos dominios de inhibición, mientras que la prolina en la posición P₄', aunque menos conservada, juega un papel importante en la conformación correcta del inhibidor (81).

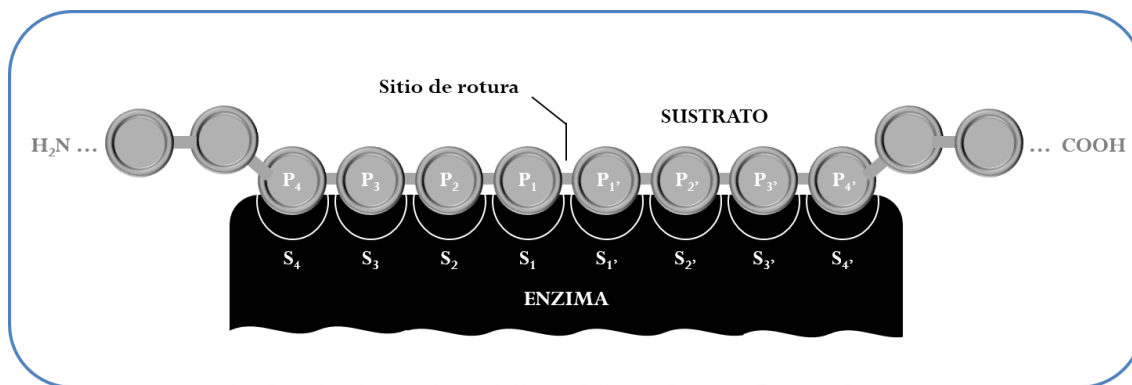


Figura 4. Representación esquemática del sitio activo de una enzima e interacción con su inhibidor, mediante la nomenclatura de Schechter y Berger (1967) (2).

La relevancia biológica de ambos dominios de inhibición, tripsina y quimotripsina, presentes en las proteínas BBI parece ser diferente, si bien en la actualidad esta idea es objeto de cierta controversia. El dominio de inhibición de tripsina juega un papel importante en la defensa de la planta frente al ataque de insectos y hongos (82) (**apartado 1.2.1**) estando, además, asociada su presencia con un descenso en la biodisponibilidad de las proteínas de la dieta (**apartado 1.5.1**). Por otro lado, el dominio de inhibición de quimotripsina parece estar involucrado específicamente en las propiedades anti-cancerígenas de estas proteínas (83,84) (**apartado 1.5.2**). Esta hipótesis se estableció tras los estudios de Yavelow *y col.* (1985) (85), en los cuales la escisión de BBI de soja, mediante bromuro de cianógeno y pepsina, daba lugar a dos fragmentos proteicos, uno con actividad inhibidora de tripsina y otro con actividad inhibidora de quimotripsina, siendo este último fragmento capaz de disminuir la transformación *in vitro* inducida por radiación. Sin embargo, recientemente se ha demostrado el papel que juega el dominio de inhibición de tripsina en su capacidad de inhibir la proliferación de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano por parte de IBBD2, un inhibidor BBI mayoritario de soja, el cual presenta dos dominios de inhibición de tripsina (77). De manera similar, el inhibidor de tripsina MsTI, procedente de semillas de *Medicago scutella*, disminuye la supervivencia clonogénica de células cancerígenas de mama (MCF-7) y células de cáncer cervical (HeLa), tras tratamiento de 24 h (86). En conjunto, estos estudios pioneros postulan que los dominios de inhibición frente a tripsina pudieran ejercer un papel beneficioso en salud.

1.4 POLIMORFISMO DE LA FAMILIA DE INHIBIDORES BOWMAN-BIRK

Las proteínas Bowman-Birk se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y, aunque en la mayoría de los casos los aminoácidos presentes en los dominios de inhibición se encuentran conservados, existe cierto polimorfismo en las proteínas BBI de leguminosas, a nivel inter- e intra-específico, debido a variaciones de secuencia existentes en los dominios de inhibición, modificaciones postraduccionales en los extremos N- y C-terminal de la proteína, y formación de oligómeros que pudieran influir en la actividad funcional y biológica de las proteínas BBI.

1.4.1 Variación de secuencia

Tal como se ha descrito en el apartado anterior (**apartado 1.3**), en la mayoría de leguminosas analizadas, el dominio de inhibición N-terminal de las proteínas BBI inhibe la enzima tripsina y presenta los aminoácidos arginina o lisina en la posición P₁ (**Tabla 4**). Existen excepciones en las que se puede encontrar el aminoácido alanina en dicha posición, el cual determina especificidad frente a elastasa (21), tal y como está descrito en soja silvestre (*Glycine soja*) (87) y almorta (*Lathyrus sativus*) (88). Por otro lado, proteínas BBI de judías pintas presentan el aminoácido glutámico en la posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal, lo cual podría resultar en formas inactivas de la proteína. La posición P₁ del dominio de inhibición C-terminal de las proteínas BBI de leguminosas presenta una mayor variabilidad (**Tabla 5**). La elevada afinidad que presentan las proteasas del tipo quimotripsina por aminoácidos aromáticos (tirosina o fenilalanina) queda reflejada en estos inhibidores, mostrando mayor potencia aquellos que presentan tirosina en la posición P₁ (89). Variaciones en la secuencia de aminoácidos de ambos dominios de inhibición pueden ser importantes en términos de relevancia biológica de los inhibidores BBI como agentes quimiopreventivos. Estudios *in vitro* demuestran que dos isoformas BBI recombinantes de guisante, rTI1 y rTI2, con diferencias en las posiciones P₁, P_{1'} y P_{2'} dentro del dominio de inhibición de quimotripsina (Tyr-Ser-Asn y Leu-Ser-Tyr, respectivamente) presentan diferencias en sus propiedades antiproliferativas frente a células HT29, mostrando valores de IC₅₀ (concentración del inhibidor requerida para alcanzar una inhibición del 50%) de 46 y 73 μM, respectivamente (90). Otras modificaciones en posiciones adyacentes al sitio reactivo (P₁-P_{1'}) también pueden afectar a la afinidad del inhibidor frente a sus proteasas diana.

Tabla 4. Secuencia de aminoácidos del dominio de inhibición N-terminal de proteínas de la familia Bowman-Birk presentes en distintas especies de leguminosas (32,76).

Especies	P ₁	P ₃	P ₂	P ₁	P _{1'}	P _{2'}	P _{3'}	P _{4'}	P _{5'}	P _{6'}
<i>Canavalia lineata</i> (a)	Lys	Cys	Thr	Lys	Ser	Glu	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Dioclea glabra</i> (b)	Arg	Cys	Thr	Lys	Ser	Glu	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Doichos axillaris</i> (c)	Ala/Thr	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Doichos biflorus</i> (d)	Ala/Thr	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Dolichos lablab</i> (e)	Ala	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Glycine max</i> (f)	Ala/Met	Cys	Thr	Lys/Arg	Ser	Asn/Met	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Glycine soja</i> (g)	Ala/Met	Cys	Thr	Lys/Ala/Arg	Ser	Asn/Met	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Lens culinaris</i> (h)	Leu/Pro	Cys	Thr	Arg	Ser	Gln/Ile	Pro	Pro	Thr/Lys	Cys
<i>Medicago scutellata</i> (i)	Pro	Cys	Thr	Arg	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Medicago sativa</i> (j)	Pro	Cys	Thr	Lys/Arg	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Phaseolus angularis</i> (k)	Ser/Leu	Cys	Thr	Lys	Ser	Met/Ile	Pro	Pro	Lys/Gln	Cys
<i>Phaseolus aureus</i> (l)	Arg/Asp	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln/Glu	Cys
<i>Phaseolus lunatus</i> (m)	Ala	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Phaseolus vulgaris</i> (n)	Ala/Ile	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile/Arg	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Pisum sativum</i> (o)	Leu/Ile	Cys	Thr	Lys/Arg/Ala	Ser	Asp/Ile/Asn	Pro	Pro	Thr/Arg/Gln	Cys
<i>Vicia angustifolia</i> (p)	Leu	Cys	Thr	Arg	Ser	Gln	Pro	Pro	Thr	Cys
<i>Vicia faba</i> (q)	Leu	Cys	Thr	Lys	Ser	Glu	Pro	Pro	Thr	Cys
<i>Vigna mungo</i> (r)	Ala	Cys	Thr	Lys	Ser	Ile	Pro	Pro	Lys	Cys
<i>Vigna unguiculata</i> (s)	Ala/Ile/Lys/Glu	Cys	Thr	Lys/Glu	Ser	Ile	Pro	Pro	Z/Gln	Cys

Números de acceso de la base de datos Swiss-Prot: (a) Q7M1P9, Q7M1Q0; (b) P82469; (c) P01057, P01059; (d) Q9S9E3, Q941H6; (e) Q93WK3; (f) P01055, Q53ZY0, P01064; (g) Q8RU23, Q8RU22, Q8RU21; (h) Q8W4Y8, Q8W4Y1, Q4W2W2, Q4W2W2; (i) P80321, Q6A4J9; (j) Q40329, Q40330; (k) P01058, P01061; (l) Q7Y1U3, P01062; (m) P01056, Q941H3; (n) Q8L6E6, Q708V8, Q708V9, Q8L6E8, Q941H4, Q93YY2; (o) P56679, Q8VX18, Q41066, Q9AVS2, Q9AVS0, Q9AVS3; (p) P01065; (q) P24661; (r) Q941H5; (s) Q84X88, Q9S9H8, P17734, Q84X85, Q84X86, Q84X87, Q84X89.

Tabla 5. Secuencia de aminoácidos del dominio de inhibición C-terminal de proteínas de la familia Bowman-Birk presentes en distintas especies de leguminosas (32,76).

Especies	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P _{1'}	P _{2'}	P _{3'}	P _{4'}	P _{5'}	P _{6'}
<i>Canavalia lineata</i> (a)	Ile/Leu	Cys	Thr/Ala	Leu	Ser	Ile/Phe	Pro	Ala	Gln/Lys	Cys
<i>Dioclea glabra</i> (b)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Dolichos axillaris</i> (c)	Val/Ile	Cys	Thr/Ala	Phe/Leu	Ser	Ile/Glu	Pro	Ala	Gln	Cys
<i>Dolichos biflorus</i> (d)	Val	Cys	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Ala	Gln	Cys
<i>Dolichos lablab</i> (e)	Leu	Cys	Thr	Phe	Ser	Ile	Pro	Ala	Gln	Cys
<i>Glycine max</i> (f)	Ile/Met	Cys	Ala/Thr	Leu/Arg	Ser	Tyr/Gln	Pro	Ala/Gly	Gln	Cys
<i>Glycine soja</i> (g)	Ile/Ala/Met	Cys	Ala/Thr	Leu/Arg	Ser	Tyr/ Met/Gln	Pro	Ala/Gly	Gln	Cys
<i>Lens culinaris</i> (h)	Val/Leu	Cys	Ala/Thr	Tyr/Arg	Ser	Asn/Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Medicago scutellata</i> (i)	Leu	Cys	Thr	Arg	Ser	Phe	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Medicago sativa</i> (j)	Leu	Cys	Thr	Arg	Ser	Ile	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Phaseolus angularis</i> (k)	Ala/Met	Cys	Thr	Tyr/Arg	Ser	Met/Ile	Pro	Ala/Gly	Lys/Gln	Cys
<i>Phaseolus aureus</i> (l)	Met/Ile	Cys	Thr	Arg	Ser	Met	Pro	Gly	Lys	Cys
<i>Phaseolus lunatus</i> (m)	Ile	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	Pro	Ala	Gln	Cys
<i>Phaseolus vulgaris</i> (n)	Ile/Met	Cys	Thr	Leu/Arg /Phe	Ser	Ile/Met	Pro	Ala/Gly	Gln/Lys	Cys
<i>Pisum sativum</i> (o)	Ile	Cys	Ala/Thr	Leu/Arg/Tyr	Ser	Tyr/Leu/Asn/Phe	Pro	Pro	Gln/Lys	Cys
<i>Vicia angustifolia</i> (p)	Val	Cys	Asn	Tyr	Ser	Asn	Pro	Pro	Gln	Cys
<i>Vicia faba</i> (q)	Val	Cys	Arg	Tyr	Ser	Asn	Pro	Pro	Lys	Cys
<i>Vigna mungo</i> (r)	Ala	Cys	Thr	Tyr	Ser	Ile	Pro	Ala	Gln	Cys
<i>Vigna unguiculata</i> (s)	Ala/Met	Cys	Thr	Phe/Arg	Ser	Met/Ile/Thr	Pro	Gly/Ala	Gln/Lys/Z	Cys

Números de acceso de la base de datos Swiss-Prot: (a) Q7M1P9, Q7M1Q0; (b) P82469; (c) P01057, P01059; (d) Q9S9E3, Q941H6; (e) Q93WK3; (f) P01055, Q53ZY0, P01064; (g) Q8RU23, Q8RU22, Q8RU21; (h) Q8W4Y8, Q8W4Y1, Q4W2W2, Q4W2W2; (i) P80321, Q6A4J9; (j) Q40329, Q40330; (k) P01058, P01061; (l) Q7Y1U3, P01062; (m) P01056, Q941H3; (n) Q8L6E6, Q708V8, Q708V9, Q8L6E8, Q941H4, Q93Y2; (o) P56679, Q8VX18, Q41066, Q9AVS2, Q9AVS0, Q9AVS3; (p) P01065; (q) P24661; (r) Q941H5; (s) Q84X88, Q9S9H8, P17734, Q84X85, Q84X86, Q84X87, Q84X89.

A la hora de caracterizar funcionalmente las proteínas Bowman-Birk, los dos factores más relevantes son la constante de inhibición (K_i) y la tasa de hidrólisis por parte de la enzima a la que inhiben (91). Ambos factores dependen, en gran medida, de la secuencia de aminoácidos de la proteína, por lo que es importante estudiar las variaciones que se producen en dicha secuencia, las cuales pueden modificar la afinidad o especificidad frente a proteasas diana, así como los requerimientos estructurales que determinan la estabilidad y resistencia a proteólisis de sus dominios de inhibición (32). Con el uso de péptidos cíclicos sintéticos de un tamaño menor que sean capaces de retener, al menos parcialmente, la actividad biológica de la proteína parental, sería posible evaluar variaciones de secuencia que pudieran influir en la actividad inhibitora y tasa de hidrólisis de los dominios de inhibición de las proteínas BBI (Figura 5).

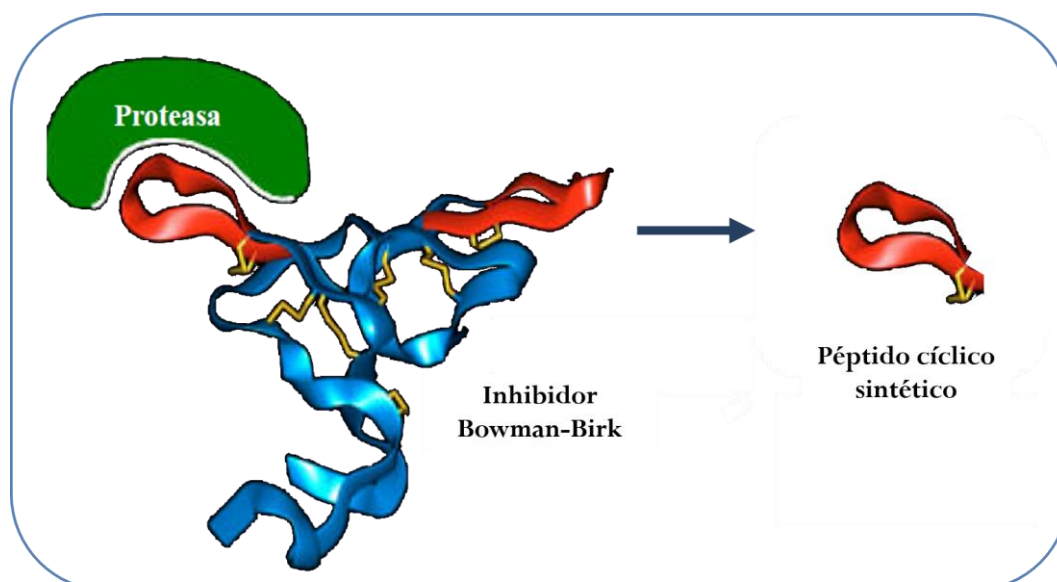


Figura 5. Péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas Bowman-Birk (Adaptado de la página web del laboratorio del Prof. Robin Leatherbarrow del Imperial College, Reino Unido).

Los primeros intentos para la obtención de péptidos sintéticos activos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas BBI se llevaron a cabo con péptidos cíclicos de 9 aminoácidos, imitando al dominio de inhibición de tripsina de las proteínas BBI de soja (92). Estos péptidos presentaban actividad inhibitora frente a la enzima tripsina ($K_i = 750$ nM), si bien mostraron una menor afinidad por la enzima comparada con la mostrada por la proteína parental ($K_i = 3$ nM) (93). Péptidos cíclicos de 11 aminoácidos mostraron una mayor actividad inhibitora frente a la enzima tripsina en relación a péptidos de menor tamaño molecular (94). La ciclación de estos péptidos, mediante un puente disulfuro entre dos moléculas de cisteína, es necesaria para que

estos sean activos frente a las enzimas tripsina, quimotripsina y elastasa (**Figura 6**); por el contrario, péptidos lineales de secuencia similar en los cuales se reducen los residuos de cisteína, no muestran capacidad de inhibición alguna frente a estas serín proteasas (95). Es interesante destacar que la conformación estructural de un péptido derivado del inhibidor de tripsina de *Phaseolus aureus roxb*, tras su unión con tripsina, es similar a la estructura que presenta el dominio de inhibición de la proteína BBI parental con dicha enzima (66).

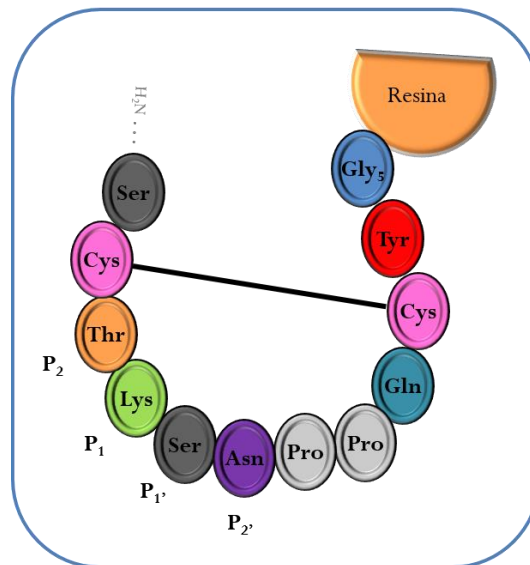


Figura 6. Representación esquemática de un péptido cíclico sintético unido a una resina mediante un espaciador de pentaglicina. Dos cisteínas en posiciones opuestas participan de un puente disulfuro intramolecular. Las posiciones P₁-P_{1'} constituyen el sitio de unión con la enzima tripsina, siendo el aminoácido localizado en la posición P₁ determinante de su especificidad. Adaptado de Clemente y Domoney (2006) (32).

Mediante el uso de librerías de péptidos cíclicos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas BBI se ha estudiado la relación existente entre secuencia de aminoácidos y actividad inhibitoria, especificidad y potencia de inhibición así como la resistencia a hidrólisis frente a sus proteasas diana (96,97). Al igual que ocurre con la proteína BBI parental, el aminoácido presente en la posición P₁ es responsable de la especificidad de la enzima a la que inhiben (2). Del mismo modo, variaciones en la posición P₁ de péptidos cíclicos sintéticos producen cambios relevantes en la especificidad frente a la enzima diana. Así, la presencia de los aminoácidos lisina o arginina en péptidos cíclicos determina especificidad frente a la enzima tripsina. La capacidad de inhibir esta enzima también se ve modificada por variaciones en la posición P_{2'}, obteniéndose diferencias significativas de varios órdenes de magnitud en los valores de K_i, siendo el aminoácido isoleucina el que muestra una menor K_i (9 nM), seguido de los aminoácidos norleucina (500 nM), arginina y leucina (1 μM) (96).

Por otro lado, los aminoácidos leucina, fenilalanina y tirosina en la posición P_1 determinan especificidad frente a quimotripsina, siendo aquellos péptidos con fenilalanina y tirosina en la posición P_1 los que presentan una menor K_i (95). McBride *y col.* (1996) (98) diseñaron una librería de péptidos inmovilizados, utilizando como molde la secuencia CXXSXPECT, correspondiente al dominio de inhibición de tripsina del inhibidor D4 procedente de *Macrotyloma axillare*, con el fin de evaluar su capacidad de inhibir la enzima quimotripsina mediante variaciones en las posiciones P_2 , P_1 y P_2' . Los investigadores obtuvieron 8000 combinaciones de las cuales sólo el 0.05 % se unían covalentemente a la enzima quimotripsina biotinilada. El análisis en solución de los péptidos activos resintetizados reflejó una secuencia consenso que presenta el aminoácido treonina en la posición P_2 , los aminoácidos aromáticos tirosina o fenilalanina en la posición P_1 , e isoleucina, leucina o norleucina en la posición P_2' . Una librería peptídica de segunda generación con variación en las posiciones P_4 , P_1 y P_2' permitió la selección de secuencias peptídicas con capacidad de inhibir quimotripsina con valores de K_i en el rango nanomolar (99), siendo la secuencia QCTFSLPPQCY la que presentaba una mayor potencia de inhibición ($K_i = 3.4$ nM).

Aunque la tasa de hidrólisis no siempre se correlaciona con la potencia de inhibición, aquellos péptidos que presentan menores valores de K_i tienden a ser hidrolizados más lentamente (96). Tal es el caso de péptidos cíclicos que presentan el aminoácido treonina en posición P_2 (100), con valores de K_i extraordinariamente bajos frente a quimotripsina (19 nM), o isoleucina en posición P_2' . Sin embargo, esta afirmación no siempre puede aplicarse a otras posiciones tales como la P_1 , observándose que péptidos cíclicos sintéticos que muestran valores más bajos de K_i frente a la enzima tripsina, con arginina en posición P_1 , presentan una mayor tasa de hidrólisis (95). Sin embargo, péptidos con los aminoácidos metionina, leucina y norleucina en posición P_1 , los cuales presentan valores elevados de K_i frente a quimotripsina, tienen una tasa de hidrólisis menor.

Tal y como se describe en el **apartado 1.1.1**, ciertas serín proteasas juegan un papel clave en el desarrollo tumoral, procesos inflamatorios y metástasis. Algunas de ellas, como la triptasa, específica de mastocitos e involucrada en asma y procesos inflamatorios (101), presenta una organización multimérica cuyas dimensiones, así como ciertos impedimentos estéricos, limitan el acceso a posibles inhibidores, como el inhibidor de tripsina bovino. Sin embargo, diversos péptidos cíclicos que simulan los dominios de inhibición de las proteínas BBI son potentes inhibidores de triptasa (102). El menor tamaño de estos péptidos, comparado con las proteínas parentales, parece ser la clave para permitir el acceso al sitio activo de la enzima. Otra serín proteasa considerada una diana terapéutica para péptidos derivados de proteínas BBI es la enzima elastasa, la cual está

involucrada en la destrucción de tejidos en procesos inflamatorios. Mediante la evaluación de una librería de péptidos derivados de BBI se han identificado secuencias de péptidos capaces de inhibir esta enzima, mostrándose valores de K_i de 65 nM, los cuales mostraban bajas tasas de hidrólisis (103).

Existe un péptido natural estructuralmente similar al dominio de inhibición de las proteínas BBI denominado SFTI-1, presente en semillas de girasol (*Helianthus annuus*), el cual fue aislado y caracterizado por Lockett *y col.* en 1999 (104) y, más recientemente, se ha expresado de forma recombinante en *E. coli* (105). Se trata del inhibidor de proteasas de origen vegetal más pequeño descubierto hasta la fecha (1513 Da), con una estructura rígida de catorce aminoácidos y un puente disulfuro que aumenta su estabilidad y divide al péptido en dos regiones, un dominio reactivo y otro cíclico de nueve y siete aminoácidos, respectivamente. SFTI-1 es un inhibidor potente de tripsina ($K_i = 0.1$ nM), muy resistente a la hidrólisis por parte de la misma (106). También es capaz de inhibir la enzima catepsina G ($K_i = 0.15$ nM), mostrando una gran selectividad, siendo menos potente frente a quimotripsina ($K_i = 7.4$ μ M), elastasa ($K_i = 105$ μ M) y trombina ($K_i = 136$ μ M) (104). Su estructura molecular, secuencia y mecanismo de inhibición son muy similares al dominio de inhibición de tripsina de las proteínas BBI por lo que, utilizando su secuencia como molde, se han obtenido péptidos que presentan una elevada inhibición frente a la enzima furina ($K_i = 0.49$ nM) (107), matriptasa-2 ($K_i = 2.6$ nM) y frente a la unidad 20S del proteosoma (108).

1.4.2 Modificaciones postraduccionales

Las proteínas Bowman-Birk pueden sufrir modificaciones postraduccionales que pueden afectar a su funcionalidad y modular su actividad biológica. En *Dolichos biflorus*, varias isoformas (HGIs) desaparecen durante la germinación de las semillas, apareciendo isoformas nuevas (HGGIs) debido a la proteólisis que ocurre en los extremos N- y C-terminal de la proteína (109), posiblemente debida a la acción de metaloproteasas (110). Esta proteólisis ocurre principalmente durante la etapa de desecación de las semillas, tal como se ha descrito en semillas de guisante (111), haba (*Vicia faba*) y garbanzo (112). De manera similar, durante la germinación de semillas de judía mungo (*Vigna radiata*) aparecen isoformas procesadas en el extremo C-terminal (MBI-E y MBI-C), procedentes del inhibidor mayoritario MBI-F (113). En semillas de guisante de invierno podemos encontrar hasta seis isoformas BBI (114) de las cuales cuatro han sido secuenciadas (PsTI-I, PsTI-II,

PsTI-IVa y PsTI-IVb) (115). Estas isoformas presentan los primeros veinte aminoácidos del extremo N-terminal idénticos y difieren en el extremo C-terminal de la proteína.

En semillas de guisante, los inhibidores BBI mayoritarios están codificados principalmente por dos genes que se encuentran estrechamente ligados, *TI1* y *TI2* (27,35). En éstas se pueden encontrar múltiples isoformas de BBI, consecuencia de procesamientos en los extremos N- y C-terminal de las proteínas que ocurren principalmente durante la etapa de desecación y desarrollo de la semilla (35). En la variedad de guisante Birte, existe un procesamiento de nueve aminoácidos en el extremo C-terminal de las proteínas TI1 y TI2, las cuales presentan una menor electronegatividad en comparación con las proteínas parentales (**Figura 7**). El cambio en la carga neta de la proteína da lugar a perfiles electroforéticos diferentes cuando las proteínas son analizadas en geles bajo condiciones no desnaturizantes, tratados con las enzimas tripsina y quimotripsina (116). Asimismo, se ha identificado procesamiento en el extremo N-terminal de inhibidores de guisante, sugiriéndose que ambos extremos pueden ser accesibles a la ruptura proteolítica (55). No obstante, la presencia de los puentes disulfuro intramoleculares parece ejercer protección frente a la acción de las enzimas proteolíticas, manteniéndose intacto el *core* de la proteína que contiene ambos dominios de inhibición (117).

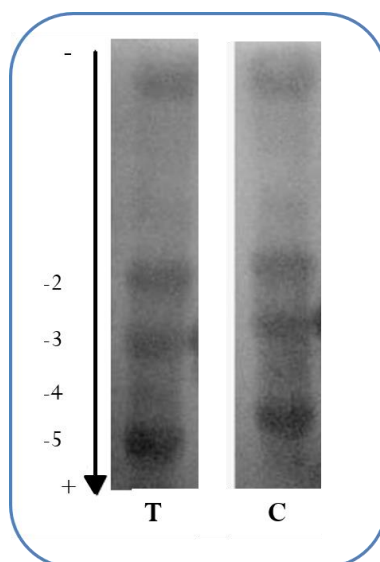


Figura 7. Análisis de actividad inhibidora *in gel* de la fracción de albúminas de guisante de la variedad Birte (116). Los geles de casein Blue se trataron con las enzimas digestivas tripsina (T) y quimotripsina (C); las áreas oscuras indican inhibición de la enzima. La dirección de la electroforesis de los geles se indica mediante una línea vertical. Las variantes -2 y -5 entre las isoformas presentes en la fracción de albúminas de la variedad Birte representan los productos génicos primarios TI1 y TI2, respectivamente.

El plegamiento de la proteína no parece verse afectado por el procesamiento de los extremos N- y C-terminal de los inhibidores Bowman-Birk; no obstante, este procesamiento podría influir en las propiedades funcionales y estabilidad de estas proteínas. La proteólisis de nueve aminoácidos del extremo C-terminal se ha asociado con un incremento en la afinidad de los inhibidores por la enzima tripsina, incrementándose la actividad inhibidora de tripsina (TIA) *in vivo* (111,118). Sin embargo, se observan los mismos valores de K_m frente a la enzima tripsina en dos isoformas de guisante de invierno, PsTI-II y PsTI-IVb, a pesar de que PsTI-II no presenta el extremo C-terminal (55). En el complejo tripsina:PsTI-IVb:quimotripsina, el extremo C-terminal del inhibidor parece interactuar con la enzima tripsina, pero no con quimotripsina (55). Sin embargo, mediante estudios de rayos X, no se han encontrado evidencias suficientes que corroboren una posible interacción del extremo C-terminal del inhibidor BBI de judía azuki (*Vigna angularis*), AB-I, con la enzima tripsina (64).

1.4.3 Oligomerización

El extremo C-terminal de las proteínas Bowman-Birk parece no interactuar de forma directa con la enzima diana, pero juega un papel fundamental en el estado de dimerización de estas proteínas. En solución acuosa, las proteínas BBI se encuentran en un equilibrio entre formas monoméricas y distintas formas oligoméricas, tal y como se ha descrito en especies tales como el guisante de invierno (55), judías pintas (63,119) y *Dolichos biflorus* (110,120,121). En semillas de *Dolichos biflorus*, el inhibidor mayoritario HGI-III y la isoforma procesada que aparece durante la germinación de las semillas, HGGI-III, se encuentran principalmente en forma dimérica y monomérica en solución, respectivamente. La principal diferencia entre ambos inhibidores es la proteólisis en los extremos N- y C-terminal de HGGI-III de doce y cuatro aminoácidos, respectivamente (110). Dado que el inhibidor HGI-I también se encuentra en forma dimérica en solución, aun presentando proteólisis en el extremo N-terminal, la eliminación de los aminoácidos Ser-His-Asp-Asp en el extremo C-terminal de HGGI-III sugiere un papel principal en el estado de dimerización de la proteína. El estado en forma dimérica del inhibidor HGI-III tiene lugar mediante un enlace salino, con el que se produce una interacción electrostática entre el grupo amino de la Lys²⁴ en la posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal de un monómero y el grupo carboxilo del Asp⁷⁵ en el extremo C-terminal del segundo monómero (**Figura 8**) (110,121). Estos datos fueron confirmados mediante las mutaciones puntuales K24A (120) y D75A (121), las cuales dieron lugar a formas monoméricas de la proteína. Además, para la formación de dímeros en HGI-III

también es necesaria la formación de un enlace salino entre los aminoácidos Lys⁷¹-Asp⁷⁶ en el extremo C-terminal de un monómero (121); durante la germinación de las semillas, la pérdida del Asp⁷⁶ impide la formación de las interacciones necesarias para la formación de dímeros, dando lugar a formas monoméricas (110).

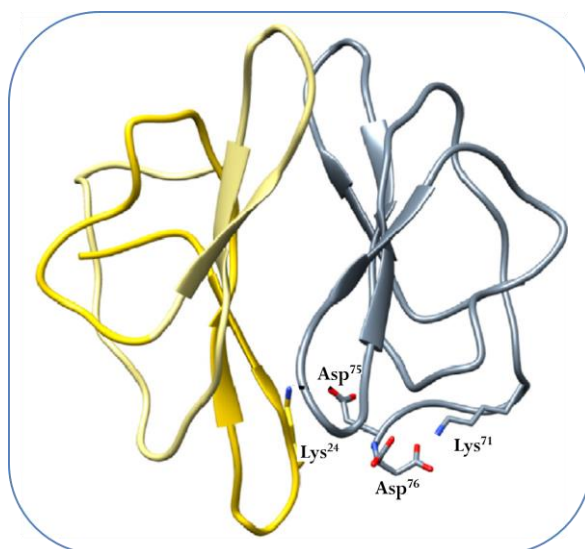


Figura 8. Modelo de dimerización del inhibidor Bowman-Birk, HGI-III, procedente de semillas de *Dolichos biflorus*. Los dos monómeros están indicados en distintos colores (amarillo y gris). La interacción intermonómeros tiene lugar mediante un puente salino entre los aminoácidos Lys²⁴-Asp⁷⁵ y la interacción intra-monómeros mediante un puente salino entre los aminoácidos Lys⁷¹-Asp⁷⁶ del extremo C-terminal de un mismo monómero (121).

En semillas de guisante de invierno, el inhibidor PsTI-IVb se encuentra en forma dimérica mediante la formación de puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas en las cuales están involucrados los aminoácidos básicos del extremo N-terminal de un monómero (Arg²³ y Lys¹⁶) y el extremo C-terminal con carga del segundo monómero (Glu⁶⁸ y Glu⁶⁹) (55). Del mismo modo, en semillas de almorta, la isoforma LSI-2a se encuentra en forma dimérica, siendo los aminoácidos Arg²³ y Lys²⁶ de un monómero los que presentan interacciones con los aminoácidos Glu⁶⁷ y Glu⁶⁸ del extremo C-terminal del segundo monómero (122). En cuanto a la estabilidad de formas monoméricas y diméricas de las proteínas Bowman-Birk, la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos de un monómero se encuentran protegidos del solvente por el segundo monómero, por lo que cabría esperar una mayor estabilidad de las formas diméricas con respecto a las formas monoméricas (55). En este sentido, las formas monoméricas parecen ser menos estables que las formas diméricas a altas temperaturas (120,121) y la transición de dímeros a monómeros parece ser crucial para unirse a las enzimas tripsina y quimotripsina y ejercer su actividad inhibidora (55,121).

1.5 PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE LOS INHIBIDORES BOWMAN-BIRK

1.5.1 Propiedades anti-nutricionales

Las enzimas tripsina y quimotripsina son serín proteasas digestivas producidas en el páncreas en forma de precursores inactivos (tripsinógeno y quimotripsinógeno, respectivamente), los cuales son activados mediante hidrólisis en el duodeno, jugando un papel esencial en el proceso de digestión proteica. Los inhibidores de proteasas presentes en semillas de leguminosas, como los inhibidores Bowman-Birk, son capaces de mantener su actividad biológica durante el proceso digestivo debido a su elevada estabilidad frente a las condiciones extremas del tracto gastrointestinal (pH ácido y actividad de enzimas digestivas). Estos pueden formar complejos estables con las enzimas digestivas dentro el tracto gastrointestinal (TGI) (123,124), los cuales son posteriormente excretados. La disminución de los niveles de las enzimas digestivas en el intestino delgado da lugar a una mayor síntesis de enzimas proteolíticas por parte del páncreas, a través de un mecanismo de feedback negativo, incrementándose los niveles de la hormona colecistoquinina (CCK) por parte de la mucosa intestinal (**Figura 9**) (125,126).

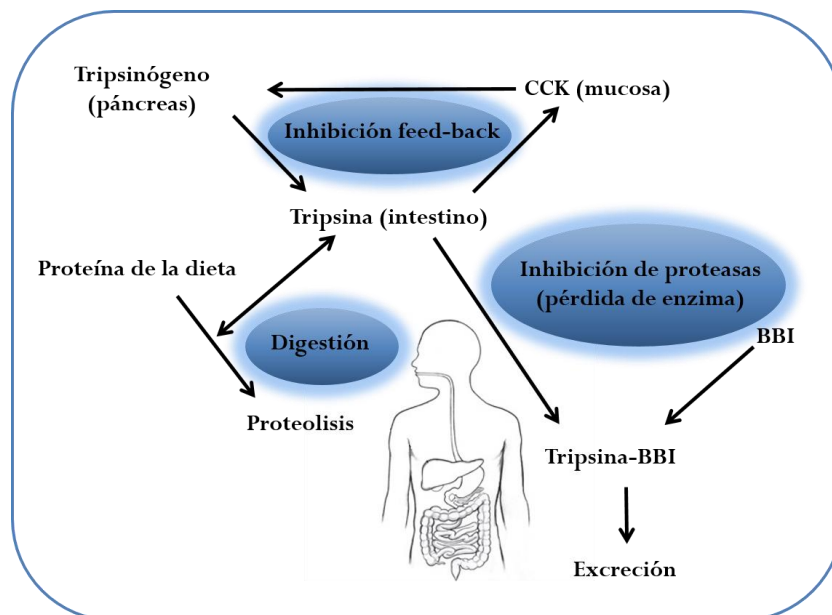


Figura 9. Mecanismo de acción de los inhibidores Bowman-Birk de soja en el páncreas (32,127). Los inhibidores BBI pueden unirse a enzimas digestivas como tripsina, formando complejos que son excretados y, como consecuencia, se produce una mayor síntesis de la enzima por parte del páncreas, siendo regulado por la hormona digestiva colecistoquinina (CCK).

En roedores, se ha observado que la hipersecreción de proteasas pancreáticas en respuesta a la acción de las proteínas BBI puede derivar en hiperplasia e hipertrofia pancreática. Sin embargo, las consecuencias de este feedback en la función pancreática difieren considerablemente entre las distintas especies animales, por lo que la extrapolación de los resultados de unas especies a otras resulta inadecuada (124,128). Así, la relación entre el tamaño del páncreas y el peso corporal total parece ser un factor clave, ya que aquellos animales cuyo páncreas excede del 0.3% del peso corporal total (por ejemplo, ratas, ratones y pollos) se ven afectados por hipertrofia pancreática; sin embargo, no se ha observado elongación del páncreas en animales de mayor tamaño, tales como perros, cerdos y monos, los cuales presentan un tamaño pancreático relativo menor (32). En humanos cabe esperar un efecto anti-nutricional mínimo o nulo debido al tamaño relativo del páncreas (0.06-0.24%) respecto al peso corporal total, si bien se ha demostrado una mayor producción de las enzimas tripsina y quimotripsina tras el consumo de BBI (129), no demostrándose efectos adversos evidentes. El consumo de semillas de leguminosas se ha relacionado de forma negativa con el crecimiento animal (123,130) como consecuencia de su contenido limitado en aminoácidos azufrados (126,131). Además, la ingesta de BBI en la dieta conduce a una pérdida de proteínas endógenas ricas en aminoácidos azufrados, como son las enzimas tripsina y quimotripsina (132), estando esta pérdida asociada a la excreción del complejo proteasa-inhibidor. De este modo, ratas alimentadas con dietas ricas en proteínas BBI de soja presentan un menor crecimiento con respecto a ratas alimentadas con dietas libres de IP (133). Estudios llevados a cabo con roedores utilizando dietas que contenían líneas isogénicas de guisante, las cuales diferían cuantitativamente en los niveles de actividad inhibidora de tripsina (8.73-7.40 y 1.45-1.78 TIU·mg⁻¹ de materia seca, respectivamente), demuestran una relación directa entre actividad inhibidora y descenso de digestibilidad proteica y valor biológico de la proteína (134). En pollos alimentados con líneas isogénicas de guisante que presentan un menor contenido en TIA (135), se observa una mejora en la digestibilidad proteica obteniéndose un mayor coeficiente de digestibilidad ileal de aminoácidos (CAID), incluidos cisteína y metionina, entre otros.

Aunque la presencia de proteínas BBI puede limitar el uso de leguminosas grano en alimentación animal (136), la mayoría de estudios se han llevado a cabo en animales de pequeño tamaño que consumen grandes cantidades de estas proteínas durante un periodo de tiempo relativamente largo. Las diferencias en el TGI de las distintas especies animales, así como el grado de inactivación de los inhibidores en el estómago y la forma en que estos son ingeridos, son factores importantes a tener en cuenta con objeto de evaluar sus efectos anti-nutricionales. Tal como se detalla en el siguiente apartado (**apartado 1.5.2**), ensayos clínicos llevados a cabo en humanos

parecen demostrar la capacidad de las proteínas BBI como agentes quimiopreventivos, sin mostrar efectos secundarios aparentes con dosis de hasta 2000 unidades de inhibición de quimotripsina (CIU) por día (137). Es de destacar que, en 1992, la Administración estadounidense de Alimentos y Medicamentos (FDA) consideró a BBIC (un extracto proteico de soja enriquecido en inhibidores BBI) como nueva droga a investigar, utilizándose desde entonces en ensayos clínicos en humanos con hiperplasia prostática benigna, leucoplasia oral y colitis ulcerosa.

1.5.2 Propiedades quimiopreventivas

Tras el procesado de alimentos y durante su paso a través del TGI, las proteínas Bowman-Birk necesitan mantener su actividad biológica, al menos en parte, para ser consideradas como componentes bioactivos integrantes de la dieta (15). Bajo condiciones simuladas de digestión gástrica e intestinal, las proteínas BBI resisten las condiciones ácidas y la acción de las enzimas digestivas pepsina y pancreatina (138), manteniendo sus características estructurales y funcionales. Además, proteínas BBI de soja, bajo condiciones similares, ejercen un efecto protector sobre el péptido lunasina, el cual posee propiedades quimiopreventivas, antioxidantes y anti-inflamatorias (139). La resistencia de las proteínas BBI a las condiciones extremas del TGI puede favorecer el transporte de formas biológicamente activas a través del epitelio gastrointestinal, permitiendo su distribución a tejidos y órganos diana, con el fin de ejercer sus propiedades beneficiosas a nivel local y sistémico (16). La rigidez conformacional de las proteínas BBI, consecuencia del número y distribución de los puentes disulfuro intramoleculares, es responsable de la estabilidad de estas proteínas frente a las condiciones adversas del TGI (condiciones ácidas y enzimas proteolíticas) y ayuda a mantener las características estructurales y funcionales de sus sitios activos (73,140,141). La reducción de los puentes disulfuro y la alquilación de los grupos cisteín sulfidriilo elimina casi totalmente tanto la actividad inhibidora de tripsina como de quimotripsina de BBI de soja debido a cambios conformacionales y/o desplegamiento de la proteína (77); estos cambios estructurales incrementan la vulnerabilidad de las proteínas BBI frente a proteasas digestivas y disminuyen su estabilidad térmica.

Estudios *in vivo* han demostrado la presencia de BBI en el intestino delgado de roedores y cerdos. En ratas, se detectaron y cuantificaron formas inmunológicamente reactivas de BBI de soja (5% del total ingerido) (142) si bien no se evaluó su capacidad de inhibir serín proteasas. Estudios llevados a cabo en cerdos canulados en el íleon terminal han demostrado que las proteínas BBI de

garbanzo permanecen activas (5-8% del total ingerido) durante su tránsito a través del estómago e intestino delgado, llegando al intestino grueso donde pueden ejercer sus propiedades beneficiosas (117). Además, ensayos de fermentación *in vitro* realizados con heces de cerdo demuestran que la actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina de las proteínas BBI no se ven afectadas por las actividades enzimáticas y metabólicas de la microbiota intestinal (143).

A nivel mundial, en los últimos años se han diagnosticado millones de nuevos casos de cáncer colorrectal (CCR). En términos de incidencia, el CCR ocupa la tercera posición, tanto en hombres como en mujeres; en concreto, en 2012 se diagnosticaron alrededor de 1.4 millones de nuevos casos (144). Se estima que alrededor de un 30-40% de los casos se puede prevenir llevando a cabo estilos de vida saludables y a través de una dieta equilibrada (145). En este sentido, el consumo de legumbres se ha asociado de manera inversa con el riesgo de padecer CCR (146), observándose un efecto protector tras la ingesta continuada de dos raciones semanales (una ración equivale a 100 g de legumbres) (147). Las leguminosas presentan una gran variedad de compuestos bioactivos, principalmente proteínas (BBI y la fracción de albúminas 2S) e hidratos de carbono (fibra soluble e insoluble, almidón resistente y oligosacáridos de la familia rafinosa) que pueden incidir positivamente en la salud gastrointestinal del individuo (148). En concreto, las proteínas BBI previenen o suprimen la transformación *in vitro* inducida por radiación o mediante exposición a agentes cancerígenos, así como procesos inflamatorios asociados en el TGI de mamíferos (**Tabla 6**) (15,16,149,150,151). Estudios llevados a cabo en ratones (149,152) y ratas (151), tratados con dimetilhidracina (DMH) como agente cancerígeno, han demostrado que las proteínas BBI de soja incorporadas en la dieta ejercen un efecto protector, reduciendo la incidencia y frecuencia de tumores colorrectales respecto a aquellos animales a los que no se les incorporó proteínas BBI en sus dietas. En estos experimentos, las proteínas BBI no ejercieron efecto adverso documentado alguno, tanto en relación con el crecimiento animal como en la fisiología de sus órganos. Más recientemente, se han obtenido resultados similares en ratones tratados con DMH y proteínas BBI de soja y *M. axillare*, en los cuales no se observan lesiones displásicas tras 24 semanas de tratamiento (24). En ratas tratadas con DMH alimentadas con BBIC autoclavado, en el cual se suprimen las actividades inhibitoras de serín proteasas, no se observa efecto supresor alguno (151), lo cual sugiere que las actividades inhibitoras de proteasas de las proteínas BBI son responsables de los efectos anti-inflamatorios de las mismas.

Tabla 6. Estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran las propiedades quimiopreventivas de los inhibidores Bowman-Birk (16).

Cáncer	Fuente BBI	Carcinógeno	Sistema modelo (especie)	Efecto y/o mecanismo de acción	Referencia
Colorrectal	Soja	DMH	Carcinogénesis colorrectal (ratón)	Reducción de incidencia y frecuencia de tumores mediante la inhibición de proteasas	(151)
			Inflamación anal y de colon (ratón)	Disminución de tumores adenomatosos en el TGI	(149)
		DSS	Inflamación de colon (ratón)	Disminución de parámetros histológicos de inflamación, menor tasa de mortalidad y descenso de la mortalidad inicial	(153)
	<i>Dolichos biflorus</i>	DMH	Carcinogénesis colorrectal (ratón)	Papel protector frente a inflamación y lesiones pre-neoplásicas	(24)
	Lenteja			Disminución de proliferación de células cancerígenas de colon HT29 (IC ₅₀ = 32 µM), sin efecto en células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD8-Co	(154)
	Guisante	-	Células cancerígenas de colon	Efecto anti-proliferativo de BBI en células cancerígenas de colon	(90)
	Soja			Efecto anti-proliferativo de manera tiempo- y dosis-dependiente en células HT29, detención de la fase G ₀ -G ₁ ; tripsina y quimotripsina como dianas potenciales	(77)

Cáncer	Fuente BBI	Carcinógeno	Sistema modelo (especie)	Efecto y/o mecanismo de acción	Referencia
Gástrico	<i>Lablab purpureus</i>	Benzopirreno	Carcinogénesis de estómago (ratón)	BBI es más efectivo en la prevención que en el tratamiento terapéutico, con actividad relacionada con su capacidad de inhibir proteasas	(155)
	Judías pintas	-	Células humanas cancerígenas de mama	BBI induce apoptosis, muerte celular y permeabilización de la membrana lisosómica	(156)
Mama	Soja	-	Células cancerígenas de próstata y carcinogénesis de próstata (rata)	BBI ejerce actividad quimiopreventiva asociada a la inducción de la expresión de conexina-43 y apoptosis	(157,158)
			Xenógrafos de cáncer de próstata (ratón nude)	BBI y BBIG inhiben el crecimiento de células LNCaP	(159)
			Células humanas cancerígenas de próstata	BBI previene la generación de especies reactivas de oxígeno y activa la reparación de ADN mediante un mecanismo independiente de p53	(160,161)
Oral	Soja	-	Leucoplasia oral (humano)	BBI ejerce una reducción dosis-dependiente en el tamaño de lesiones orales en un 31% de los pacientes sin ningún efecto secundario adverso; modulación de la actividad de proteasas y niveles de oncogenes <i>neu</i>	(162,163,164)

DMH: dimetilhidracina; DSS: dextrano sulfato sódico.

En líneas celulares humanas cancerígenas de colon HT29, concentraciones fisiológicamente relevantes de proteínas BBI de guisante (90), soja (77) y lenteja (154) muestran valores de IC_{50} en el rango de 32-73 μ M. Sin embargo, las proteínas BBI de soja no afectan al crecimiento de células fibroblásticas humanas de colon (CCD18-Co) (77). Resultados similares se han observado con proteínas BBI de soja en las cuales se elimina su capacidad de inhibir serín proteasas mediante agentes reductores (DTT) y alquilantes (IAA), las cuales no inhiben la proliferación celular de células HT29, sugiriéndose una relación entre capacidad inhibidora y efecto anti-proliferativo (77). En estos estudios, las proteínas BBI se someten a tratamientos drásticos en los cuales pierden su capacidad estructural y funcional.

Aunque, en muchos casos, la capacidad intrínseca de BBI de inhibir serín proteasas ha sido relacionada con propiedades beneficiosas para la salud, los mecanismos de acción y la identidad de sus dianas terapéuticas son aún desconocidas (16). Uno de los mecanismos de acción postulados en la literatura científica implica la inhibición de las actividades proteolíticas (tripsina, quimotripsina y caspasa) del proteosoma, las cuales generalmente se encuentran incrementadas en células cancerígenas como consecuencia de la proliferación celular, el incremento del estrés oxidativo y los niveles elevados de citoquinas (165). La inhibición del proteosoma da lugar a la pérdida de la homeostasis celular (166) e inducción de la apoptosis (167), por lo que los inhibidores de proteosoma se han caracterizado por ser importantes compuestos en terapia frente al cáncer (168). Las proteínas BBI son capaces de inhibir la actividad proteosómica *in vitro* (25,169) e *in vivo* (23), siendo capaces de internalizarse en células HT29 (170) y en células MCF-7, en las cuales se colocaliza con el proteosoma en citoplasma y núcleo (25). En células MCF-7, mediante la inhibición de la actividad del proteosoma, las proteínas BBI parecen inducir la expresión de la fosfatasa 1 (MKP-1), proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (**Figura 10**). Esta proteína inactiva la vía de señalización ERK1/2 involucrada en el control de la proliferación celular, lo cual provoca una acumulación de los sustratos del proteosoma p27^{Kip1} y p21^{Cip1/WAF1}, con la consecuente disminución de las ciclinas D₁ y E y, posiblemente, desórdenes en la progresión del ciclo celular, sugiriendo que las proteínas BBI pueden inducir la detención del ciclo celular en la fase G₁/S (23). El contenido de ADN en células HT29, tras un tratamiento de 24 h con inhibidores BBI de soja, se encuentra incrementado en la fase G₀-G₁ con respecto al control (no tratadas con proteínas BBI), mientras que la población celular en las fases G₂-M y S disminuye de manera significativa (77).

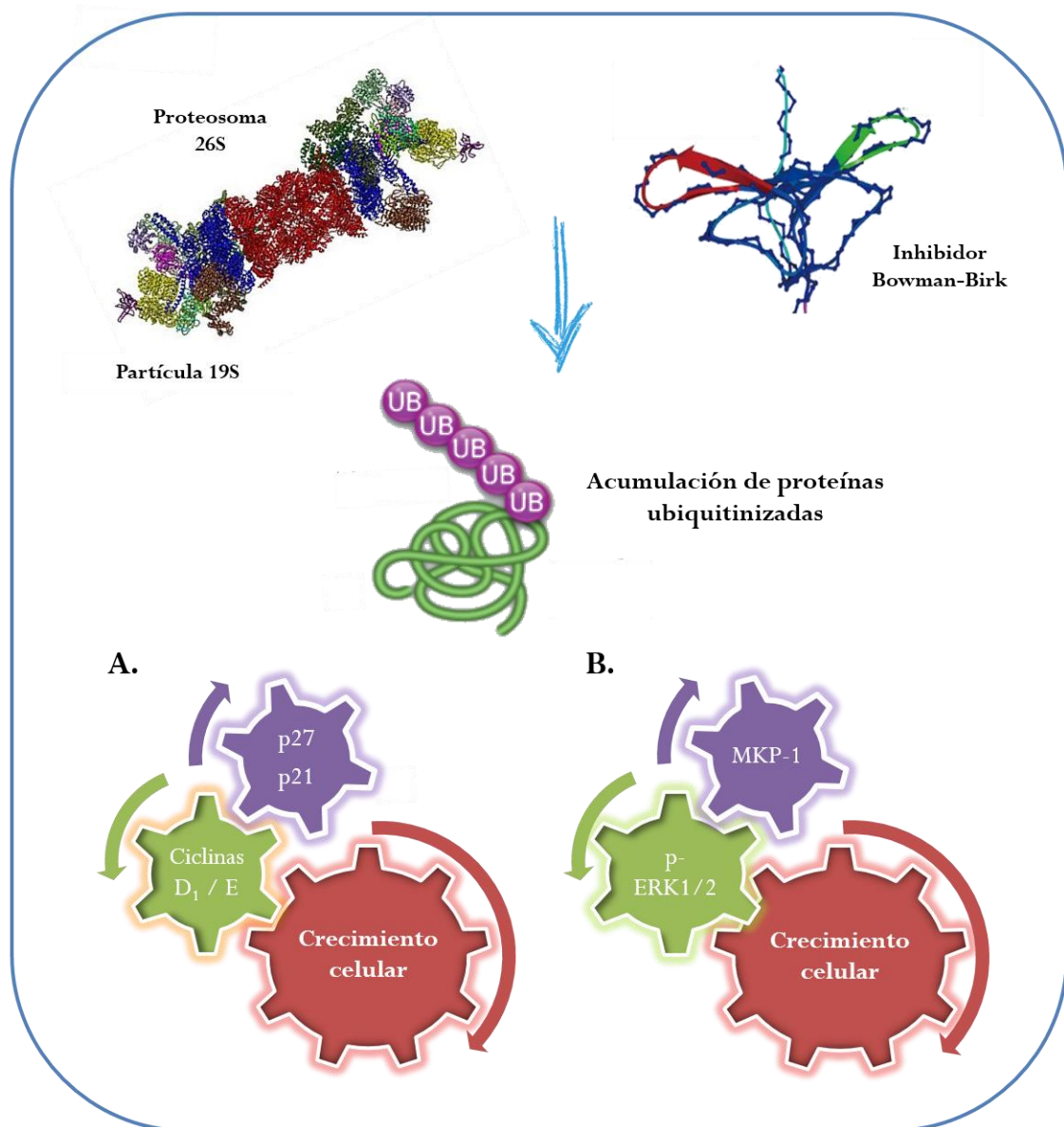


Figura 10. Posible mecanismo de acción de las proteínas Bowman Birk en la cascada de señalización de progresión tumoral mediante la inhibición de la actividad proteosómica. La inhibición del proteosoma mediante las proteínas BBI da lugar a la acumulación de proteínas ubiquitinizadas y los sustratos proteosómicos p27^{Kip1} y p21^{Cip1/WAF1}, junto con una disminución de las ciclinas D₁ y E, lo cual da lugar a la detención del ciclo celular en la fase G₁/S (A). Además, BBI provoca la inducción de MKP-1, la cual a su vez disminuye la actividad de ERK1/2 y el crecimiento celular (B).

La enzima matriptasa (MT-SP1) pertenece a la familia de serín proteasas transmembrana tipo II, y juega un papel importante en la diferenciación y función de la epidermis, el epitelio gastrointestinal y otros tejidos epiteliales (171). Es considerada una enzima del tipo tripsina asociada a procesos tumorales, estando sobreexpresada en tumores de próstata, ovario, útero y colon (172). Esta serín proteasa contribuye a la integridad epitelial y a la activación de proteínas reguladoras a nivel celular, incluyendo el activador de plasminógeno del tipo uroquinasa (uPA), el factor de

crecimiento de hepatocitos (HGF) y el receptor activado por proteasas (PAR), estando implicada en procesos de invasión tumoral y metástasis (173,174). Diversos estudios han demostrado la inhibición de una forma recombinante de matriptasa por parte de inhibidores de proteasas tales como los BBI de soja, el inhibidor de tripsina de judía de Lima (*Phaseolus lunatus*) y el péptido cíclico SFTI-1 (20,106), no estando aún probada su relevancia clínica. Otras serín proteasas están involucradas en procesos inflamatorios y respuesta inmune, por lo que existe un gran interés en la identificación de inhibidores de serín proteasas que puedan ser utilizados en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. En este sentido, existen estudios en los que se demuestra la inhibición de las enzimas catepsina G (19), elastasa (19,21) y quimasa (22) por parte de proteínas BBI de soja (**Tabla 1**) aunque, una vez más, la correlación clínica entre la inhibición de estas serín proteasas y las propiedades anti-inflamatorias asociadas a BBI de soja y proteínas homólogas necesita ser investigada.

En ensayos clínicos llevados a cabo en humanos con hiperplasia prostática benigna (**Tabla 7**), condición que precede al cáncer de próstata, y síntomas urinarios menores, el tratamiento con BBIC durante seis meses redujo los niveles del antígeno específico de próstata (PSA), biomarcador clínico de cáncer de próstata, y el volumen de la próstata (175). En pacientes con leucoplasia oral, se han desarrollado hasta cuatro ensayos clínicos en humanos utilizando BBIC. En fase I se demostró que no existen evidencias clínicas de toxicidad u otros efectos secundarios con una dosis diaria de 800 unidades de inhibición de quimotripsina (CIU) durante un mes (163). En la fase IIa, tras un mes de tratamiento, el tamaño de la lesión oral se vio reducido de manera dosis-dependiente en el 31% de los pacientes, asociándose dicho efecto positivo con la modulación de la actividad de proteasas y el oncogén *neu* (biomarcador del ensayo), en células de la mucosa oral exfoliadas (164). Más recientemente, en la fase IIb del ensayo, y tras tratamiento de los pacientes durante un periodo de seis meses, se concluyó que BBIC no es clínicamente efectivo como agente quimiopreventivo para el control de la leucoplasia oral (176). En este último ensayo no se observaron diferencias significativas en términos de disminución del área de la lesión principal y en la respuesta clínica observada en los pacientes tratados con BBIC y placebo (177). En pacientes con colitis ulcerosa, una dosis diaria de 800 CIU se ha relacionado con una respuesta clínica y una inducción de la remisión en el 50% y 36% de los pacientes, respectivamente, sin presentar el tratamiento toxicidad aparente (178). Estudios de intervención clínica posteriores deben ratificar estos resultados prometedores.

Tabla 7. Ensayos clínicos en humanos utilizando un extracto proteico de soja enriquecido en inhibidores Bowman-Birk (BBIC).

Enfermedad	Tipo de ensayo	Diseño experimental	Principales resultados	Referencia
Hiperplasia prostática benigna	Fase I	19 pacientes (6 meses) Hasta 800 CIU	Disminución significativa (hasta un 43%) en los niveles de PSA tras el tratamiento. Disminución del volumen de próstata de pacientes. Sin toxicidad que limitara la dosis.	(175)
	Fase I	24 pacientes (1 mes) 800 CIU en una única dosis diaria	BBIC fue bien tolerado. No evidencia clínica de toxicidad u otro efecto adverso secundario.	(163)
Leucoplasia oral	Fase IIa	32 pacientes (1 mes) Hasta 1066 CIU en dos dosis diarias	El 31% de los pacientes lograron respuesta clínica y el área de la lesión disminuyó tras el tratamiento. Efecto dosis-dependiente. BBIC no era tóxico. El efecto clínico positivo de BBIC puede ser debido a la inhibición de serín proteasas involucradas en la rotura de la proteína neu-oncogén en la superficie celular, previniendo la liberación del dominio extracelular de la proteína a la sangre.	(164)
	Fase IIb, ensayo doble ciego aleatorio, control placebo	148 pacientes 600 CIU	Aunque este estudio aún no ha sido completado, resultados preliminares sugieren que BBIC no es totalmente efectivo en estos pacientes	(176)
Colitis ulcerosa	Ensayo doble ciego aleatorio, ensayo control placebo	28 pacientes (12 semanas) 800 CIU	BBIC puede estar asociado con la regresión de enfermedad sin una toxicidad aparente o efecto adverso secundario. Respuesta clínica e inducción de la remisión en el 50% y 36% de los pacientes, respectivamente.	(178)

CIU: unidades de inhibición de quimotripsina; PSA: antígeno específico de próstata.

1.6 INHIBIDORES BOWMAN-BIRK: SISTEMAS DE EXPRESIÓN Y VARIACIÓN INDUCIDA

1.6.1 Sistemas de expresión eucariotas para la producción de proteínas Bowman-Birk

La elección del microorganismo adecuado para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características físico-químicas de la proteína a producir. Los sistemas de expresión procariotas presentan ventajas en cuanto a la facilidad de realizar modificaciones genéticas, rápido crecimiento en medio mínimo, elevados niveles de producción, así como permitir la producción de proteínas recombinantes a gran escala. Sin embargo, presentan ciertas desventajas como son la incapacidad de realizar modificaciones postraduccionales (glicosilación y formación de puentes disulfuro) y/o plegamiento de la proteína, lo que implica su restructuración *in vitro* (179). Si bien *E. coli* es el microorganismo más empleado para la producción de proteínas recombinantes, debido en parte al mayor conocimiento de la biología molecular del mismo, no todos los genes pueden expresarse eficientemente en este microorganismo.

Los sistemas de expresión eucariotas, como levaduras y hongos, introducen modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, eliminación de la metionina inicial y ruptura proteolítica del precursor, así como la formación de puentes disulfuro, entre otros, asemejando las proteínas recombinantes a las endógenas (180). En este sentido, los sistemas eucariotas han sido utilizados para la expresión de proteínas ricas en puentes disulfuro, tal como es el caso de las proteínas Bowman-Birk aunque, recientemente, se ha expresado de manera exitosa en *E. coli* el inhibidor BBI, RbTI, de frijol arroz (*Vigna umbellata*) (181). Dentro de los sistemas eucariotas, el hongo *Aspergillus niger* y la levadura *Pichia pastoris* son capaces de plegar y secretar correctamente proteínas ricas en puentes disulfuro, tales como el inhibidor pancreático de tripsina bovino (182) e inhibidores BBI de guisante (90,183), lenteja (154) y almorta (88). *P. pastoris* es una levadura metilotrófica anaeróbica facultativa, cuya característica principal es su capacidad de crecer en medio mínimo conteniendo metanol como única fuente de carbono y de energía (184). El metanol presente en la célula es inicialmente metabolizado por una vía metabólica que involucra las enzimas alcohol oxidasa (AOX), catalasa y formaldehído deshidrogenasa, entre otras (Figura 11) (185).

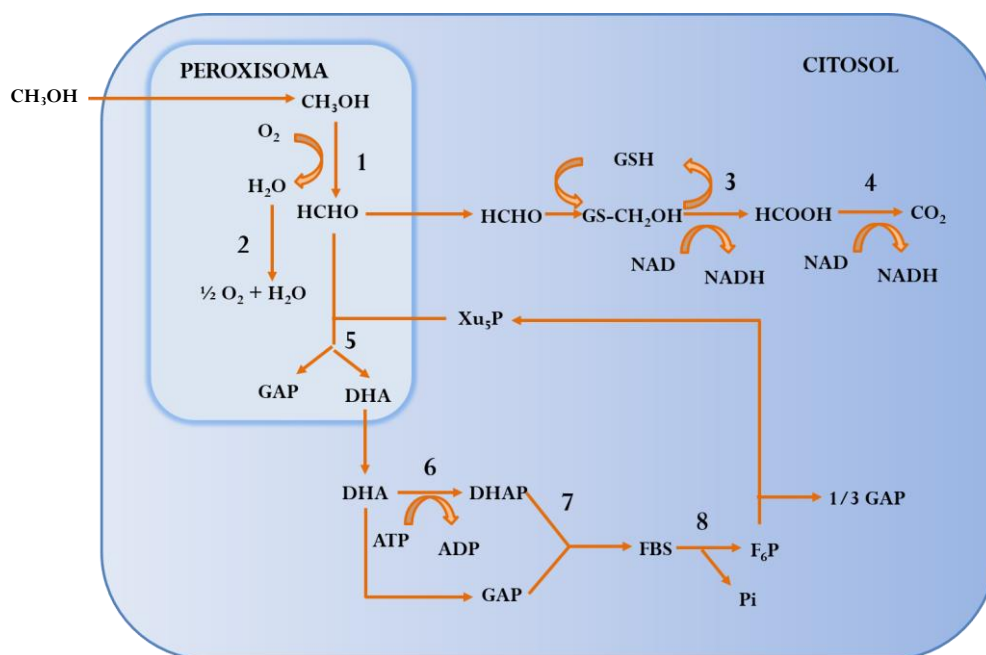


Figura 11. Metabolismo del metanol en la levadura *Pichia pastoris*. 1) Alcohol oxidasa; 2) Catalasa; 3) Formaldehído deshidrogenasa; 4) Formiato deshidrogenasa; 5) Dihidroxiacetona sintasa; 6) Dihidroxiacetona quinasa; y 7) Fructosa 1,6-bisfosfato aldolasa 8) Fructosa 1,6-bisfosfatasa (185).

La reacción inicial comienza en el interior de los peroxisomas con la oxidación del metanol a formaldehído, produciéndose también peróxido de hidrógeno como subproducto de la reacción, mediante la enzima AOX, utilizando para ello una molécula de oxígeno (186). Esta enzima, codificada principalmente por el gen *AOX1*, presenta baja afinidad por el oxígeno por lo que, con el fin de compensar su baja actividad catalítica, aumenta su tasa de síntesis con la finalidad de obtener elevadas concentraciones de la enzima. Este hecho es muy importante en la expresión de proteínas heterólogas que se hallan bajo el control del promotor del gen que codifica esta enzima (187). La expresión de este gen está fuertemente regulada; cuando la levadura crece en medio conteniendo glucosa, etanol o glicerol, la producción de AOX no es detectable (188). Sin embargo, cuando el medio contiene metanol, los niveles de esta enzima pueden alcanzar hasta un 30% del valor correspondiente a las proteínas solubles totales de la célula (186). Además, la levadura *P. pastoris* lleva a cabo modificaciones postraduccionales, produce niveles de proteínas recombinantes de uno a dos órdenes de magnitud por encima de *Saccharomyces cerevisiae* (189) y es capaz de secretar proteínas heterólogas al medio de cultivo, donde los niveles de proteínas nativas son muy bajos.

El vector de expresión pPIC9, utilizado en esta tesis doctoral, se ha utilizado para conducir la expresión de proteínas BBI, incorporando los genes tras el promotor del gen *AOX*. Este plásmido contiene un marcador de selección (*Amp*) y el gen de la histidina deshidrogenasa (*HIS4*) que

complementa el gen mutado *his4* del genoma de *P. pastoris* permitiendo el crecimiento de los clones transformados en un medio deficiente en histidina. Además, contiene un pre-pro-péptido señal de secreción, el factor- α de *S. cerevisiae*, para guiar la proteína de interés al medio extracelular (190,191).

1.6.2 Variación inducida en la secuencia de aminoácidos

La mutagénesis consiste en producir, de manera intencionada, variabilidad genética a través de métodos físicos o químicos, provocando cambios en el ADN y, por tanto, también en los genes y en el organismo. En plantas, la mutagénesis generalmente se aplica en las semillas por lo que es necesario esperar, al menos, a la segunda generación para observar efectos fenotípicos (192). En esta tesis doctoral se han llevado a cabo dos tipos de mutagénesis: 1) Mutagénesis dirigida mediante PCR solapante en el gen *TII*, que codifica a la proteína TI1 de guisante, con el fin de obtener mutantes derivados que presentan mutaciones precisas en uno o ambos dominios de inhibición de tripsina y/o quimotripsina, expresados de manera recombinante en la levadura *P. pastoris* y 2) Mutagénesis inducida por el mutágeno metanosulfonato de etilo (EMS) para provocar cambios al azar en el genoma de semillas de guisante de la variedad Cameor, con el fin de localizar mutaciones puntuales en el gen *TII*. Para ello, se llevó a cabo la metodología TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genome*), la cual es una técnica de genética inversa que combina la generación de mutaciones puntuales (SNPs) con una técnica eficiente de rastreo molecular para identificar polimorfismos a nivel de secuencia nucleotídica (193,194). El mutágeno químico EMS causa SNPs por sustitución de nucleótidos, especialmente por alquilación de guaninas, haciendo que el emparejamiento sea con la timina y no con la citosina y por lo tanto provoca transiciones del tipo G/C-A/T (Figura 12) (195,196,197).

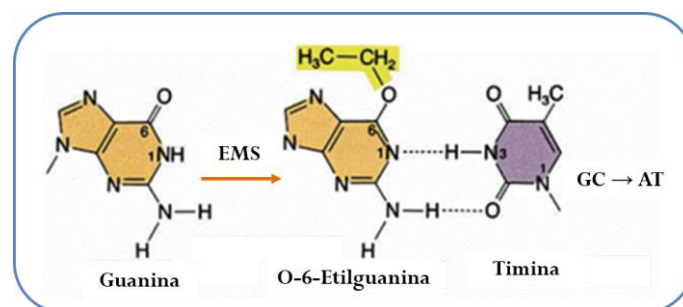


Figura 12. Efecto del etil metano sulfonato (EMS) a nivel molecular, utilizado para generar mutaciones al azar en el genoma de plantas. Las guaninas (G) se metilan y ese cambio químico hace que se comporten como una adenina (A) y, en consecuencia, complementan con bases distintas a las que deberían complementarse.

La metodología TILLING se utilizó por primera vez en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (193) y, desde entonces, se ha utilizado con éxito en varios organismos vegetales, entre ellos, soja (198) y guisante (199). Con esta técnica, es posible localizar una serie alélica de mutaciones puntuales inducidas en genes de interés en una población constituida por miles de individuos (200). Entre sus ventajas, cabe destacar que no se requiere el uso de transformación genética y, por lo tanto, los mutantes obtenidos no son transgénicos. Además, es una técnica que puede ser automatizada y optimizada permitiendo analizar un gran número de muestras en un tiempo mínimo, y pueden obtenerse no solo mutaciones sin sentido, sino también mutaciones del tipo sustitutivo que afecten a la función del gen sin llegar a inactivarlo, es decir, creando series alélicas.

1.7 INHIBIDORES BOWMAN-BIRK PRESENTES EN LECHEs DE SOJA COMERCIALES

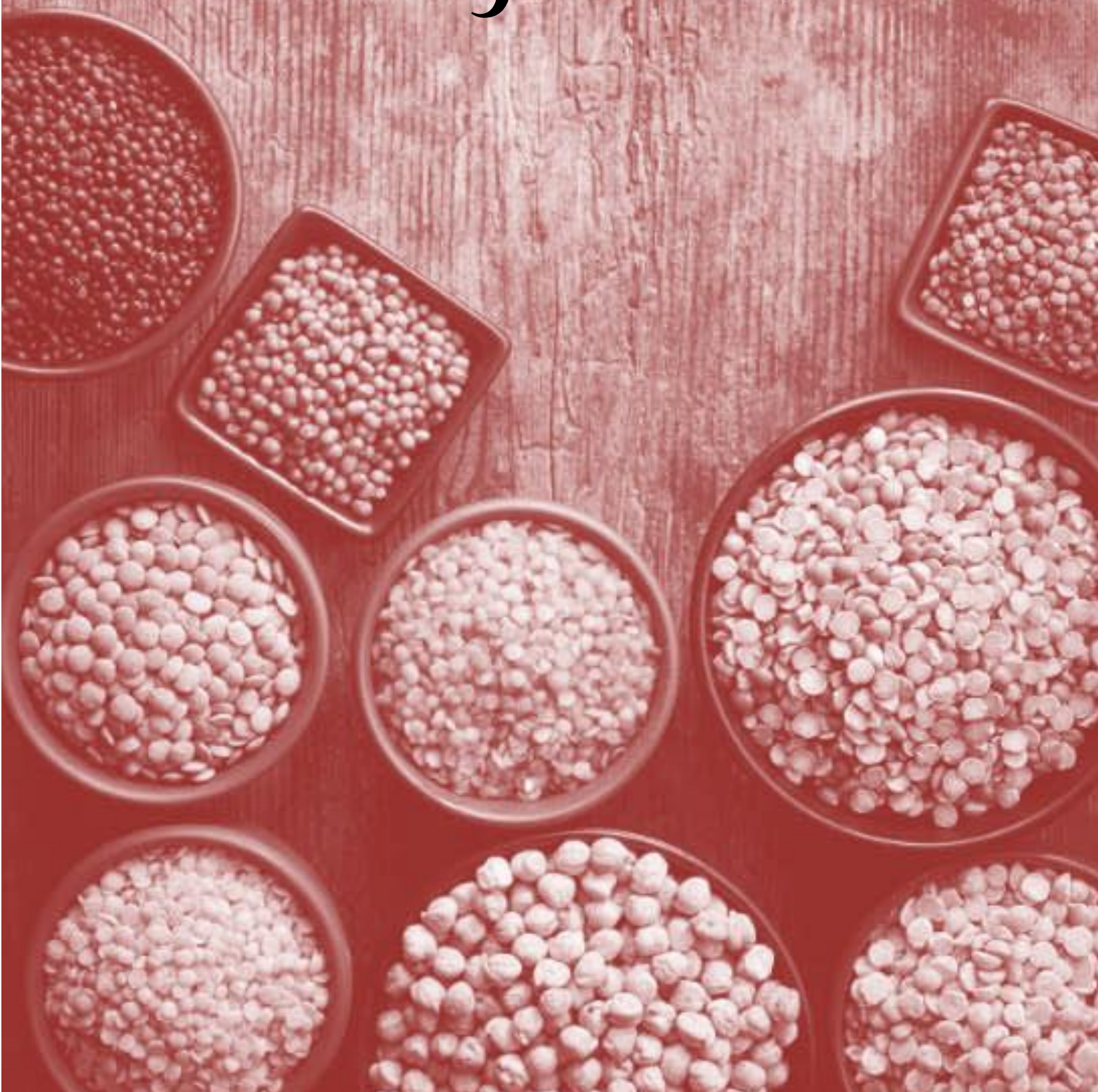
La soja es una leguminosa ampliamente utilizada en nutrición humana, cuyo contenido proteico incluye hasta un 6% de inhibidores de tripsina y quimotripsina (201). En semillas, encontramos dos isoformas BBI mayoritarias, IBB1 e IBBD2, que presentan diferencias significativas en cuanto a la secuencia de sus dominios de inhibición. IBB1 es capaz de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina, mientras que IBBD2 solo inhibe la enzima tripsina (77). KTI es una proteína de 21 kDa con un solo dominio de inhibición y dos puentes disulfuro intramoleculares, capaz de inhibir principalmente la enzima tripsina (202). Con el fin de mejorar la calidad nutricional de los productos derivados de la soja, los inhibidores de proteasas suelen ser inactivados durante el procesamiento de las semillas debido a sus propiedades anti-nutricionales, descritas en el **apartado 1.5.1**. En concreto, en leches de soja, la actividad inhibidora de tripsina residual tras el tratamiento térmico es atribuida principalmente a las proteínas BBI, ya que presentan una gran estabilidad térmica, mientras que KTI es fácilmente inactivado mediante su rápida incorporación en forma de agregados proteicos a través de interacciones covalentes (S-S) y no covalentes (203).

El procesamiento de las leches de soja implica tres pasos principales (204,205). En primer lugar, la soja se remoja en agua para eliminar la cáscara y, a continuación, se lleva a cabo la desecación, molienda, tamizado y cocción acuosa, para dar lugar a una mezcla líquida a la cual se añaden aditivos, azúcares y vitaminas, sometándose a un proceso de esterilización y homogeneizado. El tratamiento térmico durante la cocción y esterilización puede dar lugar a un descenso en la actividad de ciertos componentes de la leche de soja, como las proteínas BBI y KTI,

disminuyendo la actividad inhibidora de tripsina en distinto grado según el método utilizado (206). La calidad proteica y digestibilidad también pueden verse disminuidas debido a la reacción de Maillard (RM) (207,208), cuyas etapas iniciales e intermediarias pueden ser analizadas mediante los indicadores furosina (209) e hidroximetilfurfural (HMF) (210), respectivamente. La furosina es un aminoácido sintético que se forma mediante la interacción de los grupos amino del aminoácido lisina con glucosa, lactosa y maltosa (211). En este sentido, las leches de soja contienen proteínas ricas en aminoácidos esenciales como la lisina, cuya reactividad frente a la RM es significativa, incluso en ausencia de tratamiento térmico (205). Este proceso de glicación podría afectar al aminoácido lisina presente en los dominios de inhibición de las proteínas BBI, disminuyendo, por tanto, su capacidad de inhibir tripsina (212,213).

El contenido de proteínas BBI en leches de soja comerciales varía en el intervalo 7.2-55.9 mg por cada 100 mL de leche de soja (214,215). Sin embargo, la presencia de estas proteínas no se detecta en fórmulas infantiles de soja. En otros productos de soja como tofu, queso de soja y tortitas, el contenido en proteínas BBI es notable, aunque su concentración varía dependiendo del producto analizado (215). Por contra, en productos fermentados no se detecta la presencia de proteínas BBI, por lo que el proceso de fermentación podría inducir la degradación de estas proteínas. En general, la variación en la concentración de proteínas BBI en los alimentos puede ser debida a la variedad de soja utilizada (216), el producto final y los procesos tecnológicos utilizados para su preparación (217). Las cantidades de proteínas BBI presentes en leches de soja parecen ser fisiológicamente relevantes para ejercer efectos anticancerígenos en humanos (84), descritos en el **apartado 1.5.2**; sin embargo, estos datos están basados en formas inmunológicamente reactivas de BBI, las cuales podrían ser funcionalmente inactivas. Mediante el tratamiento de proteínas BBI con agentes reductores y alquilantes, se reduce de manera sustancial su actividad inhibidora (77), necesaria para ejercer sus propiedades anti-proliferativas mediante la inhibición de proteasas. Por tanto, es de gran utilidad obtener datos a nivel cuantitativo acerca de la cantidad de BBI activo presente en leches de soja comerciales, ya que su actividad inhibidora parece estar relacionada directamente a sus propiedades anti-cancerígenas y anti-inflamatorias

2. OBJETIVOS



2.1 OBJETIVOS

A través de los proyectos de investigación financiados por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2007-60007/ALI), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (PIE200970I054) y Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía (AGR2006-706), se ha comenzado a dilucidar la relevancia del polimorfismo de la familia de proteínas Bowman-Birk en relación a su actividad biológica. En colaboración con el Dr. Donald MacKenzie (Institute of Food Research, Reino Unido) y la Prof. Claire Domoney (John Innes Centre, Reino Unido), hemos clonado y expresado las proteínas TI1 y TI2 de guisante en *Aspergillus niger*, sistema heterólogo de expresión capaz de producir eficientemente proteínas con un alto contenido en puentes disulfuro (90). En colaboración con el Prof. Ian Johnson (Institute of Food Research, Reino Unido), hemos establecido un sistema modelo de análisis *in vitro* para investigar los efectos de las proteínas BBI, naturales y recombinantes, sobre la proliferación y viabilidad celular en modelos celulares humanos de colon (77,90,154). Estudios previos han demostrado que la proteína recombinante TI1 de guisante es altamente efectiva como agente anti-proliferativo, ejerciendo su actividad citotóxica de manera dosis-dependiente, en células procedentes de adenocarcinoma colorrectal (90). Mas recientemente, se ha demostrado que una mezcla de iso-inhibidores de soja afecta negativamente al crecimiento de células cancerígenas de colon HT29 (77); sin embargo, cuando estas proteínas pierden su conformación nativa mediante rotura de sus puentes disulfuro y bloqueo de sus grupos sulfidrilo, desaparece la capacidad que presentan de inhibir la proliferación de células cancerígenas. Estos datos sugieren que la capacidad de las proteínas BBI de ejercer actividad anti-proliferativa en células cancerígenas de colon está relacionada con su capacidad intrínseca de inhibir serín proteasas. No obstante, esta asociación está basada en evidencias indirectas utilizando proteínas BBI desnaturalizadas, bien mediante tratamiento térmico (autoclave) (151,152) bien mediante tratamiento químico (reducción y posterior alquilación de puentes disulfuro) (77).

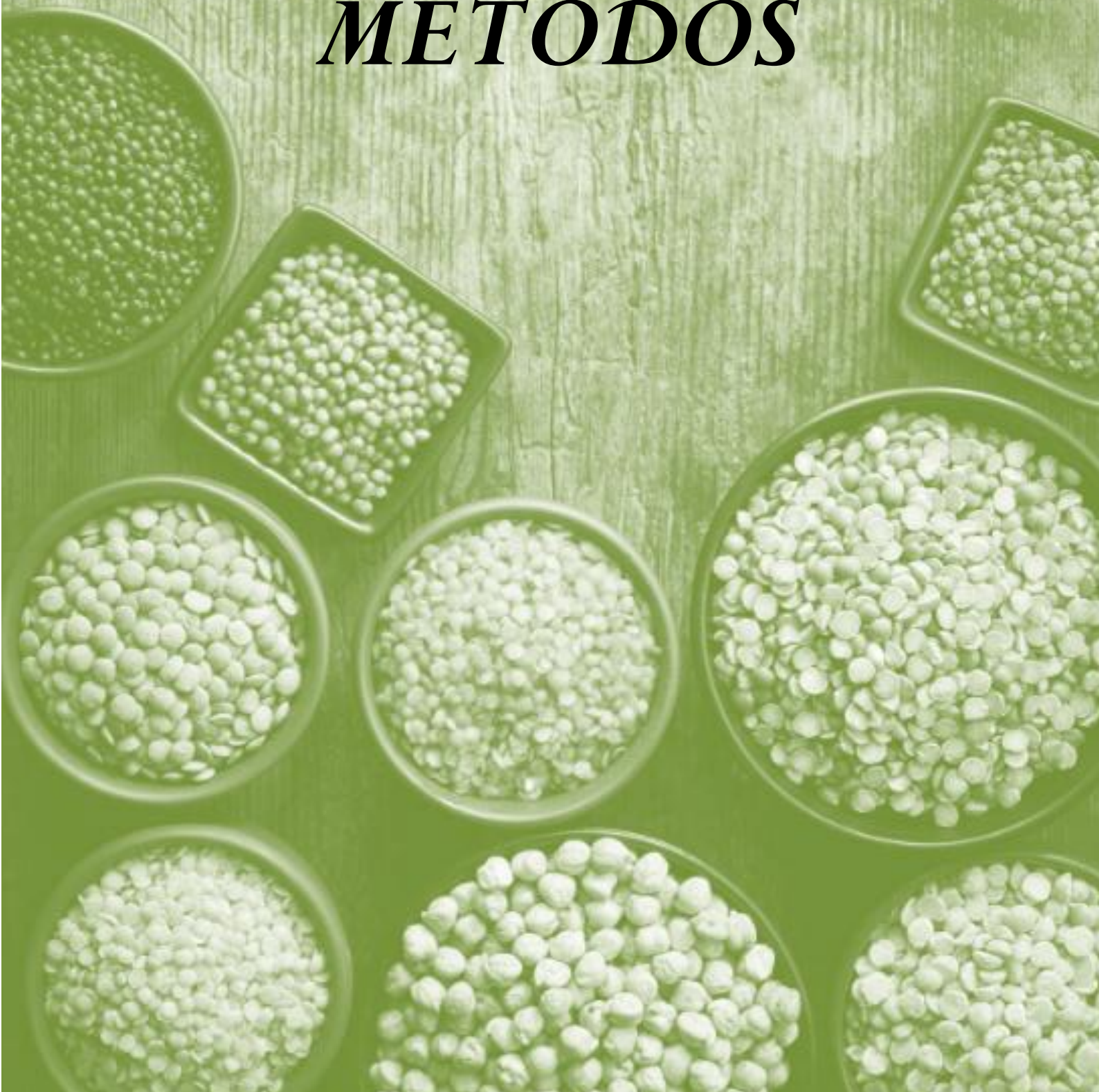
Los antecedentes presentados justifican los objetivos de esta tesis doctoral. Estos son:

- Obtención mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante de un mutante inactivo derivado de la proteína TI1 de guisante, así como de los mutantes rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym} con dos dominios de inhibición idénticos de tripsina y quimotripsina, respectivamente.

Objetivos

- Producción de la proteína rTI1 y sus mutantes derivados en un sistema de expresión heterólogo, *Pichia pastoris*, capaz de producir eficientemente proteínas con un alto contenido en puentes disulfuro. Autenticación y caracterización funcional de las proteínas recombinantes.
- Determinación de la relación existente entre actividad inhibidora de proteasas y actividad anti-proliferativa en líneas celulares de colon (HT29 y CCD18-Co), con objeto de investigar la relevancia de ambos dominios de inhibición.
- Estudio del efecto de mutaciones puntuales introducidas en la proteína TI1 de guisante mediante la metodología TILLING con el fin de profundizar en la relación existente entre estructura y funcionalidad de los BBI.
- Caracterización funcional y efecto anti-proliferativo en células procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano de péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas BBI, TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente.
- Caracterización y cuantificación de los inhibidores BBI, IBB1 e IBBD2, en leches de soja comerciales, así como el estudio de la relación existente entre actividad inhibidora y glicación, mediante el análisis de marcadores de la reacción de Maillard.

3. MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 MICROORGANISMOS

3.1.1 *Escherichia coli*

El clonaje de plásmidos se llevó a cabo utilizando la cepa DH5 α de células competentes de *Escherichia coli* (Invitrogen 18265-017, MA, USA), que proporciona una eficiencia de transformación superior a 10⁹ ufc·mg⁻¹ de ADN plasmídico [Genotipo: F⁻ Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ*].

3.1.2 *Pichia pastoris*

La cepa GS115 (Invitrogen C181-00) de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se utilizó como sistema hospedador para la sobreexpresión del gen *TII* (**apartado 3.7**), que codifica al inhibidor de serín proteasas TII de la familia Bowman-Birk, mayoritario en semillas de guisante (27,35), así como de tres mutantes derivados de *TII* (rTII_{inactivo}, rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym}), obtenidos mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante (**apartado 3.8**). La cepa GS115 presenta una mutación en el gen de la histidina deshidrogenasa (*his4*), enzima implicada en la biosíntesis de histidina. Esto permitió transformar la levadura con vectores de expresión que contienen una copia correcta del gen *HIS4*, seleccionándose los transformantes en medio mínimo con dextrosa (MD) sin histidina (**apartado 3.4.2.1**).

3.2 VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9

La integración del gen *TII* (**apartado 3.7**) y sus mutantes derivados (**apartado 3.8**) en el genoma de *P. pastoris*, mediante recombinación homóloga, se llevó a cabo utilizando el vector de expresión pPIC9 (**Figura 13**). Este vector contiene un origen de replicación de *E. coli* (pBR322) y *Amp*, un gen que confiere resistencia a ampicilina. Además, presenta la región promotora (5' *AOX1*) y de terminación (TT) de la transcripción del gen *AOX1* que codifica a la enzima alcohol oxidasa (AOX), implicada en el primer paso del metabolismo del metanol, y entre ambas se encuentra la región de clonaje, permitiendo expresar tanto *TII* como sus mutantes derivados bajo el control de dicho promotor. Tras el promotor (5' *AOX1*), se encuentra el factor- α de *Saccharomyces cerevisiae* (S), una secuencia señal que permite secretar la proteína recombinante al medio extracelular. Este factor incluye el sitio de procesamiento de *KEX2* (codificando Lys-Arg) seguido de dos repeticiones Glu-

Ala, justo antes de la zona N-terminal de la proteína recombinante TI1 (rTI1) (**apartado 3.7**) o de sus mutantes derivados (**apartado 3.8**), con objeto de aumentar la eficiencia de la proteólisis de la endoproteasa *KEX2*; ambos dipéptidos Glu-Ala deben ser eliminados mediante la enzima *STE13* endógena de *P. pastoris*. La secreción de la proteína expresada al medio de crecimiento es una ventaja importante en el proceso posterior de purificación dado que los niveles de secreción de proteína de *P. pastoris* son muy bajos. El vector de expresión pPIC9 incluye una copia completa del gen *HIS4*, el cual le permite crecer en medio MD sin histidina (**apartado 3.4.2.1**). Por tanto, los transformantes His⁺ pueden ser aislados únicamente si la recombinación ocurre entre el plásmido y el genoma de *P. pastoris*.

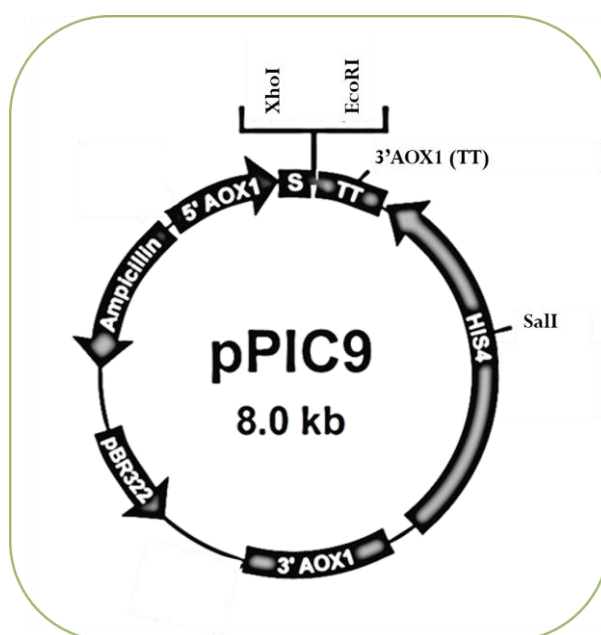


Figura 13. Diagrama del vector de expresión, pPIC9, utilizado en la producción de proteínas Bowman-Birk recombinantes en la levadura *Pichia pastoris*. El vector pPIC9 incluye una región promotora del gen *AOX1* (5'*AOX1*), el factor- α de *Saccharomyces cerevisiae* (S) para la secreción de la proteína recombinante al medio extracelular, la región de clonación del gen *TI1* o sus mutantes derivados (mediante enzimas de restricción), la región de terminación (TT), copia completa del gen *HIS4*, la región 3' del gen de la enzima AOX (3'*AOX1*), el origen de replicación de *E. coli* (pBR322) y un marcador de selección para *P. pastoris* (*Amp*).

3.3 OLIGONUCLEÓTIDOS CEBADORES

Todos los cebadores se sintetizaron y purificaron mediante filtración en gel por la compañía Roche Life Science (Barcelona, España). En la **Tabla 8** se recogen las secuencias de todos los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de PCR y de secuenciación realizadas.

Tabla 8. Cebadores específicos utilizados para (A) la clonación de *TI1*, (B) llevar a cabo mutaciones de aminoácidos localizados en distintas posiciones (P₁, P₂ y/o P₅ del dominio de inhibición N y/o C-terminal) para la obtención de mutantes derivados de rTI1 y (C) la verificación de la presencia del gen de interés en el vector de expresión pPIC9. En las secuencias N_{pea}TI1 y C_{pea}TI1 se incluyen las dianas de restricción *Xho*I (CTC GAG) y *Eco*RI (GAA TTC) (subrayadas), así como el sitio de procesamiento de *KEX*2 (AAA AGA) seguido de repeticiones de Glu-Ala (GAG GCT GAA GCT) de la señal de secreción factor- α de *S. cerevisiae* (en negrita). Los codones mutados se encuentran sombreados. La numeración de los aminoácidos sustituidos no incluye el pre-pro-péptido de 42 aminoácidos de TI1. Los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1, específicos del vector de expresión pPIC9, se utilizaron para verificar la presencia del gen de interés en el vector de expresión pPIC9.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Finalidad
A	N_{pea}TI1 GTA TCT <u>CTC GAG</u> AAA AGA GAG GCT GAA GCT GGT GAT GAT GTC AAA TC	Gen completo
	C_{pea}TI1 CCT AGG <u>GAA TTC</u> TCA GTT CTT AAT GAC CTC CT	
B	D₁ GC CTT TGC ACA GGA TCA AAC CCT CC	Mutación K16G
	R₁ GG AGG GTT TGA TCC TGT GCA AAG GC	
	D₂ GC ATT TGT GCA GGT TCT AAT CCT CC	Mutación Y42G
	R₂ GG AGG ATT AGA ACC TGC ACA AAT GC	
	D₁₁ CC TGC CTT TGC GCA TAT TCA AAC CCT CCT ACG	Mutaciones T15A:K16Y
	R₁₁ GG AGG GTT TGA ATA TGC GCA AAG GCA GG	
	D₁₂ C AAA CCC TCC TAA GTG TCG CTG TGT TG	Mutación T21K
	R₁₂ CA CAG CGA CAC TTA GGA GGG TTT G	
	D₂₁ GT TGC ATT TGT ACA AAA TCT AAT CCT CCC	Mutaciones A41T:Y42K
	R₂₁ GG AGG ATT AGA TTT TGT ACA AAT GCA ACT GTC G	
	D₂₂ C TAA TCC TCC CAC GTG TCA GTG CTT TG	Mutación K47T
	R₂₂ G CAC TGA CAC GTG GGA GGA TTA G	
C	5'AOX1 GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	Verificar gen en pPIC9
	3'AOX1 GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC	

D: directo; R: reverso.

3.4 MEDIOS DE CULTIVO

3.4.1 Medio de cultivo de *E. coli*

✓ Medio Luria-Bertani (LB): medio utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Este medio contiene 0.5% extracto de levadura (p/v), 1% bacto triptona (p/v) y 1% NaCl (p/v). Para los cultivos bacterianos crecidos en medio sólido se añadió 1.5% agar bacteriológico (p/v). Para la selección de transformantes de *E. coli* se adicionó a los medios, previamente esterilizados y enfriados a ≈ 50 °C, el antibiótico ampicilina (Sigma-Aldrich A0166, MO, USA), en una concentración final de $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.4.2 Medios de cultivo de *P. pastoris*

3.4.2.1 Medios de crecimiento y selección de transformantes

✓ Medio de extracto de levadura, peptona y dextrosa (YPD): medio utilizado para el crecimiento rutinario de la levadura *P. pastoris*. Este medio contiene 1% extracto de levadura (p/v), 2% bacto peptona (p/v) y 2% glucosa (p/v). Para solidificar el medio se añadió 2% agar (p/v).

✓ Medio mínimo con dextrosa (MD): medio utilizado para el crecimiento de la levadura *P. pastoris* en condiciones selectivas. Este medio contiene 1.34% base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos (YNB) (p/v), $4 \times 10^{-5}\%$ biotina (p/v) y 2% dextrosa (p/v). Para solidificar el medio se añadió 1.5% agar (p/v).

3.4.2.2 Medios utilizados para la producción de proteína recombinante

✓ Medio mínimo de glicerol (BMG): medio de enriquecimiento. Este medio contiene fosfato potásico 100 mM pH 6.0, 1.34% YNB (p/v), $4 \times 10^{-5}\%$ biotina (p/v) y 1% glicerol (v/v).

✓ Medio mínimo de metanol (BMM): medio de inducción. Este medio contiene fosfato potásico 100 mM pH 6.0, 1.34% YNB (p/v), $4 \times 10^{-5}\%$ biotina (p/v) y 0.5% metanol (v/v).

Las cepas de *P. pastoris* que portaban las diferentes construcciones plasmídicas se almacenaron a -80 °C en medio YPD (**apartado 3.4.2.1**) suplementado con 15% glicerol (v/v). La esterilización de los medios se llevó a cabo autoclavando durante un ciclo de 20 min a 121 °C y 1.8 atmósferas de presión, o mediante filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0.22 µm (Millipore GSWP04700, MA, USA).

3.5 MATERIAL VEGETAL

La Prof. Claire Domoney suministró el material vegetal utilizado en esta tesis doctoral (**Figura 14**), así como el ADNc de *TII*, firmándose el correspondiente acuerdo de transferencia de material vegetal con el John Innes Centre (Norwich, Reino Unido). Las semillas de guisante utilizadas para la obtención de fracciones proteicas enriquecidas en inhibidores Bowman-Birk procedieron de las variedades Birte y Cameor.



Figura 14. Diversidad de semillas de guisante.

3.6 LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano (**Figura 15**) y células humanas fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD-18Co, suministradas por el Banco Celular del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR, Granada, España), para llevar a cabo los ensayos celulares incluidos en esta tesis doctoral (**apartado**

3.29). Para su crecimiento, se utilizó medio esencial mínimo Dulbecco (DMEM, Sigma-Aldrich D5796) con elevados niveles de glucosa ($4.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), manteniéndose las células en frascos de cultivo de 75 cm^2 (Corning 430641U, NY, USA) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en aire humidificado y $5\% \text{ CO}_2$ (v/v), mediante pases seriados. El medio de cultivo se suplementó con 5% (v/v) de suero fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich F9665), glutamina 2 mM (Sigma-Aldrich G7513) y 1% solución antibiótica-antimicótica (penicilina-estreptomicina, Sigma-Aldrich P4333), a concentración final. El medio de crecimiento de células fibroblásticas CCD-18Co se suplementó, además, con 1% (p/v) de aminoácidos no esenciales (Sigma-Aldrich M7145).

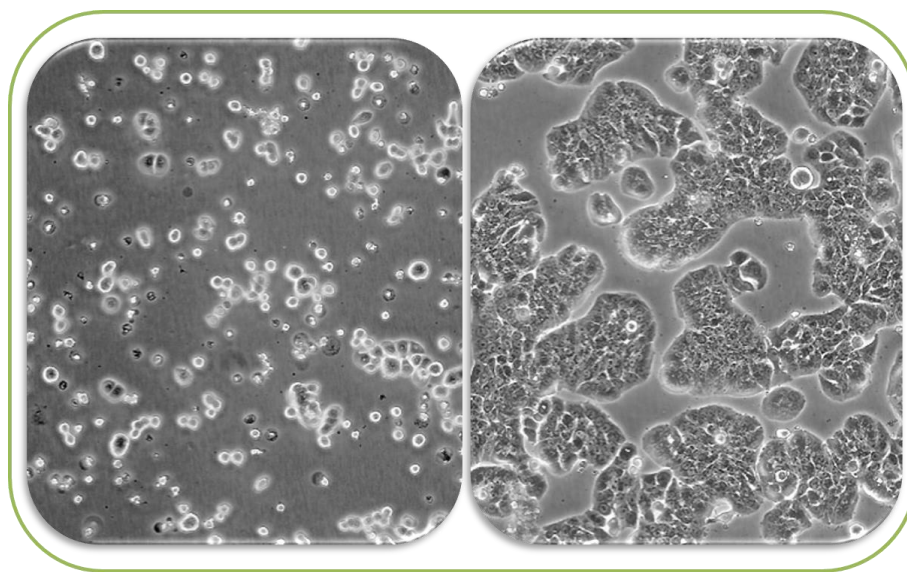


Figura 15. Células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano. Células cancerígenas de colon utilizadas en esta tesis doctoral para ensayos de internalización y proliferación celular tras tratamiento con proteínas BBI.

3.7 AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE PCR

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Scientific, MA, USA), en volúmenes de 0.05 mL . Las mezclas de reacción consistieron en 0.005 mL de tampón PCR 10X , 0.005 mL de ADN genómico ($\approx 0.001 \text{ mg}$), 0.001 mL de dNTPs 100 mM (25 mM cada uno), 0.005 mL de cebador directo ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), 0.005 mL de cebador reverso ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), agua estéril hasta 0.05 mL y $5000 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Taq polimerasa. Las reacciones de PCR se realizaron bajo las condiciones que se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Protocolo general de PCR. Programa de amplificación llevado a cabo mediante PCR para la amplificación de fragmentos de ADN.

Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 seg	35
Hibridación	56 °C	30 seg	
Polimerización	56 °C	1 min	
Elongación	68 °C	5 min	1

La secuencia correspondiente a *TII*, inhibidor Bowman-Birk mayoritario expresado en semillas de guisante *in vivo*, se amplificó a partir del ADNc pTII2-36 (27), utilizando los cebadores específicos N_peaTII y C_peaTII (Tabla 8), los cuales también se utilizaron para amplificar el producto final de las mutaciones introducidas en mutantes derivados de *TII* (apartado 3.8) obtenidos mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante (Tabla 10). En las reacciones de PCR se utilizó la enzima ADN polimerasa Platinum Pfx (Invitrogen 11304-011), bajo las condiciones descritas anteriormente. Los productos de PCR amplificados se purificaron a partir de geles de agarosa, mediante columnas MBL-Agarosa Quick Clean (Molecular Bio Laboratory MBL070, Córdoba, España) (apartado 3.10), conservándose el producto amplificado a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 10. Secuencia peptídica de rTII y sus mutantes derivados rTII_{inactivo}, rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym}.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios de inhibición se muestran subrayadas. P₁-P₁ son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores (en negrita). K en la posición P₁ determina especificidad frente a la enzima tripsina, mientras que Y determina especificidad frente a quimotripsina. Los aminoácidos sustituidos a través de mutagénesis dirigida mediante PCR solapante se encuentran sombreados.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70--
rTII	GDDVKSACCDTCLCT KS NPPTCRCVDVRETCHSACDSCIC YS NPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
rTII inactivo	GDDVKSACCDTCLCT GS NPPTCRCVDVRETCHSACDSCIC AGS NPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
rTII_{Tryp-Tryp}	GDDVKSACCDTCLCT KS NPPTCRCVDVRETCHSACDSCIC YS NPP Y KQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
rTII_{Chym-Chym}	GDDVKSACCDTCLC YS NPP Y KRCRCVDVRETCHSACDSCIC YS NPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70--

3.8 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA MEDIANTE PCR SOLAPANTE

El ADNc de *TII* (**apartado 3.7**) se utilizó como molde para la obtención de mutantes derivados, bien inactivo ($rTII_{\text{inactivo}}$) o bien con dos dominios de inhibición idénticos de tripsina ($rTII_{\text{Tryp-Tryp}}$) o quimotripsina ($rTII_{\text{Chym-Chym}}$), a diferencia de la proteína *rTII* que presenta un dominio de inhibición frente a la enzima tripsina y otro frente a quimotripsina (**Tabla 10**). La obtención de los mutantes derivados de *TII* se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante, la cual es un sistema eficiente para la introducción de mutaciones puntuales en una secuencia de ADN silvestre, utilizando la enzima ADN polimerasa Platinum Pfx, bajo las condiciones de PCR descritas en el apartado anterior (**apartado 3.7**). La PCR solapante se realizó siguiendo el método descrito por Camacho y Casadesús (2005) (218) y se llevó a cabo en dos rondas, que a su vez constaban de dos fases cada una, esquematizadas en la **Figura 16**.

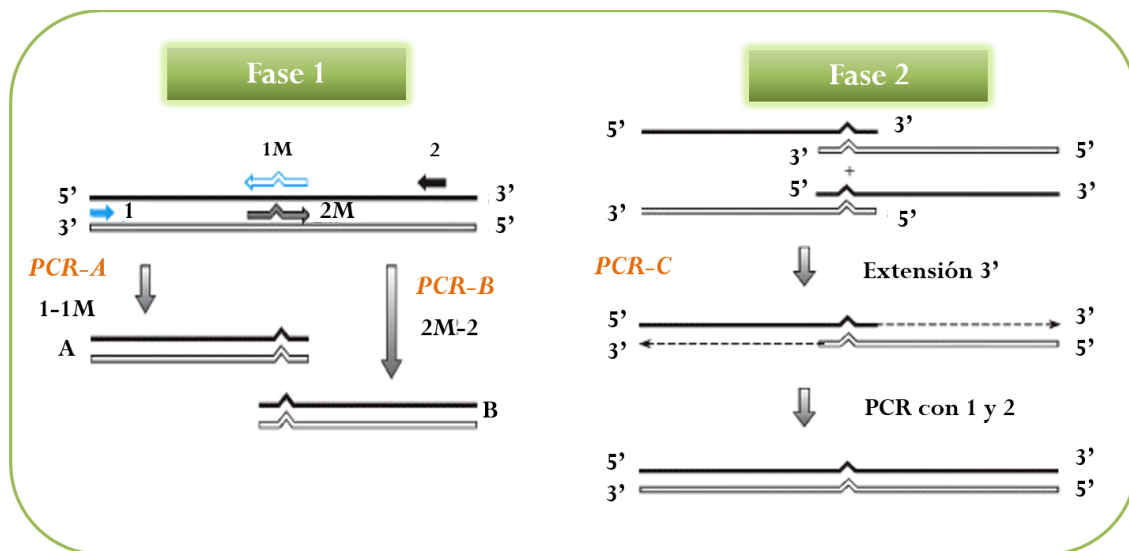


Figura 16. Esquema de PCR solapante utilizada para introducir mutaciones puntuales en la secuencia de nucleótidos de *TII*. **Fase 1)** Dos PCRs independientes (PCR-A y PCR-B), en las que se obtienen dos fragmentos con mutación en el gen *TII*, utilizado como molde, mediante la combinación de cebadores 1-1M y 2M-2. **Fase 2)** Obtención del gen completo, utilizando como molde los dos fragmentos de ADN mutados de la Fase 1, mediante la combinación de cebadores 1 y 2. Cebadores 1 y 2: externos a la región a mutar. Cebadores 1M y 2M: internos de la región a mutar, que contienen la mutación a insertar.

La obtención del mutante derivado inactivo se llevó a cabo mediante la sustitución del aminoácido presente en la posición P₁ de ambos dominios de inhibición, por el aminoácido glicina. En la primera ronda de mutagénesis dirigida mediante PCR solapante se obtuvo *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado, y en la segunda ronda se llevó a cabo la sustitución del aminoácido de la posición P₁ del dominio de inhibición C-terminal por glicina, obteniendo el mutante inactivo

derivado de rTII, con ambos dominios de inhibición mutados. En el caso de los mutantes derivados rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym}, se llevó a cabo la sustitución de los aminoácidos en las posiciones P₂, P₁ y P₅ del dominio de inhibición C- y N-terminal, respectivamente. En una primera ronda se sustituyeron los aminoácidos de las posiciones P₂ y P₁, mientras que en la segunda ronda se sustituyó el aminoácido de la posición P₅, obteniendo así mutantes derivados de rTII con ambos dominios de inhibición idénticos de tripsina y quimotripsina, respectivamente.

De manera general, en la primera ronda, se realizaron dos PCRs independientes en una primera fase (**Figura 16** Fase 1 PCR-A y PCR-B), utilizando como molde el gen *TII* y la combinación de cebadores 1-1M y 2M-2, es decir, cada PCR incluía un cebador externo a la región a amplificar (cebadores 1 y 2), y uno interno que contiene la mutación a insertar (cebadores 1M y 2M). Cada oligonucleótido interno (1M y 2M) contenía las mutaciones centradas en su secuencia flanqueadas por unos 10 nucleótidos de secuencia silvestre, siendo los dos oligonucleótidos mutados complementarios entre sí. Los fragmentos amplificados obtenidos en las PCRs (A y B) se purificaron según su tamaño en un gel de agarosa (**apartado 3.10**), para ser utilizados como molde en una segunda fase con el fin de obtener el gen completo con las mutaciones de oligonucleótidos introducidas en la primera fase.

En la segunda fase, los dos fragmentos amplificados obtenidos anteriormente se mezclaron y se utilizaron como molde en cantidades aproximadamente equimoleculares para una tercera PCR (**Figura 16** Fase 2 PCR-C) en la que los cebadores utilizados fueron los dos oligonucleótidos más externos (cebadores 1 y 2). De esta forma, se genera un único fragmento de ADN con el tamaño del gen silvestre y las mutaciones introducidas en la primera fase. Este producto de PCR solapante se purificó a partir de un gel de agarosa (**apartado 3.10**) y, tras ser digerido mediante las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* (Roche Diagnostics 10899194001 y 10703737001, Basel, Suiza) (**apartado 3.12**), se ligó al vector de expresión pPIC9 (**apartado 3.13**) para su clonación en *E. coli* (**apartado 3.14**), comprobándose la mutación llevada a cabo en *TII* mediante análisis de secuenciación (**apartado 3.15**). Este producto de PCR con mutaciones en *TII* se utilizó como molde en una segunda ronda, que consta de las fases 1 y 2 descritas anteriormente, con el fin de obtener el mutante rTII_{inactivo}, así como los mutantes rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym}, derivados de rTII. Las parejas de cebadores utilizadas para la obtención de los mutantes derivados de *TII* se recogen en la **Tabla 11**, cuya secuencia de nucleótidos se encuentra detallada en la **Tabla 8**.

Tabla 11. Parejas de cebadores utilizadas para la obtención de mutantes derivados de *TI1*. La obtención de mutantes derivados de *TI1* se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante, la cual consta de dos rondas que, a su vez, se llevan a cabo en dos fases. En la primera fase, utilizando como molde el gen *TI1*, los fragmentos obtenidos de las PCRs A y B se utilizaron como molde en la segunda fase (PCR-C). Cebadores 1 y 2: externos a la región a mutar. Cebadores 1M y 2M: internos de la región a mutar, que contienen la mutación a insertar.

	Ronda 1			Ronda 2		
	Fase 1		Fase 2	Fase 1		Fase 2
	PCR A (1-1M)	PCR B (2M-2)	PCR C (1-2)	PCR A (1-1M)	PCR B (2M-2)	PCR C (1-2)
rTI1_{inactivo}	N_peaTI1- R ₁	D ₁ - C_peaTI1	N_peaTI1- C_peaTI1	N_peaTI1- R ₂	D ₂ - C_peaTI1	N_peaTI1- C_peaTI1
rTI1_{Tryp-Tryp}	N_peaTI1- R ₂₁	D ₂₁ - C_peaTI1		N_peaTI1- R ₂₂	D ₂₂ - C_peaTI1	
rTI1_{Chym-Chym}	N_peaTI1- R ₁₁	D ₁₁ - C_peaTI1		N_peaTI1- R ₁₂	D ₁₂ - C_peaTI1	

3.9 ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO DE ADN EN GELES DE AGAROSA

El ADN plasmídico, así como el procedente de digestiones con las enzimas de restricción y el de reacciones de PCR se analizó mediante electroforesis, desarrollada a temperatura ambiente, en geles horizontales de agarosa al 0.8-2% (p/v), en tampón comercial TAE 1X (Tris 40 mM pH 8.5, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) (AppliChem A1691, Barcelona, España). El tamaño de los fragmentos de interés se estimó por comparación con marcadores de peso molecular de ADN comercial (100-1000 pb DNA ladder Molecular Weight Marker, Molecular Bio Laboratory MBL020), siendo el ADN visualizado mediante tinción con Gel Red (Biotium 41003, CA, USA) e iluminación con luz ultravioleta, utilizando el analizador de imagen transiluminador Gel Doc XR+ System (Bio-Rad, CA, USA).

3.10 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

La extracción de ADN a partir de geles de agarosa (**apartado 3.9**) se realizó utilizando columnas MBL-Agarosa Quick Clean. Las bandas de interés (identificadas por su tamaño cuando los

geles se observaban bajo luz ultravioleta) se cortaron mediante la utilización de un bisturí estéril, y a continuación se siguieron las instrucciones del fabricante para extraer el producto amplificado, conservándose a -20°C hasta su uso.

3.11 MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE ADN

La concentración de ADN en solución, tanto plasmídico como genómico, se estimó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (NanoDrop Technologies, DE, USA), basado en la tecnología de retención de muestra que permite la utilización de 0.001-0.002 mL de la misma sin necesidad de diluirla. La relación $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ y $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{230\text{nm}}$ se utilizó para estimar la contaminación de la muestra por proteínas y otros compuestos como polisacáridos, alcoholes, etc., respectivamente, cuyos valores deben estar comprendidos entre 1.8-2.0.

3.12 DIGESTIONES ENZIMÁTICAS DE FRAGMENTOS DE ADN

Previa a la ligación del gen *TII* (**apartado 3.7**) o sus mutantes derivados (**apartado 3.8**) en el vector de expresión pPIC9 (**apartado 3.13**), genes y plásmido se digirieron mediante las endonucleasas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, siguiendo las recomendaciones dadas por el fabricante respecto al tipo de tampón y temperatura de reacción. Una reacción de digestión tipo incluía 0.001-0.005 mg de plásmido o $1-5 \times 10^{-4}$ mg de fragmento de ADN, tampón específico 1X de cada enzima y 1-5 U de enzima (1 U es definida como la cantidad de enzima que digiere 0.001 mg de ADN en 1 h bajo las condiciones óptimas de reacción) en un volumen total de 0.02 mL. Las reacciones de digestión se desarrollaron durante 2-16 h a las condiciones óptimas de temperatura específica para cada enzima, generalmente 37°C .

3.13 REACCIONES DE LIGACIÓN EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN pPIC9

Las reacciones de ligación de *TII* (**apartado 3.7**) o sus mutantes derivados (**apartado 3.8**) en el vector de expresión pPIC9, previamente digeridos mediante las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* (**apartado 3.12**), se llevaron a cabo mediante la enzima T4-ADN ligasa (Molecular Bio Laboratory MBL223), que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster entre los extremos adyacentes 3' hidroxilo y 5' fosfato de ADN de cadena doble o ARN tanto con extremos romos

como cohesivos. La mezcla de ligación contenía 5×10^{-5} mg de vector lineal (ADN), un volumen de inserto en relación molar 5:1 o 3:1 (inserto:vector), 0.001 mL de tampón T4-ADN ligasa 10X, 0.001 mL de enzima T4-ADN ligasa ($5000 \text{ U Weiss} \cdot \text{mL}^{-1}$) y agua de calidad Milli-Q hasta un volumen total de 0.01 mL, incubándose durante 1 h a $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La enzima se inactivó a $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 10 min. A continuación, se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* (**apartado 3.14**) con los productos de ligación obtenidos.

3.14 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE *E. coli* MEDIANTE CHOQUE TÉRMICO

La transformación de la cepa DH5 α de células químicamente competentes de *E. coli* se llevó a cabo a partir de alícuotas de 0.05 mL, almacenadas a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$, que se descongelaron en hielo durante 5 min y a las cuales se adicionaron 0.001-0.01 mL de producto de ligación ($1-2 \times 10^{-4}$ mg de ADN plasmídico con *Tll* o sus mutantes derivados) (**apartado 3.13**). La mezcla se incubó en hielo durante 5 min. Tras este periodo, las células se sometieron a un choque térmico mediante una incubación a $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 seg y un enfriamiento posterior durante 2 min en hielo, facilitando la entrada de ADN a la célula. A continuación, se añadió 1 mL de medio LB (**apartado 3.4.1**) y las células transformadas se incubaron en agitación durante 60 min a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Las células se centrifugaron y solubilizaron en un volumen adecuado, sembrándose en placas de LB con el antibiótico de selección ampicilina, e incubándose a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 16-18 h. Los transformantes que contenían el vector de expresión, resistentes a la ampicilina, dieron lugar a colonias viables que se analizaron mediante PCR de colonia, descrita a continuación (**apartado 3.14.1**). Para confirmar la presencia del gen *Tll* o sus mutantes derivados, se utilizaron los cebadores específicos de pPIC9, 5'AOX1 y 3'AOX1 (**Tabla 8**).

3.14.1 PCR de colonia

Las colonias se picaron con un palillo estéril para ser replicadas en una placa de LB con el antibiótico de selección ampicilina (**apartado 3.4.1**); a continuación, el resto de células que quedaban en el palillo se descargaron en 0.01 mL de agua estéril, directamente en un tubo de PCR. Las células de *E. coli* se lisaron en un primer paso de desnaturalización de la PCR ($95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min) (**apartado 3.7**) para liberar el ADN plasmídico y el gen se amplificó utilizando para ello los

cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1 (**Tabla 8**). Tras la verificación, los clones positivos se crecieron en medio LB con ampicilina y se conservaron en glicerol al 15% (v/v) a -80 °C hasta su uso.

3.14.2 Aislamiento de ADN plasmídico

El aislamiento de plásmidos amplificados en *E. coli* se llevó a cabo mediante el sistema comercial GenElute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich PLN10), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.15 SECUENCIACIÓN DE ADN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

La identificación positiva, así como la obtención de la secuencia y comprobaciones de la fidelidad de la misma de cada uno de los clones que contenían tanto los insertos como las mutaciones se hizo mediante secuenciación en un secuenciador automático de fluorescencia ABI-Prism (Applied Biosystems, CA, USA), utilizando el kit de secuenciación *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*, PE, y se llevó a cabo por el Servicio de Genómica y Síntesis de Oligonucleótidos y Secuenciación, Instituto de Parasitología y Biomedicina, López-Neyra, CSIC (Granada, España).

La longitud de la secuenciación abarcaba, por término medio, unas 700-1000 pb. Las muestras se prepararon para su envío a dicho servicio en un volumen final de 0.012 mL de agua libre de DNAsas, conteniendo 5×10^{-4} mg de ADN plasmídico o $3-9 \times 10^{-5}$ mg de fragmento de PCR purificado y 3.2 picomoles de cada uno de los cebadores (**Tabla 8**), directo o reverso, para la secuenciación en ambos sentidos, de las zonas que flanquean la zona de inserción o cebadores específicos del fragmento mutado. El análisis y ensamblaje de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa ChromasPro y el alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas deducidas se determinó utilizando el programa Biology WorkBench (San Diego Supercomputer Centre), herramientas bioinformáticas de uso libre disponibles en Internet.

3.16 TRANSFORMACIÓN DE LA CEPA GS115 DE *Pichia pastoris* MEDIANTE ELECTROPORACIÓN

Tanto el vector de expresión, pPIC9, descrito en el **apartado 3.2**, como el gen *TII* (**apartado 3.7**) y sus mutantes derivados (**apartado 3.8**) se digirieron mediante las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI* (**apartado 3.12**) y, posteriormente, genes y plásmido se ligaron con la enzima T4-ADN ligasa (**apartado 3.13**). Tras su clonación en *E. coli* (**apartado 3.14**), se llevó a cabo el aislamiento de plásmidos (**apartado 3.14.2**); las células de la cepa GS115 de *P. pastoris* se hicieron electrocompetentes (**apartado 3.16.1**), para ser transformadas mediante electroporación (**apartado 3.16.2**) con 0.005-0.02 mg de los vectores, linealizados a través de la enzima *Sall* (Roche Diagnostic 10567663001), para su integración en el locus *his4* de su genoma (**Figura 17**).

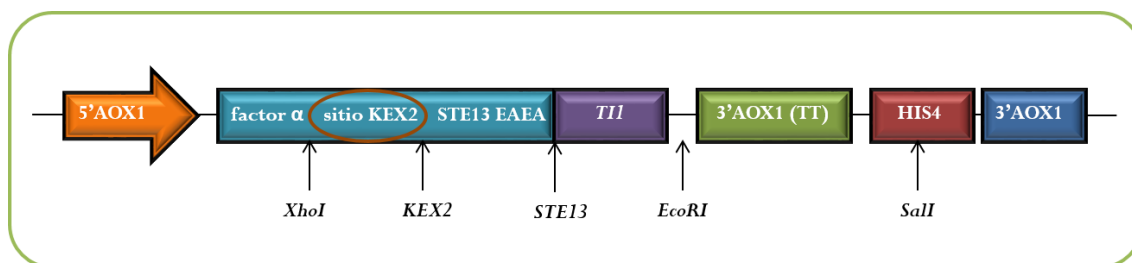


Figura 17. Diagrama esquemático del cassette de expresión pPIC9-TII en el genoma de *Pichia pastoris*. El gen *TII* o sus mutantes derivados se clonaron en el vector de expresión pPIC9 utilizando las dianas de restricción *XhoI* y *EcoRI*. El plásmido se linealizó, previo a la transformación de *P. pastoris*, utilizando la enzima *Sall*. Se introdujo un sitio de procesamiento KEX2 seguido de dos repeticiones de Glu-Ala (EAEA), con objeto de aumentar la eficiencia de la acción proteolítica de la endoproteasa *KEX2*. Las repeticiones Glu-Ala deben ser eliminadas por la enzima *STE13*, endógena de *P. pastoris*.

3.16.1 Preparación de células electrocompetentes GS115

Las células de la cepa GS115 de *P. pastoris* se mantuvieron en 5 mL de YPD (**apartado 3.4.2.1**) durante 16-18 h a 30 °C, previo al proceso de electroporación. Se añadieron 0.1-0.5 mL de este pre-inóculo en 500 mL de YPD y se incubó durante 16-18 h hasta obtener una DO_{600nm} de 1.3-1.5. Las células se centrifugaron a 1500 g durante 5 min a 4 °C y el precipitado se solubilizó en 500 mL de agua estéril, previamente enfriada en hielo. Tras centrifugar las células, el precipitado se solubilizó en 250 mL de agua estéril y se llevaron a cabo dos últimas centrifugaciones, en idénticas condiciones a las anteriores, solubilizando el precipitado en 20 mL y 1 mL de sorbitol 1 M, respectivamente, previamente enfriado en hielo, obteniéndose un volumen final aproximado de 1.5

mL. Las células electrocompetentes se dividieron en volúmenes de 0.08 mL y se electroporaron inmediatamente con los plásmidos a transformar, tal y como está descrito en el siguiente apartado (**apartado 3.16.2**).

3.16.2 Electroporación de la cepa GS115

La transformación de células de la cepa GS115 de *P. pastoris* se llevó a cabo transfiriendo alícuotas de 0.08 mL de células electrocompetentes junto con 0.005-0.02 mg de ADN linealizado, en 0.005-0.01 mL de agua desionizada y estéril, a una cubeta de electroporación, previamente enfriada en hielo, incubándose durante 5 min en hielo. De acuerdo con las condiciones descritas por el fabricante (1500 V, 25 μ F y 200 R; Gene Pulser XCell, Bio-Rad), se llevó a cabo la electroporación e, inmediatamente después, se añadió 1 mL de sorbitol 1 M, previamente enfriado en hielo. Se sembraron placas de MD (**apartado 3.4.2.1**) con alícuotas de 0.2-0.6 mL y se incubaron a 30 °C hasta la aparición de colonias (período de tiempo de incubación aproximado: 36-48 h). El vector de expresión pPIC9 vacío se utilizó como control del proceso de transformación y de expresión. Los transformantes de *P. pastoris* de la cepa GS115 se seleccionaron en placas de MD (**apartado 3.4.2.1**), sin histidina, ya que el plásmido pPIC9 contiene el gen *HIS4* que complementa a la cepa GS115 que tiene una mutación en el gen de la histidina deshidrogenasa (*his4*), que le impide sintetizar histidina (**Figura 17**). Más de 40 colonias de cada una de las construcciones se analizaron mediante PCR para confirmar la presencia de *TII* (**apartado 3.7**) o sus mutantes derivados (**apartado 3.8**), utilizando los cebadores específicos de pPIC9, 5'AOX1 y 3'AOX1 (**Tabla 8**). Tras la verificación, los clones positivos se crecieron en YPD (**apartado 3.4.2.1**) y se conservaron en glicerol al 15% (v/v) a -80 °C hasta su uso.

3.17 PRODUCCION DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK RECOMBINANTES EN *Pichia pastoris*

3.17.1 Producción a pequeña escala

Con el fin de seleccionar las colonias transformadas de *P. pastoris* que mostraban mayores niveles de producción de proteínas recombinantes, se crecieron 16 colonias individuales que contenían, integrado en su genoma, el vector de expresión pPIC9, y que presentaban *TII* (**apartado 3.7**) o uno de sus mutantes derivados (**apartado 3.8**). Las colonias se crecieron en 100

mL de medio BMG (**apartado 3.4.2.2**), en un agitador orbital, hasta alcanzar valores de DO_{600nm} de 2-6, en un rango de temperatura de 28-30 °C y 250 rpm. Las células se centrifugaron a 3000 *g* durante 10 min, y posteriormente se solubilizaron en 20 mL de medio BMM (**apartado 3.4.2.2**). La inducción se continuó durante un periodo de 6 días añadiendo metanol (0.5% v/v) cada 24 h para compensar su consumo y evaporación. La evolución de las producciones se monitorizó mediante ensayos de actividad inhibidora de tripsina (TIA) y quimotripsina (CIA), utilizando los sustratos específicos BAPNA (*N*- α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride, Sigma-Aldrich B4875) (**apartado 3.24.1.2**) y BTEE (*N*-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester, Sigma-Aldrich B6125) (**apartado 3.24.2.1**), respectivamente. Para ello, se recogieron alícuotas de 1 mL cada 24 h con el objeto de monitorizar la producción de las distintas proteínas recombinantes que presentaban actividad inhibidora. En el caso del mutante derivado inactivo, las alícuotas se monitorizaron mediante PAGE-SDS (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) con el objeto de visualizar bandas electroforéticas de peso molecular similar al de rTII (**apartado 3.26**). Las cepas que secretaron los niveles más elevados de las proteínas rTII o sus mutantes derivados se seleccionaron para llevar a cabo su expresión a gran escala (**apartado 3.17.2**), conservándolas en medio YPD (**apartado 3.4.2.1**) suplementado con 15% glicerol (v/v).

3.17.2 Producción a gran escala

Las cepas seleccionadas, descritas en el apartado anterior, se inocularon en 40 mL de medio BMG (**apartado 3.4.2.2**) y se incubaron en agitación a 28-30 °C y 250 rpm hasta llegar a una densidad óptica (DO_{600nm}) con valores en el rango de 2-6 (tiempo de incubación aproximado: 16 h). Una vez alcanzados los valores de densidad óptica adecuados, se inocularon 3 L de medio BMG con 30 mL de pre-inóculo. El cultivo creció bajo condiciones controladas (28-30 °C y 250 rpm), hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) con valores en el rango de 2-6 (tiempo de incubación aproximado: 48 h). Las células se centrifugaron a 8500 *g* durante 10 min, y posteriormente se solubilizaron en 400 mL de medio BMM (**apartado 3.4.2.2**). La expresión de las proteínas recombinantes se indujo durante un periodo de 6 días, manteniendo las levaduras a 28-30 °C, con una agitación de 250 rpm, y añadiendo 1% metanol (v/v) al medio cada 24 h, evitando así la pérdida generada por su uso o evaporación. Tras el periodo de inducción, las células se centrifugaron a 17500 *g* durante 10 min a 4 °C y el sobrenadante se dializó mediante membranas de 3.5 kDa de tamaño de poro (Spectrum Laboratories 734-0687, CA, USA) frente a agua destilada a 4 °C. Las muestras dializadas se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior análisis.

3.18 METODOLOGÍA TILLING

La metodología TILLING es una técnica de genética reversa que combina la generación de mutaciones puntuales (o SNPs, de inglés *Single Nucleotide Polimorphism*) con una técnica eficiente de rastreo molecular (**Figura 18**), que permite la identificación de polimorfismos dentro de la secuencia de nucleótidos (193,194). En el laboratorio de la Prof. Claire Domoney, la metodología TILLING se utilizó para localizar mutaciones puntuales inducidas mediante metanosulfonato de etilo (EMS) en el gen *TII* en semillas de guisante de la variedad Cameor (**apartado 3.5**). El cambio de nucleótido asociado a la mutación provocó un cambio puntual de aminoácido en la secuencia de TI1 (**Tabla 12**). En concreto, se obtuvieron tres mutantes que podrían ocasionar cambios conformacionales y/o funcionales de la proteína TI1: C77Y, involucrado en uno de los puentes disulfuro intramoleculares entre las cisteínas C⁸-C¹²; S85F, cambio que ocurre en el dominio de inhibición C-terminal; y E109K, cambio que ocurre en el extremo nonapéptido C-terminal, el cual mediante proteólisis es eliminado *in vivo* durante el periodo de desecación de la semilla, pudiendo afectar al estado de oligomerización de la proteína (111).

Las semillas de guisante de la variedad Cameor suministradas por la Prof. Claire Domoney, tanto líneas silvestres como mutantes obtenidas mediante la metodología TILLING, se analizaron mediante medidas de TIA y CIA. Tras la molienda de 8-10 semillas de las distintas líneas silvestre y mutante, se obtuvo la fracción proteica sometiendo a extracción ácida 50 mg de harina, mediante agitación suave en 1 mL de HCl 50 mM durante 2 h a 4 °C. Tras centrifugación a 15000 *g* durante 15 min, el sobrenadante se analizó mediante medidas de TIA, CIA y AEP (actividad endógena de proteasas), utilizando los sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.2**) y BTPNA (*N*-Benzoyl-L-tyrosine p-nitroanilide, Sigma-Aldrich B6760) (**apartado 3.24.2.2**).

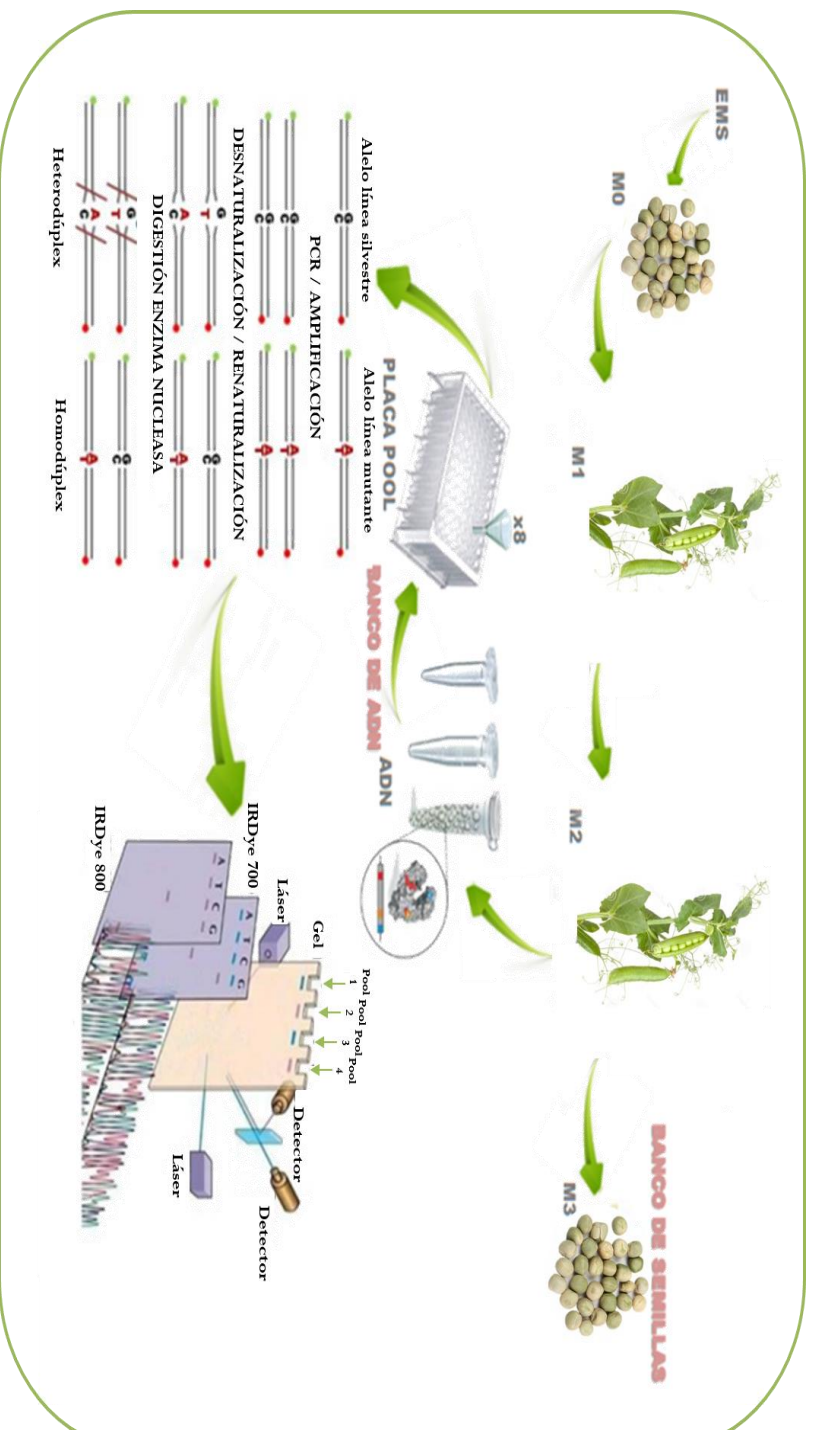


Figura 18. Protocolo empleado para la metodología TILLING. Una vez mutadas las semillas (M_0) con el mutágeno EMS, se crece la generación M_1 (heterocigota). Mediante la autofecundación de plantas mutadas de esta generación se obtiene la generación M_2 (homocigota). Las semillas de la generación M_2 , semillas M_3 , se almacenan para experimentos futuros. Se extrae el ADN de varias plantas M_2 (8 plantas/familia) y se mezcla el ADN de varias familias construyendo "pools" (por ejemplo, 4 familias/pool). A partir de esta mezcla se amplifica el gen *Tll*, mediante cebadores específicos marcados con fluorescencia en los extremos 5'. El producto de PCR se mezcla con la misma cantidad de ADN de la línea pura original (silvestre). Se desnaturalizan las cadenas y se renaturalizan provocando que se forme un ADN híbrido entre el ADN mutado y silvestre. Para detectar las mutaciones se utiliza una endonucleasa (*ENDO*) que reconoce los emparejamientos anómalos puntuales y corta en ese punto de la cadena. La visualización se realiza vía electroporosis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Según la longitud de las cadenas resultantes es posible localizar exactamente la mutación dentro del gen. La suma del tamaño de los fragmentos digeridos en las líneas mutantes debe coincidir con la totalidad del tamaño del fragmento amplificado sin digerir (líneas silvestres).

Tabla 12. Semillas de guisante de la variedad Cameor, líneas silvestre y mutante, obtenidas mediante la metodología TILLING. Las tres mutaciones puntuales introducidas en la secuencia de nucleótidos del gen *TII* dan como resultado la sustitución de los aminoácidos cisteína por tirosina (C77Y), serina por fenilalanina (S85F) y glutámico por lisina (E109K), respectivamente. La numeración de los aminoácidos incluye el pre-pro-péptido de 42 aminoácidos de TII.

Mutación <i>TII</i>	Mutación TII	Familia	Líneas silvestres	Líneas mutantes
G230A	C77Y	2808	1/1/4	2/1/3
			1/1/6	2/1/6
C254T	S85F	671	19/6	19/4
			19/7	19/11
			19/13	19/16
				19/24
G325A	E109K	895	1/2/6	1/1/15
			1/1/14	1/2/4
			1/2/7	1/2/9

3.19 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK

3.19.1 Purificación de proteínas BBI recombinantes expresadas en *P. pastoris*

Tras la inducción a gran escala de las colonias transformadas de *P. pastoris* que mostraron los mayores niveles de producción de rTII o sus mutantes derivados, el medio extracelular se centrifugó, se dializó frente a agua destilada y se liofilizó, tal y como se describe en el **apartado 3.17.2**. El material liofilizado (50 mg procedentes del sobrenadante obtenido tras el crecimiento de la levadura *P. pastoris* transformada con rTII o sus mutantes derivados) se mantuvo en agitación en 10 mL de tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4, durante 30 min a 4 °C. Tras filtración mediante filtros de 0.22 µm, la muestra se fraccionó en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia), conectada a un sistema AKTA FPLC (GE Healthcare). Para ello, se utilizó un gradiente lineal de NaCl de 0-0.22 M en tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4, a un flujo de 1 mL·min⁻¹. La elución se monitorizó a 280 nm, recolectándose fracciones de 0.5 mL. La monitorización de la actividad inhibidora de tripsina de cada una de las fracciones obtenidas se llevó a cabo en microplacas de fondo plano, utilizándose BAPNA como sustrato específico, tal y como se describe en el **apartado 3.24.1.1**. La actividad inhibidora de quimotripsina se llevó a cabo en cubetas semi-micro, utilizando BTEE como sustrato específico (**apartado 3.24.2.1**). Aquellas fracciones que presentaban TIA y/o CIA se reunieron, se dializaron frente a agua destilada a 4 °C

en una membrana de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro y se liofilizaron, almacenándose a -20 °C hasta su uso. En el caso del mutante derivado inactivo, y dado que no presentaba TIA ni CIA, su monitorización se llevó a cabo mediante PAGE-SDS (**apartado 3.26**). La identificación y autentificación de las proteínas recombinantes, rTII y sus mutantes derivados, se llevó a cabo mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**).

3.19.2 Purificación de proteínas BBI de semillas de guisante

Tras la molienda de 8-10 semillas de guisante de las líneas silvestre y mutante obtenidas mediante metodología TILLING, 150 mg de harina se sometieron a extracción ácida mediante agitación en 3 mL de HCl 50 mM durante 2 h a 4 °C. Tras centrifugación a 15000 g durante 15 min, el sobrenadante se dializó frente a tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4 durante 24 h a 4 °C en una membrana de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro (Spectrum Laboratories 734-0684).

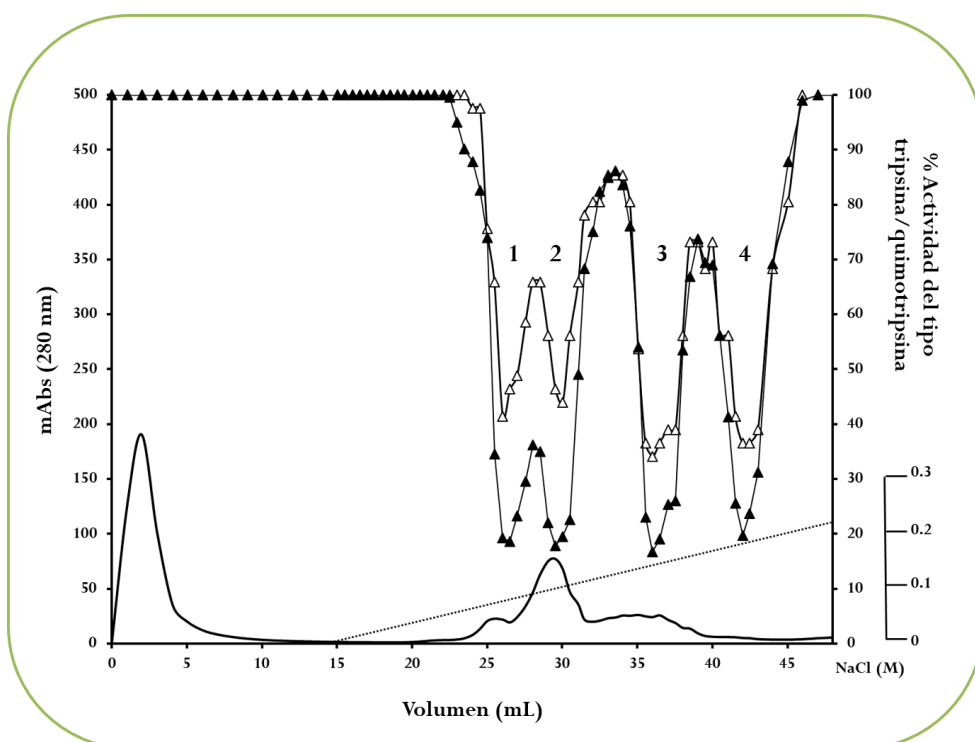


Figura 19. Perfil de elución de las proteínas Bowman-Birk procedentes de semillas de guisante de la variedad Cameor mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua y punteada, respectivamente. La actividad inhibitoria de tripsina (\blacktriangle) y quimotripsina (\triangle) se evaluó en cada fracción, utilizándose los sustratos específicos BAPNA y BTPNA, respectivamente. Los picos de elución correspondientes a los distintos isoINHIBIDORES están enumerados como 1-4.

La muestra se centrifugó a 15000 *g* durante 15 min y se filtró a través de filtros de 0.22 μm . Posteriormente, el sobrenadante se fraccionó tal y como se describe en el apartado anterior (**apartado 3.19.1**). Las medidas de TIA y CIA se monitorizaron utilizando los sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.1**) y BTPNA (**apartado 3.24.2.2**), respectivamente. Las fracciones que contenían TIA y CIA se reunieron de manera individual y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. El perfil de elución de semillas de la variedad Cameor se utilizó como control, obteniéndose los picos cromatográficos 1, 2, 3 y 4 (en orden de elución en la cromatografía de intercambio catiónico) (**Figura 19**), los cuales se identificaron mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**).

3.19.3 Purificación de IBB1 e IBBD2, isoformas BBI mayoritarias de soja

3.19.3.1 Separación de isoformas IBB1 e IBBD2 en preparaciones comerciales

Una mezcla comercial de inhibidores BBI de soja (Sigma-Aldrich T9777), que incluía los isoinhibidores IBB1 e IBBD2 (**Tabla 13**), se solubilizó en tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4 y, una vez filtrada mediante filtros de 0.22 μm , la muestra se fraccionó tal y como se describe en el **apartado 3.19.1** (77). Las medidas de TIA y CIA se monitorizaron utilizando BAPNA (**apartado 3.24.1.1**) y BTEE (**apartado 3.24.2.1**) como sustratos específicos, respectivamente. Las fracciones que contenían TIA y CIA se recolectaron y dializaron de manera independiente frente a agua destilada a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una membrana de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro y, posteriormente, se liofilizaron y almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Su identificación se llevó a cabo mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**), confirmándose los picos I y II obtenidos mediante columna MonoS, como IBB1 e IBBD2, respectivamente.

Tabla 13. Secuencia peptídica de IBB1 e IBBD2, isoformas Bowman-Birk mayoritarias de soja. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de inhibición han sido subrayadas. P₁-P_{1'} son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores (en negrita). K o R en la posición P₁ determina especificidad frente a la enzima tripsina, mientras que L determina especificidad frente a quimotripsina.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----
IBB1	-----DDESSKPCCDQCACT KSN PPQCRCSMDRLNSCHSACKSCIC LS YPAQCFCVDITDFCYEPCCKPSEDDKEN
IBBD2	SDQSSSYDDDEYSKPCCDLCMCT RS MPPQCSCEDIRLNSCHSDCKSCMCT RS QPGQCRCLDTNDFCYKPKSRDD----
	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----

Dado que los productos derivados de la soja contienen los isoINHIBIDORES BBI, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI), fue necesario el obtener una mezcla patrón con los inhibidores BBI liofilizados y el inhibidor tipo KTI (Sigma-Aldrich T2327) en un ratio 1:1:1, mediante agitación suave en 10 mL acetato sódico 25 mM pH 4.4. La mezcla se fraccionó tal y como está descrito anteriormente con modificación en el gradiente de NaCl (0-0.16 M), con el fin de optimizar la separación de los isoINHIBIDORES BBI y KTI. Se analizó TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.1**) y se corroboró la identificación de las isoformas IBB1, IBBD2 y KTI mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**), en los picos I, II y III, respectivamente. Además, se llevaron a cabo medidas de TIA (**apartado 3.24.1.2**) y CIA (**apartado 3.24.2.1**) de IBB1, IBBD2 y KTI purificados para calcular su actividad inhibidora específica ($U \cdot mg^{-1}$ de proteína) y poder así analizar la cantidad de inhibidores BBI activos presentes en leches de soja comerciales (**apartado 3.19.3.2**).

3.19.3.2 Purificación de proteínas BBI presentes en leches de soja comerciales y cuantificación de isoformas

Se utilizaron seis leches de soja comerciales (SM1-SM6) para analizar su composición en isoINHIBIDORES IBB1 e IBBD2 de la familia BBI. Cuatro muestras de cada marca comercial (500 mL) se liofilizaron individualmente y se almacenaron a $-20^{\circ}C$ hasta su uso. Las distintas leches de soja liofilizadas (500 mg) se solubilizaron en 10 mL de tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4 mediante agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente. Los extractos se centrifugaron a $2270 g$ durante 15 min y el sobrenadante se dializó a través de una membrana de 3.5 kDa de tamaño de poro frente a tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4 durante 24 h a $4^{\circ}C$. A continuación, los extractos proteicos de las preparaciones de leche de soja se centrifugaron y filtraron en las condiciones descritas anteriormente, recogiendo alícuotas de 1 mL para llevar a cabo medidas de TIA y CIA, utilizando como sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.2**) y BTEE (**apartado 3.24.2.1**), respectivamente. Los extractos proteicos SM1-SM6 se fraccionaron tal y como está descrito en el apartado anterior (**apartado 3.19.3.1**). TIA y CIA se monitorizaron mediante los sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.1**) y BTEE (**apartado 3.24.2.1**), respectivamente. Aquellas fracciones que presentaban TIA y CIA se reunieron, se liofilizaron y posteriormente se solubilizaron en agua de calidad Milli-Q para llevar a cabo medidas de TIA (**apartado 3.24.1.2**) y CIA (**apartado 3.24.2.1**), con el fin de cuantificar las cantidades de IBB1, IBBD2 y Kunitz presentes en

las leches de soja comerciales SM1-SM6, en función de la actividad TIA y CIA de los mismos, analizadas como tal y como se describe en el apartado anterior (**apartado 3.19.3.1**).

3.20 OLIGOMERIZACIÓN DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK DE SEMILLAS DE GUISANTE

El extremo nonapéptido C-terminal de TI1, eliminado *in vivo* durante el proceso de desecación de la semilla (111), y en particular su residuo Glu¹⁰⁹, parece estar implicado en el estado de dimerización de la proteína (55). Por tanto, el efecto de la mutación E109K obtenida mediante metodología TILLING (**apartado 3.18**) sobre el perfil de oligomerización de la proteína TI1 se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). El perfil de oligomerización de inhibidores BBI procedentes de semillas de la variedad Cameor se utilizó como control de las líneas silvestre y mutante (E109K) (no mostrado). La obtención de la fracción de albúminas se llevó a cabo mediante la extracción de 10 g de harina en 100 mL de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.0 con NaCl 0.5 M, mediante agitación durante 2 h a temperatura ambiente. La mezcla se centrifugó a 15000 *g* durante 10 min y el sobrenadante se dializó utilizando membranas de diálisis de 3.5 kDa de tamaño de poro frente a tampón citrato sódico 25 mM pH 4.6 durante 36-48 h a 4 °C (219). Tras centrifugar a 15000 *g* durante 10 min a 4 °C, las albúminas permanecieron solubles mientras que las globulinas (fracciones 11S y 7S) precipitaron por punto isoeléctrico (pH 4.6). La fracción de albúminas se dializó frente a agua destilada a 4 °C, se liofilizó y se almacenó a -20 °C hasta su uso (**Figura 20**).

El perfil de oligomerización de las proteínas BBI de semillas de guisante de la variedad Cameor, líneas silvestre y mutante (E109K), se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular seguida de cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.1**) e identificación mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**). En primer lugar, las fracciones de albúminas liofilizadas (60 mg) se solubilizaron en 3.5 mL de tampón Tris 50 mM pH 7.5 mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR (GE Healthcare), conectada a un sistema AKTA FPLC. La elución se llevó a cabo con tampón Tris 50 mM pH 7.5, a un flujo de 0.3 mL·min⁻¹, y se monitorizó a 280 nm, recolectándose fracciones de 2.2 mL. La monitorización de TIA se llevó a cabo según se describe en el **apartado 3.24.1.1**. Las fracciones que contenían TIA (denominadas A, B y C, en orden de elución de la cromatografía de exclusión molecular) se dializaron en una membrana de diálisis de

3.5 kDa frente a agua destilada a 4 °C, y posteriormente se liofilizaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso.

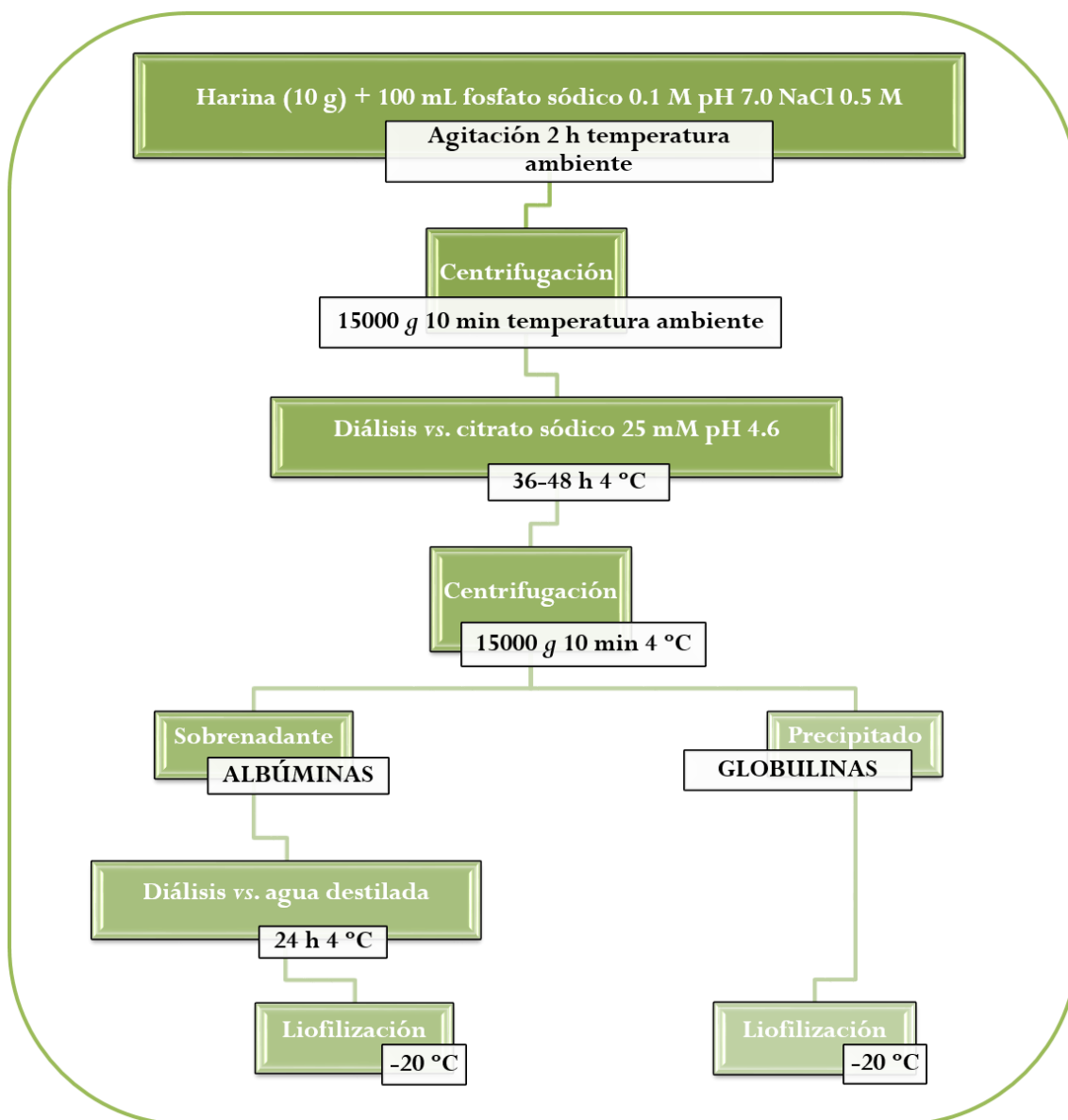


Figura 20. Diagrama de separación de las fracciones de albúminas y globulinas de guisante (219).

Las masas moleculares estimadas de aquellas fracciones que contenían TIA se determinaron mediante una recta de calibrado utilizando marcadores de peso molecular en el rango de 6.5-63.5 kDa (GE Healthcare 17-0442-01), los cuales incluían albúmina de suero bovino (63.5 kDa), ovoalbúmina (48.1 kDa), quimotripsinógeno A (20.4 kDa), ribonucleasa A (15.6 kDa) y aprotinina (6.5 kDa), obteniéndose la recta de calibrado $K_{av} = -0.5619 + 1.072 \cdot PM$, siendo $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$; V_e : volumen de elución, V_0 : volumen de exclusión (89.09 mL), V_t : volumen total de columna (320 mL) y PM: peso molecular (Figura 21).

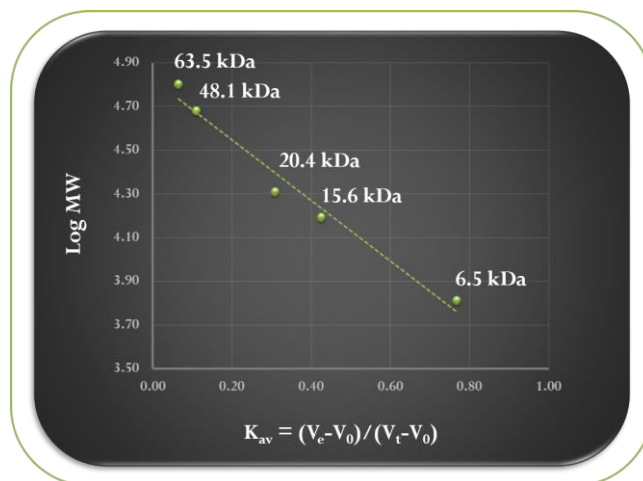


Figura 21. Recta de calibrado para la determinación de pesos moleculares por cromatografía de exclusión molecular (SEC) mediante columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR.

A continuación, las fracciones liofilizadas (A, B y C) se solubilizaron en 3 mL de tampón acetato sódico 25 mM pH 4.4 y fraccionaron en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL (apartado 3.19.1). Las fracciones que presentaban TIA (apartado 3.24.1.1) se reunieron de manera individual, siendo almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. La identificación de las isoformas individuales se llevó a cabo mediante análisis de huella peptídica (apartado 3.27) y masa molecular (apartado 3.28).

3.21 DETERMINACIÓN DE FUROSINA E HIDROXIMETILFURFURAL EN LECHE DE SOJA COMERCIALES

La reacción de Maillard (RM), en la cual participa el aminoácido lisina en presencia de azúcares reductores, se evaluó en seis leches de soja comerciales (SM1-SM6) mediante el análisis de los productos generados tanto en las primeras etapas de la RM (furosina) como en las etapas intermedias (hidroximetilfurfural, HMF).

3.21.1 Cuantificación de furosina

La determinación de furosina en leches de soja comerciales (SM1-SM6) se llevó a cabo mezclando 1 mL de muestra con 7 mL de HCl 9.08 M. Se borboteó nitrógeno de alta pureza a través de las muestras durante 2 min y se hidrolizaron a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 23 h. El hidrolizado resultante se filtró con papel de filtro de grado medio y la furosina se purificó mediante cartuchos

de extracción de fase sólida (SPE) Sep-Pak Plus C18 (Waters JJAN20229, MA, USA). Para ello, 0.5 mL de hidrolizado se eluyeron por un cartucho, previamente activado con 5 mL de metanol y 10 mL de agua desionizada. La elución de la furosina se realizó con 3 mL de HCl 3N, evaporando el ácido mediante rotavapor (220). Finalmente, la furosina purificada se solubilizó en 3 mL de una mezcla de agua, acetonitrilo y ácido fórmico (95:5:0.2); 0.02 mL de la solución resultante se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión UPLC Accela 600 (Thermo-Fisher, Dreieich, Alemania) con par iónico (221), utilizando una columna Extrasyl-ODS2 (25 x 0.4 cm, 5 μ m tamaño de partícula, Tecknokroma, Barcelona, España). La furosina se eluyó isocráticamente a 32 °C, con un flujo de 1 mL·min⁻¹ de una fase móvil compuesta por una solución acuosa de heptanosulfonato sódico 5 mM (Sigma-Aldrich H2766) en 20% acetonitrilo y 0.2% ácido fórmico. La detección se llevó a cabo mediante un detector de fotodiodo a 280 nm. La cuantificación se realizó mediante el método de estándar externo con una recta de calibración de furosina comercial (Polypeptide SC494, Estrasburgo, Francia) con concentraciones 1.2-42.8 mg·L⁻¹. Los resultados se expresaron en mg·L⁻¹ de leche de soja.

Además, con el fin de analizar el efecto del tratamiento térmico y la glicosilación sobre la actividad inhibitoria de las proteínas BBI, se utilizó un sistema modelo compuesto por BBI de soja comercial (1 mg·mL⁻¹) y glucosa (1 mg·mL⁻¹), ambas disueltas en tampón fosfato 0.1 M pH 6.5. Alícuotas de 3 mL se sumergieron en un baño de glicerol a 120 °C durante 30 min, monitorizándose las actividades inhibitorias de tripsina (**apartado 3.24.1.2**) y quimotripsina (**apartado 3.24.2.1**) así como el contenido en furosina, cada 5 min. Las muestras se enfriaron en hielo y se almacenaron a -80 °C hasta su evaluación. Los tiempos de tratamiento térmico excluyen el periodo de “*heating-up*”, estimado en 2 min. Como control, las proteínas BBI se sometieron a tratamiento térmico en ausencia de glucosa.

3.21.2 Cuantificación de hidroximetilfurfural

En el caso del HMF, las muestras procedentes de las leches de soja comerciales (1 mL) se clarificaron mediante la adición de Carrez I (15% ferrocianuro potásico) y II (30% acetato de zinc). Tras centrifugación a 4500 *g* durante 10 min a 4 °C, 0.02 mL de la solución resultante se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión UPLC mediante el método descrito en Rufián-Henares *y col.*, (2006) (210), en una columna Extrasyl-ODS2. El HMF se eluyó isocráticamente a 32 °C, con un flujo de 1 mL·min⁻¹ de una fase móvil compuesta por una solución acuosa con un 5%

de acetonitrilo. La detección se llevó a cabo mediante un detector de fotiodo a 284 nm. La cuantificación se realizó mediante el método de estándar externo con una recta de calibración de HMF comercial (Sigma-Aldrich W501808) con concentraciones entre 0.01-10 mg·mL⁻¹. Los resultados se expresaron en mg·L⁻¹ de leche de soja.

3.22 SÍNTESIS DE PÉPTIDOS CÍCLICOS QUE IMITAN A LOS DOMINIOS DE INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK

La síntesis de péptidos cíclicos que imitan a los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de las proteínas BBI se llevó a cabo basándose en las secuencias peptídicas de las proteínas TI1 (Tabla 10) e IBB1 (Tabla 13), procedentes de guisante y soja, respectivamente. Los péptidos utilizados se sintetizaron mediante la técnica Fmoc (Figura 22), siendo suministrados por Biomedal (Sevilla, España) (Tabla 14).

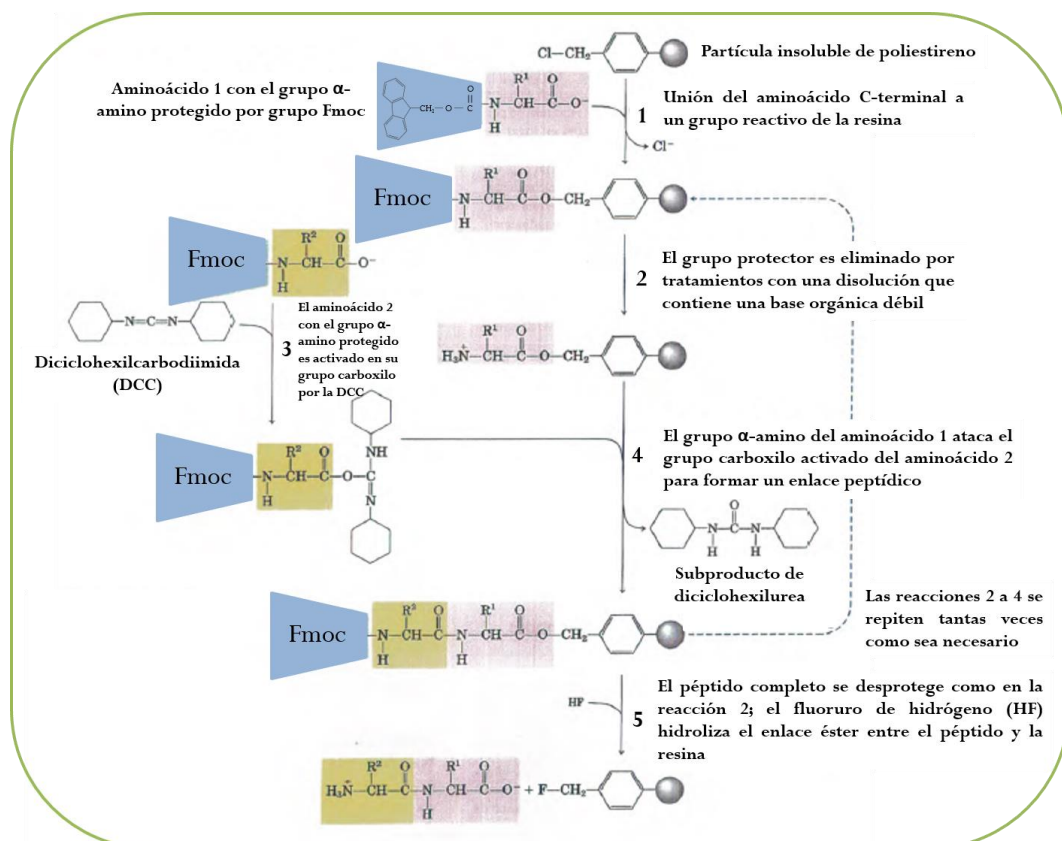


Figura 22. Síntesis química de péptidos sobre un soporte polimérico insoluble. Las reacciones 1-4 son necesarias para la formación de cada enlace peptídico. El grupo 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) (sombreado en azul) impide reacciones no deseadas del grupo α-amino del aminoácido (sombreado en rojo). La síntesis química transcurre desde el extremo C-terminal al extremo N-terminal, la dirección inversa a la dirección de síntesis proteica *in vivo* (222).

La obtención de péptidos derivados, deducidos inactivos, se llevó a cabo mediante la sustitución del aminoácido de la posición P₁, responsable de la especificidad del inhibidor, por el aminoácido glicina. Un péptido derivado de IBB1 en el cual se sustituyó el aminoácido de la posición P₄ del dominio de inhibición C-terminal por el aminoácido prolina, se sintetizó con el objeto de analizar su potencia de inhibición frente a la enzima quimotripsina. El proceso de ciclación de los péptidos, con el fin de imitar la estructura de los dominios de inhibición de TI1 e IBB1, se llevó a cabo mediante un puente disulfuro entre dos cisteínas opuestas en la secuencia. Estas cisteínas se sustituyeron por el aminoácido alanina para obtener péptidos lineales potencialmente inactivos.

Tabla 14. Péptidos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas Bowman-Birk, TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente. A partir de la secuencia correspondiente a los dominios de inhibición N- (Tryp) y C-terminal (Chym) de las proteínas parentales TI1 e IBB1, se obtuvieron péptidos derivados que imitan a sus dominios de inhibición; péptidos derivados, deducidos inactivos, mediante la sustitución del aminoácido de la posición P₁ por glicina (modP₁); péptidos lineales derivados de TI1; y un péptido derivado del dominio de inhibición C-terminal de IBB1 con sustitución del aminoácido de la posición P₄ por prolina (modP₄). Los aminoácidos sustituidos se encuentran sombreados.

Secuencia de aminoácidos de los dominios de inhibición											
Péptidos sintéticos	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '	P ₅ '	P ₆ '	P ₇ '
TI1 (Tryp)	L	C*	T	K	S	N	P	P	T	C*	R
TI1 (Tryp-modP ₁)	L	C*	T	G	S	N	P	P	T	C*	R
TI1 (Tryp-lineal)	L	A	T	K	S	N	P	P	T	A	R
TI1 (Chym)	I	C*	A	Y	S	N	P	P	K	C*	Q
TI1 (Chym-modP ₁)	I	C*	A	G	S	N	P	P	K	C*	Q
TI1 (Chym-lineal)	I	A	A	Y	S	N	P	P	K	A	Q
IBB1 (Tryp)	A	C*	T	K	S	N	P	P	Q	C*	R
IBB1 (Tryp-modP ₁)	A	C*	T	G	S	N	P	P	Q	C*	R
IBB1 (Chym)	I	C*	A	L	S	Y	P	A	Q	C*	F
IBB1 (Chym-modP ₁)	I	C*	A	G	S	Y	P	A	Q	C*	F
IBB1 (Chym-modP ₄)	I	C*	A	L	S	Y	P	P	Q	C*	F

*Ciclación de péptidos sintéticos mediante un puente disulfuro entre dos cisteínas opuestas en la molécula.

La purificación de los péptidos se llevó a cabo mediante HPLC en una columna Inertsil OSD-SP, 5 μm (4.6 x 250 mm) (GL Sciences, CA, USA). La fase móvil utilizada fue 0.1% TFA en acetonitrilo (A) y 0.1% TFA en agua (B), con un gradiente lineal de 10 a 60% durante 25 min y un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La elución se monitorizó a 220 nm y la pureza de los péptidos fue superior al 95%, siendo analizados mediante MALDI-TOF MS con el objeto de confirmar su identidad. Las medidas de actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina de los péptidos sintéticos derivados de TI1 e IBB1, se analizaron utilizando los sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.2**) y BTEE (**apartado 3.24.2.1**), respectivamente.

3.23 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas solubles se determinó mediante el sistema comercial Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific 23225), siguiendo las instrucciones del fabricante. Distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) se utilizaron como estándar (0-2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), excepto en la cuantificación de proteínas purificadas BBI expresadas en *P. pastoris* (**apartado 3.19.1**), en cuyo caso las concentraciones estándar se realizaron con proteínas BBI purificadas, ya que presentan distinta curva patrón probablemente debido a la diferencia en el ratio de los aminoácidos cisteína, triptófano y tirosina, frente a aminoácidos totales (**Figura 23**).

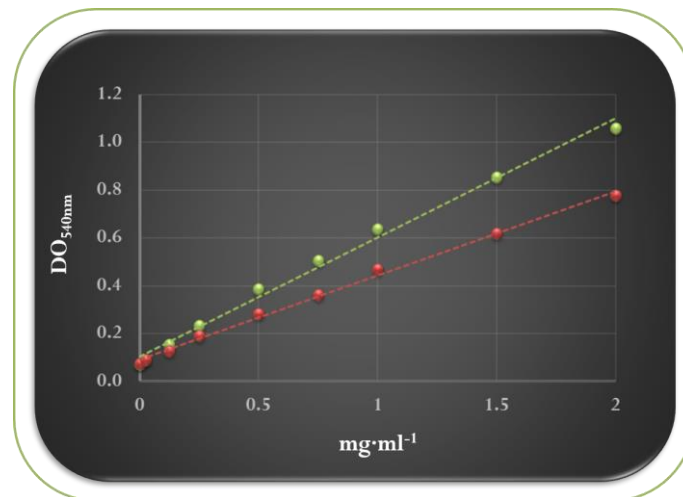


Figura 23. Recta de calibrado para la cuantificación de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) utilizando las proteínas albúmina de suero bovino (BSA, en verde) y Bowman-Birk (BBI, en rojo).

La cuantificación de proteínas mediante el método BCA se analizó en cubetas semi-micro o en microplacas de fondo plano. En cubetas semi-micro, se realizaron incubaciones de 0.1 mL de muestra o estándar y 2 mL de reactivo de trabajo durante 30 min a 37 °C; la absorbancia (DO_{562nm}) se midió en un espectrofotómetro Genesys 10uv (Thermo Scientific). El análisis en microplacas de fondo plano se llevó a cabo mediante incubaciones de 0.01 mL de muestra o estándar y 0.2 mL de reactivo de trabajo, durante 30 min a 37 °C, previa agitación de 30 seg; la absorbancia (DO_{540nm}) se midió en un lector de placas iMark Microplate Reader (Bio-Rad).

3.24 CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA

3.24.1 Actividad inhibidora de tripsina

3.24.1.1 Ensayo semicuantitativo

La actividad inhibidora de tripsina (TIA), de manera semicuantitativa, se determinó en microplacas de fondo plano utilizando BAPNA como sustrato específico y Tris 50 mM pH 7.5 como tampón del ensayo enzimático (Figura 24) (117). Una alícuota de 0.05 mL de solución de tripsina de páncreas bovino (tipo III, Sigma-Aldrich T1426) ($0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en HCl 1 mM) se pre-incubó durante 1 min a 37 °C con tampón Tris 50 mM pH 7.5 y una solución de inhibidor hasta un volumen total de 0.075 mL con objeto de favorecer la interacción proteasa-inhibidor.

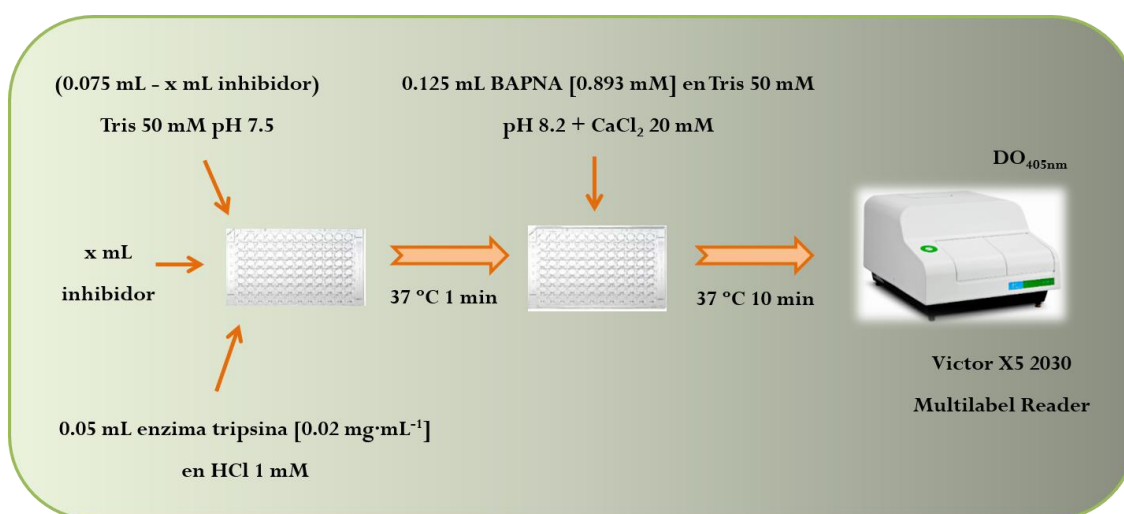


Figura 24. Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de tripsina (TIA) de manera semicuantitativa. BAPNA se utilizó como sustrato específico (117).

Tras el periodo de incubación, la reacción se inició adicionando 0.125 mL de sustrato específico BAPNA (0.893 mM), disuelto en DMSO (40 mg·mL⁻¹) y solubilizado en tampón Tris 50 mM pH 8.2 con CaCl₂ 20 mM. Tras 10 min de incubación a 37 °C, la absorbancia (DO_{405nm}) se midió en un lector de placas Victor X5 2030 (Perkin Elmer, MA, USA), tras una agitación suave de 5 seg.

3.24.1.2 Ensayo cuantitativo

La actividad inhibidora de tripsina (TIA), de manera cuantitativa, se determinó mediante un ensayo modificado a pequeña escala (**Figura 25**), utilizando BAPNA como sustrato específico y Tris 50 mM pH 7.5 como tampón del ensayo enzimático (223). Una alícuota de 0.2 mL de solución de tripsina de páncreas bovino (0.02 mg·mL⁻¹ en HCl 1 mM) se pre-incubó durante 1 min a 37 °C con tampón Tris 50 mM pH 7.5 y una solución de inhibidor hasta un volumen total de 0.4 mL.

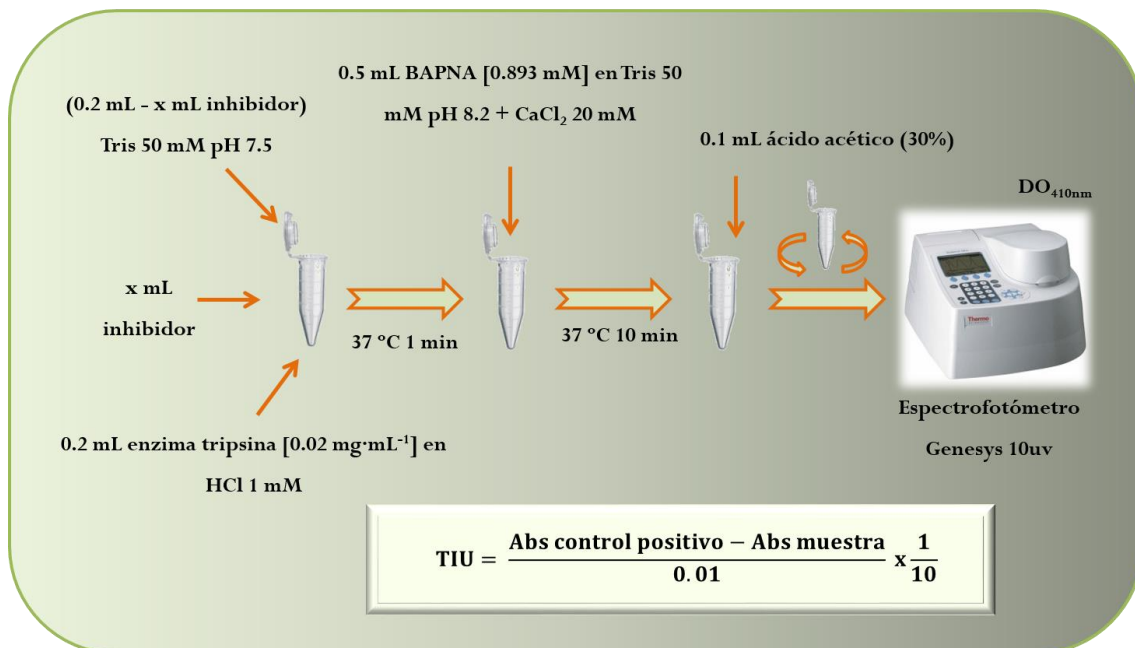


Figura 25. Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de tripsina (TIA) de manera cuantitativa. BAPNA se utilizó como sustrato específico (223).

Tras el periodo de incubación, la reacción se inició adicionando 0.5 mL de sustrato específico BAPNA (0.893 mM), disuelto en DMSO (40 mg·mL⁻¹) y solubilizado en tampón Tris 50 mM pH 8.2 con CaCl₂ 20 mM. Tras 10 min de incubación a 37 °C, la reacción se paró adicionando 0.1 mL de ácido acético al 30%. Tras centrifugación a 15000 g durante 1 min, se llevó a cabo la

medición de absorbancia (DO_{410nm}) en un espectrofotómetro Genesys 10uv. Las muestras se analizaron por triplicado, acompañadas de controles positivos, en ausencia del inhibidor, y controles negativos a los que se adicionó ácido acético (30%) previa a la adición del sustrato. Una unidad inhibidora de tripsina (TIU) se definió como aquella que proporciona una reducción en la absorbancia a 410 nm de 0.01, en función de las reacciones control de tripsina, en un volumen de ensayo definido de 10 mL (223). La actividad inhibidora de tripsina específica se expresó en unidades de inhibición de tripsina por miligramo de proteína ($TIU \cdot mg^{-1}$), cuantificada tal y como se describe en el **apartado 3.23**.

La actividad endógena de proteasas (AEP) del tipo tripsina que puede presentar el extracto proteico, interfiriendo así en la medida de actividad inhibidora de tripsina por parte de los inhibidores BBI presentes en fracciones proteicas de guisante, se determinó siguiendo el procedimiento anterior, y sustituyendo la enzima tripsina por 0.2 mL de HCl 1 mM. El valor de absorbancia obtenido a DO_{410nm} se sustrajo al valor de absorbancia obtenido en la muestra para calcular las unidades de inhibición de tripsina (TIU):

$$TIU = \frac{\text{Abs control positivo} - (\text{Abs muestra} - \text{Abs AEP})}{0.01} \times \frac{1}{10}$$

3.24.2 Actividad inhibidora de quimotripsina

3.24.2.1 Sustrato BTEE

La actividad inhibidora de quimotripsina (CIA) se determinó utilizando BTEE como sustrato específico y Tris 0.1 M pH 7.8 como tampón de ensayo enzimático (**Figura 26**) (90). Una alícuota de 0.035 mL de solución de quimotripsina de páncreas bovino (tipo VII, Sigma-Aldrich C3142) ($0.02 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en HCl 1 mM) se pre-incubó durante 2 min a 30°C con tampón Tris 0.1 M pH 7.8 con CaCl_2 10 mM y una solución de inhibidor hasta un volumen total de 0.465 mL.

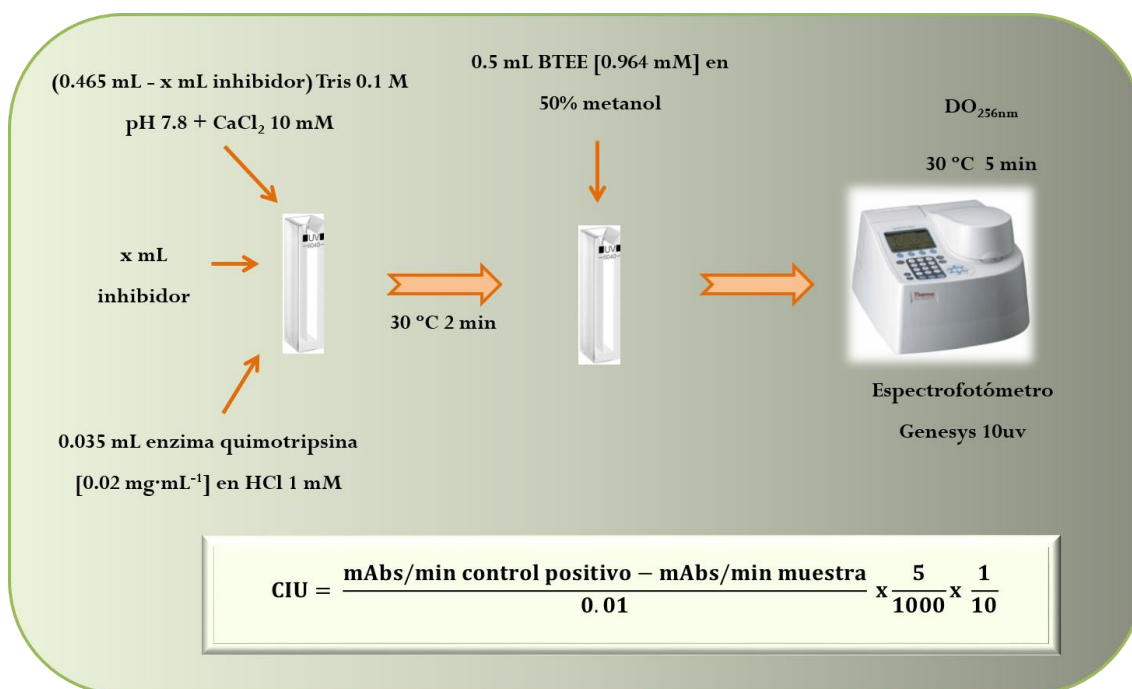


Figura 26. Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de quimotripsina (CIA), utilizando BTEE como sustrato específico (90).

Tras el periodo de incubación, la reacción se inició adicionando 0.5 mL de sustrato específico BTEE (0.964 mM), disuelto en 50% metanol. La lectura de la absorbancia (DO_{256nm}) se midió en un espectrofotómetro Genesys 10uv durante 5 min a 30 °C. Las muestras se analizaron por triplicado y se incluyeron controles positivos en ausencia de inhibidor. Una unidad inhibidora de quimotripsina (CIU) se definió como aquella que proporciona una reducción en la absorbancia a 256 nm de 0.01, en función de las reacciones control de quimotripsina, en 5 min de reacción, en un volumen de ensayo definido de 10 mL, tal como está descrito anteriormente (90). La actividad inhibidora de quimotripsina específica se expresó en unidades de inhibición de quimotripsina por miligramo de proteína (CIU·mg⁻¹), cuantificada tal y como se describe en el **apartado 3.23**.

3.24.2.2 Sustrato BTPNA

La actividad inhibidora de quimotripsina de los extractos proteicos obtenidos en las líneas silvestre y mutante de semillas de guisante de la variedad Cameor (**apartado 3.18**) se determinó utilizando el sustrato específico BTPNA, siguiendo el protocolo de Erlanger *y col.* (1961) (224), con modificaciones (**Figura 27**), debido a la turbidez formada al añadir el sustrato BTEE a la extracción proteica. Una alícuota de 0.2 mL de solución de quimotripsina de páncreas bovino (0.02

$\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en HCl 1 mM) se pre-incubó durante 1 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ con tampón Tris 50 mM pH 7.5 con CaCl_2 20 mM y una solución de inhibidor hasta un volumen total de 0.4 mL.

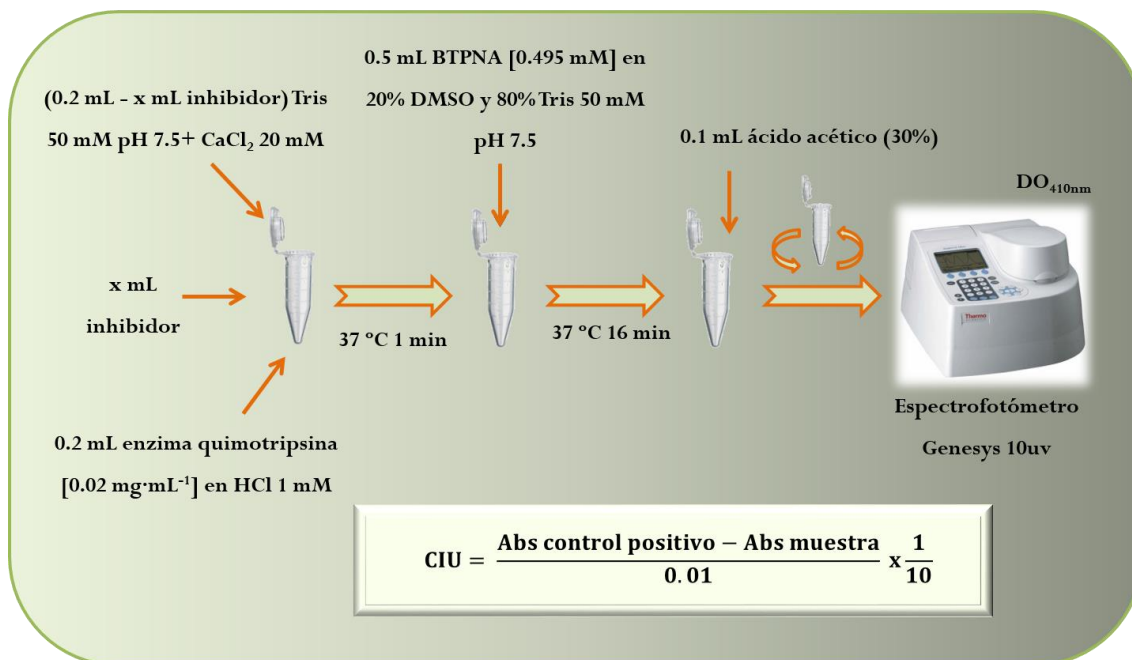


Figura 27. Diagrama del ensayo enzimático utilizado para evaluar la actividad inhibidora de quimotripsina (CIA), utilizando BTPNA como sustrato específico (Erlanger y col., 1961, con modificaciones) (224).

Tras el periodo de incubación, la reacción se inició adicionando 0.5 mL de sustrato específico BTPNA (0.495 mM), disuelto en DMSO ($20.3\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y solubilizado en tampón Tris 50 mM pH 7.5 con 20% DMSO. Tras 16 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, la reacción se paró adicionando 0.1 mL de ácido acético al 30%. La lectura de la absorbancia ($\text{DO}_{410\text{nm}}$) se midió en un espectrofotómetro Genesys 10uv, tras centrifugación a 15000 g durante 1 min. Las muestras se analizaron por triplicado, acompañadas de controles positivos, en ausencia del inhibidor, y controles negativos a los que se adicionaba ácido acético (30%) antes de la adición del sustrato. Una unidad inhibidora de quimotripsina (CIU) se definió como aquella que proporciona una reducción en la absorbancia a 410 nm de 0.01, en función de las reacciones control de quimotripsina, en un volumen de ensayo definido de 10 mL. La actividad inhibidora de quimotripsina específica se expresó en unidades de inhibición de quimotripsina por miligramo de proteína ($\text{CIU}\cdot\text{mg}^{-1}$), cuantificada tal y como se describe en el apartado 3.23.

3.24.3 Cinética enzimática

3.24.3.1 Determinación de K_m de las enzimas tripsina y quimotripsina

Para determinar la velocidad máxima (V_{max}) de las enzimas tripsina y quimotripsina, se añadieron concentraciones crecientes de sustrato (BAPNA o BTEE, respectivamente) hasta alcanzar una velocidad constante de formación de producto. Mediante la concentración de sustrato a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la V_{max} , se calculó la constante de Michaelis-Menten (K_m) de cada enzima. Las reacciones enzimáticas llevadas a cabo fueron las descritas en los **apartados 3.24.1.2 y 3.24.2.1**, con modificaciones.

3.24.3.2 Determinación de K_i de proteínas BBI recombinantes y péptidos sintéticos derivados

Las constantes de inhibición (K_i), tanto de las proteínas BBI expresadas de manera recombinante en *P. pastoris* (**apartado 3.19.1**) como de los péptidos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de TI1 e IBB1 (**apartado 3.22**), frente a las enzimas tripsina (pH 7.5) y quimotripsina (pH 7.8), se determinaron mediante curvas dosis-respuesta de ensayos competitivos, utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTEE, respectivamente. Las reacciones se iniciaron según está descrito en los **apartados 3.24.1.2 y 3.24.2.1**, mediante la adición de tripsina (108 nM) o quimotripsina (28 nM), con ligeras modificaciones en las concentraciones de sustrato, ajustadas mediante medidas de K_m obtenidas tal y como se describe en el apartado anterior (**apartado 3.24.3.1**). Para cada enzima, se determinó la concentración de inhibidor requerida para alcanzar una inhibición del 50% (IC_{50}), utilizándose el software GraFit (GraFit versión 5, Erithacus Software Limited, Reino Unido). Las K_i se calcularon a partir de los valores IC_{50} utilizando las ecuaciones para inhibidores competitivos del tipo tight-binding descritas previamente por Copeland *y col.*, 1995 (**Figura 28**) (225).

$$K_i = \frac{\left(IC_{50} - \frac{[E_t]}{2} \right)}{\left(1 + \frac{[S]}{K_m} \right)}$$

Figura 28. Cálculo de la K_i de inhibidores competitivos del tipo tight-binding (225). K_i : constante de inhibición; IC_{50} : concentración del inhibidor requerida para alcanzar una inhibición del 50%; $[E_t]$: concentración total de enzima; $[S]$: concentración de sustrato; K_m : constante de Michaelis-Menten.

3.25 GELES DE ACTIVIDAD INHIBIDORA DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK

El patrón de inhibición de las proteínas recombinantes BBI expresadas en la levadura *P. pastoris* (**apartado 3.19.1**) frente a las enzimas tripsina y quimotripsina, así como el de los inhibidores BBI procedentes de semillas de guisante de la variedad Cameor (líneas silvestres) y obtenidas mediante metodología TILLING (líneas mutantes) (**apartado 3.18**), se analizó mediante geles de actividad (zimogramas), utilizando geles Novex Zymogram Blue Casein 4-16% (Invitrogen EC6415). Las muestras se solubilizaron en agua de calidad Milli-Q, mezclándose con un volumen similar de tampón de muestra Novex Tris-Glycine Native Sample Buffer 2X (Invitrogen LC2673). Tras cargar la muestra en el gel, este se sometió a un voltaje constante de 125 V durante aproximadamente 180 min a 4 °C, utilizándose como tampón de recorrido Novex Tris-Glycine Native Running Buffer (Invitrogen LC2672). El perfil de inhibición de las proteínas BBI recombinantes se comparó con el perfil obtenido de la fracción de albúminas de semillas de guisante de la variedad Birte mientras que, en el caso de las semillas obtenidas mediante metodología TILLING procedentes de semillas de la variedad Cameor, se comparó con albúminas procedentes de semillas de esta variedad de guisante. La fracción de albúminas se obtuvo tal y como se describe en el **apartado 3.20**.

Tras electroforesis, y siguiendo las instrucciones del fabricante, los geles se incubaron en tampón renaturalizante Novex Zymogram Renaturing Buffer (Invitrogen LC2670) durante 30 min a temperatura ambiente mediante agitación suave, se equilibraron con tampón de desarrollo Novex Zymogram Developing Buffer (Invitrogen LC2671) durante 30 min a 37 °C y, finalmente, se revelaron con una solución de las enzimas tripsina o quimotripsina ($0.08 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) en tampón de revelado Novex Zymogram Developing Buffer a 37 °C durante 1.5 h. Los geles se lavaron con agua destilada y se visualizaron utilizando un transiluminador Gel Doc XR+ System; las áreas de los geles que se mantuvieron azules indicaban las zonas donde las enzimas tripsina y quimotripsina habían sido inhibidas de manera específica.

3.26 ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA CON DODECILSULFATO SÓDICO

Las proteínas se separaron electroforéticamente en geles prefabricados de poliacrilamida NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris (Invitrogen NP0335BOX), utilizando NuPAGE MES SDS Running Buffer (MES 50 mM, Tris base 50 mM, 0.1% SDS, EDTA 1 mM, pH 7.3) como tampón de recorrido (Invitrogen NP0002), añadiendo 0.5 mL antioxidante NuPAGE (Invitrogen NP0005) al tampón de la cámara interna para evitar que las proteínas reducidas se reoxidaran durante el proceso electroforético. Antes de realizar la carga, las muestras liofilizadas se solubilizaron en 0.02 mL de agua de calidad Milli-Q y 7.5×10^{-3} mL de tampón de muestra NuPAGE LDS 4X (dodecil sulfato de litio pH 8.4, Invitrogen NP0007), reduciéndose con 0.003 mL de DL-ditiotreitol 0.5 M (DTT, Sigma-Aldrich D9163) durante 10 min a 70 °C. En algunos casos, las muestras se alquilaron adicionando, tras el proceso de reducción, 0.01 mL de iodoacetamida 0.25 M (IAA, Sigma-Aldrich I6125) durante 15 min a 50 °C, en condiciones de oscuridad. Tras una centrifugación a 15000 *g* durante 1 min, las muestras se cargaron en el gel, el cual se sometió a un voltaje constante de 125 V, durante 45 min aproximadamente.

El peso aparente de las proteínas se estimó por comparación con marcadores de peso molecular comerciales Mark12 (Invitrogen LC5677), no teñidos, que incluía proteínas con un peso molecular desde 2.5 a 200 kDa: miosina (200.0 kDa), β -galactosidasa (116.3 kDa), fosforilasa B (97.4 kDa), BSA (66.3 kDa), deshidrogenasa glutámica (55.4 kDa), lactato deshidrogenasa (36.5 kDa), anhidrasa carbónica (31.0 kDa), inhibidor de tripsina (21.5 kDa), lisozima (14.4 kDa), aprotinina (6.0 kDa), y las cadenas B (3.5 kDa) y A (2.5 kDa) de la insulina. Tras electroforesis, los geles se tiñeron para la visualización de las proteínas utilizando Colloidal Blue (Invitrogen LC6025), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas se fijaron mediante la incubación del gel en 100 mL de tampón fijador (50% metanol, 10% ácido acético), en agitación suave durante 10 min a temperatura ambiente, y se tiñeron mediante su incubación en 100 mL de tampón de tinción (20% metanol, 20% Stainer A), añadiendo 5% Stainer B (Colloidal Blue) una vez transcurridos 10 min en agitación, durante 2 h. A continuación, el gel se lavó con agua destilada durante 16-18 h, hasta su visualización en el transiluminador Gel Doc XR+ System.

3.27 IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE HUELLA PEPTÍDICA

La obtención de muestras para el análisis de huella peptídica se llevó a cabo recortando las bandas electroforéticas individuales previamente teñidas con Colloidal Blue (**apartado 3.26**), las cuales se sometieron a digestión *in-gel* con tripsina bovina en el Servicio de Instrumentación del Instituto de Parasitología y Biomedicina, López-Neyra, CSIC. Los fragmentos peptídicos de las proteínas digeridas se desalinizaron y concentraron mediante columnas C-18 ZipTip (Millipore ZTC18S096), añadiéndose directamente en placas MALDI, utilizando ácido cianohidroxicinámico como matriz para el análisis MALDI-MS. Los espectros MS se obtuvieron de forma automática en un analizador proteómico 4700 (Applied Biosystems) que funciona en modo reflectón con extracción retardada. Los datos de masas peptídicas obtenidos se utilizaron para la identificación de proteínas en comparación con la base de datos de secuencia proteica MS (www.matrixscience.com).

El análisis de huella peptídica de los mutantes derivados de rTII expresados en *P. pastoris* (**apartado 3.8**), así como de los inhibidores BBI procedentes de semillas de guisante de la variedad Cameor que presentaban mutaciones en su secuencia de aminoácidos mediante la metodología TILLING (**apartado 3.18**), se efectuó manualmente, llevándose a cabo digestiones *in silico* de las proteínas con la enzima tripsina.

3.28 DETERMINACIÓN DE MASA MOLECULAR

La determinación de masa molecular se llevó a cabo mediante la solubilización de las proteínas purificadas y liofilizadas en 1% TFA, mezclándose con un volumen similar de matriz (3 mg·mL⁻¹ ácido cianohidroxicinámico en 70% (v/v) acetonitrilo/0.1% TFA), depositado en una sonda MALDI y secándose a temperatura ambiente. Los espectros de masas se obtuvieron de manera automática en un analizador proteómico 4700, en el rango de masa/carga 800-10000 (m/z), calculándose las masas moleculares medias de las proteínas.

3.29 ENSAYOS CELULARES

3.29.1 Análisis de proliferación celular en líneas celulares humanas (HT29 y CCD18-Co)

Las líneas celulares de colon HT29 y CCD-18Co humanas se cultivaron bajo las condiciones descritas en el **apartado 3.6**, determinadas previamente por Clemente *y col.* (2005) (90). Tras alcanzar una confluencia en el rango 70-80%, se llevó a cabo el proceso de tripsinización, en el cual las células adheridas a la superficie se separaron de manera individualizada mediante una incubación con 6 mL de solución tripsina-EDTA (Sigma-Aldrich T4049) durante 5 min a 37 °C. Con el fin de neutralizar la acción de la tripsina, se adicionaron 7 mL de DMEM y las células se centrifugaron durante 5 min a 144 *g*. El precipitado se solubilizó en 5-10 mL de DMEM y las células individualizadas se contabilizaron mediante un contador automático de células Countess Automated Cell Counter (Invitrogen), a través de su tinción con 0.4% Trypan Blue Stain (Invitrogen T10282), siguiendo las instrucciones del fabricante.

En placas de 96 pocillos (Corning 3598), se crecieron 2000 células HT29 o CCD-18Co por pocillo en 0.2 mL de medio de crecimiento (DMEM), incubándose a 37 °C en aire humidificado y 5% CO₂ durante un periodo de 24 h, con el objeto de permitir que las células se adhirieran a la base de los pocillos. Transcurrido ese periodo, el medio se sustituyó por 0.2 mL de DMEM en el que se solubilizaron las proteínas BBI expresadas de forma recombinante en *P. pastoris* (**apartado 3.19.1**) o los péptidos cíclicos sintéticos que imitan a sus dominios de inhibición (**apartado 3.22**), en un rango de concentraciones establecido, añadiéndose a las células en condiciones de esterilidad mediante filtrado con filtros de 0.22 µm. Como control, se crecieron células HT29 y CCD-18Co en ausencia de inhibidores BBI. El efecto de los BBI sobre la proliferación celular se evaluó tras un periodo de incubación de 96 h (77).

La viabilidad de las células se analizó mediante estudios de proliferación celular basados en la tinción vital celular con rojo neutro (RN, 3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride, Sigma-Aldrich N4638). Este ensayo se basa en la habilidad que presentan las células viables de incorporar y fijar activamente RN en los lisosomas. Transcurrido el tiempo de incubación de las células HT29 o CCD-18Co junto con las proteínas BBI o péptidos cíclicos sintéticos, se llevó a cabo el proceso de tinción. El medio se sustituyó por 0.2 mL de DMEM en el que se había solubilizado RN (12.5 x 10⁻³ mL de una solución 0.4% NR (p/v) por cada mL de DMEM) y las

células se incubaron durante 2 h a 37 °C en aire humidificado y 5% CO₂. El proceso de fijación celular se llevó a cabo sumergiendo la placa en 0.5% formaldehído con 0.1% CaCl₂ 1M durante 30 seg a temperatura ambiente. La placa se lavó finalmente mediante dos breves inmersiones en tampón fosfato salino (PBS, fosfato sódico 0.01 M, NaCl 0.15 M) y se adicionaron 0.2 mL de una solución de etanol acidificada (50% etanol, 1% ácido acético) con el fin de extraer RN de las células viables, incubándose durante 16-18 h a 4 °C. La absorbancia se midió a DO_{540nm} en un lector de placas iMark (**Figura 29**). La concentración de las proteínas rTI1 y sus mutantes derivados, así como de los péptidos cíclicos sintéticos derivados, que redujeron un 50% la viabilidad celular (IC₅₀) se calculó mediante una curva de regresión no lineal, utilizando el software GraFit.

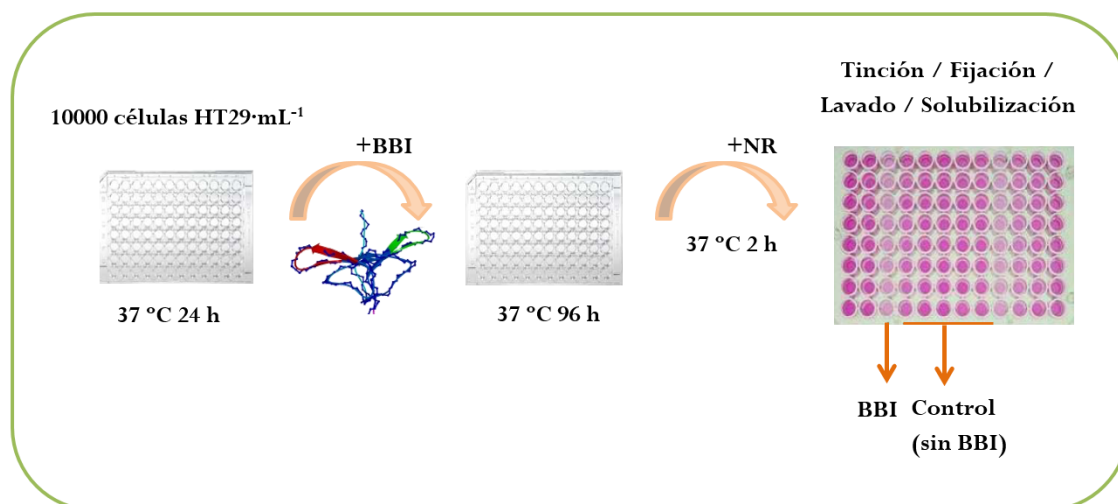


Figura 29. Diagrama del ensayo de proliferación celular mediante tinción vital con objeto de evaluar las propiedades anti-proliferativas de las proteínas Bowman-Birk recombinantes, utilizando la línea celular HT29 procedente de adenocarcinoma colorrectal humano.

3.29.2 Marcado con fluorescencia e internalización celular de proteínas BBI recombinantes en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano

En colaboración con el laboratorio de los Dres. Antonio Jesús Castro y Juan de Dios Alché de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Granada, España), las proteínas BBI recombinantes expresadas en la levadura *P. pastoris* (**apartado 3.19.1**) se marcaron con los fluorocromos CyDye (GE Healthcare 25-8010-65), los cuales poseen un grupo éster NHS que reacciona de forma covalente e irreversible con el grupo amino ε de la lisina mediante un enlace amida. Se siguió el protocolo “minimal labelling”, el cual permite marcar una única lisina por cada proteína, con objeto

de minimizar el daño potencial sobre la actividad enzimática del dominio de inhibición de tripsina, cuya posición P₁ (responsable de la especificidad) está ocupada por dicho aminoácido.

Los fluorocromos CyDye2 y CyDye3 se reconstituyeron de manera independiente en 0.005 mL de DMF (N,N-dimetilformamida), obteniéndose una concentración final de 1 mM. El fluorocromo CyDye2 (con un máximo de absorbancia a 491 ± 3 nm y un máximo de emisión a 506 ± 5 nm) se utilizó para marcar la proteína rTII y su mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}, mientras que el fluorocromo CyDye3 (con un máximo de absorbancia a 548 ± 3 nm y un máximo de emisión a 560 ± 5 nm) se utilizó para marcar la proteína rTII_{inactivo} y el mutante rTII_{Chym-Chym}. Las proteínas purificadas y liofilizadas (0.25 mg) se reconstituyeron en 0.25 mL de tampón de lisis (Tris 30 mM, urea 7 M, tiourea 2 M, 4% CHAPS pH 8.5), al cual se adicionaron 2.5×10^{-3} mL del fluorocromo CyDye correspondiente. Las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C, en condiciones de oscuridad. Tras adicionar 0.001 mL de una solución de lisina 10 mM, la mezcla se incubó en condiciones idénticas durante 10 min. Se añadió DMEM hasta un volumen final de 0.5 mL y se eliminó el CyDye libre (no unido a proteína) en un sistema de filtración en columna Amicon Ultra-0.5, 3K (Millipore UFC500308), mediante una centrifugación a 14000 *g* durante 30 min. Tras la centrifugación, se añadió DMEM al concentrado (0.05 mL), hasta un volumen final de 0.5 mL, y se repitió el proceso de filtrado dos veces. Tras la última centrifugación, las proteínas marcadas se almacenaron en alícuotas de 0.050 mL a -80 °C hasta su uso. La calidad del marcado de las distintas proteínas se comprobó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS) (**apartado 3.25**). El gel de las proteínas marcadas y de sus controles correspondientes (CyDyes de las fracciones filtradas) se visualizó en un escáner Pharos FX (Bio-Rad) mediante excitación a 488 nm con un láser de Ar en el caso del fluorocromo CyDye2 y a 532 nm con un láser de He-Ne en el caso del CyDye3.

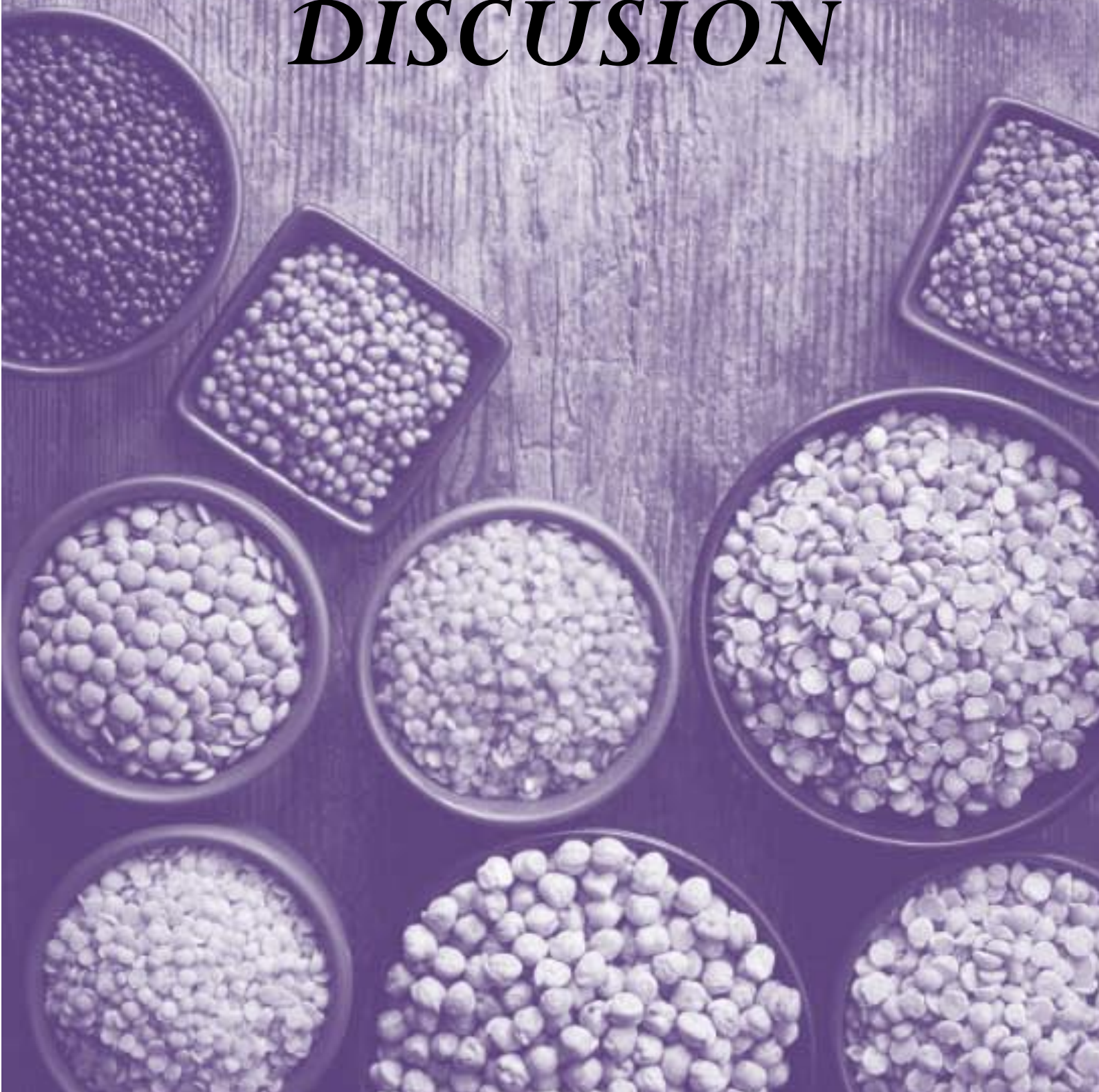
Tras el proceso de tripsinización (**apartado 3.29.1**), se sembraron 25000 células HT29 (**apartado 3.6**) sobre placas de 0.18 mm de grosor (Ibidi 80444, Martinsried, Alemania) y se incubaron a 37 °C en 5% CO₂ en aire humidificado durante 24 h, tiempo en el cual las células crecen en pequeños grupos de 2-10 unidades. Tras este periodo de crecimiento, se adicionaron 0.05 mg de proteína marcada y se tomaron imágenes a intervalos regulares de tiempo (1, 15, 20 y 40 min). La internalización de las proteínas rTII y sus mutantes derivados se monitorizó en un microscopio Eclipse Ti-U (Nikon), equipado con un sistema de iluminación Cool LED300. Las proteínas marcadas con CyDye2 (rTII y rTII_{Tryp-Tryp}) y CyDye3 (rTII_{inactivo} y rTII_{Chym-Chym}) se visualizaron

mediante excitación a 430-505 nm con una lámpara LED azul y a 525-570 nm con una lámpara LED verde, respectivamente.

3.30 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se analizaron mediante un análisis descriptivo, estimándose los valores medios y la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes ($n \geq 3$ por experimento). Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test de Bonferroni con objeto de comparar los valores medios, estableciéndose una significancia estadística a $P < 0.05$, excepto en los ensayos realizados con semillas de guisante obtenidas mediante metodología TILLING, en los cuales se estableció una significancia estadística de $P < 0.01$. En la determinación de furosin y HMF en leches de soja comerciales, la homogeneidad de la varianza se estudió en primer lugar mediante el test de Levene, estableciéndose una significancia estadística de $P < 0.05$. La significancia estadística de los datos se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de una sola vía seguido del test de Duncan para comparar las medias que presentaron una diferencia significativa ($P < 0.05$). Para evaluar la relación entre los diferentes ensayos que se realizaron, se determinó el coeficiente de correlación lineal de Pearson, estableciéndose una significancia estadística a $P < 0.05$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4.1 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK EXPRESADAS EN LA LEVADURA *Pichia pastoris*

4.1.1 Clonación de *TII*

El inhibidor TII es un inhibidor de proteasas de la familia Bowman-Birk, mayoritario en semillas de guisante (27,35). La secuencia correspondiente a la proteína TII madura (Tabla 10), en ausencia de su pro-péptido, se amplificó a partir del ADNc pTII2-36, en colaboración con el laboratorio de la Prof. Claire Domoney (John Innes Centre, Norwich, Reino Unido). Tal y como está descrito anteriormente (35,111), la traducción *in silico* del ADNc pTII2-36 reveló la presencia de dos dominios de inhibición y catorce cisteínas en posiciones conservadas (Figura 30), unidas mediante siete puentes disulfuro intramoleculares (C¹-C¹⁴, C²-C⁶, C³-C¹³, C⁴-C⁵, C⁷-C⁹, C⁸-C¹² y C¹⁰-C¹¹). La posición P₁ del dominio de inhibición N- (CTKSNPPTC) y C-terminal (CAYSNPPKC) (2), responsable de la especificidad de la enzima, muestra los aminoácidos lisina (Lys¹⁶) y tirosina (Tyr⁴²), respectivamente, los cuales confieren especificidad frente a serín proteasas del tipo tripsina y quimotripsina.

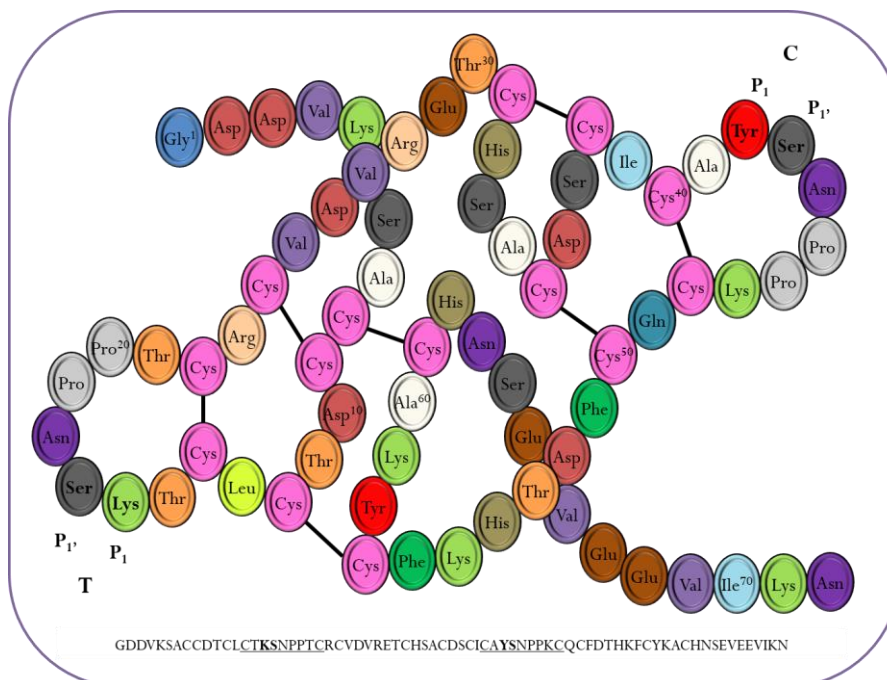


Figura 30. Secuencia de aminoácidos de la proteína TII de guisante. Los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina presentan la secuencia CTKSNPPTC y CAYSNPPKC, respectivamente, mostrándose los siete puentes disulfuro intramoleculares que unen las catorce cisteínas mediante líneas conectadas. Las posiciones P₁ y P₁' de los dominios de inhibición de tripsina (T) y quimotripsina (C) constituyen el sitio de unión a las enzimas diana.

La clonación de *TII* se llevó a cabo tras amplificación mediante PCR (**apartado 3.7**), utilizando los cebadores específicos N_peaTII1 y C_peaTII1 (**Tabla 8**) para la obtención del gen completo, tal y como se muestra en la **Figura 31 A**, obteniéndose un tamaño esperado de 260 pb. Tras digestión con *XhoI* y *EcoRI* (**apartado 3.12**) y ligación con T4-ADN ligasa del fragmento de ADN en el vector de expresión pPIC9 (**apartado 3.13**), éste se introdujo en células DH5 α de *E. coli* y los clones positivos se seleccionaron en placas de LB con ampicilina (**apartado 3.14**). Mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**) se comprobó la inserción efectiva de *TII* (**Figura 31 B**), en la cual los clones positivos mostraron un tamaño de 740 pb (240 pb correspondientes a *TII* y 500 pb correspondientes al vector de expresión pPIC9). Los clones que habían incorporado el vector vacío presentaron un tamaño de 500 pb. Los análisis de secuencia mostraron los nucleótidos AAA y TAT, que codifican para los aminoácidos lisina y tirosina en la posición P₁ de los dominios de inhibición N- y C-terminal, respectivamente (**Figura 31 C**).

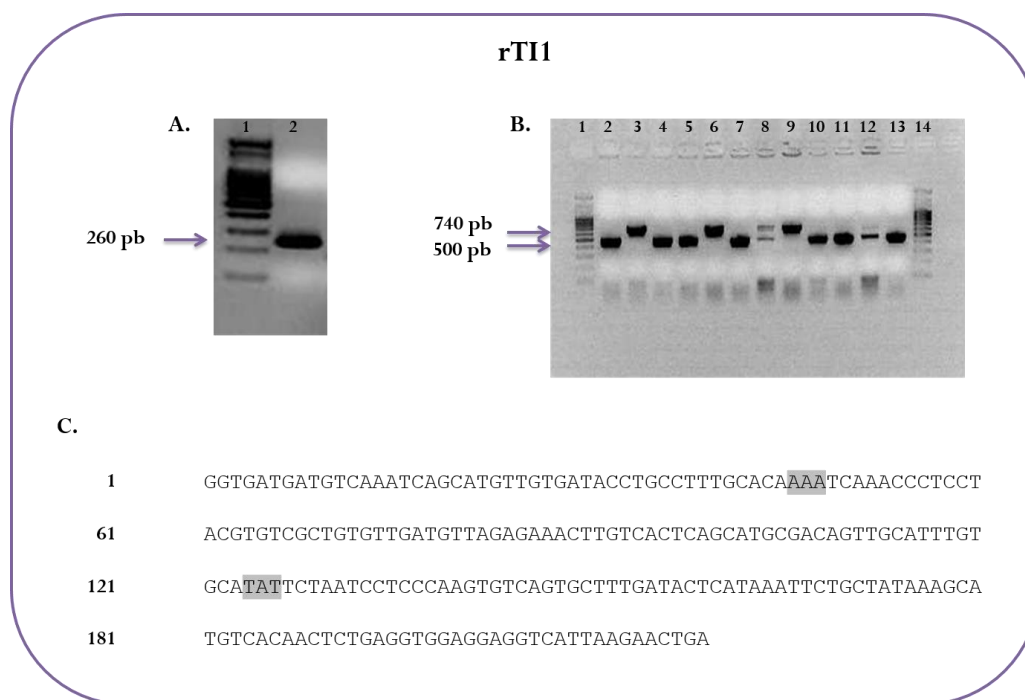


Figura 31. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de clonación de *TII*. **A)** Gen completo obtenido mediante los cebadores N_peaTII1 y C_peaTII1. **B)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 3, 6 y 9 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen *TII*. Las calles 2, 4-5, 7, 10-13 son clones de 500 pb que contienen el vector vacío. El marcador está localizado en las calles 1 y 14 (A y B). **C)** Secuencia de nucleótidos de *TII*. Los nucleótidos que codifican para el aminoácido de la posición P₁ de ambos dominios de inhibición (Lys y Tyr, respectivamente) se muestran sombreados.

4.1.2 Obtención de mutantes derivados de *TI1* mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante

Los mutantes derivados de la proteína TI1 se obtuvieron mediante la introducción de mutaciones puntuales en los dominios de inhibición de tripsina y/o quimotripsina mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante (**apartado 3.8**), utilizando el ADNc de *TI1* como molde (**apartado 4.1.1**). Se obtuvieron así los mutantes derivados inactivo ($rTI1_{\text{inactivo}}$) y aquellos que presentaban dos dominios de inhibición idénticos de tripsina ($rTI1_{\text{Tryp-Tryp}}$) o quimotripsina ($rTI1_{\text{Chym-Chym}}$) (**Tabla 15**).

Tabla 15. Secuencia peptídica de los dominios de inhibición de $rTI1$ y sus mutantes derivados $rTI1_{\text{inactivo}}$, $rTI1_{\text{Tryp-Tryp}}$ y $rTI1_{\text{Chym-Chym}}$. P₁-P₁' son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores (en negrita). K en la posición P₁ determina especificidad frente a la enzima tripsina mientras que Y determina especificidad frente a quimotripsina. Los aminoácidos sustituidos a través de mutagénesis dirigida mediante PCR solapante se encuentran sombreados.

Proteínas BBI recombinantes	Dominio de inhibición	
	N-terminal	C-terminal
$rTI1$	CTKSNPPTC	CAYSNPPKC
$rTI1_{\text{inactivo}}$	CTG [■] SNPPTC	CAG [■] SNPPKC
$rTI1_{\text{Tryp-Tryp}}$	CTKSNPPTC	CTK [■] SNP [■] PTC
$rTI1_{\text{Chym-Chym}}$	CAY [■] SNPP [■] KC	CAYSNPPKC

4.1.2.1 Mutante derivado $rTI1_{\text{inactivo}}$

El mutante inactivo derivado de $rTI1$ se obtuvo mediante la sustitución, en ambos dominios de inhibición, del aminoácido en la posición P₁, responsable de la especificidad de la enzima, por el aminoácido glicina (K16G:Y42G) (**Figura 32**).

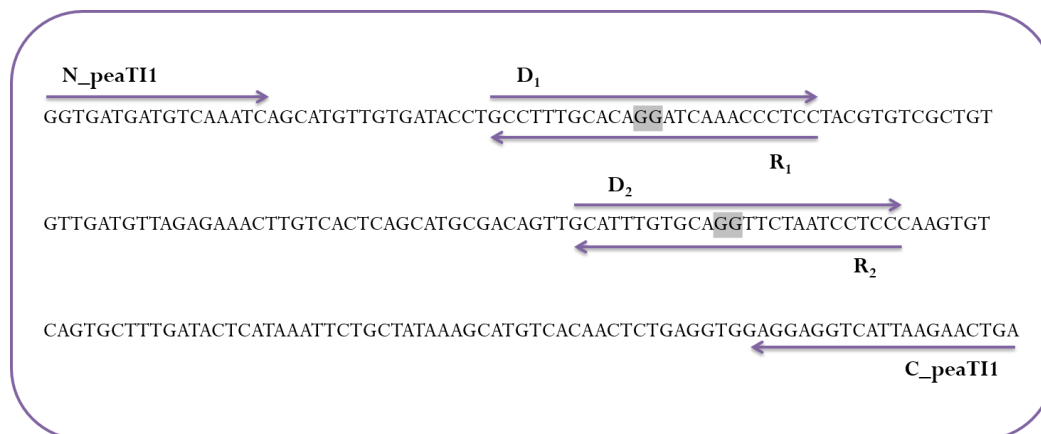


Figura 32. Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado rTII_{inactivo} obtenido mediante la sustitución de los residuos P₁, responsables de la especificidad dentro de los dominios de inhibición, por el aminoácido glicina. Sustitución de los codones AAA y TAT, que codifican para los residuos Lys y Tyr de la posición P₁ de los dominios de inhibición N- y C-terminal, respectivamente, por los codones GGA y GGT, que codifican al aminoácido Gly. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

En la primera ronda de mutagénesis (**apartado 3.8**) se llevó a cabo una primera fase con dos PCRs independientes, en las que utilizando el ADNc de *TII* como molde, se obtuvieron dos fragmentos que solapaban en la región mutada de su secuencia. Con la combinación de cebadores N_peaTII1-R₁ y D₁-C_peaTII1 (**Tabla 8**), se llevó a cabo la sustitución del aminoácido lisina por glicina (K16G) en la posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal (CTG_SNPPTC) (**Figura 33 A**). Los dos productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa (**apartado 3.10**) y se utilizaron como molde en una segunda fase de PCR, con los cebadores N_peaTII1 y C_peaTII1 (**Tabla 8**), para la obtención del gen completo con el dominio de inhibición N-terminal mutado (**Figura 33 B**). El gen mutado se clonó en *E. coli*, tal y como está descrito en el apartado anterior (**apartado 4.1.1**) y, en los clones seleccionados en placas de LB con ampicilina (**apartado 3.14**), se comprobó la inserción de *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado, mediante PCR de colonia, utilizando los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**).

Los clones positivos presentaron un tamaño de 740 pb (**Figura 33 C**), correspondientes a 240 pb de *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado más 500 pb del vector de expresión pPIC9, mientras que los clones que solo amplificaron la parte de pPIC9 presentaban 500 pb. Las mutaciones puntuales introducidas en *TII* se comprobaron secuenciando los productos de PCR de los clones positivos (**apartado 3.15**), utilizando los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**). La posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal mostraba los nucleótidos GGA, que codifican para el aminoácido glicina, sustituyendo a los nucleótidos AAA, que codifican para lisina (**Figura 33 D**).

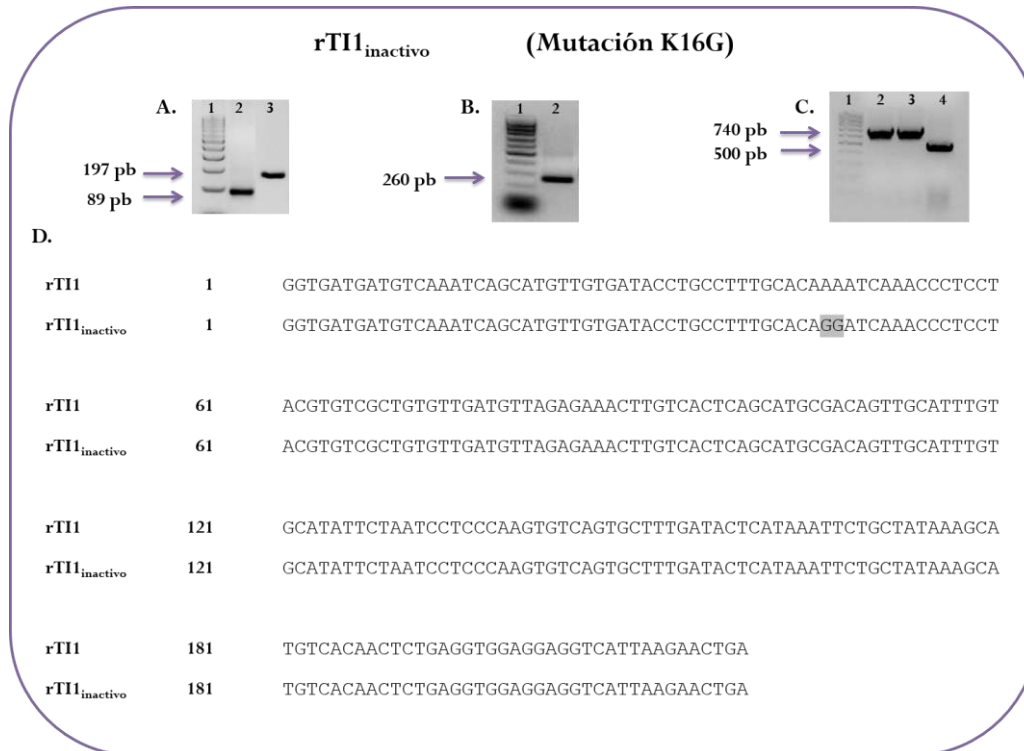


Figura 33. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en la posición P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{inactivo}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 2: Fragmento obtenido con el par de cebadores N₁-peaTII-R₁; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₁-C₁-peaTII. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N₁-peaTII y C₁-peaTII. El marcador está localizado en la calle 1 (A y B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2 y 3 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado. La calle 4 es un clon de 500 pb que contiene el vector vacío. El marcador está localizado en la calle 1. **D)** Secuencia de nucleótidos de *TII*, con el dominio de inhibición N-terminal mutado en la posición P₁. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

La mutación del dominio de inhibición C-terminal se llevó a cabo en una segunda ronda de PCR solapante (**apartado 3.8**). En la primera fase se utilizó como molde el ADNc de *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado, obtenido anteriormente, y la combinación de cebadores N₁-peaTII-R₂ y D₂-C₁-peaTII (**Tabla 8**) para la sustitución de tirosina por glicina (Y42G) en la posición P₁ del dominio de inhibición C-terminal (CAGSNPPKC) (**Figura 34 A**). Los dos productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa (**apartado 3.10**) y se utilizaron como molde en la segunda fase de PCR, con los cebadores N₁-peaTII y C₁-peaTII (**Tabla 8**), para obtener el gen completo con ambos dominios de inhibición mutados (**Figura 34 B**). El gen mutado se clonó en *E. coli*, tal y como está descrito en el apartado anterior (**apartado 4.1.1**) y, mediante los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**), se comprobó la inserción de *TII* con ambos dominios de

inhibición mutados en los clones seleccionados en placas de LB con ampicilina (**apartado 3.14**). Tal y como muestra la **Figura 34 C**, los clones positivos mostraron un tamaño de 740 pb (240 pb del mutante inactivo derivado de *TII* y 500 pb de pPIC9), mientras que los clones que únicamente amplificaron el vector de expresión vacío mostraron un tamaño de 500 pb. Mediante análisis de su secuencia (**apartado 3.15**), se comprobó la sustitución de los nucleótidos TAT, que codifican para el aminoácido tirosina, por GGT, que codifican para glicina, en la posición P₁ del dominio de inhibición C-terminal (**Figura 34 D**). De esta forma se obtuvo la secuencia de *TII* con los dos dominios de inhibición mutados en la posición P₁, dando como resultado lo que denominamos rTII_{inactivo}.

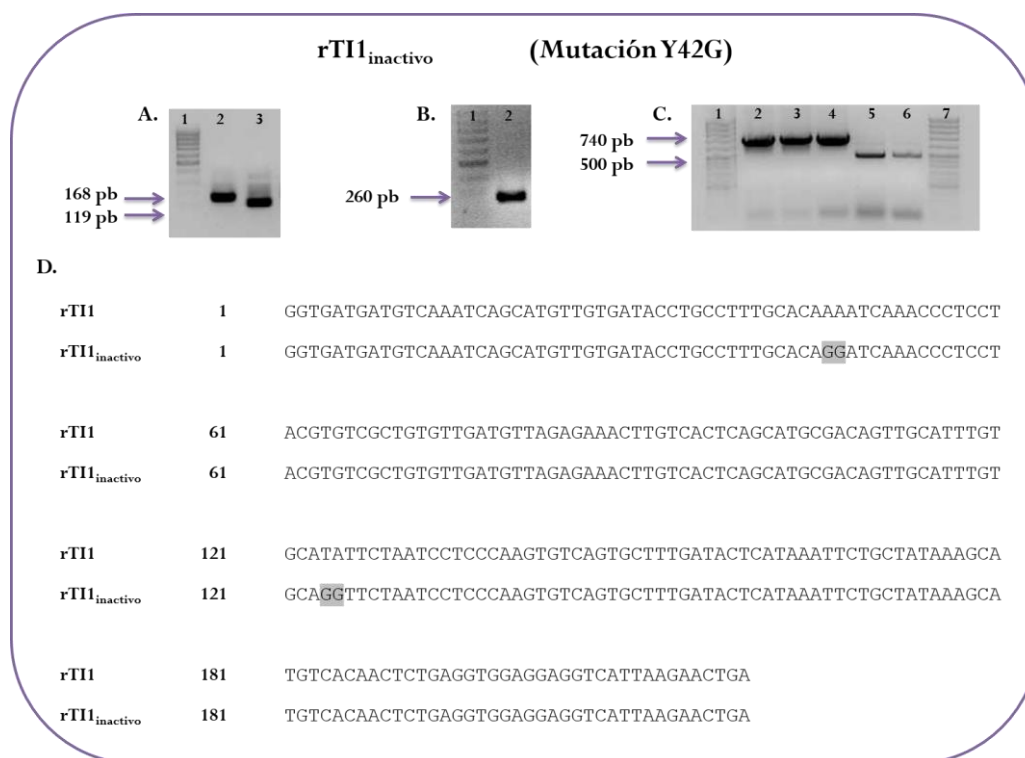


Figura 34. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en la posición P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{inactivo}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 2: Fragmento obtenido con el par de cebadores N_peaTII-R₂; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₂-C_peaTII. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N_peaTII y C_peaTII. El marcador está localizado en la calle 1 (A y B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2, 3 y 4 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen *TII* inactivo. Las calles 5 y 6 son clones de 500 pb que contienen el vector vacío. El marcador está localizado en las calles 1 y 7. **D)** Secuencia de nucleótidos del mutante inactivo derivado de *TII*, con ambos dominios de inhibición mutados en la posición P₁. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

4.1.2.2 Mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}

El mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp} se obtuvo mediante la sustitución de los aminoácidos alanina, tirosina y lisina en las posiciones P₂, P₁ y P₅ del dominio de inhibición C-terminal por los aminoácidos treonina, lisina y treonina (A41T:Y42K:K47T), con el fin de obtener una proteína con dos dominios de inhibición de tripsina idénticos (CTKSNPPTC) (**Figura 35**).

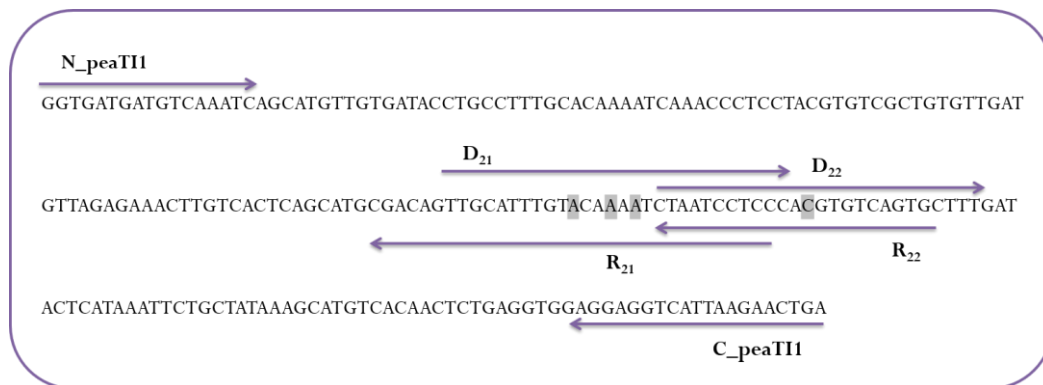


Figura 35. Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp} obtenido mediante la sustitución de los residuos P₂, P₁ (responsable de la especificidad dentro de los dominios de inhibición) y P₅ en el dominio de inhibición C-terminal. Sustitución de los codones GCA, TAT y AAG, que codifican para los residuos Ala, Tyr y Lys de las posiciones P₂, P₁ y P₅ dentro del dominio de inhibición C-terminal, respectivamente, por los codones ACA, AAA y ACG, que codifican a los aminoácidos Thr, Lys y Thr. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

De manera similar a como está descrito para la obtención del mutante derivado rTII_{inactivo} (**apartado 4.1.2.1**), el mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp} se obtuvo mediante dos rondas de mutagénesis dirigida por PCR solapante, constituidas cada una, a su vez, por dos fases (**apartado 3.8**). En una primera ronda (primera fase) se utilizó el ADNc de *TII* como molde, con la combinación de cebadores N_peaTII-R₂₁ y D₂₁-C_peaTII (**Tabla 8**), para la sustitución de alanina y tirosina por treonina y lisina (A41T:Y42K) en las posiciones P₂ y P₁ del dominio de inhibición C-terminal (**Figura 36 A**). Los dos productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa (**apartado 3.10**) y se utilizaron como molde en una segunda fase, con los cebadores N_peaTII y C_peaTII (**Tabla 8**), para la obtención del gen completo con mutaciones en las posiciones P₂ y P₁ del dominio de inhibición C-terminal (**Figura 36 B**), el cual se clonó en *E. coli* tal y como está descrito en el **apartado 4.1.1**. Los clones positivos mostraron un tamaño de 740 pb equivalentes a 240 pb del gen y 500 pb del vector pPIC9 en todos los transformantes analizados (**Figura 36 C**). Las mutaciones introducidas se comprobaron mediante secuenciación (**apartado 3.15**), utilizando los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**), verificándose las sustituciones de los nucleótidos GCA

y TAT, que codifican para los aminoácidos alanina y tirosina en las posiciones P₂ y P₁ del dominio de inhibición C-terminal, por los nucleótidos ACA y AAA, que codifican para treonina y lisina (Figura 36 D).

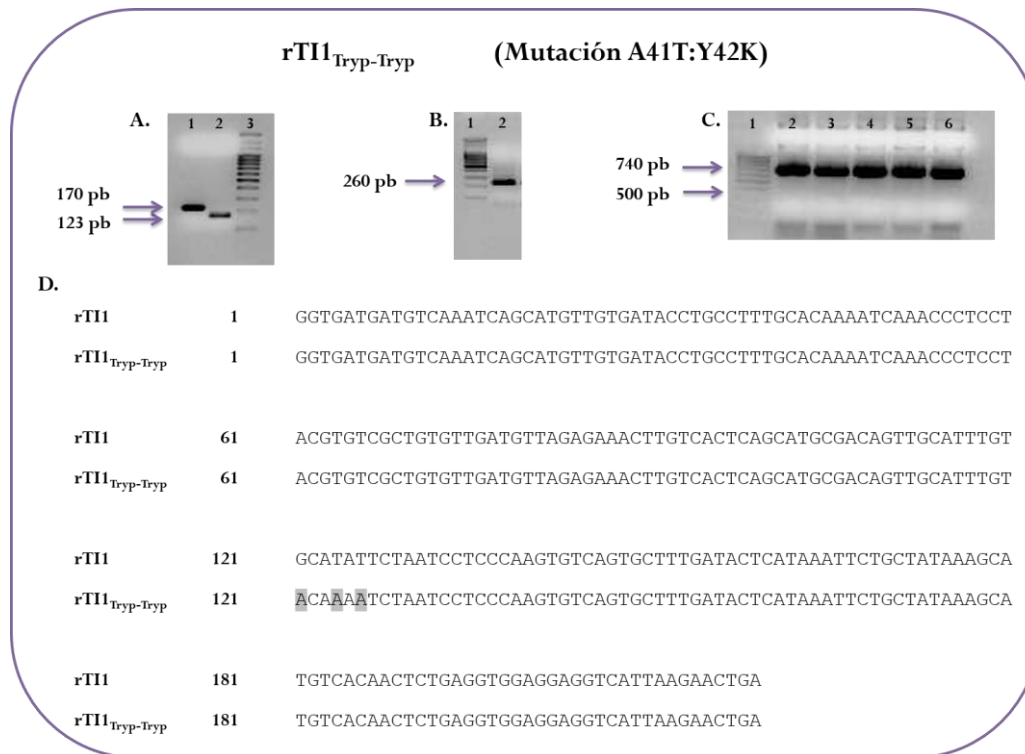


Figura 36. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en las posiciones P₂ y P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 1: Fragmento obtenido con el par de cebadores N_{peaTII}-R₂₁; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₂₁-C_{peaTII}. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N_{peaTII} y C_{peaTII}. El marcador está localizado en las calles 3 (A) y 1 (B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2-6 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}. Ningún transformante corresponde a clones que contengan el vector vacío de 500 pb. El marcador está localizado en la calle 1. **D)** Secuencia de nucleótidos del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}, con mutaciones en las posiciones P₂ y P₁ en el dominio de inhibición C-terminal. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

El gen *TII* con el dominio de inhibición C-terminal mutado en las posiciones P₂ y P₁ se utilizó como molde en una segunda ronda de PCR solapante (**apartado 3.8**) con la combinación de cebadores N_{peaTII}-R₂₂ y D₂₂-C_{peaTII} (**Tabla 8**), para la sustitución de lisina por treonina (K47T) en la posición P₅ del dominio de inhibición C-terminal (**Figura 37 A**). Los productos de PCR obtenidos en esta primera fase se utilizaron como molde en una segunda fase para obtener el gen completo con el dominio de inhibición C-terminal mutado (**Figura 37 B**), utilizando los

cebadores N_peaTII1 y C_peaTII1 (**Tabla 8**). Tal y como está descrito en el **apartado 4.1.1**, el gen con el dominio de inhibición C-terminal mutado se clonó en *E. coli*. Todos los clones mostraron un tamaño de 740 pb (correspondientes al gen y pPIC9) (**Figura 37 C**) y las mutaciones introducidas se verificaron mediante secuenciación (**apartado 3.15**), utilizando los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**), comprobando la sustitución de los nucleótidos AAG, que codifican para el aminoácido lisina en la posición P₅ del dominio de inhibición C-terminal, por los nucleótidos ACG, que codifican para treonina (**Figura 37 D**). De esta forma, se obtuvo la secuencia de rTII con el dominio de inhibición C-terminal mutado dando como resultado lo que denominamos rTII_{Tryp-Tryp}.

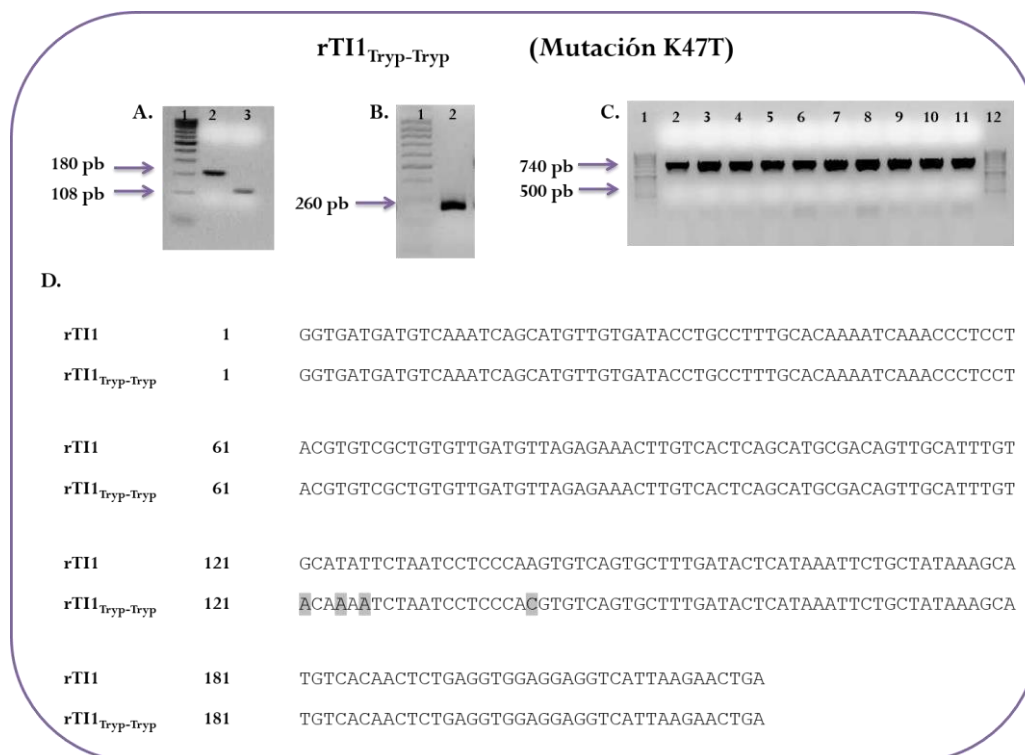


Figura 37. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición C-terminal en la posición P₅, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 1: Fragmento obtenido con el par de cebadores N_peaTII1-R₂₂; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₂₂-C_peaTII1. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N_peaTII1 y C_peaTII1. El marcador está localizado en la calle 1 (A y B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2-11 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}. Ningún transformante corresponde a clones que contengan el vector vacío de 500 pb. El marcador está localizado en las calles 1 y 12. **D)** Secuencia de nucleótidos del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp}, con mutaciones en las posiciones P₂, P₁ y P₅ en el dominio de inhibición C-terminal. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

4.1.2.3 Mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}

La obtención de una proteína con dos dominios de inhibición de quimotripsina (mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}) se llevó a cabo mediante sustituciones de los aminoácidos treonina, lisina y treonina en las posiciones P₂, P₁ y P₅ del dominio de inhibición N-terminal por los aminoácidos alanina, tirosina y lisina (T15A:K16Y:T21K), obteniéndose una proteína con dos dominios de inhibición de quimotripsina idénticos (CAYSNPPKC) (**Figura 38**). Las dos rondas de mutagénesis dirigida mediante PCR solapante (**apartado 3.8**), así como el análisis en sus distintas etapas y la verificación de las secuencias, con el fin de obtener el mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}, se llevó a cabo tal y como ha sido descrito en el apartado anterior para la obtención del mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp} (**apartado 4.1.2.2**), con modificaciones en el dominio de inhibición mutado y las parejas de cebadores utilizadas (**Tabla 8**).

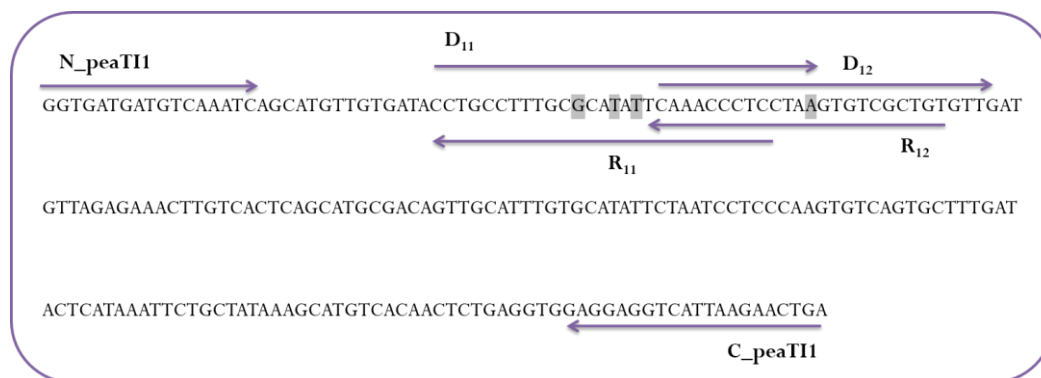


Figura 38. Esquema de la estrategia utilizada para la obtención del mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} obtenido mediante la sustitución de los residuos P₂, P₁ (responsable de la especificidad dentro de los dominios de inhibición) y P₅ en el dominio de inhibición N-terminal. Sustitución de los codones ACA, AAA y ACG, que codifican para los residuos Thr, Lys y Thr de las posiciones P₂, P₁ y P₅ dentro del dominio de inhibición N-terminal, respectivamente, por los codones GCA, TAT y AAG, que codifican a los aminoácidos Ala, Tyr y Lys. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

En la primera ronda de PCR solapante (Fase 1) se utilizó el ADNc de *TI1* como molde, con la combinación de cebadores N_peaTI1-R₁₁ y D₁₁-C_peaTI1 (**Tabla 8**), para sustituir los aminoácidos treonina y lisina por alanina y tirosina (T15A:K16Y) en las posiciones P₂ y P₁ del dominio de inhibición N-terminal (**Figura 39 A**). Estos productos de PCR se purificaron a partir de geles de agarosa (**apartado 3.10**) y se utilizaron como molde en una segunda fase, con los cebadores N_peaTI1 y C_peaTI1 (**Tabla 8**), para obtener el gen completo con el dominio de inhibición N-terminal mutado en las posiciones P₂ y P₁ (**Figura 39 B**), el cual se clonó en *E. coli*, tal y como está descrito previamente (**apartado 4.1.1**). Los clones positivos mostraron 740 pb

correspondientes al gen (240 pb) junto con el vector de expresión pPIC9 (500 pb), mientras que los clones que solo incorporaron el vector vacío mostraron el tamaño correspondiente a este último (500 pb) (**Figura 39 C**). Mediante secuenciación (**apartado 3.15**), con los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**), se verificó la sustitución de los nucleótidos ACA y AAA, que codifican para los aminoácidos treonina y lisina en las posiciones P₂ y P₁ del dominio de inhibición N-terminal, por los nucleótidos GCA y TAT, que codifican para alanina y tirosina (**Figura 39 D**).

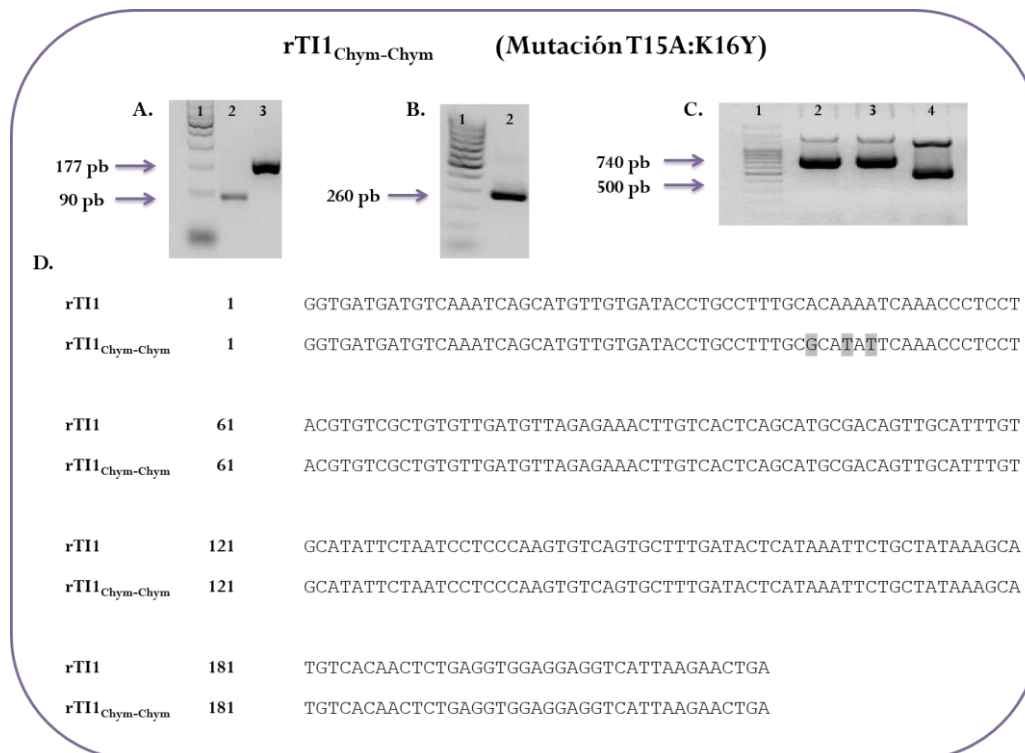


Figura 39. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en las posiciones P₂ y P₁, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{Chym-Chym}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 1: Fragmento obtenido con el par de cebadores N_peaTII-R₁₁; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₁₁-C_peaTII1. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N_peaTII y C_peaTII1. El marcador está localizado en la calle 1 (A y B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2 y 3 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen del mutante derivado rTII_{Chym-Chym}. La calle 4 es un clon de 500 pb que contiene el vector vacío. El marcador está localizado en la calle 1. **D)** Secuencia de nucleótidos del mutante derivado rTII_{Chym-Chym}, con mutaciones en las posiciones P₂ y P₁ en el dominio de inhibición N-terminal. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

La segunda ronda de PCR solapante se llevó a cabo utilizando la combinación de cebadores N_peaTII-R₁₂ y D₁₂-C_peaTII1 (**Tabla 8**), para sustituir el aminoácido treonina por lisina (T21K) en la posición P₅ del dominio de inhibición N-terminal (**Figura 40 A**). Los productos de PCR

obtenidos en esta primera fase, purificados a partir de geles de agarosa (**apartado 3.10**), se utilizaron como molde para obtener el gen completo con el dominio de inhibición N-terminal mutado (**Figura 40 B**), utilizando los cebadores N_peaTII y C_peaTII (**Tabla 8**). El gen se clonó en *E. coli* tal y como está descrito en el **apartado 4.1.1**. Los clones positivos (gen ligado en el vector de expresión pPIC9) y los clones que contenían el vector vacío, mostraron un tamaño de 740 pb y 500 pb, respectivamente (**Figura 40 C**). La secuencia de nucleótidos, analizada mediante secuenciación (**apartado 3.15**), mostró la sustitución de los nucleótidos ACG, que codifican para el aminoácido treonina en la posición P₅ del dominio de inhibición N-terminal, por los nucleótidos AAG, que codifican para lisina (**Figura 40 D**). De esta forma, se obtuvo la secuencia de *TII* con el dominio de inhibición N-terminal mutado dando como resultado lo que denominamos rTII_{Chym-Chym}.

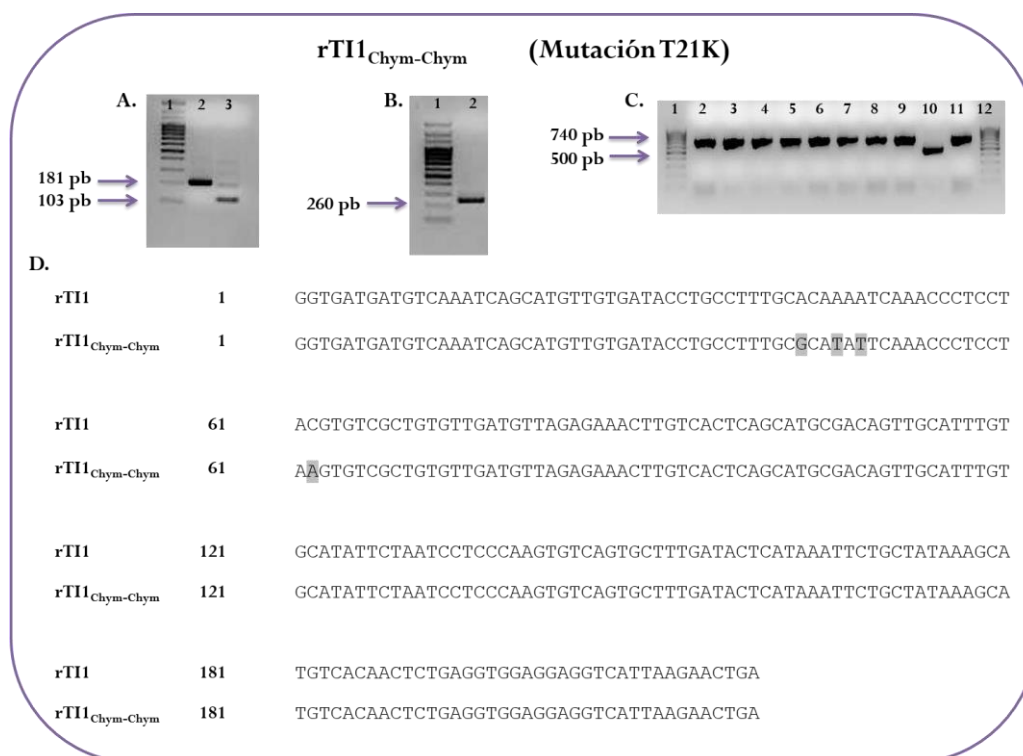


Figura 40. Geles de agarosa de los productos de PCR durante las distintas fases del proceso de mutagénesis dirigida de *TII* por PCR solapante para la mutación del dominio de inhibición N-terminal en la posición P₅, con el fin de obtener el mutante derivado rTII_{Chym-Chym}, y PCR de colonia de clones en *E. coli*. **A)** calle 1: Fragmento obtenido con el par de cebadores N_peaTII-R₁₂; calle 3: Fragmento obtenido con el par de cebadores D₁₂-C_peaTII. **B)** calle 2: Gen completo tras mutagénesis, obtenido mediante los cebadores N_peaTII y C_peaTII. El marcador está localizado en la calle 1 (A y B). **C)** Selección de transformantes mediante PCR de colonia con los cebadores 5'AOX y 3'AOX. Las calles 2-9 y 11 son productos de PCR de 740 pb y corresponden a clones positivos que contienen el gen del mutante derivado rTII_{Chym-Chym}. La calle 10 es un clon de 500 pb que contiene el vector vacío. El marcador está localizado en las calles 1 y 12. **D)** Secuencia de nucleótidos del mutante derivado rTII_{Chym-Chym}, con mutaciones en las posiciones P₂, P₁ y P₅ en el dominio de inhibición N-terminal. Los nucleótidos mutados se muestran sombreados.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios de inhibición N- y C-terminal, así como la secuencia completa correspondiente a la proteína rTII y sus mutantes derivados rTII_{inactivo}, rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym}, se encuentran reflejadas en la **Tablas 10 y 15**.

4.1.3 Transformación de *P. pastoris* con *TII* y sus mutantes derivados

La expresión heteróloga tanto de rTII (**apartado 4.1.1**) como de sus mutantes derivados (**apartado 4.1.2**) se llevó a cabo en la levadura *P. pastoris*. Tanto los vectores de expresión pPIC9 vacíos, como los que contenían *TII* o sus mutantes derivados se linealizaron utilizando la enzima de restricción *Sall* para su integración en el genoma de *P. pastoris*, según está descrito en el **apartado 3.16**. La linealización se llevó a cabo de manera efectiva, tal y como se muestra en la **Figura 41**. Los vectores linealizados que presentaban *TII* o sus mutantes derivados mostraron un tamaño esperado de 8.2 Kb, siendo 8 Kb correspondientes al vector de expresión pPIC9.

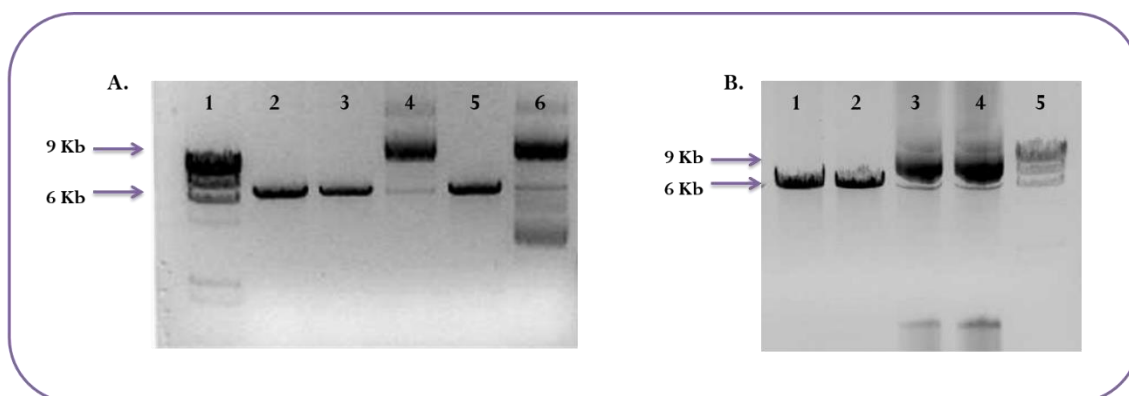


Figura 41. Linealización del vector de expresión pPIC9 mediante la acción de la enzima *Sall*. **A)** calles 2 y 3: Vector linealizado pPIC9_{TII} y pPIC9_{TII_{inactivo}}, respectivamente; calle 4: Vector pPIC9_{TII} no linealizado; calles 5 y 6: Vector pPIC9 vacío linealizado y sin linealizar, respectivamente. **B)** calles 1 y 2: Vector linealizado pPIC9_{TII_{Tryp-Tryp}} y pPIC9_{TII_{Chym-Chym}}, respectivamente; calles 3 y 4: Vector pPIC9_{TII_{Tryp-Tryp}} y pPIC9_{TII_{Chym-Chym}}, respectivamente, sin linealizar. El marcador está localizado en las calles 1 (A) y 5 (B). El vector de expresión pPIC9 vacío presenta un tamaño de 8 Kb y cuando contiene *TII* o sus mutantes derivados, 8.2 Kb.

Los productos lineales se utilizaron para transformar eficientemente células competentes GS115 de *P. pastoris*, sistema heterólogo con el que se consigue expresar proteínas recombinantes que presentan un elevado número de puentes disulfuro, tal y como se ha demostrado anteriormente en lenteja (154) y otros inhibidores de proteasas no relacionados (226). Los transformantes positivos que habían incorporado el vector de expresión pPIC9 se analizaron mediante placas de MD, sin histidina (**apartado 3.16**). El vector de expresión pPIC9 contiene el gen *HIS4* que

complementa a la cepa GS115 de *P. pastoris*, la cual tiene una mutación en el gen de la histidina deshidrogenasa (*his4*) que le impide sintetizar histidina (**Figura 17**). Por tanto, los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio deficiente en histidina. La electroporación de la cepa GS115 de *P. pastoris* (**apartado 3.16.2**) con los vectores de expresión linealizados dio lugar a un número elevado de colonias individuales que se analizaron mediante PCR de colonia (**apartado 3.14.1**), utilizando los cebadores 5'AOX y 3'AOX (**Tabla 8**). Tal y como se muestra en la **Figura 42**, todas las colonias evaluadas demostraron ser transformantes positivos de rTI1 y de sus mutantes derivados, mostrando productos de PCR de 740 pb. En el caso del vector de expresión vacío, utilizándolo como control del proceso de transformación y expresión, presentó un producto con tamaño de 500 pb.

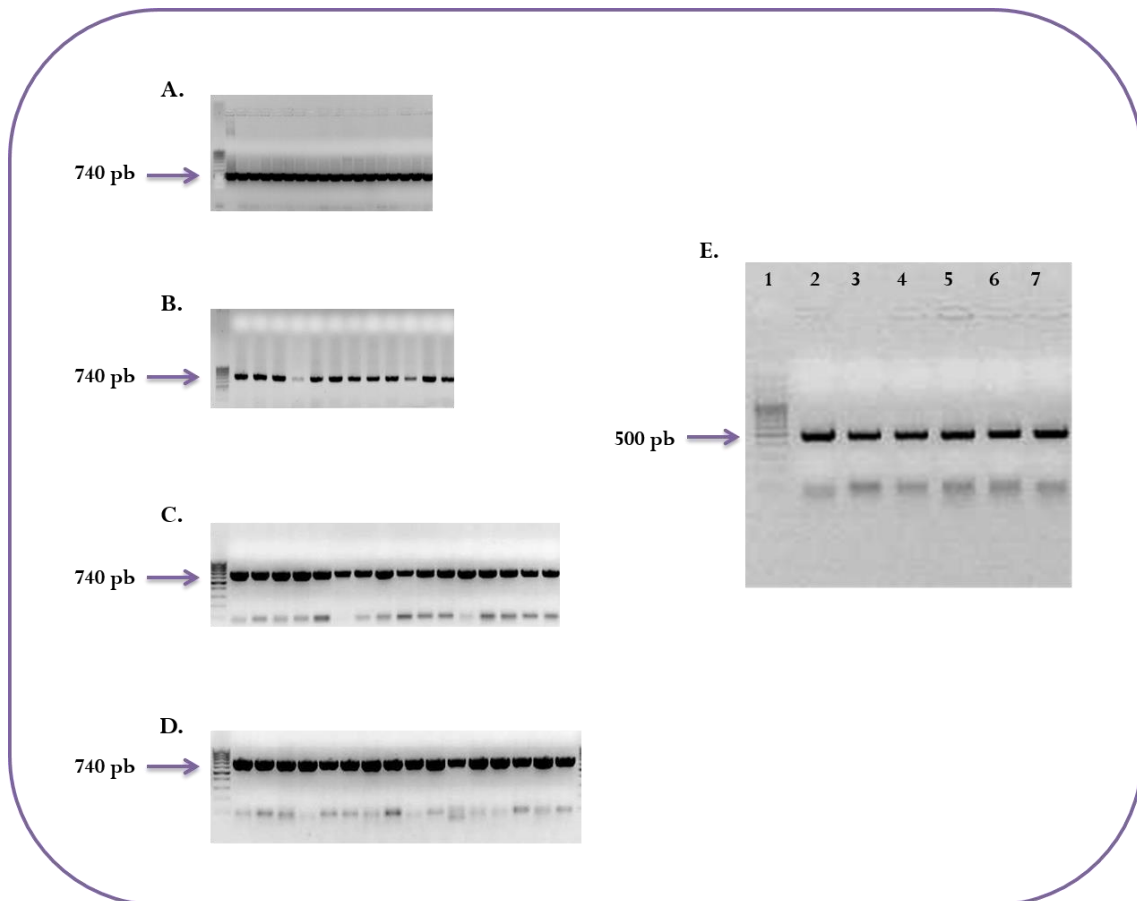


Figura 42. PCR de colonia utilizando los cebadores AOX con objeto de demostrar la transformación efectiva de la cepa GS115 de *Pichia pastoris*. Monitorización de transformantes de *P. pastoris* que contenían el vector de expresión pPIC9 integrado en su genoma junto con *TII* o sus mutantes derivados. **A)** pPIC9_TII1, **B)** pPIC9_TII_{inactivo}, **C)** pPIC9_TII_{Tryp-Tryp}, **D)** pPIC9_TII_{Chym-Chym} y **E)** pPIC9 vacío. El marcador está localizado en la calle 1 (A-E).

4.1.4 Producción de rTI1 y sus mutantes derivados en *P. pastoris*

La expresión de las proteínas rTI1 y sus mutantes derivados en la levadura metilotrófica *P. pastoris* se llevó a cabo mediante su inducción con metanol, siendo posteriormente secretadas al medio de cultivo gracias al factor- α de *S. cerevisiae*, incorporado en el vector de expresión pPIC9. Las colonias transformadas de *P. pastoris* que mostraron los mayores niveles de producción de la proteína rTI1, o sus mutantes derivados, se seleccionaron mediante producciones a pequeña escala (**apartado 3.17.1**). Se obtuvieron alícuotas cada 24 h del sobrenadante generado durante el proceso de incubación para analizar la presencia de las proteínas recombinantes mediante PAGE-SDS (**apartado 3.26**). Además, se evaluó su actividad inhibidora mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.2**), para rTI1 y su mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp}, y CIA (**apartado 3.24.2.1**), en el caso del mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}. Los transformantes que contenían el vector vacío se cultivaron durante un periodo de 96 h, no observándose capacidad alguna de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina (no mostrado).

La monitorización de los distintos transformantes positivos llevada a cabo mediante medidas de TIA y CIA, junto con los perfiles electroforéticos, se utilizaron para seleccionar los mejores transformantes y establecer los tiempos idóneos de inducción por metanol, con el objeto de llevar a cabo la producción a gran escala (**apartado 3.17.2**). Los sobrenadantes obtenidos de los mejores transformantes que expresaban la proteína rTI1 o sus mutantes derivados (rTI1-T₂, rTI1_{inactivo}-S₈, rTI1_{Tryp-Tryp}-TT₁ y rTI1_{Chym-Chym}-CC₁₀) se evaluaron mediante PAGE-SDS (**apartado 3.26**), observándose una banda electroforética de masa molecular adecuada en el rango de 9-10 kDa, ausente en el sobrenadante obtenido de transformantes que habían incorporado el vector de expresión pPIC9 vacío (no mostrado). Tras la producción a gran escala y purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.1**), se alcanzaron niveles de producción en el rango de 5-25 mg·L⁻¹ de medio de cultivo. Se han obtenido elevados niveles de producción de proteínas BBI de lenteja (154), así como de otros IP como el inhibidor MTI2 (40-160 mg·L⁻¹) (227), con la utilización del factor de secreción α , que dirige la proteína recombinante a la vía de secreción de *P. pastoris* al medio de cultivo.

4.1.5 Purificación de rTI1 y sus mutantes derivados mediante cromatografía de intercambio catiónico

Con objeto de caracterizar las proteínas rTI1 y sus mutantes derivados, expresadas en la levadura *P. pastoris*, se llevó a cabo la purificación de las mismas mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando una columna MonoS acoplada a un sistema AKTA FPLC (**apartado 3.19.1**). Todas las proteínas recombinantes se retuvieron en columna MonoS a pH 4.4, siendo eluidas en presencia de NaCl (**Figura 43**). El patrón de elución se monitorizó a 280 nm y mediante medidas de actividad inhibitora de tripsina (**apartado 3.24.1.1**) y quimotripsina (**apartado 3.24.2.1**), así como PAGE-SDS en el caso del mutante derivado rTI1_{inactivo}, dado que no presentaba TIA ni CIA (**apartado 3.26**). La monitorización mediante TIA y CIA demostró la presencia de dos picos cromatográficos en la elución de rTI1, en el rango de 0.07-0.10 M NaCl (Pico 1) y 0.13-0.16 M NaCl (Pico 2), los cuales presentaron capacidad de inhibir tanto la enzima tripsina como quimotripsina (**Figura 43 A**). El mutante derivado rTI1_{inactivo} eluyó en un único pico cromatográfico (**Figura 43 B**), en el rango de 0.04-0.09 M NaCl, tal y como se demostró mediante PAGE-SDS, no mostrando TIA ni CIA, en concordancia con la sustitución del aminoácido en posición P₁ de ambos dominios de inhibición por el aminoácido glicina. Del mismo modo, el mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp} eluyó en dos picos cromatográficos (**Figura 43 C**), en un rango de 0.08-0.10 M NaCl (Pico 1) y 0.12-0.17 M NaCl (Pico 2). Ambos picos presentaban TIA, pero no CIA. El mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} también eluyó en dos picos cromatográficos (**Figura 43 D**) en un rango de 0.04-0.06 M NaCl (Pico 1) y 0.09-0.15 M NaCl (Pico 2), los cuales presentaban CIA, exclusivamente.

Las proteínas TI1 y TI2, inhibidores BBI mayoritarios en semillas de guisante, habían sido anteriormente purificadas con éxito mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS a pH 4.4, tras su expresión de forma recombinante en *A. niger*, eluyendo en un único pico cromatográfico en un rango de 0.2-0.25 M NaCl (90,183). Sin embargo, mediante cromatografía de intercambio aniónico en columna MonoQ a pH 7.8 los inhibidores de proteasas de guisante no fueron capaces de retenerse en columna (183). Así mismo, las formas completa y procesada de proteínas recombinantes BBI de lenteja, expresadas en *P. pastoris*, han sido purificadas mediante cromatografía de intercambio catiónico a pH 2.4, sin diferencias apreciables en su perfil de elución (154).

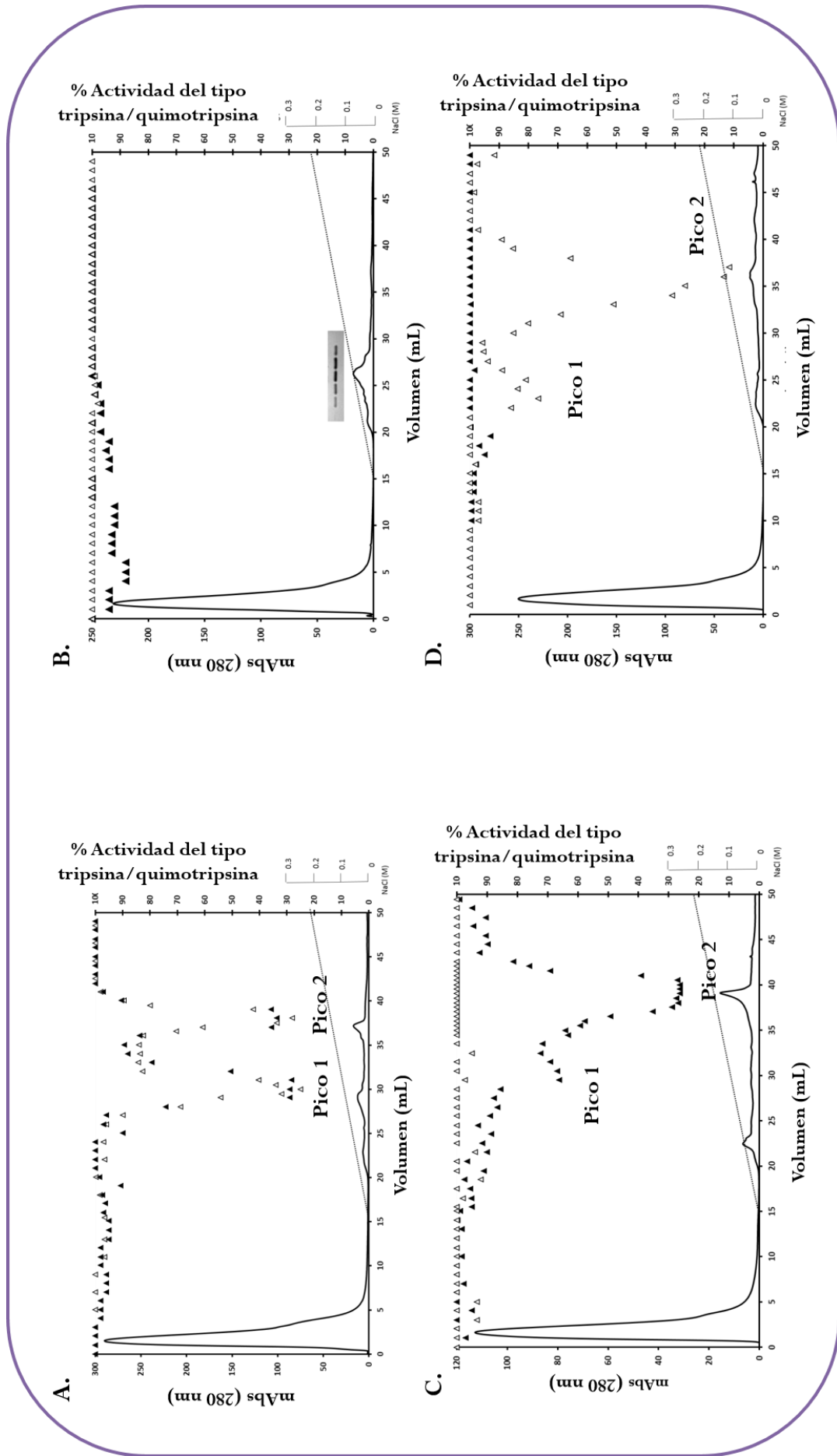


Figura 43. Perfil de elución de rTII (A), rTII_{inactivo} (B), rTII_{Tryp-Tryp} (C) y rTII_{Chym-Chym} (D) mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua y punteada, respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina (▲) y quimotripsina (Δ) se evaluó en cada fracción, utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTEE, respectivamente. En el caso del mutante derivado inactivo, la monitorización de la elución se realizó mediante PAGE-SDS debido a la ausencia de actividad inhibidora.

4.1.6 Autenticación de rTI1 y sus mutantes derivados mediante análisis de huella peptídica y masa molecular

Las proteínas BBI recombinantes purificadas mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 4.1.5**) se analizaron mediante PAGE-SDS (**apartado 3.26**). El pico cromatográfico 1 de la proteína rTI1 presentó una mayor movilidad electroforética con respecto al pico 2, el cual presentaba un tamaño esperado de 9-10 kDa (**Figura 44**). De manera similar, el pico 2 de los mutantes rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym}, presentaba una banda mayoritaria de 9-10 kDa y una banda minoritaria de mayor movilidad electroforética. El mutante rTI1_{inactivo} presentó una única banda electroforética del tamaño esperado (9-10 kDa).

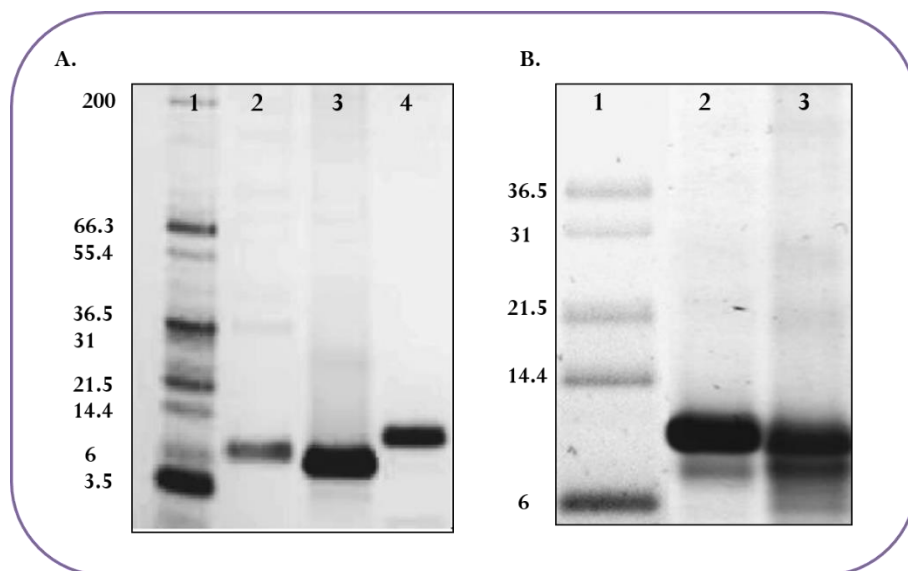


Figura 44. PAGE-SDS bajo condiciones desnaturilizantes de rTI1 y sus mutantes derivados. A) calle 2: rTI1_{inactivo}; calles 3 y 4: Picos 1 y 2 de rTI1, respectivamente. B) calles 2 y 3: Pico 2 de los mutantes derivados rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym}, respectivamente. Los marcadores de peso molecular están localizados en la calle 1 (A y B).

La autenticidad de las proteínas BBI recombinantes se confirmó mediante estudios de huella peptídica (**apartado 3.27**) y masa molecular (**apartado 3.28**), comparando los datos obtenidos con los adquiridos de la base de datos Swiss-Prot para la proteína TI1 de guisante (número de acceso: Q41065) (**Tabla 16**). Los valores experimentales m/z obtenidos para los picos 1 y 2 de la proteína rTI1 fueron 7694 y 8146 Da, respectivamente, presentando el pico 1 un procesamiento de cuatro aminoácidos en el extremo C-terminal (VIKN). Esta proteólisis está en concordancia con la mayor movilidad electroforética del pico 1 con respecto al pico 2 observada en PAGE-SDS (**Figura 44**). La caracterización posterior de rTI1 se llevó a cabo con la forma completa de la proteína (pico 2). El mutante derivado rTI1_{inactivo} contenía una mezcla de tres isoformas, incluyendo la forma

completa de 7968 Da e isoINHIBIDORES con un procesamiento en el extremo C-terminal de cuatro (VIKN) y cinco (EVIKN) aminoácidos, con masas moleculares de 7515 y 7386 Da, respectivamente. La presencia de estas tres isoformas no se reveló en PAGE-SDS (**Figura 44**), probablemente debido a diferencias en las proporciones de las mismas. La caracterización del mutante derivado inactivo se llevó a cabo con la mezcla de isoINHIBIDORES, sin una separación cromatográfica posterior, dada su falta de actividad inhibidora. En el caso de los mutantes rTI1_{Tryp} y rTI1_{Chym-Chym}, los análisis se llevaron a cabo con el pico 2 por ser el pico mayoritario tras la purificación cromatográfica. El pico 2 de los mutantes rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym} mostró valores experimentales de 8114 y 8178 Da, respectivamente, siendo identificadas como formas completas, sin procesamiento en el extremo C-terminal (**Figura 44**). Las masas moleculares de las proteínas recombinantes fueron consistentes con una correcta formación de los siete puentes disulfuro intramoleculares.

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas BBI recombinantes se dedujeron mediante análisis de huella peptídica (**Tabla 16**). Las bandas electroforéticas obtenidas mediante PAGE-SDS, previa alquilación, se sometieron a digestión *in gel* frente a la enzima tripsina, seguida de la separación de los péptidos generados y posterior análisis de sus masas peptídicas. La identificación de secuencias asociadas a las masas peptídicas se realizó frente a la base de datos Swiss-Prot (entrada: IBBA_PEA), que permitió la identificación de la proteína rTI1; la identificación de péptidos asociados a las masas peptídicas de sus mutantes derivados se llevó a cabo *in silico*. Los porcentajes de identificación de la secuencia de aminoácidos para las proteínas rTI1 y sus mutantes derivados rTI1_{inactivo}, rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym} fueron 86%, 82%, 35% y 76%, respectivamente. Las secuencias identificadas de los mutantes derivados incluían las sustituciones de los aminoácidos en la posición P₁, responsables de la especificidad, llevadas a cabo mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante (**apartado 3.8**), en los dominios de inhibición N- y C-terminal. Los datos obtenidos de masa molecular y huella peptídica muestran que las proteínas recombinantes presentaban una extensión EA de 200 Da en el extremo N-terminal, tal y como ha sido descrito previamente en la expresión de proteínas BBI de lenteja en *P. pastoris* (154). Aunque la endoproteasa KEX2 de *P. pastoris* elimina teóricamente de forma efectiva el péptido señal, la extensión EAEA incluida en la construcción para aumentar la eficiencia de KEX2 no se eliminó de manera eficiente (**apartado 3.2**), probablemente debido a la actividad ineficiente de la enzima STE13 dipeptidil aminopeptidasa endógena de *P. pastoris*. No se observaron formas recombinantes que presentaran la extensión completa EAEA ni formas en las que se produjera la eliminación completa de dicha extensión.

Tabla 16. Determinación de masa molecular y secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las proteínas recombinantes rTII y sus mutantes derivados, expresadas en *Pichia pastoris*. El número de acceso de TII (Q41065) pertenece a la base de datos Swiss-Prot. Las secuencias se aminoácidos de los dominios de inhibición han sido subrayadas. P-P- son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores (en negrita). K e Y en la posición P₁ determina especificidad frente a las enzimas tripsina y quimotripsina, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes se dedujeron a partir de los análisis de huella peptídica efectuados; las secuencias de péptidos identificadas se encuentran en cursiva. Las masas moleculares de las proteínas recombinantes, determinadas mediante MALDI-TOF, son comparadas con los valores esperados de las mismas. La secuencia EA se introdujo en las proteínas recombinantes justo antes de la región N-terminal para aumentar la efectividad de la actividad endoproteasa kexin, necesaria para la secreción de las proteínas al medio extracelular.

		Masa molecular	
		Esperada	Observada
IBBA_PEA (Q41065)			
	GDDVKSACCDTFCI CTKSN NPPTGRCVDVRETFCHSACDSCICA Y SNP PK QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	7946	
rTII			
Pico 1	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTKSN</i> <i>PPTGRCVDV</i> <i>RETFCHSACDSC</i> <i>ICAYSNP</i> PK <i>QCFDTHKFCY</i> KACHNSEVEE	7694	
Pico 2	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTKS</i> <i>NPPTGRCVDVRETFCHSACDSC</i> <i>ICAYSNP</i> PK <i>QCFDTHKFCY</i> KACHNSEVEE VIKN	8146	
rTII_{Inactivo}			
	GDDVKSACCDTFCI CTG SNNPPTGRCVDVRETFCHSACDSCICA GS NP PK QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	7768	
	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTG</i> SNNPPTGRCVDVRETC <i>HSACDSC</i> <i>ICAGSNP</i> PK <i>QCFDTHKFCY</i> KACHNSEVEE VIKN	7968	
	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTG</i> SNNPPTGRCVDVRETC <i>HSACDSC</i> <i>ICAGSNP</i> PK <i>QCFDTHKFCY</i> KACHNSEVEE	7515	
	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTG</i> SNNPPTGRCVDVRETC <i>HSACDSC</i> <i>ICAGSNP</i> PK <i>QCFDTHKFCY</i> KACHNSEVEE	7386	
rTII_{Tryp-Tryp}			
	GDDVKSACCDTFCI CTK SNNPPTGRCVDVRETFCHSACDSCICA Y SNP PK QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	7914	
Pico 2	EAGDDVKSAC <i>CDTGLCTKS</i> NPPTGRCVDVRETFCHSA <i>CDSCI</i> <i>CTKS</i> NPPTGQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	8114	
rTII_{Chym-Chym}			
Pico 2	GDDVKSACCDTFCI CA Y SNP PKGRQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	7978	
	EAGDDVKSACCDT <i>CLCA</i> Y SNP PK GRQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN	8178	

Con el sistema de expresión eucariota *P. pastoris* hemos conseguido producir formas completas de las proteínas rTII y sus mutantes derivados, así como formas procesadas en el extremo C-terminal de la proteína de rTII y su derivado inactivo. La expresión heteróloga de rTII en *A. niger* también dio lugar a formas procesadas, con la pérdida de tres (GDD) o seis (GDDVKS) aminoácidos en el extremo N-terminal, y de ocho (EVVEVIKN) o nueve (SEVEEVIKN) aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína (183). Esta proteólisis puede ser debida a la acción de proteasas endógenas de *P. pastoris* y, aunque podría no afectar a la capacidad de inhibir las enzimas tripsina y/o quimotripsina, el extremo C-terminal está involucrado en el estado de oligomerización de las proteínas BBI. En concreto, los aminoácidos Lys²⁴ y Asp⁷⁵ de la isoforma BBI mayoritaria de *Dolichos biflorus*, HGI-III, parecen ser necesarios para que se produzca el enlace entre dos monómeros (121). Por tanto, con el sistema de expresión *P. pastoris*, se consiguen isoformas completas sin procesamiento en el extremo C-terminal, en las que su capacidad de formar dímeros no debería verse afectada. Sin embargo, la mutación introducida en la posición P₁ del mutante rTII_{Chym-Chym} (K16Y), podría afectar al perfil de oligomerización de la proteína.

4.1.7 Caracterización funcional de rTII y sus mutantes derivados

Tras la identificación molecular de las proteínas rTII y sus mutantes derivados, se evaluó la capacidad que presentaban de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina utilizando para ello los sustratos específicos BAPNA (**apartado 3.24.1.2**) y BTEE (**apartado 3.24.2.1**), respectivamente (**Tabla 17**). La actividad específica TIA y CIA de rTII (pico 2) fue de 2476 ± 238 y 2956 ± 196 unidades de inhibición (IU) por miligramo de proteína, respectivamente, mientras que el mutante derivado inactivo fue incapaz de inhibir ninguna de las enzimas tripsina y quimotripsina. La actividad específica frente a la enzima tripsina del pico 2 del mutante derivado rTII_{Tryp-Tryp} fue de 5489 ± 66 TIU·mg⁻¹ de proteína y no se detectó CIA. Por el contrario, TIA no se detectó en el pico 2 del mutante derivado rTII_{Chym-Chym} y su actividad específica frente a la enzima quimotripsina fue de 3700 ± 56 CIU·mg⁻¹ de proteína. Los valores de K_i de las proteínas rTII y sus mutantes derivados frente a las enzimas tripsina y quimotripsina se calcularon siguiendo la fórmula de Copeland *et al.*, (1995) (225), en base a los valores de IC₅₀ (concentración del inhibidor requerida para alcanzar una inhibición del 50%), descrita en el **apartado 3.24.3**. Tal y como se refleja en la **Tabla 17**, la proteína rTII demostró ser un potente inhibidor de tripsina ($K_i = 21 \pm 2$ nM) y quimotripsina ($K_i = 8 \pm 1$ nM). De igual modo, los mutantes derivados rTII_{Tryp-Tryp} y rTII_{Chym-Chym} demostraron ser

potentes inhibidores frente a las enzimas tripsina ($K_i = 42 \pm 1$ nM) y quimotripsina ($K_i = 25 \pm 0.6$ nM), respectivamente.

Los valores obtenidos se asemejan a la proteína rTI1 expresada de forma recombinante en *A. niger*, que presentaba valores de K_i de 19 y 13 nM para las enzimas tripsina y quimotripsina, respectivamente (183). En semillas de guisante de invierno, han sido purificadas hasta seis isoformas BBI que presentan una actividad inhibidora de tripsina en el rango de 2980-3350 UI·mg⁻¹ de proteína (78). Respecto al inhibidor rTI1, con un dominio de inhibición frente a la enzima tripsina y otro frente a quimotripsina, el mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp} presenta más del doble de actividad inhibidora específica frente a la enzima tripsina, estando en concordancia con la presencia de dos dominios idénticos de inhibición de la misma; sin embargo, el aumento en la actividad inhibidora de quimotripsina del mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} no es tan significativa. Dado que presenta mayor valor de K_i con respecto al inhibidor rTI1, es posible que las mutaciones llevadas a cabo en el mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} en las posiciones P₂, P₁ y P₅ del dominio de inhibición N-terminal, con el fin de obtener un mutante con dos dominios de inhibición idénticos frente a la enzima quimotripsina, pudieran provocar cambios en la conformación de la proteína, la cual podría no ser favorable para su unión a la enzima. Ensayos futuros de modelización podrían aportar una mayor información acerca de la unión de los distintos inhibidores con sus correspondientes enzimas diana.

Tabla 17. Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibidora específica frente a las enzimas tripsina y quimotripsina de rTI1 y sus mutantes derivados. Las actividades específicas y los valores de K_i representan la media \pm desviación estándar de, al menos, cinco determinaciones independientes. P₁-P₁, el sitio activo de enlace, está marcado en negrita. K en la posición P₁ determina especificidad por tripsina, mientras que Y determina especificidad frente quimotripsina. En los mutantes derivados, la sustitución de los distintos aminoácidos en las posiciones P₂, P₁ y/o P₅, se muestran sombreados.

	Secuencia de los dominios de inhibición		K_i (nM)		Actividad inhibidora específica (IU·mg ⁻¹ proteína)	
	Dominio de inhibición N-terminal	Dominio de inhibición C-terminal	T	C	T	C
	rTI1	CTKSNPPTC	CAYSNPPKC	21 \pm 2	8 \pm 1	2476 \pm 238
rTI1 _{inactivo}	CTG S NPPTC	CAG S NPPKC	ND	ND	ND	ND
rTI1 _{Tryp-Tryp}	CTKSNPPTC	CTKSN P PTC	42 \pm 1	ND	5489 \pm 66	ND
rTI1 _{Chym-Chym}	CAY S N P PKC	CAYSNPPKC	ND	25 \pm 0.6	ND	3700 \pm 56

ND: no detectado.

Los datos obtenidos mediante zimogramas desarrollados bajo condiciones no desnaturalizantes (**apartado 3.25**), estuvieron en concordancia con los datos cromatográficos (**Figura 43**), electroforéticos (**Figura 44**) y cinéticos (**Tabla 17**). Tal como queda reflejado en la **Figura 45**, una banda electroforética principal con actividades inhibitoras frente a las enzimas tripsina y quimotripsina se detectó en zimogramas desarrollados para la proteína rTI1 (pico 2). Los zimogramas desarrollados para el pico 2 del mutante derivado rTI1_{Tryp-Tryp} mostraron una banda mayoritaria en geles tratados con tripsina mientras que aquellos zimogramas tratados con quimotripsina no mostraron banda electroforética alguna. Por el contrario, en zimogramas desarrollados para el pico 2 del mutante derivado rTI1_{Chym-Chym} se detectaron tres bandas electroforéticas en geles tratados con quimotripsina, pero ninguna banda electroforética en geles tratados con la enzima tripsina. El mutante derivado inactivo no inhibió *in gel* las actividades de las enzimas tripsina y quimotripsina. La movilidad aparente de las proteínas recombinantes en los zimogramas (-3) se vio incrementada por la extensión EA en el extremo N-terminal, de 200 Da, cuando se comparó con el producto génico primario TI1 observado en semillas de guisante de la variedad Birte, el cual mostró menor movilidad aparente (-2).

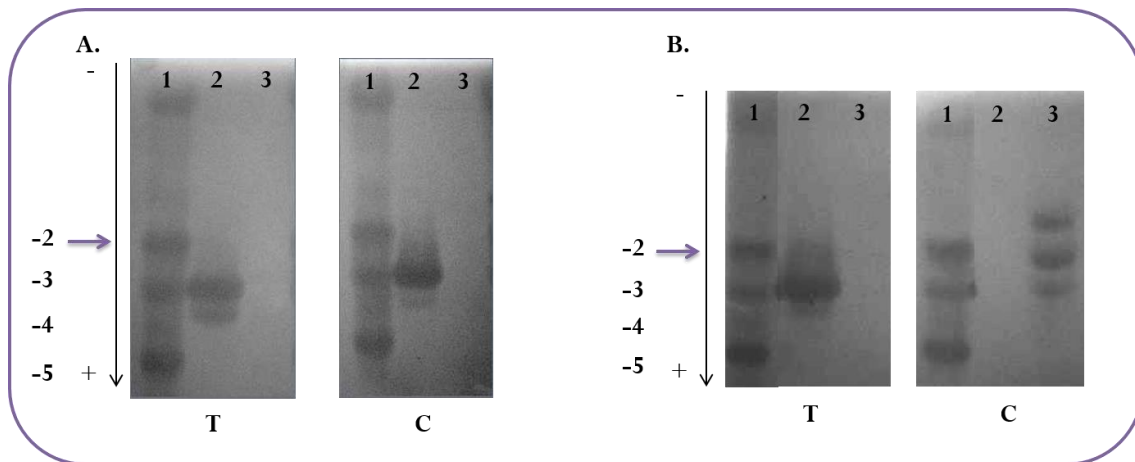


Figura 45. Análisis de actividad inhibitora *in gel* de rTI1 y sus mutantes derivados. Los geles casein Blue se trataron con las enzimas digestivas tripsina (T) y quimotripsina (C); las áreas oscuras indican inhibición de la enzima. **A)** calle 2: rTI1; calle 3: rTI1_{inactivo}. **B)** calle 2: rTI1_{Tryp-Tryp}; calle 3: rTI1_{Chym-Chym}. La calle 1 (A y B) contiene 1.5 mg de fracción de albúminas de guisante variedad Birte, mientras que las calles 2 y 3 (A y B) contienen 24 µg de proteína. La dirección de la electroforesis de los geles se indica mediante una línea vertical. Las variantes -2 y -5 entre las isoformas presentes en la fracción de albúminas de la variedad Birte representan los productos génicos primarios TI1 y TI2, respectivamente.

4.1.8 Internalización de rTI1 y sus mutantes derivados en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano

En colaboración con el laboratorio de los Dres. Antonio Jesús Castro y Juan de Dios Alché (Estación Experimental del Zaidín, Granada, España), las proteínas BBI recombinantes se marcaron mediante los fluorocromos CyDye 2 (rTI1 y rTI1_{Tryp-Tryp}) y CyDye 3 (rTI1_{inactivo} y rTI1_{Chym-Chym}) para monitorizar su internalización en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano (**apartado 3.29.2**). Las células HT29, creciendo de forma individualizada o en pequeños grupos de 2-10 unidades tras una incubación previa de 24 h, se incubaron con 50 µg de proteína recombinante marcada y se tomaron imágenes a intervalos regulares de tiempo (1, 15, 25 y 40 min) (**Figura 46**).

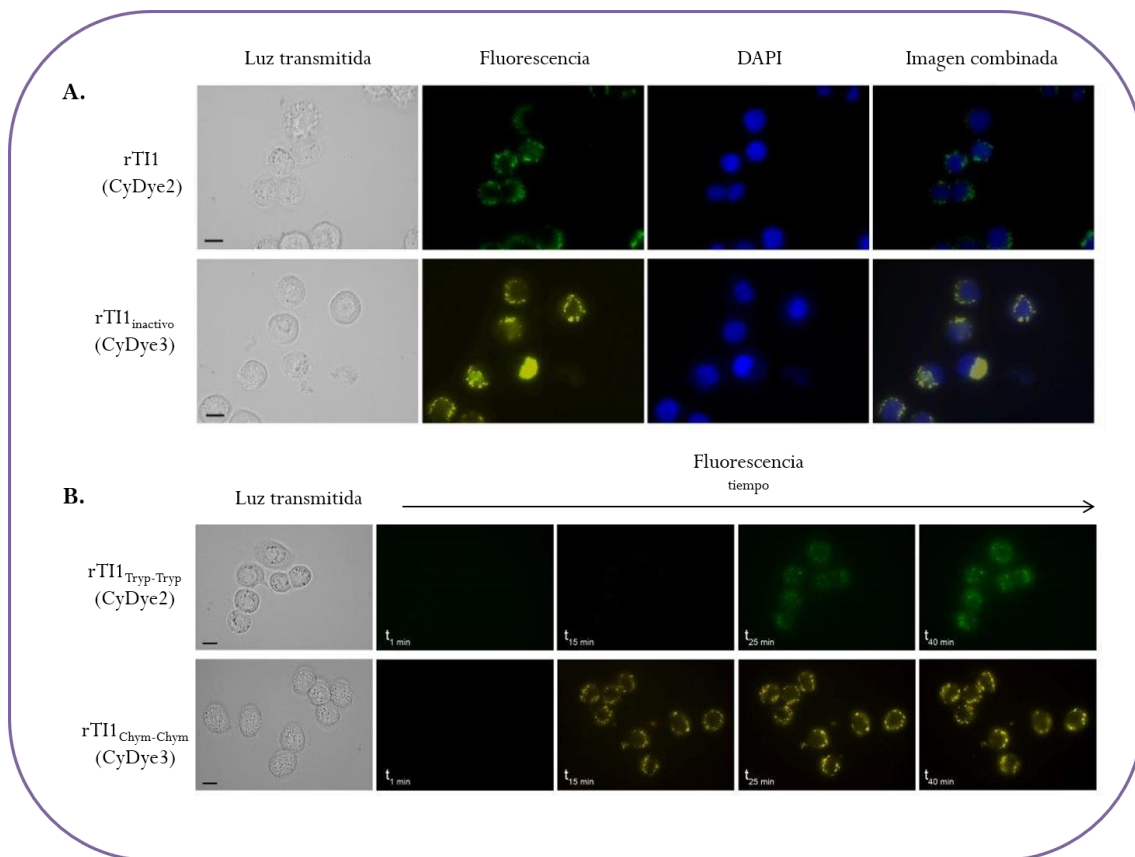


Figura 46. Internalización de las proteínas Bowman-Birk recombinantes en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano. A) Internalización de las proteínas rTI1 y rTI1_{inactivo}, marcadas con fluorescencia (CyDye 2 y CyDy3, respectivamente). El núcleo fue marcado con el marcador fluorescente DAPI, que se une a secuencias de ADN. B) Internalización de los mutantes derivados de rTI1, rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym}, marcados con fluorescencia (CyDye 2 y CyDy3, respectivamente) en distintos intervalos de tiempo (1, 15, 25 y 40 min).

Tanto la proteína rTI1 como sus mutantes derivados internalizaron en las células HT29, atravesando rápidamente la membrana celular y acumulándose en su interior de manera gradual, formando pequeños puntos fluorescentes que se distribuyeron de manera aleatoria en el citoplasma e incrementaron en intensidad de la señal a medida que transcurría el tiempo de incubación (**Figura 46**). Anteriormente en nuestro laboratorio, mediante microscopia confocal, demostramos la internalización en células HT29 del inhibidor BBI mayoritario de soja, IBB1, el cual presenta inhibición frente a las enzimas tripsina y quimotripsina (170). Dado que el mutante derivado rTI1 inactivo mostró un perfil de internalización similar a IBB1 y las proteínas recombinantes que presentaban actividad inhibidora de tripsina y/o quimotripsina, la internalización de las proteínas BBI en células cancerígenas de colon parece ser independiente de su capacidad de inhibir serín proteasas. Estudios en los que se prolonguen los tiempos de incubación a los ya analizados en esta tesis doctoral podrían dilucidar si las proteínas BBI permanecen en el citoplasma para ejercer su actividad inhibidora o si éstas atraviesan la membrana nuclear, en cuyo caso se podría determinar si la actividad inhibidora de proteasas juega en ese proceso un papel relevante.

En las proteínas BBI, el aminoácido lisina presente en la posición P₁ del dominio de inhibición de tripsina de un monómero es capaz de interactuar con el aminoácido aspartato del extremo C-terminal de un segundo monómero para formar una estructura dimérica estable (110,121). Por tanto, de acuerdo a la secuencia del mutante rTI1_{Tryp-Tryp}, las mutaciones introducidas no deberían afectar a la conformación nativa de la proteína, pudiéndose encontrar en forma dimérica en solución. Sin embargo, las mutaciones introducidas en el mutante derivado rTI1_{Chym-Chym}, entre las que se incluye la sustitución del aminoácido lisina por tirosina en la posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal, podrían afectar al estado de oligomerización de la proteína. De este modo, la posible conformación del mutante rTI1_{Chym-Chym} en forma monomérica, debido a la mutación llevada a cabo en la posición P₁ del dominio de inhibición N-terminal, podría ser responsable de la mayor velocidad de internalización observada al interior de la célula (**Figura 46**).

El paso a través de la membrana celular también transcurre de forma rápida en células epiteliales del intestino y células fibroblásticas NIH/3T3 procedentes de embriones de ratones, tras tratamiento con proteínas BBI de soja marcadas con fluorescencia (TRITC). Estas proteínas parecen permanecer principalmente en el citosol, en forma activa, hasta 12 h después de un tratamiento de 2 h con BBI (228), y núcleo, incluso tras un proceso de digestión gastrointestinal simulada (138). De manera similar, estudios de microscopía confocal demuestran que proteínas BBI procedentes de

judías pintas atraviesan la membrana de células cancerígenas de mama (MCF-7) y co-localizan con el proteosoma en el citoplasma y núcleo, inhibiendo la actividad del tipo tripsina, quimotripsina y caspasa del mismo (25). El mecanismo por el cual las proteínas BBI son capaces de internalizar en células cancerígenas de colon aún se desconoce. Existen estudios en células Hep G2 procedentes de hepatoma humano en los que proteínas BBI de *Fagopyrum esculentum*, marcadas mediante isocianato de fluoresceína (FITC-BTI), co-localizan con la proteína transportadora específica del hierro en plasma, transferrina, lo cual implica que las proteínas BTI internalizan en las células Hep G2 mediante endocitosis mediada por clatrina (229).

4.1.9 Actividad anti-proliferativa de rTII y sus mutantes derivados en líneas celulares humanas de colon

4.1.9.1 Propiedades anti-proliferativas de rTII y sus mutantes derivados en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano

Las proteínas Bowman-Birk, presentes a elevadas concentraciones en semillas de leguminosas, son consideradas como potenciales agentes quimiopreventivos dentro del TGI (151). Han demostrado ser capaces de prevenir o suprimir la transformación *in vitro* inducida por radiación y carcinógenos químicos, así como la carcinogénesis *in vivo* desarrollada en distintos sistemas modelo (15,32,83,84,230). Los efectos anti-proliferativos de las proteínas rTII y sus mutantes derivados, expresadas en la levadura *P. pastoris*, se analizaron en células HT29 (**apartado 3.6**), utilizando células cultivadas en ausencia de proteínas BBI como control, tal y como está descrito en el **apartado 3.29.1**. Tras tratamiento de 96 h, los efectos anti-proliferativos se monitorizaron a través de la tinción vital con RN (90). Todas las proteínas, a excepción del mutante derivado inactivo, ejercieron un efecto dosis-dependiente en el rango de concentraciones testado, observándose efecto significativo ($P < 0.05$) a concentraciones tan bajas como 15 μM (**Figura 47**).

Varios estudios han demostrado la capacidad de proteínas BBI de soja (77), lenteja (154) y guisante (90) de disminuir de manera dosis-dependiente el crecimiento celular de células cancerígenas de colon (HT29, LoVo, Caco2); sin embargo, proteínas BBI de soja tratadas con agentes reductores y alquilantes, con los cuales se reduce de manera sustancial su capacidad de inhibir serín proteasas, son incapaces de inhibir la proliferación celular de células cancerígenas de colon (77). Estos tratamientos dan lugar a modificaciones químicas en las cuales se alquilan los

grupos sulfidrilo y, dada la importancia de los puentes disulfuro en la estructura y actividad inhibidora de las proteínas BBI (231), la pérdida de su conformación nativa va acompañada con la pérdida de su actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina. Por tanto, la relación entre actividad inhibidora de proteasas, estructura proteica y efectos anti-cancerígenos no queda claramente establecida. En células HT29 tratadas con el mutante rTII_{inactivo}, el cual se encuentra en conformación nativa, no se observó efecto anti-proliferativo alguno incluso a las concentraciones más elevadas (61 μ M) estableciéndose, por tanto, una relación directa entre los efectos anti-proliferativos que ejercen las proteínas BBI sobre células cancerígenas de colon y su capacidad intrínseca de inhibir serín proteasas.

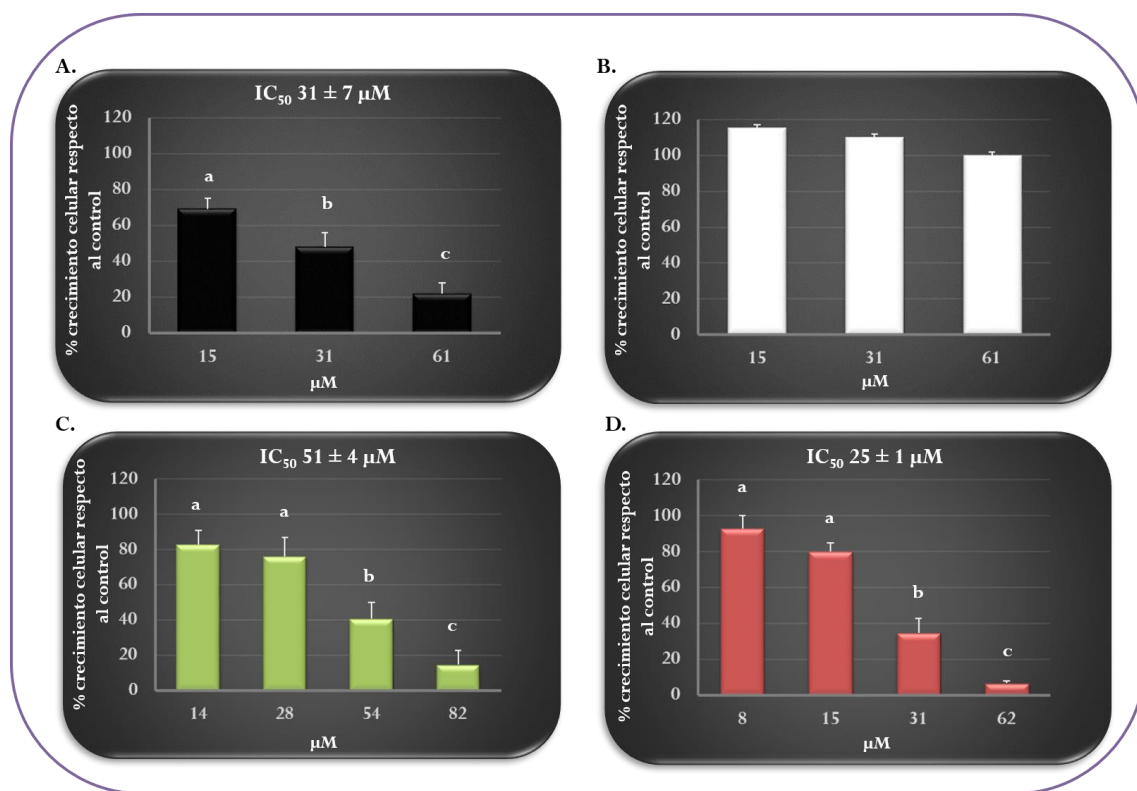


Figura 47. Efecto de las proteínas rTII (A) y sus mutantes derivados rTII_{inactivo} (B), rTII_{Tryp-Tryp} (C) y rTII_{Chym-Chym} (D) sobre el crecimiento *in vivo* de células cancerígenas HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano. El medio de crecimiento se suplementó con concentraciones de proteínas recombinantes en el rango testado, siendo las células tratadas durante un periodo de 96 h. Los datos son la media de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno con cuatro replicados técnicos. Los valores medios con letras difieren significativamente ($P < 0.05$; test de Bonferroni). Los valores de IC₅₀ de cada proteína recombinante están indicados en cada histograma.

La proteína recombinante que mostró el menor valor de IC₅₀ (concentración del inhibidor requerida para alcanzar una inhibición de la proliferación celular del 50%) fue el mutante rTII_{Chym-}

chym ($25 \pm 1 \mu\text{M}$), seguido de rTI1 ($31 \pm 7 \mu\text{M}$) y rTI1_{Tryp-Tryp} ($51 \pm 4 \mu\text{M}$). En 1985, Yavelow y col., (1985) (85) demostraron que proteínas BBI modificadas químicamente, que presentaban la capacidad de inhibir la enzima quimotripsina exclusivamente, eran efectivas frente a la transformación *in vitro* inducida por radiación, mientras que las proteínas BBI modificadas que únicamente mostraban actividad inhibidora de tripsina resultaban ser inefectivas. Esto condujo a la hipótesis de que las dianas potenciales de las proteínas BBI en procesos cancerígenos eran proteasas del tipo quimotripsina. Sin embargo, más recientemente nuestro grupo de investigación ha demostrado que un inhibidor de soja mayoritario, IBBD2, que presenta capacidad de inhibir la enzima tripsina, es capaz de ejercer efectos anti-proliferativos frente a células cancerígenas de colon (77). Hasta la fecha, se desconoce tanto el mecanismo de acción como las posibles dianas terapéuticas de las proteínas BBI (6,15), pero estos datos, junto con los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, parecen indicar que tanto enzimas del tipo tripsina como quimotripsina deberían ser tenidas en cuenta como posibles dianas terapéuticas en fases iniciales de procesos cancerígenos colorrectales.

En la naturaleza, encontramos inhibidores BBI que presentan, en su mayoría, un dominio de inhibición de tripsina (**Tabla 4**) y otro de quimotripsina (**Tabla 5**), aunque también se pueden encontrar isoformas con ambos dominios de inhibición frente a la enzima tripsina, como ocurre en distintas especies de leguminosas como soja, soja silvestre, lenteja, *Medicago scutella* y *Medicago sativa*, entre otras. Sin embargo, hasta la fecha, no han sido descubiertos inhibidores BBI que presenten ambos dominios de inhibición frente a quimotripsina. En este sentido, el mutante derivado de rTI1 con dos dominios de inhibición de quimotripsina idénticos (rTI1_{Chym-Chym}), ha demostrado ser un potente inhibidor de la proliferación celular de células HT29 ($\text{IC}_{50} = 25 \pm 1 \mu\text{M}$).

4.1.9.2 Propiedades anti-proliferativas de rTI1 y su mutante derivado rTI1_{inactivo} en células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co

Los efectos anti-proliferativos de la proteína rTI1, y su mutante derivado rTI1_{inactivo}, en el crecimiento de células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co (**apartado 3.6**) se determinó utilizando como control células cultivadas en ausencia de BBI y mediante un ensayo monitorizado a través de la tinción vital con RN (**apartado 3.29.1**). El crecimiento de la línea celular CCD18-Co no se vio afectado por la proteína rTI1 ni por su mutante derivado inactivo en el rango de concentraciones testado (0-61 μM), incluso a las concentraciones más elevadas (**Figura**

48). Los resultados obtenidos confirman estudios previos llevados a cabo por nuestro laboratorio donde se demostró que tanto proteínas BBI de soja con actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina, como proteínas BBI de soja inactivadas químicamente, sin capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina y con su estructura nativa alterada, eran incapaces de inhibir la proliferación de células CCD18-Co (77).

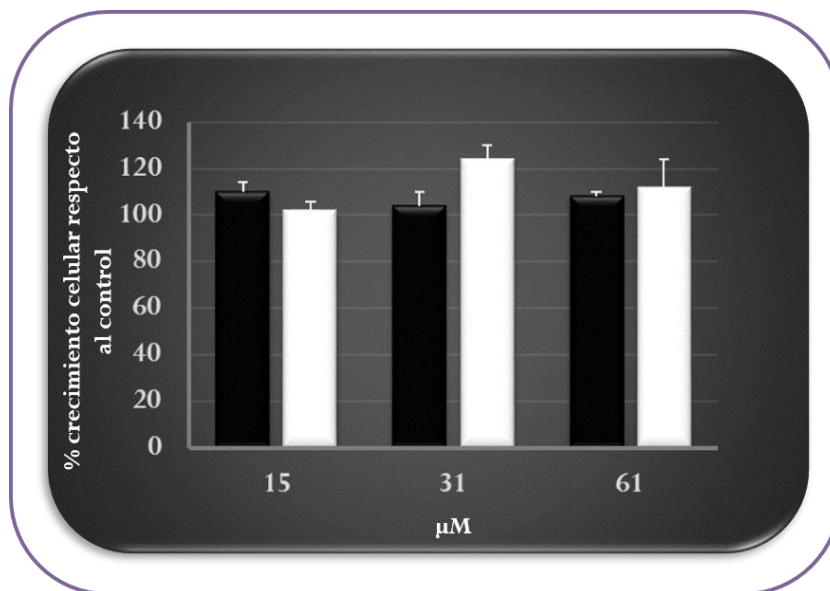


Figura 48. Efecto de las proteínas rTI1 (barras negras) y su mutante derivado rTI1_{inactivo} (barras blancas) sobre el crecimiento *in vivo* de células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co. El medio de crecimiento se suplementó con concentraciones de proteínas recombinantes en el rango de 15-61 μM, siendo las células tratadas durante un periodo de 96 h. Los datos son la media de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno con cuatro replicados técnicos. Los valores medios no difieren estadísticamente ($P < 0.05$; test de Bonferroni).

Estudios llevados a cabo con proteínas BBI (BTCl) procedentes de semillas de *Vigna unguiculata* demuestran que, aunque estas presentan capacidad de inhibir la proliferación celular de células cancerígenas de mama MCF-7, no ejercen ningún efecto en el crecimiento de células humanas de mama no cancerígenas MCF-10A (156). El comportamiento aberrante de ciertas serín proteasas en procesos cancerígenos, en los que se encuentran incrementados sus niveles de expresión, podría explicar el efecto de los inhibidores BBI en células cancerígenas, en las cuales pueden inhibir proteasas diana involucradas en procesos tumorales. En este sentido, será necesaria la realización de estudios de interacción proteína-proteína que determinen sus posibles dianas terapéuticas.

4.2 PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK EN SEMILLAS DE GUISANTE OBTENIDAS MEDIANTE METODOLOGÍA TILLING

Las semillas de leguminosas son utilizadas ampliamente en la nutrición de monogástricos; sin embargo, su uso se ve limitado por presentar un alto contenido en factores anti-nutricionales como lectinas, taninos e inhibidores de proteasas, que dificultan la digestibilidad proteica. Los IP de leguminosas son capaces de formar complejos estables con las enzimas digestivas y reducir la absorción de nutrientes, pudiendo dar lugar a hiperplasia e hipertrofia pancreática en animales pequeños como ratas, ratones y pollos (32). Por tanto, la disminución en el contenido de IP de semillas es una estrategia de notable interés a desarrollar con objeto de mejorar de manera considerable su calidad proteica. En semillas de soja, el inhibidor KTI está codificado por un solo gen (232), lo cual facilitó la obtención de una variedad de soja con una variante nula de KTI, en la que se redujeron sus efectos anti-nutricionales (233,234). Sin embargo, los inhibidores BBI de soja están codificados por distintos genes, por lo que conseguir mutantes nulos resulta más complicado. En líneas transgénicas de soja, aun cuando el inhibidor KTI se encontraba en forma activa en las semillas, se consiguió una disminución en la actividad inhibidora de proteasas del 20-50% mediante la expresión de un mutante BBI inactivo, en el que se introdujo el aminoácido glicina en los sitios activos de ambos dominios de inhibición (235).

En el caso de semillas de guisante, un estudio realizado sobre 195 cultivos demostró variaciones en la actividad inhibidora de tripsina en un rango de 1.8-14.6 TIU·mg⁻¹ de materia seca (236). Más recientemente, mediante estudios del locus genético *Tri*, el cual contiene la mayoría de los genes que codifican para los TI de semillas de guisante, se observaron diferencias cuantitativas, así como variaciones en la secuencia entre los distintos inhibidores de tripsina presentes en especies de guisante como Birte, Frisson y Victor (237). Este polimorfismo parece ser debido principalmente a la secuencia del promotor que, junto con las variaciones de secuencia dentro de los dominios de inhibición, determinarán la actividad inhibidora de tripsina en semillas. Una técnica útil para identificar y caracterizar mutaciones en la secuencia de las proteínas BBI, con la cual se pueden estudiar las características funcionales de las mismas, es la metodología TILLING (**apartado 3.18**). Esta metodología ha sido descrita y utilizada con éxito (199), mediante la utilización del mutágeno EMS, con el fin de identificar mutaciones puntuales en el gen de interés. De este modo, es posible analizar isoformas con mutaciones que provoquen una menor actividad inhibidora de proteasas o incluso variantes nulas, analizando la relación entre estructura y función de las proteínas BBI.

Los IP de semillas de guisante son principalmente proteínas de la familia Bowman-Birk. En concreto, dos genes estrechamente ligados, *T11* y *T12*, son los responsables de expresar las isoformas BBI mayoritarias, TI1 y TI2, las cuales tienen capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina (27,35). Estas proteínas son sintetizadas como precursores de 100 aminoácidos aproximadamente, que posteriormente dan lugar a proteínas maduras con un peso molecular de 6-9 kDa (**Figura 30**). En el laboratorio de la Prof. Claire Domoney se utilizó la metodología TILLING (**apartado 3.18**) para generar mutaciones puntuales inducidas mediante EMS en semillas de guisante de la variedad Cameor. Se identificaron trece cambios nucleotídicos en la secuencia de *T11*, de los cuales siete se encontraban en fragmentos de ADN no codificante y seis en la región codificante. Dentro de estos últimos, dos cambios nucleotídicos producían mutaciones silenciosas, uno provocaba una mutación sin sentido en la región del pre-pro-péptido (T33I) y tres podrían ocasionar cambios conformacionales y/o funcionales de la proteína TI1 (**Figura 49**).

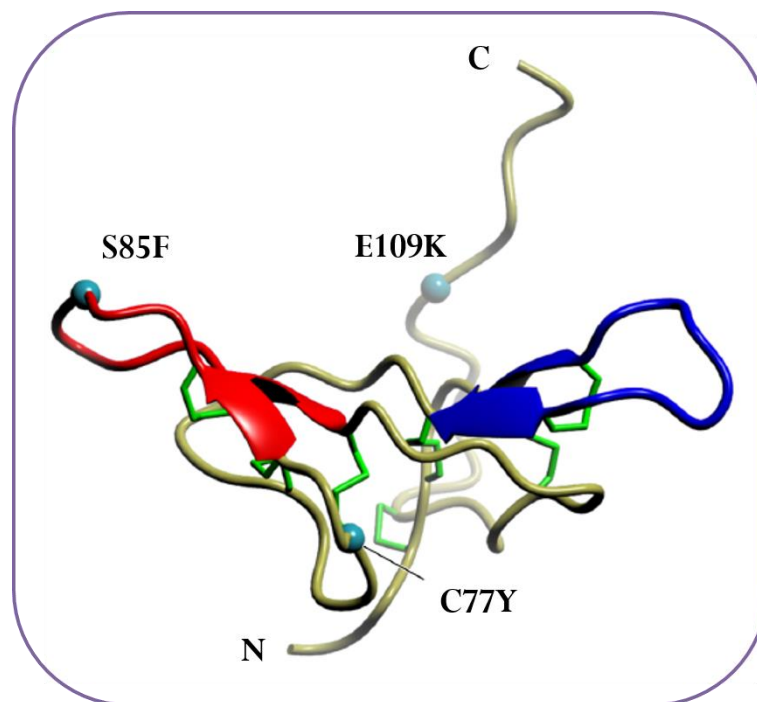


Figura 49. Mutaciones de la proteína TI1, inhibidor Bowman-Birk mayoritario de semillas de guisante, obtenidas mediante la metodología TILLING. Modelo homólogo a TI1 en el que los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina se muestran en azul y rojo, respectivamente. La identidad y localización de las mutaciones están indicadas mediante esferas de color cian y los puentes disulfuro en verde. N: extremo amino terminal; C: extremo carboxilo terminal (238).

El cambio nucleotídico asociado a la mutación G230A es responsable de la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina (C77Y) en uno de los puentes disulfuro intramoleculares (C⁸-C¹²); la mutación C254T causa la sustitución de aminoácido serina por fenilalanina (S85F) en el dominio

de inhibición C-terminal; y la mutación G325A es responsable de la sustitución del aminoácido glutámico por lisina (E109K) en el extremo nonapéptido C-terminal, eliminado *in vivo* durante el periodo de desecación de la semilla (111). La numeración de los aminoácidos incluye el pre-pro-peptido de 42 aminoácidos (Tabla 18).

Tabla 18. Cambio de aminoácidos en la proteína TI1 de semillas de guisante de la variedad Cameor debido a mutaciones inducidas en *TI1* mediante la metodología TILLING. Las tres mutaciones introducidas en la secuencia de nucleótidos del gen *TI1* dan como resultado la sustitución de los aminoácidos cisteína por tirosina (C77Y), serina por fenilalanina (S85F) y glutámico por lisina (E109K), respectivamente. La numeración de los aminoácidos incluye el pre-pro-peptido de 42 aminoácidos de TI1.

Mutación TI1	Sustitución de aminoácidos	Posibles consecuencias
C77Y	Cys ⁷⁷ :Tyr ⁷⁷	Rotura del puente disulfuro entre C ⁸ -C ¹²
S85F	Ser ⁸⁵ :Phe ⁸⁵	Modificación en la interacción inhibidor-quimotripsina
E109K	Glu ¹⁰⁹ :Lys ¹⁰⁹	Cambios en el equilibrio monómero-dímero

Las líneas silvestre y mutante (C77Y, S85F, E109K) se evaluaron a partir de extractos proteicos, obtenidos tal y como se describe en el apartado 3.18, y tras su fraccionamiento en columna de intercambio catiónico (apartado 3.19.2), mediante medidas de actividad inhibidora de tripsina (apartado 3.24.1.1) y quimotripsina (apartado 3.24.2.2), y geles de actividad (zimogramas) tratados con ambas enzimas (apartado 3.25).

4.2.1 Caracterización funcional de proteínas BBI en semillas de guisante obtenidas mediante la metodología TILLING

Con el fin de evaluar los posibles efectos de las mutaciones puntuales inducidas en la proteína TI1 (C77Y, S85F, E109K) (Tabla 18), se llevaron a cabo medidas de actividad inhibidora de tripsina (apartado 3.24.1.2) y quimotripsina (apartado 3.24.2.2), utilizando BAPNA y BTPNA como sustratos específicos, respectivamente. Para ello, se realizaron extracciones ácidas a partir de semillas de guisante de la variedad Cameor (líneas silvestre y mutante), tal y como está descrito en el apartado 3.18. Las unidades de inhibición de tripsina (TIU) y quimotripsina (CIU) se expresaron tanto por mg de harina (Figura 50 A-B) como por mg de proteína (Figura 50 C-D).

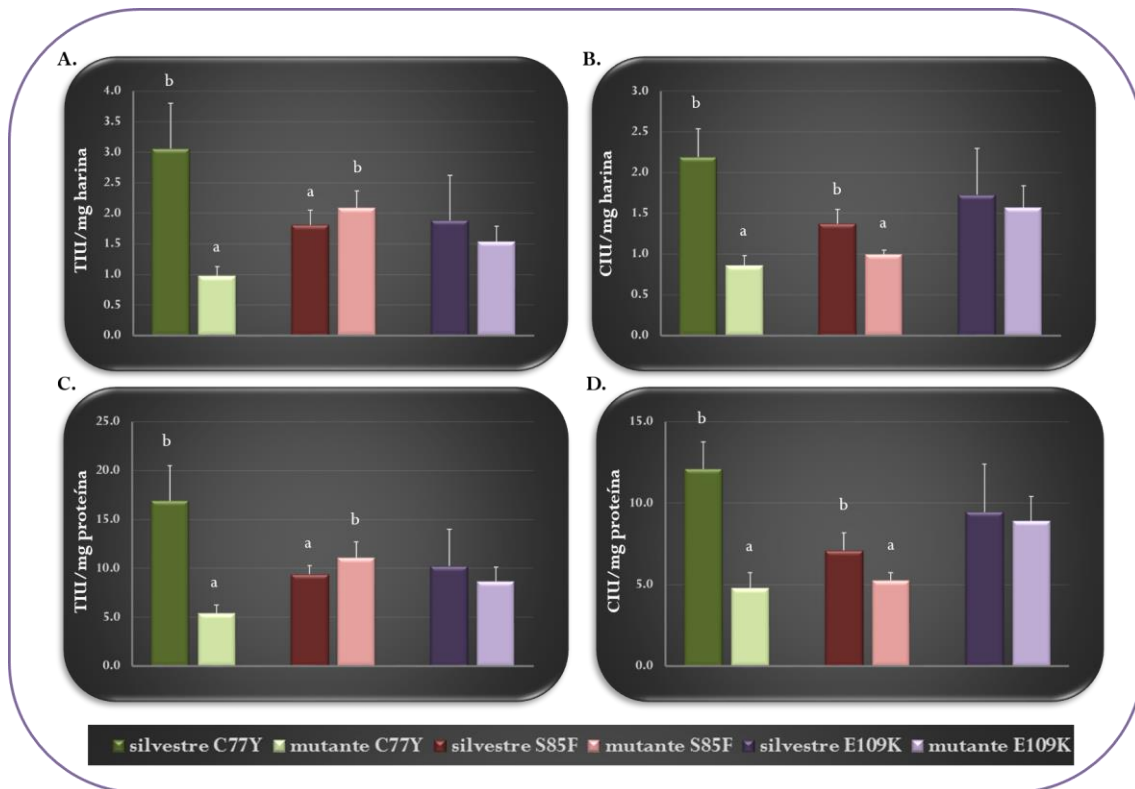


Figura 50. Actividad inhibitoria de tripsina y quimotripsina de las líneas silvestre y mutante de guisante obtenidas mediante metodología TILLING. Unidades de inhibición de tripsina (TIU, A, C) y quimotripsina (CIU, B, D) por mg de harina (A, B) o por mg de proteína (C, D) de las tres líneas mutantes obtenidas mediante metodología TILLING (C77Y, S85F, E109K) y sus correspondientes líneas silvestres. Los datos son la media de, al menos, tres experimentos independientes, cada uno con cuatro replicados técnicos. Los valores medios con letras difieren significativamente ($P < 0.01$; test de Bonferroni).

La mutación C77Y, cuyo aminoácido mutado forma parte de un puente disulfuro involucrado en la estabilidad del dominio de inhibición C-terminal (C⁸-C¹²) (Figura 3), presentó una disminución de TIA y CIA superior al 60% con respecto al extracto proteico procedente de las líneas silvestres. En semillas de *Dolichos biflorus*, la rotura de un puente disulfuro de la proteína HGI-III cercano al dominio de inhibición N-terminal (C³-C¹³) disminuye su capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina, así como a su estabilidad térmica, aumentando la susceptibilidad a hidrólisis por parte de la enzima a la que inhiben (73). Por tanto, ambos dominios de inhibición parecen no comportarse de un modo totalmente independiente ya que, en el caso del mutante C77Y, cuyo desarreglo estructural tiene lugar en el dominio de inhibición de quimotripsina tras la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina, se ve afectada la capacidad de inhibir ambas enzimas, tripsina y quimotripsina.

La mutación S85F, con sustitución del aminoácido serina por fenilalanina dentro el dominio de inhibición C-terminal, presentó una disminución en la actividad inhibidora de quimotripsina, a la vez que un pequeño pero significativo aumento en la actividad inhibidora de tripsina cuando se comparaba con las líneas silvestres. El aminoácido serina presente en la posición P₁' de ambos dominios de inhibición se encuentra muy conservado a lo largo de las distintas isoformas BBI presentes en leguminosas (**Tablas 4 y 5**). Aunque parece no estar implicado en la integridad estructural de la proteína (80), su implicación en las uniones de hidrógeno a lo largo del dominio de inhibición (65) parece proporcionar una ligera contribución a la afinidad por la enzima, lo cual podría explicar la reducción encontrada. Por último, la mutación E109K, con sustitución del aminoácido glutámico por lisina en el extremo C-terminal de la proteína, aunque de manera no significativa, presentó una ligera disminución en la actividad inhibidora de las enzimas tripsina y quimotripsina. Esta mutación parece no tener un efecto directo en la capacidad de inhibir ambas enzimas, pero podría afectar al estado de oligomerización de la proteína. El aminoácido aspártico presente en el extremo C-terminal de las proteínas BBI, el cual presenta carga negativa al igual que el aminoácido glutámico, ha demostrado estar implicado en las interacciones entre monómeros para dar lugar a formas diméricas en solución (110,121).

4.2.2 Identificación de isoformas BBI en líneas silvestres de guisante

Los extractos proteicos procedentes de semillas de guisante de la variedad Cameor, línea parental utilizada como control, y de las líneas silvestres, se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.2**) y se monitorizaron mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.2**). Tal y como se muestra en las **Figuras 51, 52 y 53 (A-B ▲)**, las líneas silvestres eluyeron en cuatro picos cromatográficos, denominados picos 1, 2, 3 y 4 (en orden de elución en la cromatografía de intercambio catiónico), con capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina. Extractos proteicos obtenidos de semillas de guisante de la variedad Cameor utilizadas como control mostraron un perfil de elución similar a las líneas silvestres (**Figura 19**). Los picos cromatográficos se analizaron mediante PAGE-SDS, tal y como se describe en el **apartado 3.26**, para su posterior identificación mediante análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**).

Los picos 1, 2, 3 y 4 se identificaron como formas madura y procesada de las proteínas TI1 y TI2 (**Tabla 19**). Los picos 1 y 2 contenían la proteína TI2, presentando el aminoácido aspártico

en posición P₂, dentro del dominio de inhibición N-terminal. Los picos 3 y 4 contenían la proteína TI1, presentando el aminoácido asparagina en la posición P₂, de ambos dominios de inhibición y los aminoácidos tirosina y lisina en las posiciones P₁ y P₅ del dominio de inhibición C-terminal. La identificación del extremo C-terminal (CHNSEVEEVIKN) en los picos 2 y 4 indicaba que estos picos contenían la forma madura no procesada de las proteínas TI2 y TI1, respectivamente (**Tabla 19**). Esta secuencia C-terminal incluye el extremo nonapéptido que es eliminado *in vivo* durante el proceso de desecación de la semilla, mediante proteólisis (111). Por tanto, se puede concluir que el perfil de elución de las distintas isoformas en las líneas silvestres analizadas es: TI2 procesada, TI2 no procesada, TI1 procesada, TI1 no procesada.

Tabla 19. Determinación de la secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las formas procesada y no procesada de las proteínas TI1 y TI2 de semillas de guisante de la variedad Cameor obtenidas mediante la metodología TILLING. El número de acceso de TI1 (Q41065) y TI2 (Q41066) pertenece a la base de datos Swiss-Prot. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de inhibición están subrayadas. P₁-P₅ son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores (en negrita). K en la posición P₁ determina especificidad frente a la enzima tripsina, mientras que L e Y determinan especificidad frente a quimotripsina.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70--
TI2 (Q41066)	GDDVKSACCDTCLCT <u>TKSDPPTCR</u> CRVDVGETCHSACDSCIC <u>ALS</u> YPPQCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
TI2	
Pico 1	GDDVKSACCDTCLCT <u>TKSDPPTCR</u>
Pico 2	GDDVKSACCDTCLCT <u>TKSDPPTCR</u> -----ACHNSEVEEVIKN
TI1 (Q41065)	GDDVKSACCDTCLCT <u>TKSNPPTCR</u> CRVDVRETCHSACDSCIC <u>AYS</u> NPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
TI1	
Pico 3	-----SACCDTCLCT <u>TKSNPPTCR</u> CRVDVRETCHSACDSCIC <u>AYS</u> NPPK
Pico 4	-----SACCDTCLCT <u>TKSNPPTCR</u> CRVDVRETCHSACDSCIC <u>AYS</u> NPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70--

Los extractos proteicos procedentes de las líneas silvestres se analizaron mediante geles de actividad (zimogramas) (**apartado 3.25**). Tal y como se muestra en las **Figuras 51, 52 y 53 (C)**, en geles tratados con las enzimas tripsina y quimotripsina, se muestra la existencia de tres bandas electroforéticas, correspondiendo a la forma madura de TI1 (-2) y a las formas procesada (-3) y madura (-5) de TI2. La forma procesada de TI1, bajo las condiciones desarrolladas durante la electroforesis (pH 7.0), presenta carga neta cero por lo que no es detectada en los geles de actividad.

4.2.3 Identificación de isoformas BBI en líneas mutantes (C77Y, S85F y E109K) de guisante

4.2.3.1 Mutación C77Y

La mutación C77Y, llevada a cabo en la proteína TI1 de semillas de guisante de la variedad Cameor mediante la metodología TILLING (**apartado 3.18**), provoca la sustitución del aminoácido cisteína por tirosina en la posición 77, dando lugar a la pérdida de uno de los siete puentes disulfuro intramoleculares (C⁸-C¹²), lo cual podría ocasionar la pérdida de rigidez estructural de la proteína. Los extractos proteicos procedentes de las líneas mutantes C77Y se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.2**) y se monitorizaron mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.2**). Tal y como se muestra en la **Figura 51 (A-B ▲)**, las líneas mutantes C77Y eluyeron en dos picos cromatográficos (picos 1 y 2), correspondientes a las formas procesada y madura de TI2, con capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina. A diferencia de las líneas silvestres (**Figura 51 A-B ▲**) (**apartado 4.2.2**), la mutación C77Y no presentaba actividad inhibidora de tripsina y/o quimotripsina por parte de la proteína TI1, tanto en su forma procesada (pico 3) como madura (pico 4).

Los extractos proteicos procedentes de las líneas mutantes C77Y se analizaron mediante zimogramas (**apartado 3.25**). Tal y como se muestra en la **Figura 51 (C)**, en geles tratados con las enzimas tripsina y quimotripsina, se muestra la existencia de dos bandas electroforéticas, correspondientes a las formas procesada (-3) y madura (-5) de TI2. Teniendo en cuenta que la forma procesada de TI1 (pico 3) presenta una carga neta igual a cero bajo las condiciones desarrolladas durante la electroforesis (pH 7.0) y que, por tanto, no se detecta en geles de actividad, solo podemos confirmar la pérdida de una de las dos isoformas de la proteína TI1 (forma madura o pico 4). La mutación C77Y parece provocar un desarreglo estructural que conlleva a la pérdida de actividad inhibidora de ambos dominios de inhibición. La reducción de más del 60% tanto en TIA como en CIA en las líneas mutantes C77Y (**Figura 50**) implica una mayor contribución de TI1 sobre la actividad inhibidora total (**apartado 4.2.1**). Estos datos sugieren que el segundo mayor inhibidor de semillas, TI2, contribuye en menor medida a la actividad inhibidora.

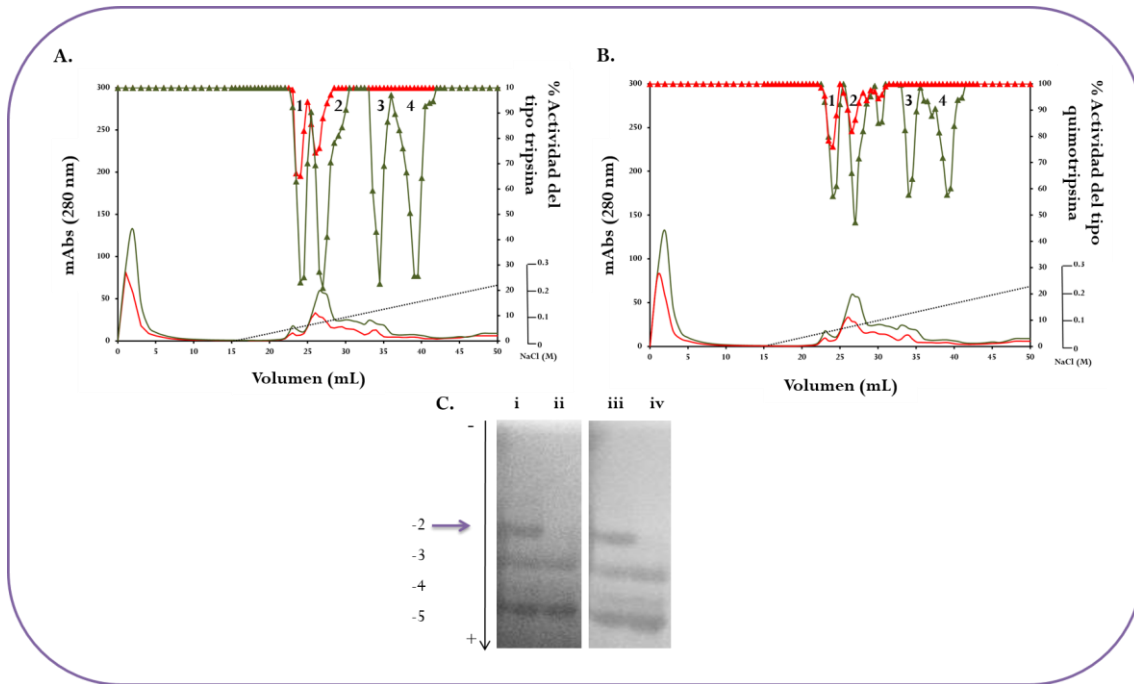


Figura 51. Perfil de actividad inhibitora de las líneas silvestre y mutante C77Y tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. A-B La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua (verde y roja sin símbolos) y punteada, respectivamente. La actividad inhibitora de tripsina (A) y quimotripsina (B) se evaluó en cada fracción de las líneas silvestre (▲) y mutante (▲), utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTPNA, respectivamente. C) Análisis de actividad inhibitora *in gel* de las líneas silvestre (i, iii) y mutante C77Y (ii, iv). Los geles casein Blue se trataron con las enzimas digestivas tripsina (i, ii) y quimotripsina (iii, iv); las áreas oscuras indican inhibición de la enzima. La dirección de la electroforesis de los geles se indica mediante una línea vertical. La posición de la isoforma ausente en las líneas mutantes se indica mediante una línea horizontal. Las variantes -2 y -5 representan los productos génicos primarios TI1 y TI2, respectivamente.

La pérdida tanto de TIA como de CIA de la proteína TI1 en líneas mutantes C77Y refleja la importancia de, al menos, uno de los siete puentes disulfuro involucrados en la estabilidad de la proteína (C⁸-C¹³). La pérdida de más del 60% de la actividad inhibitora, asociada a la proteína TI1 tal y como se observa tras la separación de las distintas isoformas en la cromatografía de intercambio catiónico, parece indicar que el segundo mayor inhibidor de semillas de guisante, TI2, contribuye en menor proporción a la actividad inhibitora global. El dominio de inhibición C-terminal de las proteínas TI1 y TI2 presenta los aminoácidos Tyr-Ser-Asn y Leu-Ser-Tyr, respectivamente. Ambas proteínas, expresadas de forma recombinante, demostraron ejercer distinta actividad inhibitora frente a la enzima quimotripsina, siendo TI1 más activo (183). En cuanto a la actividad inhibitora de tripsina, el dominio de inhibición N-terminal de las proteínas TI1 y TI2 presenta los aminoácidos Lys-Ser-Asn y Lys-Ser-Asp. Mediante el estudio de péptidos sintéticos, el aminoácido Asn en

posición P₂, presenta menor valor de K_i frente a la enzima tripsina (2.5 vs. 26 μM) (96), lo cual estaría en concordancia con una menor contribución de TI2 en la actividad inhibidora de la misma.

4.2.3.2 Mutación S85F

La mutación S85F, llevada a cabo en la proteína TI1 de semillas de guisante de la variedad Cameor mediante la metodología TILLING (**apartado 3.18**), provoca la sustitución del aminoácido serina por fenilalanina en la posición 85, dentro del dominio de inhibición C-terminal, pudiendo por tanto afectar a la inhibición de quimotripsina. Los extractos proteicos procedentes de las líneas mutantes S85F se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.2**) y se monitorizaron mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.2**). Al igual que las líneas silvestres (**Figura 52 A-B ▲**) (**apartado 4.2.2**), las líneas mutantes S85F eluyeron en cuatro picos cromatográficos (picos 1, 2, 3 y 4), con capacidad de inhibir la enzima tripsina, correspondientes a las formas procesada y madura de las proteínas TI2 y TI1 (**Figura 52 A-B ▲**). Sin embargo, la mutación S85F no presentaba actividad inhibidora de quimotripsina asociada a la proteína TI1, tanto en su forma procesada (pico 3) como madura (pico 4).

Los extractos proteicos procedentes de las líneas mutantes S85F se analizaron mediante geles de actividad (zimogramas) (**apartado 3.25**). Al igual que las líneas silvestres, en geles tratados con la enzima tripsina se muestra la existencia de tres bandas electroforéticas, correspondientes a la forma madura de TI1 (-2) y a las formas procesada (-3) y madura (-5) de TI2 (**Figura 52 C**). Tal y como se ha explicado anteriormente, la forma procesada de TI1 tiene carga neta cero bajo las condiciones desarrolladas durante la electroforesis (pH 7.0) y, por tanto, no se detecta en geles de actividad. En geles tratados con la enzima quimotripsina, se confirma la pérdida de la forma madura de TI1 (-2). Estos datos están en concordancia con los datos obtenidos mediante medidas de TIA y CIA a partir de extractos procedentes de las líneas mutantes S85F (**Figura 50**), en los cuales había una disminución de la actividad inhibidora de quimotripsina, como consecuencia de la pérdida del residuo serina del sitio activo del dominio de inhibición C-terminal de TI1 (**apartado 4.2.2**). Sin embargo, la actividad inhibidora de tripsina no se vio afectada negativamente por esta mutación en las distintas isoformas, aunque la TIA global está ligeramente elevada. Este efecto en TIA en las líneas mutantes podría ser un reflejo de cambios estructurales de la proteína como consecuencia del aminoácido Phe⁸⁵, el cual podría tener un impacto en la unión a la enzima tripsina.

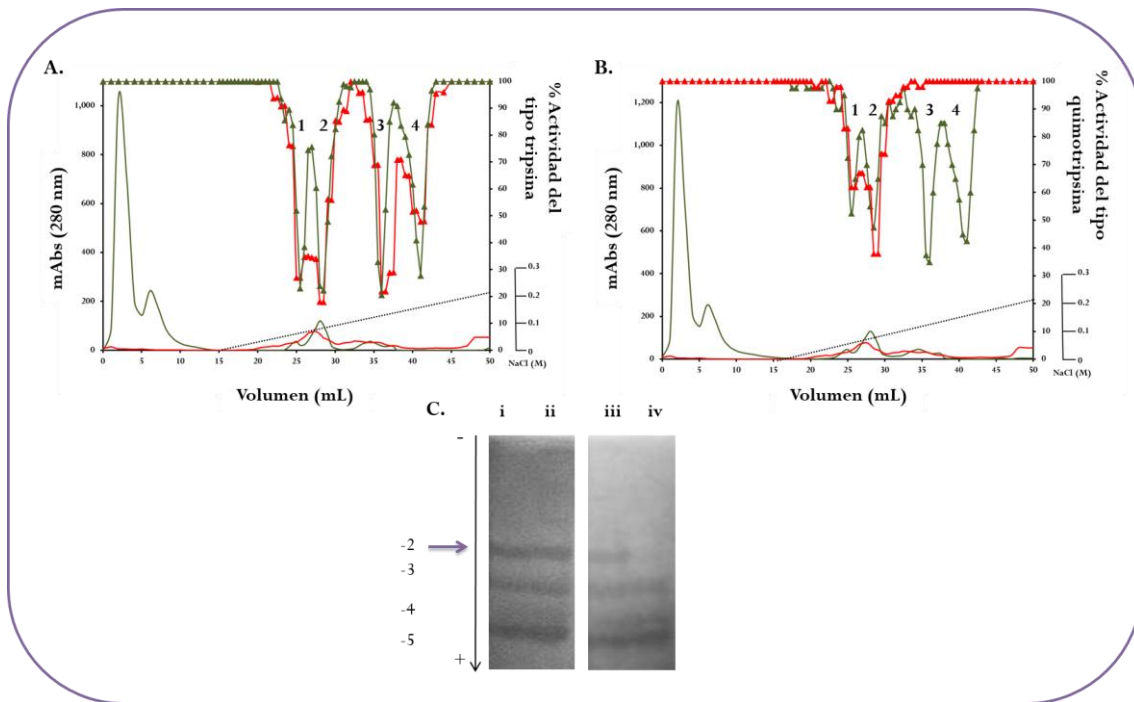


Figura 52. Perfil de actividad inhibidora de las líneas silvestre y mutante S85F tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. A-B) La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua (verde y roja sin símbolos) y punteada, respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina (A) y quimotripsina (B) se evaluó en cada fracción de las líneas silvestre (\blacktriangle) y mutante (\blacktriangle), utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTPNA, respectivamente. C) Análisis de actividad inhibidora *in gel* de las líneas silvestre (i, iii) y mutante S85F (ii, iv). Los geles de casein Blue se trataron con las enzimas digestivas tripsina (i, ii) y quimotripsina (iii, iv); las áreas oscuras indican inhibición de la enzima. La dirección de la electroforesis de los geles se indica mediante una línea vertical. La posición de la isoforma ausente en las líneas mutantes (frente a la enzima quimotripsina) se indica mediante una línea horizontal. Las variantes -2 y -5 representan los productos génicos primarios TI1 y TI2, respectivamente.

4.2.3.3 Mutación E109K

La mutación E109K, llevada a cabo en la proteína TI1 de semillas de guisante de la variedad Cameor mediante la metodología TILLING (**apartado 3.18**), provoca la sustitución del aminoácido glutámico por lisina en la posición 109, dentro del extremo C-terminal, el cual mediante proteólisis es eliminado *in vivo* durante el periodo de desecación de la semilla. Aunque no debería afectar de manera directa en la capacidad de TI1 de inhibir las proteasas diana, tripsina y quimotripsina, sí podría influir en el estado de oligomerización de la proteína. Por otro lado, la mutación E109K da lugar a un cambio en la carga total de la forma madura de TI1 (de 6 a 7.5) a pH 4.4, por lo que el perfil de elución podría variar en el caso de las líneas mutantes, independientemente de cualquier cambio asociado a su actividad inhibidora. Los extractos proteicos

procedentes de las líneas mutantes E109K se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 3.19.2**) y se monitorizaron mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.2**). Tal y como se muestra en la **Figura 53 (A-B ▲)**, las líneas mutantes E109K eluyeron en tres picos cromatográficos (picos 1, 2 y 3), con capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina, correspondientes a las formas procesada y madura de TI2 y a la forma procesada de TI1, respectivamente (**apartado 4.2.2**). La carga deducida de la forma madura de TI1 (carga más positiva) está en concordancia con la aparente pérdida de actividad inhibidora asociada al pico 4 observada en líneas silvestres (**Figura 53 A-B ▲**) ya que, dado que no se identificó ningún otro pico cromatográfico con actividad inhibidora, ambas isoformas de TI1 (procesada y madura) parecen co-eluir en el pico 3 de las líneas mutantes E109K.

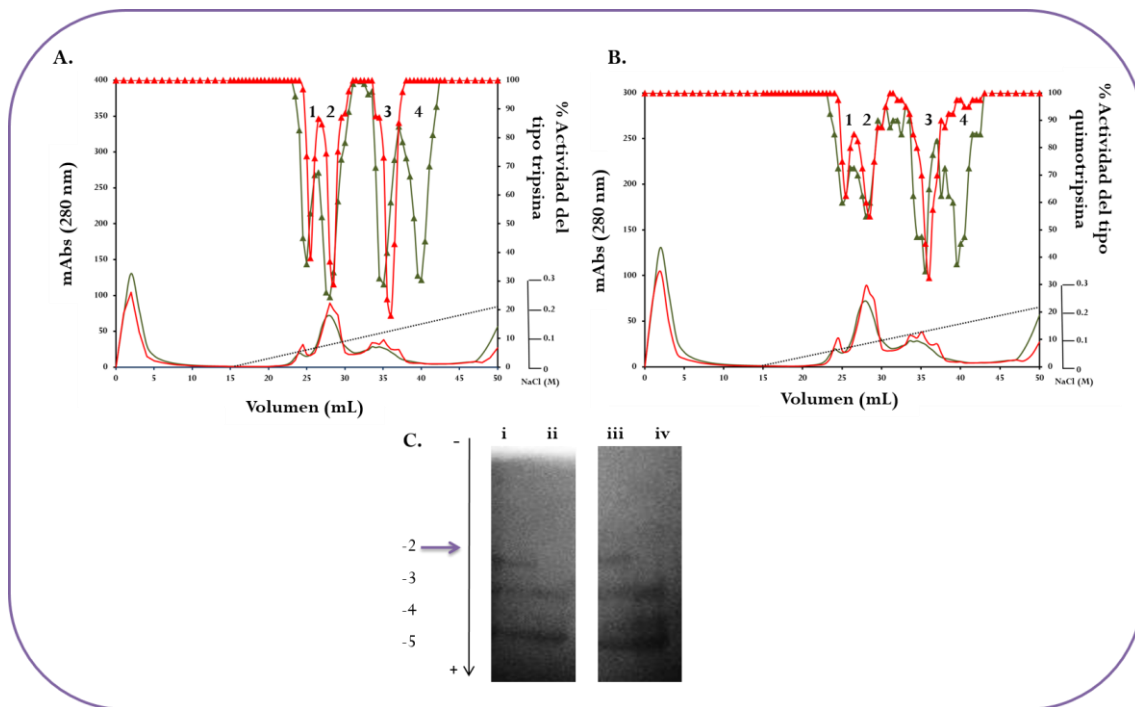


Figura 53. Perfil de actividad inhibidora de las líneas silvestre y mutante E109K tras cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. A-B) La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua (verde y roja sin símbolos) y punteada, respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina (A) y quimotripsina (B) se evaluó en cada fracción de las líneas silvestre (▲) y mutante (▲), utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTPNA, respectivamente. **C)** Análisis de actividad inhibidora *in gel* de las líneas silvestre (i, iii) y mutante E109K (ii, iv). Los geles de casein Blue se trataron con las enzimas digestivas tripsina (i, ii) y quimotripsina (iii, iv); las áreas oscuras indican inhibición de la enzima. La dirección de la electroforesis de los geles se indica mediante una línea vertical. La posición de la isoforma ausente en las líneas mutantes se indica mediante una línea horizontal. Las variantes -2 y -5 representan los productos génicos primarios TI1 y TI2, respectivamente.

Los extractos proteicos procedentes de las líneas mutantes E109K se analizaron mediante geles de actividad (zimogramas) (**apartado 3.25**). Tal y como se muestra en la **Figura 53 (C)**, en geles tratados con las enzimas tripsina y quimotripsina, se muestra la existencia de dos bandas electroforéticas, correspondientes a las formas procesada (-3) y madura (-5) de TI2. Debido al cambio en la carga de la forma madura de TI1, provocado por la mutación E109K, la carga neta de ambas isoformas de TI1 (procesada y madura) es igual a cero bajo las condiciones desarrolladas durante la electroforesis (pH 7.0) y, por tanto, no son detectadas en geles de actividad. Estos datos están en concordancia con los datos obtenidos mediante medidas de TIA y CIA a partir de extractos procedentes de las líneas mutantes E109K (**Figura 50**), en los cuales no se reflejaba ninguna variación en la actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina cuando se comparaba con las líneas silvestres (**apartado 4.2.1**). Tal y como está descrito anteriormente, no se observa interacción alguna entre el extremo C-terminal del inhibidor de judía azuki con la enzima tripsina (64). La ligera disminución de TIA y CIA obtenida en el mutante E109K sería consistente con la nula participación del extremo C-terminal en interacciones con las enzimas tripsina y quimotripsina. Sin embargo, la variación en la carga podría tener un impacto en las interacciones entre monómeros.

4.2.3.3.1 Perfil de oligomerización de las líneas silvestre y mutante E109K de guisante

La mutación E109K tiene lugar en una región de la proteína TI1 (extremo C-terminal) que, aunque parece no estar involucrada en la interacción entre el inhibidor y la enzima diana, podría ser importante en cuanto a la formación de dímeros. Por tanto, el posible efecto en el perfil de oligomerización de las isoformas, procesada y madura, de TI1 y TI2 se analizó en las líneas silvestre y mutante E109K mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), tal y como está descrito en el **apartado 3.20**. Mediante una recta de calibrado en el rango de peso molecular entre 6.5-65.5 kDa, se estimaron las masas moleculares de los picos obtenidos tras SEC. Tal y como se muestra en la **Figura 54**, los extractos de albúminas de las líneas silvestre y mutante (E109K) mostraron tres picos cromatográficos, denominados picos A, B y C (en orden de elución de la cromatografía de exclusión molecular), con capacidad de inhibir la enzima tripsina. Las áreas relativas de los picos cromatográficos que presentaban TIA mostraron ser diferentes entre las líneas silvestre y mutante; en concreto, la actividad del pico A era significativamente superior en líneas silvestres que en líneas mutantes E109K. Es decir, las líneas silvestres mostraban mayor cantidad de

isoformas TI en forma de oligómeros, deducidos dímeros (55,63), en comparación con las líneas mutantes.

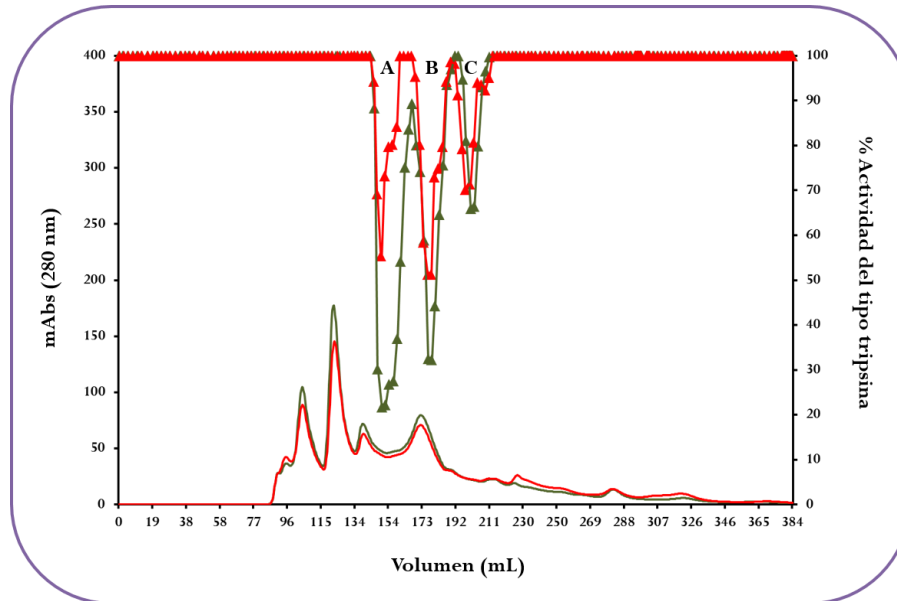


Figura 54. Perfil de oligomerización de las isoformas TI en las líneas silvestre y mutante E109K mediante cromatografía de exclusión molecular en columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR. La absorbancia a 280 nm durante la elución queda indicada con línea continua (verde y roja sin símbolos). La actividad inhibidora de tripsina se evaluó en cada fracción de las líneas silvestre (▲) y mutante (▲), utilizando BAPNA como sustrato específico.

Cada uno de los picos (A, B y C) que presentaban actividad inhibidora de tripsina, fraccionados en la cromatografía de exclusión molecular, se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico, tal y como se describe en el apartado 3.20. Las líneas silvestres presentaban las isoformas maduras de TI2 y TI1 en el pico A, mientras que los picos B y C contenían formas procesadas en el extremo C-terminal de las proteínas TI2 y TI1, respectivamente (picos 2 y 4, 1 y 3, respectivamente) (Figura 55). Por el contrario, las líneas mutantes E109K presentaban en el pico A exclusivamente isoformas maduras de TI2 (pico 2), mientras que, al igual que las líneas silvestres, los picos B y C de la cromatografía de exclusión molecular contenían las formas procesadas de TI2 y TI1 (picos 1 y 3), respectivamente. Tal y como se ha indicado en el apartado anterior, la forma madura de TI1 en líneas mutantes E109K mostraba alterado su comportamiento bajo cromatografía de intercambio catiónico debido a que la mutación producida le da una carga neta más positiva, por lo que se puede concluir que probablemente ambas isoformas de TI1 están presentes en el pico C de la cromatografía de exclusión molecular en las líneas mutantes E109K.

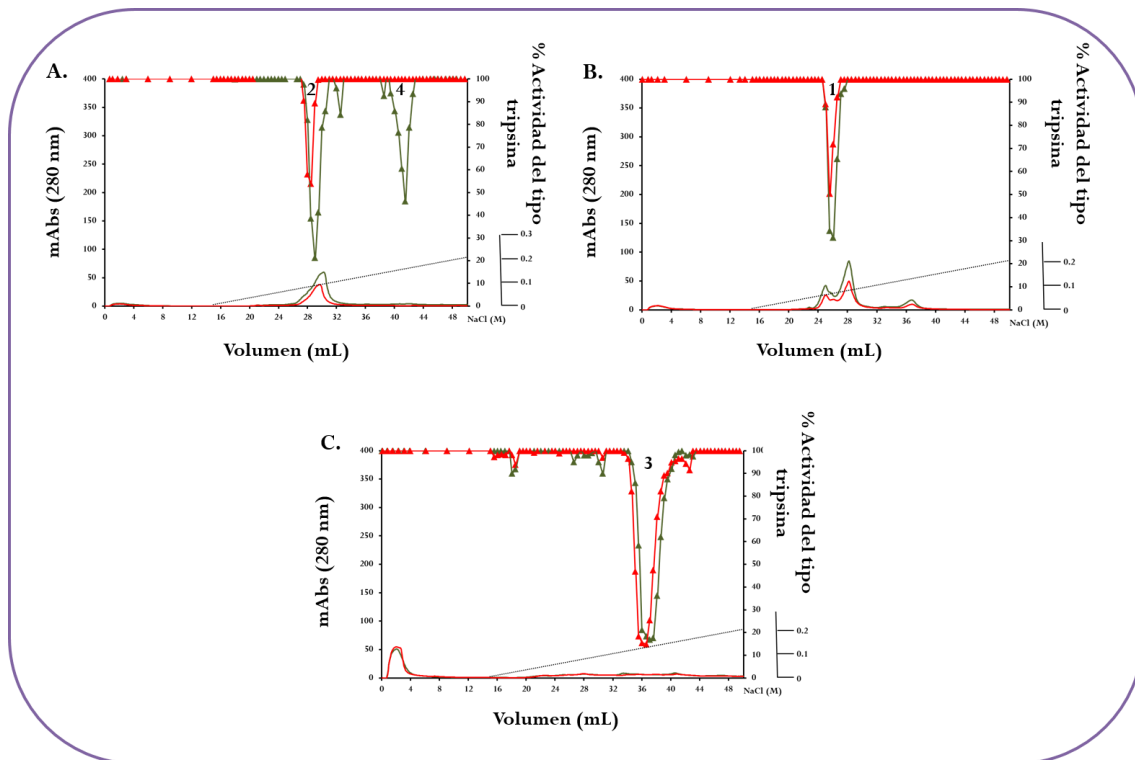


Figura 55. Perfil de actividad inhibitora de las formas oligoméricas (A-B-C) obtenidas tras cromatografía de exclusión molecular de las líneas silvestre y mutante E109K, mediante cromatografía de intercambio catiónico en columna MonoS 5/50 GL. La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.22 M) durante la elución queda indicado con línea continua (verde y roja sin símbolos) y punteada, respectivamente. La actividad inhibitora de tripsina se evaluó en cada fracción de las líneas silvestre (\blacktriangle) y mutante (\blacktriangle), utilizando BAPNA como sustrato específico.

El pico A de las líneas silvestres, deducidos dímeros, fue significativamente mayor que el pico A de las líneas mutantes E109K. Estos datos demuestran que, aun no teniendo un efecto directo en la actividad inhibitora de las enzimas tripsina y quimotripsina, el extremo C-terminal influye en la formación de dímeros de la proteína T11 de guisante y la diferencia de carga de la mutación E109K interfiere en el proceso. En estudios anteriores se ha demostrado la interacción electrostática entre el grupo amino de la Lys⁵⁸ de un monómero y un aminoácido con carga negativa del segundo monómero en la formación de dímeros (110,120). Aunque existen hasta tres glutamatos en el extremo C-terminal de la proteína T11 (Figura 30), el aminoácido Glu¹⁰⁹ parece ser estrictamente necesario en el proceso de dimerización de T11. Dado que los extremos C-terminal de T11 y T12 son idénticos, cabría esperar la presencia de heterodímeros y homodímeros en las líneas silvestres. Tras la cromatografía de exclusión molecular, los picos B y C contenían formas T12 y T11 procesadas, respectivamente, deducidas monómeros.

Se ha sugerido que las formas monoméricas y diméricas de la proteína TI1 de guisante difieren en forma, siendo los dímeros más compactos (55). En este trabajo, las formas procesadas monoméricas de TI1 y TI2 eluyen con aparentemente distinta masa molecular en el rango de 12-15 y 22-30 kDa, respectivamente; diferencias en la secuencia de aminoácidos y la falta de formas compactas de los monómeros, principalmente debido a una mayor hidrofobicidad, podría explicar este comportamiento anómalo. La dimerización de TI1 da lugar a una estructura con cuatro dominios de inhibición localizados en la parte más externa de la estructura dimérica. Estudios en los que se determina la estructura de la isoforma PsTI-IVb de guisante (55) y estudios llevados a cabo con HGI-III de *Dolichos biflorus* (121) sugieren que las formas diméricas son más estables que las monoméricas. Aunque no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina, la funcionalidad y estabilidad de las formas de TI1 monoméricas y diméricas en las líneas mutantes puede diferir con otras enzimas distintas a las utilizadas en este trabajo, como por ejemplo las enzimas matriptasa (239) y el proteosoma (23), implicadas en el desarrollo de procesos cancerígenos.

4.3 PÉPTIDOS CÍCLICOS SINTÉTICOS QUE IMITAN A LOS DOMINIOS DE INHIBICIÓN DE LAS PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK

4.3.1 Síntesis de péptidos cíclicos y lineales que imitan a los dominios de inhibición de proteínas BBI

Dada la capacidad que presentan las proteínas Bowman-Birk, TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente, de inhibir la proliferación celular de células humanas HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano mediante la inhibición de proteasas (77,90), se llevó a cabo la síntesis de péptidos sintéticos (**Tabla 14**), tal y como se describe en el **apartado 3.22**. Se obtuvieron péptidos cíclicos que imitan a los dominios de inhibición de ambas proteínas, denominados TI1 (Tryp), TI1 (Chym), IBB1 (Tryp) e IBB1 (Chym); péptidos cíclicos derivados deducidos inactivos [TI1 (Tryp-modP₁), TI1 (Chym-modP₁), IBB1 (Tryp-modP₁) e IBB1 (Chym-modP₁)]; péptidos cíclicos con sustitución del aminoácido situado en la posición P₄ del dominio de inhibición C-terminal de la proteína IBB1 [IBB1 (Chym-modP₄)]; y péptidos lineales de la proteína TI1 [TI1 (Tryp-lineal) y TI1 (Chym-lineal)], con objeto de investigar sus propiedades funcionales y potenciales como agentes anti-proliferativos en modelos celulares de colon. Los datos obtenidos en espectrofotometría de masas y del patrón de iones de los distintos péptidos confirmaron la correcta secuencia de aminoácidos y la ciclación de los mismos. Tanto la ausencia de péptidos lineales tras el proceso de ciclación como la ausencia de dímeros formados por péptidos lineales se confirmó a través del análisis de masas (no mostrado).

4.3.2 Caracterización funcional de péptidos sintéticos cíclicos y lineales que imitan a los dominios de inhibición de proteínas BBI

La evaluación de la actividad inhibidora de las enzimas tripsina (**apartado 3.24.1.2**) y quimotripsina (**apartado 4.24.2.1**) se llevó a cabo tal y como está descrito anteriormente. La actividad específica de los péptidos sintéticos, expresada como unidades de inhibición de tripsina (TIU) o quimotripsina (CIU) por mg de proteína, se encuentra reflejada en las **Tablas 20** y **21**. Los valores de K_i se calcularon a partir de los valores de IC_{50} obtenidos mediante ensayos competitivos (**apartado 3.24.3**), utilizando la fórmula de Copeland *y col.* (1995) (225).

Tabla 20. Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibitora específica frente a tripsina (T) y quimotripsina (C) de péptidos sintéticos cíclicos y lineales derivados de los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental TI1 de guisante.

Péptidos sintéticos ^a	K_i (nM) ^b		Actividad inhibitora específica (IU·mg ⁻¹ proteína) ^b	
	T	C	T	C
TI1 (Tryp)	465 ± 51	ND	1382 ± 65	ND
TI1 (Tryp-modP ₁)	ND	ND	ND	ND
TI1 (Tryp-lineal)	ND	ND	ND	ND
TI1 (Chym)	ND	122 ± 16	ND	2209 ± 216
TI1 (Chym-modP ₁)	ND	ND	ND	ND
TI1 (Chym-lineal)	ND	ND	ND	ND
rTI1 ^c	21 ± 2	8 ± 1	2476 ± 238	2956 ± 196

^aLos péptidos cíclicos TI1 (Tryp) y (Chym) imitan los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental TI1 de guisante. Los péptidos modificados en la posición P₁ se obtuvieron mediante sustitución de Lys (K), TI1 (Tryp-modP₁), o Tyr, TI1 (Chym-modP₁), por Gly (G). Los péptidos lineales, TI1 (Tryp-lineal) y TI1 (Chym-lineal) se obtuvieron mediante sustitución, en las posiciones P₃ y P₆, de Cys (C) por Ala (A). ^bLas actividades específicas y valores de K_i representan los valores medios ± SD de, al menos, cinco determinaciones independientes. ^cLos datos de inhibición de la proteína parental rTI1 provienen de la caracterización funcional llevada a cabo en esta tesis doctoral (apartado 4.1.7). ND: no detectado.

Tal y como se refleja en la **Tabla 20**, los péptidos cíclicos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición N- y C-terminal de la proteína TI1 de guisante, TI1 (Tryp) y TI1 (Chym), que presentaban los aminoácidos lisina y tirosina en la posición P₁ (**Tabla 14**), resultaron ser específicos frente a las enzimas tripsina y quimotripsina, mostrando valores de 1382 ± 65 TIU·mg⁻¹ de proteína y 2209 ± 216 CIU·mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Tras comparar los valores de K_i de la proteína rTI1, expresada de manera recombinante en *P. pastoris* (**apartado 4.1.7**), frente a los péptidos cíclicos derivados, éstos presentaron valores superiores de K_i ; en concreto, mostraron una potencia 20 veces menor para inhibir la enzima tripsina, TI1 (Tryp) $K_i = 465$ nM vs. 21 nM, y 15 veces menor frente a quimotripsina, TI1 (Chym) $K_i = 122$ nM vs. 8 nM. Los péptidos cíclicos en los cuales se modificó el aminoácido de la posición P₁, TI1 (Tryp-modP₁) y TI1 (Chym-modP₁), sustituyendo los aminoácidos lisina y tirosina, respectivamente, por el aminoácido glicina (**Tabla 14**), no presentaron inhibición frente a las enzimas tripsina y quimotripsina. De manera similar, no

presentaron capacidad de inhibir estas serín proteasas los péptidos lineales que imitaban los dominios de inhibición de la proteína TI1 en los que las cisteínas de las posiciones P₃ y P₆, necesarias para la ciclación, se sustituyeron por el aminoácido alanina, TI1 (Tryp-lineal) y TI1 (Chym-lineal) (Tabla 14).

Tabla 21. Constante de inhibición (K_i) y actividad inhibidora específica frente a tripsina (T) y quimotripsina (C) de péptidos sintéticos cíclicos derivados de los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental IBB1 de soja.

Péptidos sintéticos ^a	K_i (nM) ^b		Actividad inhibidora específica (IU·mg ⁻¹ proteína) ^b	
	T	C	T	C
IBB1 (Tryp)	225 ± 20	ND	3763 ± 298	ND
IBB1 (Tryp-modP ₁)	ND	ND	ND	ND
IBB1 (Chym)	ND	2971 ± 310	ND	48 ± 5
IBB1 (Chym-modP ₁)	ND	ND	ND	ND
IBB1 (Chym-modP ₄)	ND	755 ± 65	ND	292 ± 47
IBB1 ^c	30 ± 4	3 ± 1	2572 ± 122	5691 ± 365

^aLos péptidos cíclicos IBB1 (Tryp) y (Chym) imitan los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina de la proteína parental IBB1 de soja. Los péptidos modificados en la posición P₁ se obtuvieron mediante sustitución de Lys (K), IBB1 (Tryp-modP₁), o Leu (L), IBB1 (Chym-modP₁), por Gly (G). El péptido IBB1 (Chym-modP₄) modificado en la posición P₄ se obtuvo mediante la sustitución de Ala (A) por Pro (P). ^bLas actividades específicas y valores de K_i representan los valores medios ± SD de, al menos, cinco determinaciones independientes. ^cLos datos de inhibición de la proteína parental IBB1 provienen de Clemente *et al.* (2010) (77). ND: no detectado.

En el caso de los péptidos sintéticos derivados de la proteína IBB1 de soja (Tabla 21), se observó un patrón similar al mostrado para los péptidos derivados de TI1. Los péptidos IBB1 (Tryp) e IBB1 (Chym), que imitan a los dominios de inhibición de la proteína parental IBB1 de soja, presentaban los aminoácidos lisina y leucina en la posición P₁ (Tabla 14), confiriéndoles especificidad frente a las enzimas tripsina y quimotripsina. Estos péptidos presentaron valores de 3763 ± 298 TIU·mg⁻¹ de proteína y 48 ± 5 CIU·mg⁻¹ de proteína, respectivamente. Tras comparar sus valores de K_i con respecto a los datos descritos previamente para la proteína parental IBB1 (77), se observó una reducción en la potencia de inhibición de tripsina de 7 veces, IBB1 (Tryp) K_i = 225 nM vs. 30 nM, y una reducción aún más drástica, de tres órdenes de magnitud, para la enzima

quimotripsina, IBB1 (Chym) $K_i = 2971 \text{ nM}$ vs. 3 nM . De manera similar a los péptidos modificados derivados de TI1, la sustitución de los aminoácidos lisina y leucina en posición P_1 por el aminoácido glicina, péptidos IBB1 (Tryp-mod P_1) e IBB1 (Chym-mod P_1), determinó la inactivación de los péptidos frente a las enzimas digestivas tripsina y quimotripsina. La sustitución por prolina del aminoácido alanina en la posición P_4 , en el péptido derivado IBB1 (Chym-mod P_4) consiguió recuperar, al menos de manera parcial, la capacidad de inhibir la enzima quimotripsina, presentando un valor de K_i de 755 nM .

La capacidad de inhibir la enzima tripsina por parte de péptidos cíclicos sintéticos que presentan el aminoácido lisina o arginina en la posición P_1 , así como la capacidad de inhibir la enzima quimotripsina cuando presentan los aminoácidos leucina o tirosina, ha sido descrito previamente (97), tal y como es el caso de los péptidos TI1 (Tryp), TI1 (Chym), IBB1 (Tryp) e IBB1 (Chym). Sin embargo, se observa una disminución en la capacidad de inhibir estas enzimas en comparación con las proteínas parentales. Esto podría ser debido a una mayor tasa de hidrólisis de los péptidos sintéticos por parte de las enzimas a las que inhiben o a posibles requerimientos estructurales adicionales. Secuencias peptídicas más largas que incluyen un segundo puente disulfuro muestran mejoras con respecto a la K_i y/o estabilidad frente a proteólisis (91). La recuperación parcial de la actividad inhibidora frente a la enzima quimotripsina por parte del péptido IBB1 (Chym-mod P_4) podría ser debido a la estructura del aminoácido prolina, el cual influye de manera significativa en la estructura proteica. Al igual que en las proteínas parentales, modificaciones en la posición P_1 son responsables de cambios en la especificidad por la enzima diana, pudiendo resultar en formas inactivas. En esta tesis doctoral se demuestra que un inhibidor derivado de TI1, obtenido mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante, en el que se sustituye el aminoácido de la posición P_1 por glicina (rTI1_{inactivo}), resulta inactivo frente a las enzimas tripsina y quimotripsina (**apartado 4.1.7**). Del mismo modo, los péptidos TI1 (Tryp-mod P_1), TI1 (Chym-mod P_1), IBB1 (Tryp-mod P_1) e IBB1 (Chym-mod P_1), los cuales presentan el aminoácido glicina en la posición P_1 , no presentan actividad frente a estas enzimas.

Tal y como está descrito anteriormente, la ciclación de los péptidos sintéticos mediante un puente disulfuro entre dos moléculas de cisteína es necesaria a la hora de ejercer su actividad inhibidora. La incapacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina por parte de los péptidos lineales TI1 (Tryp-lineal) y TI1 (Chym-lineal) está en concordancia con los resultados obtenidos en otros estudios en los que los péptidos lineales presentaban actividad prácticamente nula frente a estas enzimas (95). El puente disulfuro parece ser necesario para organizar la estructura del péptido,

aunque la proteína parental sea capaz de ejercer actividad inhibitoria en ausencia del mismo (240). El péptido cíclico SFTI-1, que se encuentra de manera natural en semillas de girasol, es un potente inhibidor de enzimas como tripsina (106) y catepsina G (104). Su estructura incluye 9 aminoácidos unidos mediante un puente disulfuro, similar a la secuencia utilizada como molde a la hora de construir péptidos cíclicos sintéticos, unidos a 7 aminoácidos que parecen aportar una mayor rigidez estructural, consiguiendo obtener valores de K_i de hasta 0.1 nM frente a la enzima tripsina (104).

4.3.3 Propiedades anti-proliferativas de péptidos cíclicos sintéticos en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano

Los efectos anti-proliferativos de las proteínas BBI parentales, rTI1 e IBB1 (77), y de los péptidos cíclicos derivados se evaluaron en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano, tras un tratamiento de 96 h con concentraciones en el rango de 15-92 μM y 103-615 μM , respectivamente. Utilizando como control células que se cultivaron en ausencia de proteínas parentales y/o péptidos derivados, los efectos anti-proliferativos se monitorizaron a través de la tinción vital con RN, tal y como está descrito en el apartado 3.29.1. Tanto la proteína parental rTI1 (**Figura 56 A**), expresada de manera recombinante en la levadura *P. pastoris* (apartado 4.1), como la proteína IBB1 de soja (**Figura 57 A**), purificada a partir de una mezcla de inhibidores de soja comercial (77), redujeron de manera significativa el crecimiento de las células HT29, siendo su efecto dosis-dependiente. Por el contrario, los péptidos cíclicos derivados de TI1 (**Figura 56 B**) e IBB1 (**Figura 57 B**) que presentaban inhibición frente a las enzimas tripsina y quimotripsina [TI1 (Tryp), TI1 (Chym), IBB1 (Tryp) e IBB1 (Chym)], así como el péptido con el aminoácido modificado de la posición P_+ , IBB1(Chym-mod P_+), no mostraron actividad anti-proliferativa alguna, incluso a las concentraciones más elevadas (615 μM). A su vez, los péptidos cíclicos inactivos en los que se había sustituido el aminoácido de la posición P_1 por glicina [TI1 (Tryp-mod P_1), TI1 (Chym-mod P_1), IBB1 (Tryp-mod P_1) e IBB1 (Chym-mod P_1)] tampoco presentaron capacidad de inhibir el crecimiento celular de células HT29.

Mediante la utilización de agentes reductores y alquilantes, proteínas BBI de soja pierden su conformación nativa, disminuyendo así su capacidad de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina y, como consecuencia, desaparece la capacidad que presentan de inhibir la proliferación de células cancerígenas (77). De forma similar ocurre con el inhibidor inactivo

derivado de TI1 obtenido en esta tesis doctoral (**apartado 4.1.9.1**) salvo que, en este caso, el inhibidor mantiene su conformación nativa. Estos datos sugieren que la capacidad de las proteínas BBI de ejercer actividad anti-proliferativa de células cancerígenas de colon está relacionada con su capacidad intrínseca de inhibir serín proteasas. Por tanto, la disminución en los valores de K_i frente a las enzimas tripsina y quimotripsina por parte de los péptidos cíclicos sintéticos TI1 (Tryp), TI1 (Chym), IBB1 (Tryp), IBB1 (Chym) e IBB1(Chym-modP₄), con respecto a las proteínas parentales, podrían explicar, al menos parcialmente, su incapacidad de inhibir la proliferación celular de células HT29.

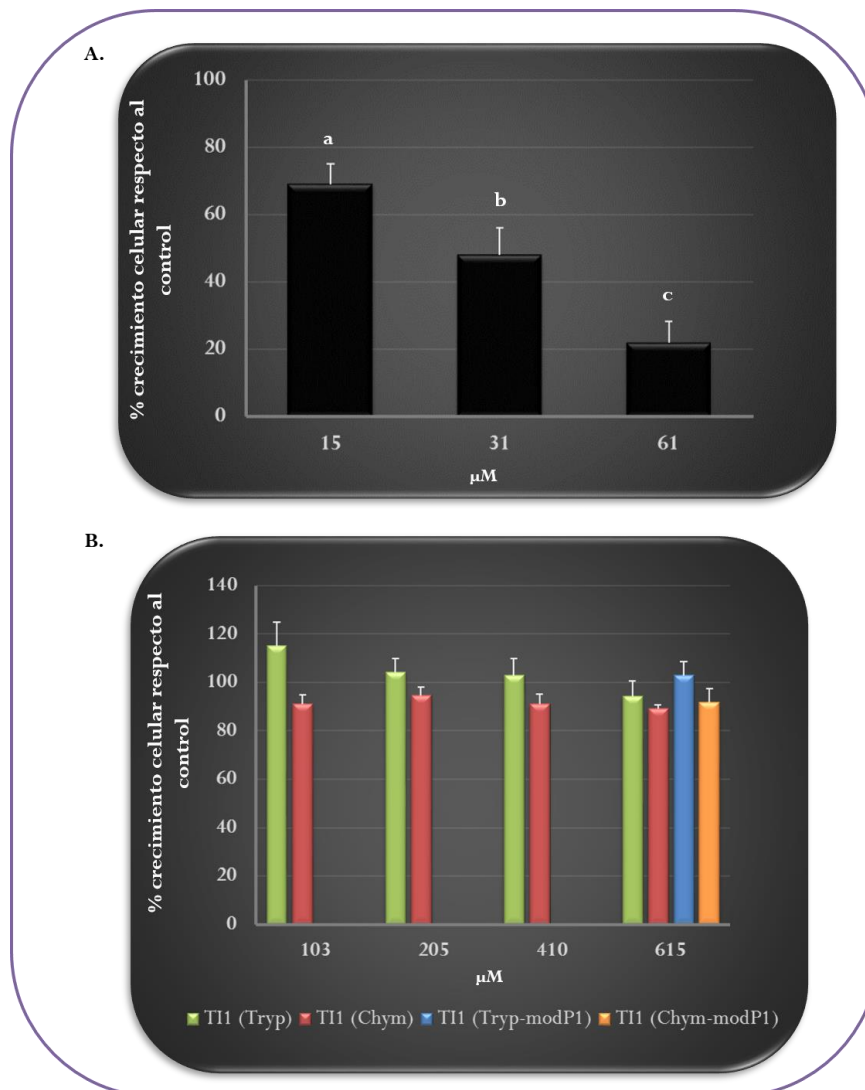


Figura 56. Efecto de la proteína rTI1 (A) y sus péptidos derivados (B), que imitan a los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina, sobre el crecimiento *in vitro* de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano. El medio de crecimiento se suplementó con concentraciones de rTI1 (15-92 μM) o péptidos sintéticos (100-615 μM), siendo las células tratadas durante un periodo de 96 h. Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno con cuatro replicados técnicos. Los valores medios de los péptidos evaluados no demostraron diferencia significativa ($P < 0.05$; test de Bonferroni).

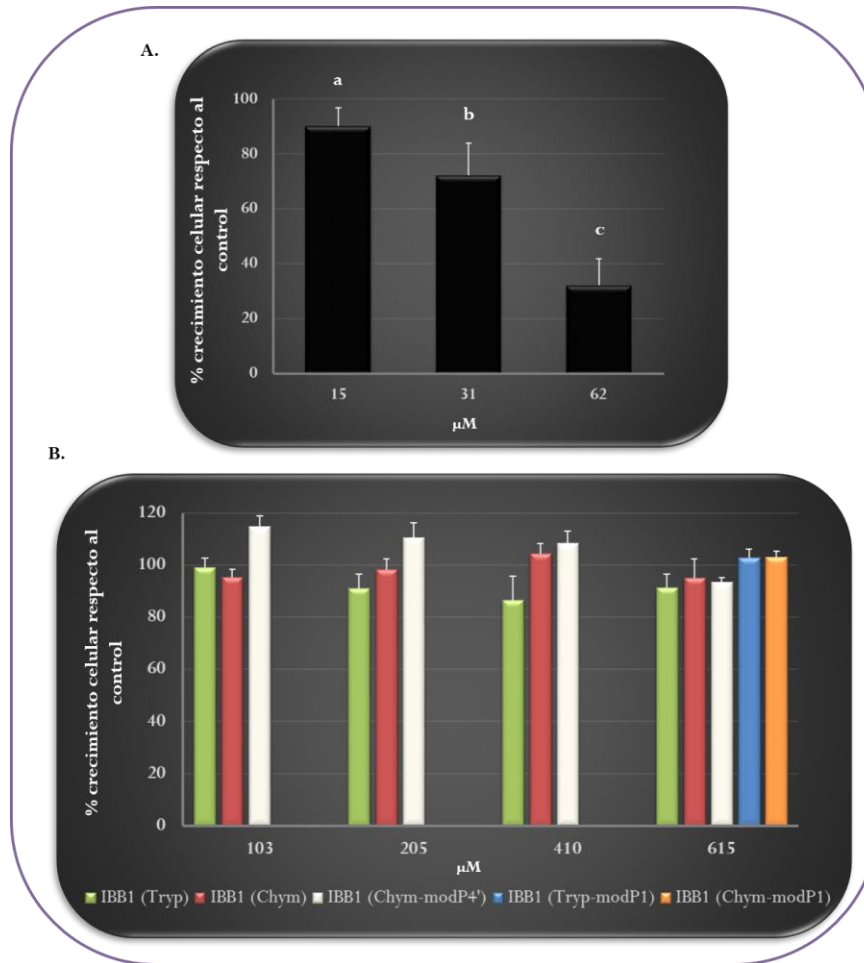


Figura 57. Efecto de la proteína IBB1 de soja (A) y sus péptidos derivados (B), que imitan a los dominios de inhibición de tripsina y quimotripsina, sobre el crecimiento *in vitro* de células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano. El medio de crecimiento se suplementó con concentraciones de IBB1 (15-92 µM) o péptidos sintéticos (100-615 µM), siendo las células tratadas durante un periodo de 96 h. Los datos son la media de dos experimentos independientes, cada uno con cuatro replicados técnicos. Los valores medios de los péptidos evaluados no demostraron diferencia significativa ($P < 0.05$; test de Bonferroni).

4.4 PROTEÍNAS BOWMAN-BIRK PRESENTES EN LECHEs DE SOJA COMERCIALES

4.4.1 Purificación de proteínas BBI mediante cromatografía de intercambio catiónico

Anteriormente en nuestro laboratorio demostramos mediante cromatografía, electroforesis y análisis de huella peptídica que una mezcla comercial de proteínas Bowman-Birk de soja estaba compuesta tanto de IBB1 como de IBBD2 con una divergencia importante en la secuencia de aminoácidos dentro de los dominios activos (**Tabla 13**) (77). En esta tesis doctoral, con el fin de caracterizar individualmente cada uno de los inhibidores de soja, se partió de una mezcla comercial que contenía purificados los isoinhibidores BBI de soja, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI). Esta mezcla de inhibidores de proteasas se fraccionó en una columna de intercambio catiónico (**apartado 3.19.3.1**) y el perfil de elución se monitorizó mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.1**) y CIA (**apartado 3.24.2.1**) (**Figura 58**).

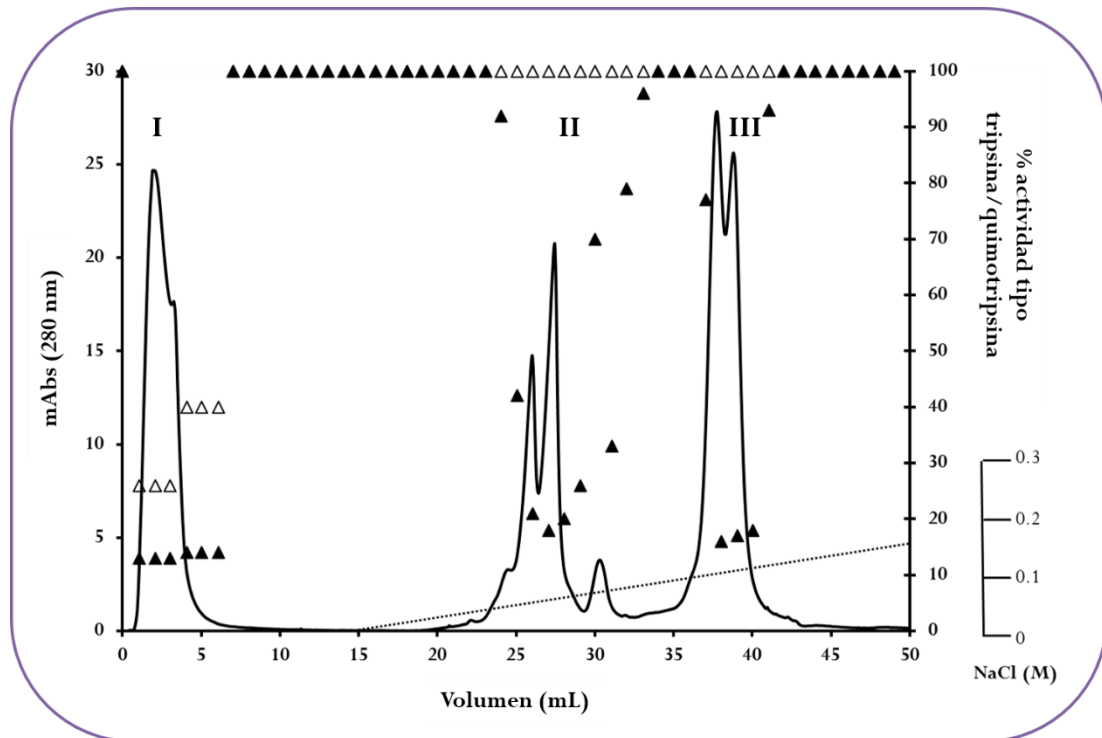


Figura 58. Perfil de elución de una mezcla de isoinhibidores Bowman-Birk, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL. La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.16 M) durante la elución queda indicado con línea continua y punteada, respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina (▲) y quimotripsina (Δ) se evaluó en cada fracción, utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTEE, respectivamente.

Tal y como se muestra en la **Figura 58**, se identificaron tres picos cromatográficos mayoritarios con actividad inhibidora de proteasas, los cuales se denominaron picos I, II y III, según su orden de elución en la cromatografía de intercambio catiónico. El pico I, que contenía proteínas con capacidad de inhibir tripsina y quimotripsina, no se retuvo en columna a pH 4.4. Los picos II y III, mostrando exclusivamente actividad inhibidora frente a la enzima tripsina, eluyeron en un rango de 0.05-0.08 M NaCl y 0.11-0.14 M NaCl, respectivamente.

4.4.2 Identificación de proteínas BBI y KTI de soja mediante análisis de huella peptídica

Con el fin de confirmar la autenticidad de los picos cromatográficos obtenidos mediante cromatografía de intercambio catiónico (**apartado 4.4.1**), los picos I, II y III se analizaron mediante PAGE-SDS (**Figura 59**), tras someter las muestras a un proceso de reducción y alquilación (**apartado 3.26**). Los picos I y II presentaron una masa molecular estimada en el rango de 10-12 kDa mientras que el pico III mostró una única banda electroforética de 21 kDa, en concordancia con las bandas electroforéticas que presentaba la mezcla inicial.

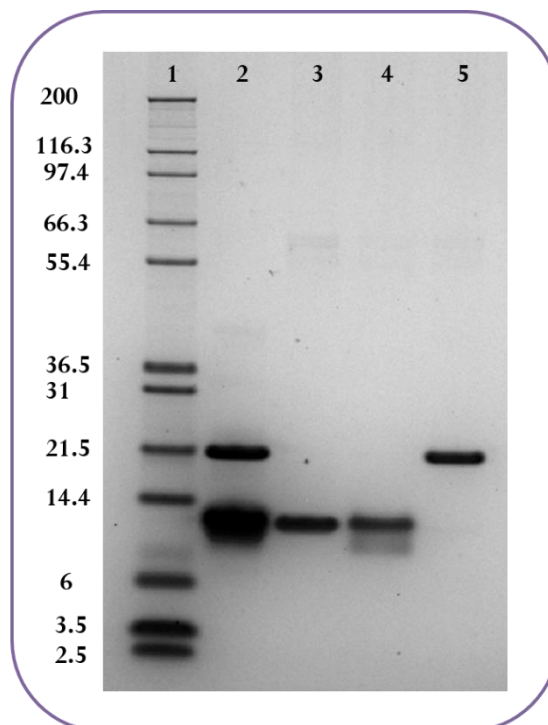


Figura 59. PAGE-SDS bajo condiciones desnaturalizantes de la mezcla de IBB1, IBBD2 y KTI (calle 2) y los picos cromatográficos I (calle 3), II (calle 4) y III (calle 5) tras cromatografía de intercambio catiónico. Los marcadores de peso molecular están localizados en la calle 1.

Las bandas electroforéticas se sometieron a una digestión *in gel* frente a la enzima tripsina, seguido de la separación de los péptidos generados y posterior análisis de sus masas peptídicas con el fin de realizar análisis de huella peptídica (**apartado 3.27**). La búsqueda de masas peptídicas a través de una base de datos de secuencia de proteínas permitió la identificación de las proteínas IBB1 (entrada Swiss-Prot: IBB1_SOYBN), IBBD2 (entrada Swiss-Prot: IBBD2_SOYBN) y Kunitz (entrada Swiss-Prot: 1BA7_A) (**Tabla 22**), correspondientes a los picos I, II y III (**Figura 58**), respectivamente, siendo los porcentajes de identificación de la secuencia de aminoácidos 52%, 86% y 72%, respectivamente.

Tabla 22. Identificación de los inhibidores Bowman-Birk de soja mayoritarios, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz de soja. Los números de acceso de IBB1 (GI: 157830209), IBBD2 (GI: 350045) y KTI (GI: 3318877) pertenecen a la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com>).

Pico	Proteína	Número de acceso (NCBI)	Entrada Swiss-Prot	Porcentaje de identificación	Péptidos identificados	Puntuación ^a
I	Inhibidor de proteasas Bowman-Birk	GI: 157830209	1BBI_A	52	3	123
II	Inhibidor de proteasas Bowman-Birk tipo D-II	GI: 350045	IBBDII	86	5	228
III	Inhibidor A de tripsina (tipo Kunitz)	GI: 3318877	1BA7_A	72	16	775

^aPuntuaciones superiores a 57 fueron significativas para su identificación ($P < 0.05$).

Tal y como se muestra en la **Tabla 23**, la secuencia de aminoácidos de las proteínas Bowman-Birk, IBB1 e IBBD2 (picos I y II, respectivamente), mostró la presencia de catorce cisteínas en posiciones conservadas, tal y como está descrito anteriormente (77). IBB1 presentó los aminoácidos lisina (Lys¹⁶) y leucina (Leu⁴²) en la posición P₁ del primer y segundo dominio de inhibición, los cuales dan especificidad frente a las enzimas del tipo tripsina y quimotripsina, respectivamente. Los dominios de inhibición de IBBD2 presentaron una menor variación en la secuencia de aminoácidos, siendo prácticamente idéntica a excepción de las posiciones P₂ y P₄, encontrándose el aminoácido arginina en la posición P₁ de ambos dominios de inhibición (Arg²⁴; Arg⁵¹), confiriendo por tanto especificidad frente a proteasas del tipo tripsina. Estos datos

concuerdan con los datos obtenidos por Clemente *y col.* (2010) (77), tras la separación de isoformas BBI de una mezcla comercial de inhibidores de soja mediante RP-HPLC.

Tabla 23. Determinación de la secuencia de aminoácidos deducida por huella peptídica de las isoformas Bowman-Birk de soja, IBB1 e IBBD2. Las secuencias de aminoácidos de los dominios de inhibición están subrayadas. P₁-P₁' (en negrita) son las posiciones que corresponden al sitio reactivo de los inhibidores. K (Lys) y R (Arg) en la posición P₁ determina especificidad frente a la enzima tripsina, mientras que L (Leu) determina especificidad frente a quimotripsina. Las secuencias de péptidos identificadas se encuentran en cursiva.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----
IBB1_	-----DDESSKPCCDQCACT KS NPPQCRCSDMRLNSCHSACKSCIC LS YPAQCFVCDITDFCYEPCCKPSEDDKEN
SOYBN	
IBBD2_	SDQSSSYDDDEYSKPCCDLCMCT RS MPPQCSCEDIRLNSCHSDCKSCMCT RS QPGQCRCLDTNDFCYKPKCSRDD----
SOYBN	
	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----

4.4.3 Caracterización funcional de proteínas BBI de soja

Los picos I, II y III, identificados como IBB1, IBBD2 y KTI (**apartado 4.4.2**), se analizaron mediante medidas de TIA (**apartado 3.24.1.2**) y CIA (**apartado 3.24.2.1**). IBB1 resultó ser un potente inhibidor de tripsina y quimotripsina, mientras que IBBD2 solo fue capaz de inhibir la enzima tripsina (**Tabla 24**). IBB1 mostró una actividad específica frente a las enzimas tripsina y quimotripsina de 3828 ± 209 TIU·mg⁻¹ de proteína y 2917 ± 292 CIU·mg⁻¹ de proteína, respectivamente, mientras que IBBD2 únicamente inhibió la enzima tripsina (4819 ± 101 TIU·mg⁻¹ de proteína), mostrando una actividad específica superior a IBB1 frente a esta serín proteasa. Estas diferencias significativas reflejan la variación en la secuencia de aminoácidos dentro de los dominios de inhibición, la cual es determinante en cuanto a especificidad y potencia (32). KTI mostró una menor actividad específica, comparada con las proteínas BBI, frente a la enzima tripsina (2147 ± 105 TIU·mg⁻¹ de proteína) y una actividad específica prácticamente nula frente a quimotripsina (78 ± 5 CIU·mg⁻¹ de proteína). Tanto la proteína IBBD2 de soja como el mutante derivado de TI1 de guisante, rTI1_{Tryp-Tryp}, obtenido mediante mutagénesis dirigida por PCR solapante en esta tesis doctoral (**apartado 4.1.2.2**), presentan dos dominios de inhibición de tripsina, siendo en ambos casos su actividad específica frente a la enzima tripsina superior con respecto a IBB1 (**Tabla 24**) y rTI1 (**Tablas 17**), los cuales presentan un dominio de inhibición frente a tripsina y otro frente a quimotripsina.

Tabla 24. Actividad inhibidora específica frente a las enzimas tripsina (TIA) y quimotripsina (CIA) de los inhibidores Bowman-Birk de soja mayoritarios, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) de soja. Las actividades específicas representan la media \pm desviación estándar de, al menos, tres determinaciones independientes. P₁-P₁', el sitio activo de enlace, está marcado en negrita. K (Lys) o R (Arg) en la posición P₁ determina especificidad por tripsina, mientras que L (Leu) determina especificidad frente quimotripsina.

	Secuencia de aminoácidos de los dominios de inhibición		Actividad inhibidora específica (IU·mg ⁻¹ proteína)	
	Dominio 1	Dominio 2	T	C
IBB1	CTKSNPPQC	CALSYPAQC	3828 \pm 209	2917 \pm 292
IBBD2	CTRSMPQC	CTRSQPGQC	4819 \pm 101	ND
KTI	SPYRIR	-	2147 \pm 105	78 \pm 5

ND: no detectado.

4.4.4 Cuantificación de proteínas BBI en leches de soja comerciales

Los inhibidores BBI, en su forma activa, han demostrado en modelos preclínicos ser capaces de ejercer sus propiedades anti-cancerígenas y anti-inflamatorias (84). Sin embargo, no existen hasta la fecha estudios sobre la evaluación cuantitativa de las distintas isoformas BBI en leches de soja comerciales. El objetivo de este estudio fue desarrollar una metodología adecuada que combinara la separación de los inhibidores de serín proteasas mediante cromatografía de intercambio catiónico junto con determinaciones enzimáticas de TIA y CIA, con el fin de cuantificar la cantidad de inhibidores BBI, IBB1 e IBBD2, en forma activa, presentes en leches de soja comerciales, que pudiera ejercer efectos beneficiosos en la salud de los consumidores. La separación cromatográfica de las distintas isoformas procedentes de una mezcla comercial de inhibidores de soja, nos permitió evaluar cuantitativamente la presencia de dichas isoformas en seis leches de soja comerciales, denominadas SM1-SM6, que se analizaron mediante cromatografía de intercambio catiónico, tal y como está descrito en el **apartado 3.19.3.2**. El perfil de elución obtenido (**Figura 60**), monitorizado mediante medidas de TIA y CIA, fue similar al revelado en la mezcla comercial de inhibidores de proteasas de soja tras cromatografía de intercambio catiónico (**Figura 58**). Los tres picos cromatográficos revelados, denominados picos I_{SM}, II_{SM} y III_{SM} según el orden de elución en la cromatografía de intercambio catiónico, se analizaron mediante PAGE-SDS (**apartado 3.26**), para su identificación mediante huella peptídica (**apartado 3.27**) (**Figura 61**). El perfil electroforético, así como las masas moleculares estimadas fueron similares a los obtenidos para la mezcla de inhibidores de soja, correspondiendo los picos I_{SM}, II_{SM} y III_{SM} a los inhibidores IBB1, IBBD2 y KTI, respectivamente.

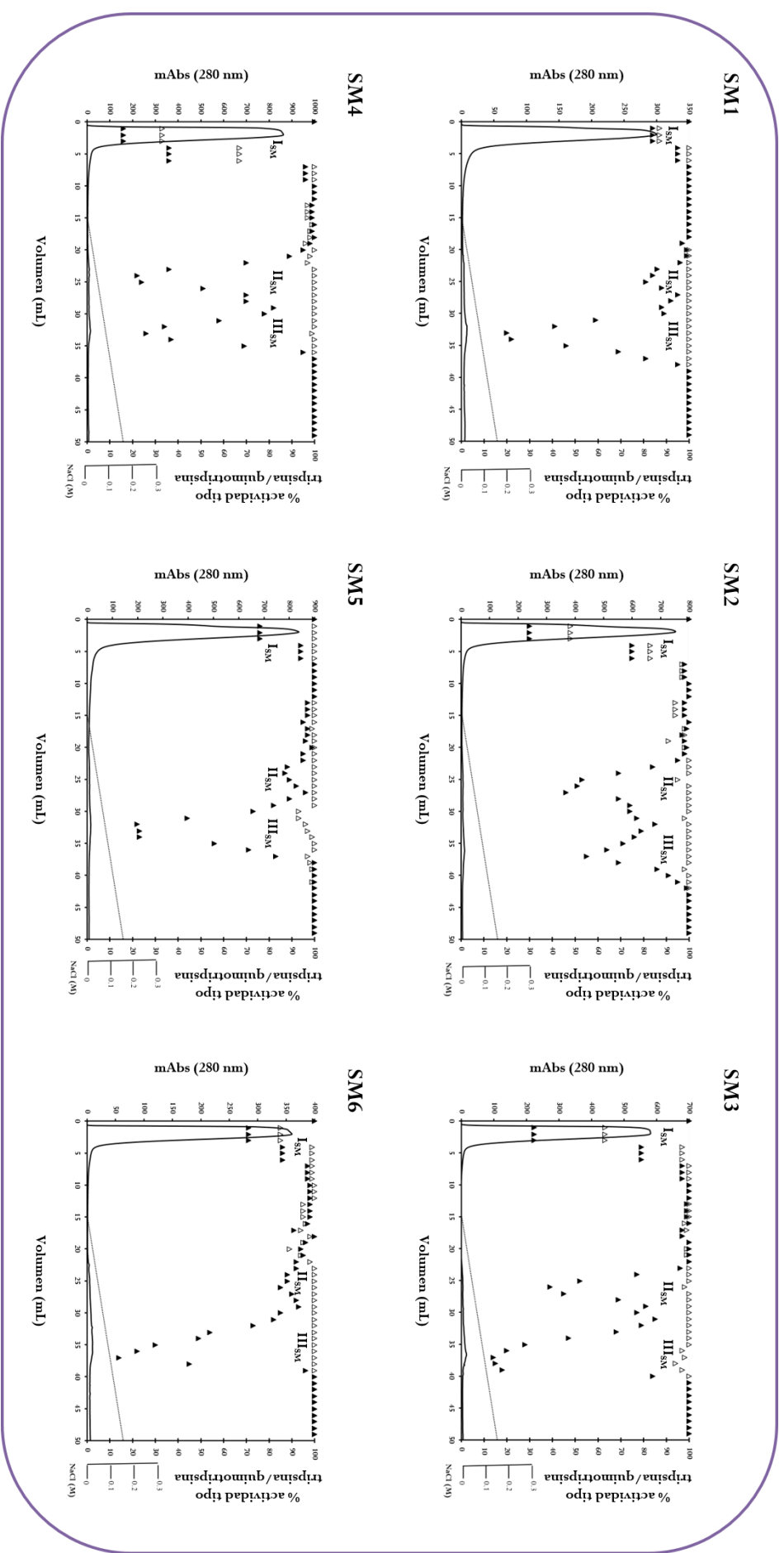


Figura 60. Perfil de elución de inhibidores de proteasas procedente de leches de soja comerciales (SM1-SM6) en una columna de intercambio catiónico MonoS 5/50 GL. La absorbancia a 280 nm y el gradiente de NaCl (0-0.16 M) durante la elución queda indicado con línea continua y punteada, respectivamente. La actividad inhibidora de tripsina (▲) y quimotripsina (▼) se evaluó en cada fracción, utilizando los sustratos específicos BAPNA y BTEE, respectivamente.

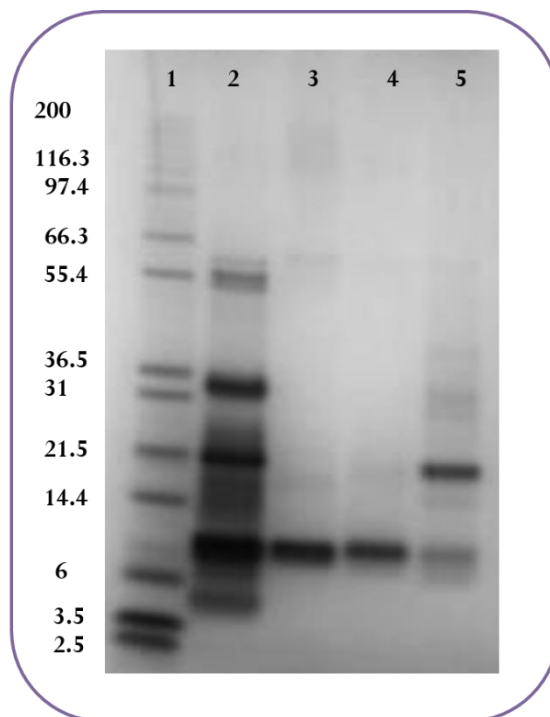


Figura 61. PAGE-SDS bajo condiciones desnaturizantes de SM4 (calle 2) y los picos cromatográficos I_{SM} (calle 3), II_{SM} (calle 4) y III_{SM} (calle 5) que contienen inhibidores de proteasas. Los marcadores de peso molecular están localizados en la calle 1.

Las medidas de actividad inhibidora de tripsina, determinadas en el **apartado 4.4.3**, se utilizaron para estimar el contenido en inhibidores de proteasas (IBB1, IBBD2 y KTI) en las leches de soja comerciales (**Tabla 25**). Las concentraciones de IBB1 e IBBD2, entre las distintas leches de soja SM1-SM6, variaron dentro de los intervalos 0.44-5.20 y 0.27-4.60 mg por cada 100 mL de leche de soja, respectivamente. La cantidad total de BBI, considerada como la suma de los inhibidores IBB1 e IBBD2, equivale a valores en el rango 0.59-9.18 mg BBI por cada 100 mL de leche de soja. KTI se encuentra en un rango de concentraciones entre 1.82-5.50 mg por cada 100 mL de leche de soja. Los valores obtenidos en esta tesis doctoral de acuerdo con la cantidad de BBI en forma activa presente en distintas leches de soja comerciales difieren de los valores obtenidos mediante determinación inmunológica (241), en los que se determinó una concentración de BBI en leches de soja entre 7.2-55.9 mg por cada 100 ml de leche de soja (215). Esto puede ser debido a que, si bien los inmunoensayos son capaces de reconocer de manera específica a los inhibidores BBI, son incapaces de distinguir entre formas activas e inactivas de la proteína. Sin duda, la falta de anticuerpos comerciales específicos para estas proteínas dificulta de manera considerable su cuantificación en productos de soja.

Tabla 25. Actividad inhibidora de tripsina (TIA) y quimotripsina (CIA), y determinación cuantitativa de los isoINHIBIDORES Bowman-Birk de soja, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina tipo Kunitz (KTI) en seis leches de soja comerciales (SM1-SM6). Los valores representan la media \pm desviación estándar de, al menos, tres determinaciones independientes. Los datos cuantitativos de los inhibidores de proteasas individuales se calcularon teniendo en cuenta sus actividades inhibidoras específicas frente a la enzima tripsina (ver **Tabla 24**).

Leche de soja comercial	TIA total	CIA total	IBB1 (mg)	IBBD2 (mg)	BBI total ^a (mg)	KTI (mg)
SM1	6853 \pm 1727	2857 \pm 382	0.44 \pm 0.08	0.27 \pm 0.05	0.71 \pm 0.14	1.82 \pm 0.58
SM2	50857 \pm 4895	15356 \pm 1308	4.63 \pm 0.62	4.44 \pm 0.71	9.07 \pm 1.18	5.50 \pm 0.39
SM3	11858 \pm 1630	4913 \pm 305	1.11 \pm 0.15	0.67 \pm 0.15	1.77 \pm 0.23	1.98 \pm 0.20
SM4	43295 \pm 6012	14368 \pm 2888	5.20 \pm 0.82	3.54 \pm 0.46	8.74 \pm 1.25	2.96 \pm 0.17
SM5	8495 \pm 1364	8495 \pm 171	0.49 \pm 0.03	0.11 \pm 0.03	0.60 \pm 0.05	2.84 \pm 0.48
SM6	12839 \pm 1408	3198 \pm 251	0.80 \pm 0.11	0.33 \pm 0.04	1.12 \pm 0.11	3.74 \pm 0.44

^aBBI total es la suma de IBB1 e IBBD2.

El efecto protector que ejercen las proteínas BBI frente a procesos inflamatorios y desarrollo tumoral ha sido atribuido específicamente a su capacidad intrínseca de inhibir serín proteasas (9,16), ya que formas inactivas de las proteínas no son capaces de inhibir la proliferación celular de células cancerígenas de colon (77). En esta tesis doctoral, hemos demostrado que un inhibidor BBI inactivo cuya estructura no se ve modificada por agentes reductores y alquilantes (rTII_{inactivo}), expresado de forma recombinante en *P. pastoris*, no ejerce efecto anti-proliferativo alguno en células procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano (**apartado 4.1.9.1**). Por tanto, es esencial evaluar la cantidad de inhibidores BBI presentes en productos derivados de la soja, en forma activa, que pudieran ejercer efectos beneficiosos para la salud de los consumidores.

Mediante la separación cromatográfica de las dos isoformas BBI mayoritarias de soja, IBB1 e IBBD2, y el inhibidor de tripsina de soja tipo Kunitz en las leches de soja comerciales, hemos podido determinar la actividad inhibidora de tripsina específica de los distintos inhibidores de manera individual. Existen diferencias en las concentraciones de los mismos en las distintas muestras analizadas. Esto puede ser debido a las variedades de soja utilizadas, así como al procesamiento al que han sido sometidas. Dado que los efectos beneficiosos de las proteínas BBI de soja han demostrado ser dosis-dependientes, las diferencias que existen tanto a nivel cualitativo como

cuantitativo en las distintas leches de soja podrían tener efectos fisiológicos relevantes, lo cual debería analizarse en profundidad. El tratamiento térmico que se lleva a cabo en los productos derivados de la soja con el fin de disminuir la actividad inhibidora de tripsina influirá sobre la cantidad de inhibidores BBI que permanezcan activos al final de la cadena de procesado.

4.4.5 Determinación de indicadores de la reacción de Maillard en seis leches de soja comerciales

La producción de leche de soja a nivel industrial incluye dos tratamientos térmicos principales, uno durante la etapa de cocción de las semillas de soja y otro durante la esterilización de la leche de soja. Con el fin de determinar si la calidad nutricional de la leche de soja se ve afectada por el tratamiento térmico, se evaluó la extensión de la reacción de Maillard (RM) de seis leches de soja comerciales (SM1-SM6) mediante el análisis de furosina e hidroximetilfurfural (HMF) (Tabla 26), indicadores de las etapas inicial e intermediarias de la RM, respectivamente, tal y como se describe en el apartado 3.21.

Tabla 26. Presencia de los indicadores de la reacción de Maillard (RM), furosina e hidroximetilfurfural (HMF), en leches de soja comerciales (SM1-SM6). Los valores representan la media \pm desviación estándar de, al menos, tres determinaciones independientes ($P < 0.05$; test de Levene).

Leche de soja comercial	Furosina (mg·L ⁻¹)	HMF (mg·L ⁻¹)
SM1	96.2 \pm 1.2 ^a	ND ^a
SM2	24.7 \pm 1.3 ^b	ND ^a
SM3	84.3 \pm 2.0 ^c	ND ^a
SM4	31.2 \pm 3.3 ^d	0.011 \pm 0.002 ^b
SM5	87.5 \pm 2.9 ^c	ND ^a
SM6	76.4 \pm 2.1 ^c	0.024 \pm 0.003 ^c
media	66.7 \pm 30.8	0.006 \pm 0.001

ND: no detectado.

El contenido en furosina de las leches de soja comerciales variaba dentro de los intervalos 24.7-96.2 mg·L⁻¹ de leche de soja, con un valor medio de 66.7 mg·L⁻¹. Estos datos están en concordancia con los publicados previamente por Toro-Funes *y col.* (2015) (213), los cuales alcanzaban valores de 29.8 mg·L⁻¹ de leche de soja tras tratamiento a 80 °C durante 20 min, 54 mg·L⁻¹ tras el proceso de esterilización UHT, y hasta 100 mg·L⁻¹ tras un almacenamiento a

temperatura ambiente durante cuatro meses (213). Un contenido similar también ha sido encontrado en leche de vaca ($2\text{-}150\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (220). Las proteínas de soja son ricas en aminoácidos esenciales como la lisina, la cual tiene un papel importante en la RM, incluso en ausencia de tratamiento térmico (205), por lo que el contenido en furosina podría ser utilizado como un indicador durante el proceso de elaboración de leche de soja, con el fin de analizar la calidad nutricional de la misma. Sin embargo, el análisis de HMF no fue de utilidad, ya que solo dos de las seis muestras de leche de soja analizadas presentaban HMF en cantidades cuantificables, presentando menos de $0.025\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de leche de soja y, en ambos casos, los valores fueron menores a los reportados previamente en leche de vaca ($0.2\text{-}1500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) (242). La posible ausencia de azúcares reductores en el producto final podría explicar la ausencia o casi nula cantidad de HMF analizada en las leches de soja comerciales. En estas, el azúcar se añade antes del proceso de esterilización mientras que, la leche de vaca, contiene lactosa de manera natural, siendo por tanto más favorable la presencia de HMF.

Dadas las diferencias tanto en la actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina (**Tabla 25**), como en el contenido en furosina de las leches de soja comerciales (**Tabla 26**), se analizó la correlación lineal entre ambos parámetros en leches de soja. Tal y como se muestra en la **Figura 62 (A)**, existe una correlación lineal significativa ($P < 0.05$) de 0.9779 y 0.9925 para el contenido en furosina con respecto a TIA y CIA, respectivamente. Puesto que las proteínas BBI podrían verse afectadas por procesos de glicosilación durante el tratamiento térmico de las leches de soja, un sistema modelo de BBI, detallado en el **apartado 3.20**, se sometió a tratamiento térmico ($120\text{ }^{\circ}\text{C}$) en presencia o ausencia de glucosa durante 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos. Tal y como se muestra en la **Figura 62 (B)**, el comportamiento de BBI fue similar al obtenido en leches de soja comerciales, ya que cuanto mayor era la concentración de furosina menor era la actividad inhibidora de las enzimas tripsina o quimotripsina, obteniendo una correlación de 0.9924 y 0.9859 para el contenido en furosina con respecto a TIA y CIA, respectivamente. Sin embargo, no se observó ningún cambio en el contenido de furosina o TIA-CIA cuando BBI se sometía a tratamiento térmico en ausencia de glucosa.

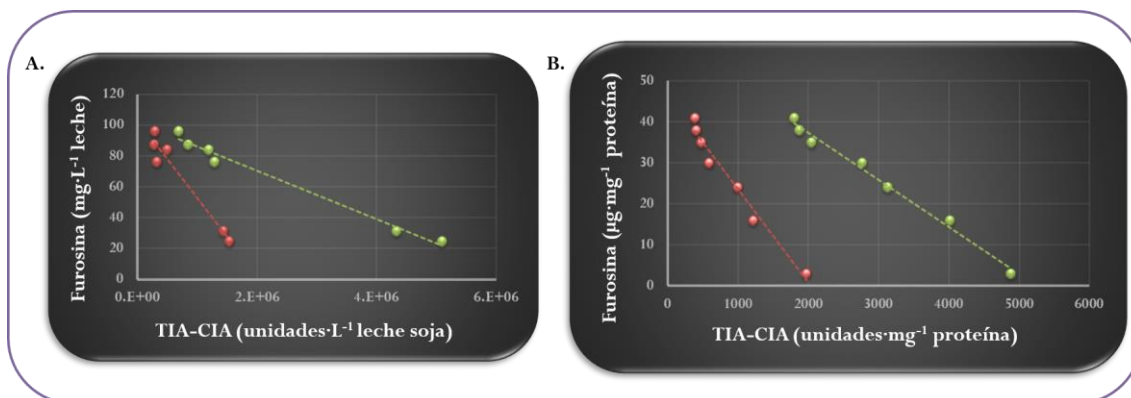
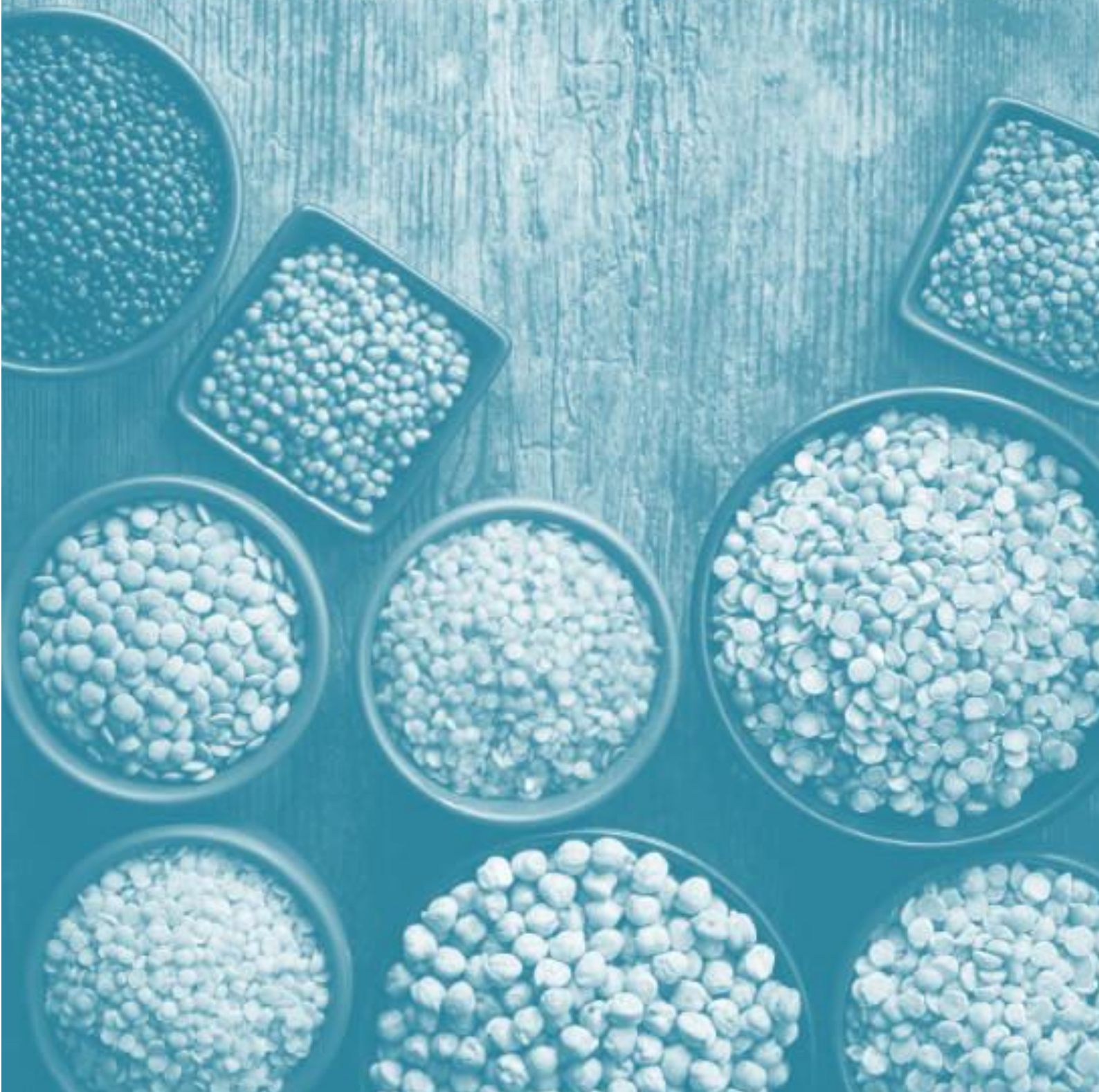


Figura 62. Correlación lineal entre el contenido de furosina y la actividad inhibidora de tripsina (\blacktriangle) y quimotripsina (Δ) en leches de soja comerciales (A) y sistemas modelo de BBI sometidos a tratamiento térmico a 120 °C durante 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos en presencia de glucosa (B). Los valores representan la media \pm desviación estándar de, al menos, tres determinaciones independientes (correlación lineal Pearson, $P < 0.05$).

Aunque las proteínas BBI han demostrado ser resistentes frente a condiciones de elevada temperatura y un amplio rango de pH, la glicación de la lisina que se encuentra en la posición P₁ del dominio de inhibición de tripsina de proteínas BBI de soja podría afectar a la capacidad inhibidora de la proteína; sin embargo, aún no está claro como esta glicación podría afectar a la actividad inhibidora de quimotripsina.

5. *CONCLUSIONES*








5.1 CONCLUSIONES

- Con el sistema de expresión *Pichia pastoris*, hemos sido capaces de expresar proteínas ricas en puentes disulfuro tales como las proteínas Bowman-Birk. El inhibidor rTI1 ha demostrado ser capaz de inhibir las enzimas tripsina y quimotripsina y, mediante mutaciones en su secuencia, se han obtenido inhibidores con dominios de inhibición idénticos de tripsina (rTI1_{Tryp-Tryp}) y quimotripsina (rTI1_{Chym-Chym}), los cuales han demostrado ser potentes inhibidores de estas enzimas, respectivamente, así como un inhibidor inactivo sin actividad inhibidora de las mismas.
- Tanto rTI1 como rTI1_{Tryp-Tryp} y rTI1_{Chym-Chym}, fueron capaces de internalizar en células HT29 procedentes de adenocarcinoma colorrectal humano y ejercer un efecto anti-proliferativo de manera dosis-dependiente. Sin embargo, el mutante rTI1_{inactivo}, aun siendo capaz de internalizar en células HT29, no afectó a la viabilidad de las mismas. De este modo, se relaciona de manera directa la capacidad de ejercer efectos anti-proliferativos con la capacidad intrínseca que presentan las proteínas Bowman-Birk de inhibir serín proteasas. Ni la proteína rTI1 ni su mutante derivado inactivo influyeron en la proliferación celular de células fibroblásticas de colon no cancerígenas CCD18-Co.
- Mediante metodología TILLING, se realizaron mutaciones puntuales en la secuencia de la proteína TI1, con las cuales se puede determinar que (1) el puente disulfuro (C⁸-C¹²) es esencial para la actividad inhibidora de proteasas; (2) la serina presente de forma conservada en la posición P₁ en el dominio de inhibición C-terminal es esencial para inhibir la enzima quimotripsina; y (3) el cambio de carga en el extremo C-terminal no influye en la actividad inhibidora pero modifica el perfil de oligomerización de TI1.
- Los péptidos sintéticos que imitan a los dominios de inhibición de las proteínas BBI, TI1 e IBB1, de guisante y soja, respectivamente, presentan menor actividad inhibidora de tripsina y quimotripsina con respecto a sus proteínas parentales y, a su vez, no son capaces de ejercer efectos proliferativos en células HT29.
- La cantidad de inhibidores BBI de soja, IBB1 e IBB2, presentes en forma activa en leches de soja comerciales parece ser relevante para ejercer sus propiedades beneficiosas para a salud. El contenido en furosinas puede ser utilizado como indicador para monitorizar tanto el

tratamiento térmico como los efectos sobre la actividad inhibidora de proteasas en leches de soja, dada la relación directa entre daño térmico y actividad inhibidora de proteasas por parte de los inhibidores Bowman-Birk.

CONCLUSIONS

-  *Pichia pastoris* has been used as heterologous system to express disulphide-bonded proteins like Bowman-Birk inhibitors and derivative mutants. rTI1, a major pea protease iso-inhibitor, has proved to be active against both trypsin and chymotrypsin. Novel engineered mutants with identical inhibitory domains, rTI1_{Tryp-Tryp} and rTI1_{Chym-Chym}, were potent inhibitors of trypsin and chymotrypsin, respectively. However, an inactive mutant was unable to inhibit both serine proteases.
-  rTI1 as well as rTI1_{Tryp-Tryp} and rTI1_{Chym-Chym} mutants were internalised by HT29 colon cancer cells, affecting cell proliferation in a dose-dependent manner. Despite being internalised, the inactive mutant did not affect HT29 cell growth. These findings suggest that inhibition of cell proliferation is associated with serine protease inhibition of Bowman-Birk proteins. In addition, neither rTI1 nor rTI1_{inactive} affected non-malignant colonic fibroblast CCD-18Co cell growth.
-  Three *TII* mutants were generated using the TILLING methodology. We confirmed that (1) C⁸-C¹² disulphide bridge is critical for the protease inhibitory activity; (2) the serine residue located in P₁ position at carboxi-terminal domain is essential to inhibit chymotrypsin activity; and (3) changes in carboxi-terminal charge have no significant effect in their inhibitory activities but have an effect on interactions between monomers that might affect its stability.
-  Synthetic peptides which mimic inhibitory domains of Bowman-Birk inhibitors from pea and soybean, TI1 and IBB1 respectively, showed lower inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin than the native proteins. Moreover, these synthetic peptides are not able to affect HT29 cell proliferation.
-  Significant amounts of active Bowman-Birk inhibitors, IBB1 and IBBD2, are present in commercial soymilks. Therefore, these products are a relevant source of these beneficial peptides and soymilk consumption may, in this way, contribute to health maintenance. Furosine content can be used as an indicator to monitor both thermal treatment and effects on protease inhibitory activities in soymilk, due to a direct correlation between thermal damage and protease inhibitory activity of Bowman-Birk inhibitors.

6. *BIBLIOGRAFÍA*



6.1 BIBLIOGRAFÍA

1. Hooper, N. Proteases: a primer. *Essays in Biochemistry* **2002**, *38*, 1-8.
2. Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* **1967**, *27* (2), 157-162.
3. Leung, D.; Giovanni, A.; Fairlie, D. Protease inhibitors: Current status and future prospects. *Journal of Medicinal Chemistry* **2000**, *43* (3), 305-341.
4. Whitaker, J. Enzyme-catalyzed reactions. Experimental factors that affect rates. In *Handbook of Food Enzymology*; JR, W., AGJ, , DWS, W., Eds.; CRC Press, 2002; Chapter 4, pp 31-48.
5. Losso, J. The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48* (1), 94-118.
6. Clemente, A.; Arques, M. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World Journal of Gastroenterology* **2014**, *20* (30), 10305-10315.
7. Soreide, K.; Janssen, E.; Kömer, H.; Baak, J. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *Journal of Pathology* **2006**, *209* (2), 147-156.
8. Sharony, R.; Yu, P.; Park, J.; Galloway, A.; Mignatti, P.; Pintucci, G. Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. *Journal of Inflammation* **2010**, *7* (45), 1-17.
9. Safavi, F.; Rostami, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experimental and Molecular Pathology* **2012**, *93* (3), 428-433.
10. Turk, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews: Drug Discovery* **2006**, *5* (9), 785-799.
11. Drag, M.; Salvesen, G. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews: Drug Discovery* **2010**, *9* (9), 690-701.
12. Shen, A. Allosteric regulation of protease activity by small molecules. *Molecular Biosystems* **2010**, *6* (8), 1431-1443.
13. Bode, W.; Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry* **1992**, *204* (2), 433-451.

14. Deu, E.; Verdoes, M.; Bogyo, M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nature Structural & Molecular Biology* **2012**, *19* (1), 9-16.
15. Clemente, A.; Sonnante, G.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Current Protein and Peptide Science* **2011**, *12* (5), 358-373.
16. Clemente, A.; Marín-Manzano, M.; Arques, M.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes: utilisation in disease prevention and therapy. In *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*; B, H.-L., CC, H., Eds., 2013; Chapter 2, pp 23-44.
17. Scarpi, D.; McBride, J.; Leatherbarrow, R. Inhibition of human B-tryptase by Bowman-Birk inhibitor derived peptides: creation of a new tri-functional inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**, *12* (23), 6045-6052.
18. Muricken, D.; Gowda, L. Molecular engineering of a small trypsin inhibitor based on the binding loop of horsegram seed Bowman-Birk inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2011**, *26* (4), 553-560.
19. Larionova, N.; Gladysheva, I.; Tikhonova, T.; Kazanskaia, N. Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of the Bowman-Birk type of soy inhibitor. *Biokhimiia* **1993**, *58* (9), 1437-1444.
20. Yamasaki, Y.; Satomi, S.; Murai, N.; Tsuzuki, S.; Fushiki, T. Inhibition of membrane-type serine protease 1/matriptase by natural and synthetic protease inhibitors. *Journal of Nutrition Science and Vitaminology* **2003**, *49* (1), 27-32.
21. Rocco, M.; Malorni, L.; Chambery, A.; Poerio, E.; Parente, A.; Di Marco, A. A Bowman-Birk inhibitor with anti-elastase activity from *Lathyrus sativus* L. seeds. *Molecular BioSystems* **2011**, *7* (8), 2500-2507.
22. Ware, J.; Wan, X.; Rubin, H.; Schechter, N.; Kennedy, A. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1997**, *344* (1), 133-138.
23. Chen, Y.; Huang, S.; Lin-Shiau, S.; Lin, J. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* **2005**, *26* (7), 1296-1306.
24. de Paula Carli, A.; de Abreu Vieira, P.; Silva, K.; de Sá Cota, R.; Carneiro, C.; Castro-Borges, W.; de Andrade, M. Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and

- colorectal pre neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice. *Food and Chemical Toxicology* **2012**, *50* (5), 1405-1412.
25. Souza, L.; Camargo, R.; Demasi, M.; Santana, J.; de Sá, C.; de Freitas, S. Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PLoS ONE* **2014**, *9* (1), 1-10.
 26. Ryan, C. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **1990**, *28*, 425-449.
 27. Domoney, C.; Welham, T.; Ellis, N.; Mozzanega, P.; Turner, L. Three classes of proteinase inhibitor gene have distinct but overlapping patterns of expression in *Pisum sativum* plants. *Plant Molecular Biology* **2002**, *48* (3), 319-329.
 28. García-Olmedo, F.; Salcedo, G.; Sánchez-Monge, R.; Gómez, L.; Royo, J.; Carbonero, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. In *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*; Oxford University Press: United Kingdom, 1987; Vol. 4, pp 275-334.
 29. Hilder, B.; Gatehouse, A.; Boulter, D. Genetic engineering of crops for insects resistance using genes of plant origins. In *Genetic Engineering of Crop Plants*; GW, , D, , Eds.;, 1990; Chapter 5, pp 51-66.
 30. Richardson, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In *Methods in Plant Biochemistry*; PM, D., JB, H., Eds.; Academic Press: New York, 1991; pp 259-305.
 31. Belozersky, M.; Dunaevsky, Y.; Musolyamov, A.; Egorov, T. Complete amino acid sequence of the protease inhibitor from buckwheat seeds. *FEBS Letters* **1995**, *371* (3), 264-266.
 32. Clemente, A.; Domoney, C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Current Protein and Peptide Science* **2006**, *7* (3), 201-216.
 33. de Leo, F.; Volcippella, M.; Licciulli, F.; Liuni, S.; Gallerani, R.; Ceci, L. PLANT-PIs: a database for plants protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research* **2002**, *30* (1), 347-348.
 34. Rawlings, N.; Tolle, D.; Barret, A. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *The Biochemical Journal* **2004**, *378*, 705-716.
 35. Domoney, C. Inhibition of legume seeds. In *Seed Proteins*; PR, S., R, C., Eds.; Springer Netherlands, 1999; Chapter 27, pp 635-655.

36. Lam, J.; Pwee, K.; Sun, W.; Chua, Y.; Wang, X. Enzyme-stabilizing activity of seed trypsin inhibitors during desiccation. *Plant Science* **1999**, *142* (2), 209-218.
37. Ragg, E.; Galbusera, V.; Scarafoni, A.; Negri, A.; Tedesch, G.; Consonni, A.; Sessa, F.; Duranti, M. Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman-Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. *The FEBS Journal* **2006**, *273* (17), 4024-4039.
38. Lioi, L.; Galasso, I.; Daminati, M.; Piergiovanni, A. Inhibitory properties and binding loop polymorphism in Bowman-Birk inhibitors from *Phaseolus* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* **2010**, *57* (4), 533-542.
39. Prasad, E.; Dutta-Gupta, A.; Padmasree, K. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insects pests. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2010**, *98* (1), 80-88.
40. Gatehouse, J.; Gatehouse, A.; Brown, D. Control of phytophagous insect pests using serine proteinase inhibitors. In *Recombinant Protease Inhibitors in Plants*; D, M., Ed.; Landes Bioscience: Texas USA, 2000; Chapter 2, pp 9-26.
41. Giudici, A.; Regente, M.; de la Canal, L. A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry* **2000**, *38* (11), 881-888.
42. Jamal, F.; Pandey, P.; Singh, D.; Khan, M. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Reviews* **2013**, *12* (1), 1-34.
43. Hilder, V.; Gatehouse, A.; Sheerman, S.; Barker, R.; Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* **1987**, *300*, 160-163.
44. Zhu-Salzman, K.; Zeng, R. Insect response to plant defensive protease inhibitors. *Annual Review of entomology* **2015**, *60*, 233-252.
45. Chiang, C.; Hadwiger, L. The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* **1991**, *4* (4), 324-331.
46. Qu, L.; Chen, J.; Liu, M.; Pan, N.; Okamoto, H.; Lin, Z.; Li, C.; Li, D.; Wang, J.; Zhu, G.; Zhao, X.; Chen, X.; Gu, H.; Chen, Z. Molecular Cloning and Functional Analysis of a Novel Type of Bowman-Birk Inhibitor Gene Family in Rice 1. *Plant Physiology* **2003**, *133* (2), 560-570.
47. Richards, K.; Snowden, K.; Cardner, R. wali6 and wali7: Genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Gene Register* **1994**, *105* (4), 1455-1456.

48. Shitan, N.; Horiuchi, K.; Sato, F.; Yazaki, K. Bowman-Birk proteinase inhibitor confers heavy metal and multiple drug tolerance in yeast. *Plant and Cell Physiology* **2007**, *48* (1), 193-197.
49. Shan, L.; Li, C.; Chen, F.; Zhao, S.; Xia, G. A Bowman-Birk type protease inhibitor is involved in the tolerance to salt stress in wheat. *Plant, Cell and Environment* **2008**, *31* (8), 1128-1137.
50. Dramé, K.; Passaquet, C.; Repellin, A.; Zuily-Fodil, Y. Cloning, characterization and differential expression of a Bowman-Birk inhibitor during progressive water deficit and subsequent recovery in peanut (*Arachis hypogaea*) leaves. *Journal of Plant Physiology* **2013**, *170* (2), 225-229.
51. Bowman, D. Differentiation of soy bean antitryptic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* **1946**, *63* (3), 547-550.
52. Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S. A pure trypsin inhibitor from soya beans. *The Biochemical Journal* **1963**, *87*, 281-284.
53. Chen, P.; Rose, J.; Love, R.; Wei, C.; Wang, B. Reactive Sites of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Proteinase-Inhibitor Are Similar To Other Trypsin-Inhibitors. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (3), 1990-1994.
54. Bode, W.; Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **2000**, *1477* (1-2), 241-252.
55. de la Sierra, I.; Quillien, L.; Flecker, P.; Gueguen, J.; Brunie, S. Dimeric crystal structure of a Bowman-Birk protease inhibitor from pea seeds. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *285* (3), 1195-1207.
56. Birk, Y. Protease inhibitors. In *Hydrolytic Enzymes*; A, N., K, B., Eds.; Elsevier: Amsterdam, 1987; pp 257–305.
57. Werner, M.; Wemmer, D. Identification of a protein binding surface by differential amide hydrogen exchange measurements. *Journal of Molecular Biology* **1992**, *225* (3), 873-889.
58. Suzuki, A.; Yamane, T.; Ashida, T. Crystallographic Refinement of Bowman-Birk A-II from Peanut (*Arachis hypogaea*) at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* **1993**, *234* (2), 722-734.

59. Voss, R.; Ermler, U.; Essen, L.; Wenzl, G.; Kim, Y.; Flecker, P. Crystal structure of the bifunctional soybean Bowman-Birk inhibitor at 0.28-nm resolution. Structural peculiarities in a folded protein conformation. *European journal of biochemistry / FEBS* **1996**, *242* (1), 122-131.
60. Song, H.; Kim, Y.; Yang, J.; Moon, J.; Lee, J.; Suh, S. Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution. *Journal of molecular biology* **1999**, *293* (5), 1133-1144.
61. Catalano, M.; Ragona, L.; Molinari, H.; Tava, A.; Zetta, L. Anticarcinogenic Bowman Birk inhibitor isolated from snail medic seeds (*Medicago scutellata*): Solution structure and analysis of self-association behavior. *Biochemistry* **2003**, *42* (10), 2836-2846.
62. Debreczeni, J.; Bunkóczi, G.; Girmann, B.; Sheldrick, G. In-house phase determination of the lima bean trypsin inhibitor: A low-resolution sulfur-SAD case. *Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography* **2003**, *59* (Pt 2), 393-395.
63. Rao, K.; Suresh, C. Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2007**, *1774* (10), 1264-1273.
64. Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Kikkawa, J.; Ashida, T.; Ishikawa, C.; Watanabe, K.; Nakamura, S.; Takahashi, K. Structure of the Trypsin-Binding Domain of Bowman-Birk Type Protease Inhibitor and Its Interaction with Trypsin. *The Journal of Biochemistry* **1986**, *100* (6), 1637-1646.
65. Lin, G.; Bode, W.; Huber, R.; Chi, C.; Engh, R. The 0.25-nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. *European journal of biochemistry / FEBS* **1993**, *212* (2), 549-555.
66. Li, Y.; Huang, Q.; Zhang, S.; Liu, S.; Chi, C.; Tang, Y. Studies on an artificial trypsin inhibitor peptide derived from the mung bean trypsin inhibitor: chemical synthesis, refolding, and crystallographic analysis of its complex with trypsin. *The Journal of Biochemistry* **1994**, *116* (1), 18-25.
67. Koepke, J.; Ermler, U.; Warkentin, E.; Wenzl, G.; Flecker, P. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *Journal of Molecular Biology* **2000**, *298* (3), 477-491.

68. Park, E.; Kim, J.; Kim, H.; Kim, Y.; Song, H. Crystal structure of the Bowman-Birk inhibitor from barley seeds in ternary complex with porcine trypsin. *Journal of Molecular Biology* **2004**, *343* (1), 173-186.
69. Barbosa, J.; Silvia, L.; Teles, R.; Esteves, G.; Azevedo, R.; Ventura, M.; de Freitas, S. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with β -Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. *Biophysical Journal* **2007**, *92* (5), 1638-1650.
70. Berman, H.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.; Weissig, H.; Shindyalov, I.; Bourne, P. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (1), 235-242.
71. Birk, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1985**, *25* (2), 113-131.
72. Ramasarma, P.; Rao, A.; Rao, D. Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochimica et Biophysica Acta* **1995**, *1248* (1), 35-42.
73. Kumar, V.; Gowda, L. The contribution of two disulfide bonds in the trypsin binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2013**, *537* (1), 49-61.
74. Chan, Y.; Zhang, Y.; Ng, T. Brown kidney bean bowman-birk trypsin inhibitor is heat and pH stable and exhibits anti-proliferative activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *169* (4), 1306-1314.
75. Wang, S.; Shao, B.; Lu, W.; Hong, J.; Rao, P. Isolation of a trypsin-chymotrypsin inhibitor and its functional properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *44* (6), 545-557.
76. Piergiovanni, A.; Galasso, I. Polymorphism of trypsin and chymotrypsin binding loops in Bowman-Birk inhibitors from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* **2004**, *166* (6), 1525-1531.
77. Clemente, A.; Moreno, F.; Marín-Manzano, M.; Jiménez, E.; Domoney, C. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular Nutrition and Food Research* **2010**, *54* (3), 396-405.
78. Ferrasson, E.; Quillien, L.; Gueguen, J. Proteinase Inhibitors from Pea Seeds: Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45* (1), 127-131.

79. Scarafoni, A.; Consonni, A.; Galbusera, V.; Negri, A.; Tedeschi, G.; Rasmussen, P.; Magni, C.; Duranti, M. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry* **2008**, *69* (9), 1820-1825.
80. Brauer, A.; Leatherbarrow, R. The conserved P1' Ser of Bowman-Birk-type proteinase inhibitors is not essential for the integrity of the reactive site loop. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2003**, *308* (2), 300-305.
81. Brauer, A.; Kelly, G.; Matthews SJ; Leatherbarrow, R. The (1)H-NMR solution structure of the antitryptic core peptide of Bowman-Birk inhibitor proteins: a minimal canonical loop. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics* **2002**, *20* (1), 59-70.
82. Lawrence, P.; Koundal, K. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology* **2002**, *5* (1), 93-109.
83. Kennedy, A. Chemopreventive Agents Protease Inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* **1998**, *78* (3), 167-209.
84. Kennedy, A. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *American Journal of Clinical Nutrition* **1998**, *68* (6 Suppl.), 1406S-1412S.
85. Yavelow, J.; Collins, M.; Birk, Y.; Troll, W.; Kennedy, A. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1985**, *82* (16), 5395-5399.
86. Lanza, A.; Tava, A.; Catalano, M.; Ragona, L.; Singuaroli, I.; Robustelli Della Cuna, F.; Robustelli Della Cuna, G. Effects of the *Medicago scutellata* Trypsin. *Anticancer Research* **2004**, *24* (1), 227-234.
87. Deshimaru, M.; Hanamoto, R.; Kusano, C.; Yoshimi, S.; Terada, S. Purification and Characterization of Proteinase Inhibitors from Wild Soja (*Glycine soja*) Seeds. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **2002**, *66* (9), 1897-1903.
88. de Paola, D.; Blanco, E.; Pierri, C.; Sonnante, G. Isolation and characterization of novel variants of BBI coding genes from the legume *Lathyrus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **2012**, *57*, 45-53.
89. Perona, J.; Craik, C. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science* **1995**, *4*, 337-360.

90. Clemente, A.; Gee, J.; Johnson, I.; MacKenzie, D.; Domoney, C. Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53* (23), 8979-8986.
91. Gariani, T.; Leatherbarrow, R. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* **1997**, *49* (6), 467-475.
92. Nishino, N.; Aoyagi, H.; Kato, T.; Izumiya, N. Studies on the synthesis of proteinase inhibitors: I. Synthesis and activity of nonapeptide fragments of soybean Bowman-Birk inhibitor. *The Journal of Biochemistry* **1977**, *82* (3), 901-909.
93. Terada, S.; Sato, K.; Kato, T.; Izumiya, N. Inhibitory properties of nonapeptide loop structures related to reactive sites of soybean Bowman-Birk inhibitor. *FEBS Lettera* **1978**, *90* (1), 89-92.
94. Maeder, D.; Sunde, M.; Botes, D. Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1992**, *40* (2), 97-102.
95. Domingo, G.; Leatherbarrow, R.; Freeman, N.; Patel, S.; Weir, M. Synthesis of a mixture of cyclic peptides based on the Bowman-Birk reactive site loop to screen for serine protease inhibitors. *International Journal of Peptide and Protein Research* **1995**, *46* (1), 79-87.
96. Gariani, T.; McBride, J.; Leatherbarrow, R. The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin: Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1999**, *1431* (1), 232-237.
97. McBride, J.; Leatherbarrow, R. Synthetic peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor protein. *Current Medicinal Chemistry* **2001**, *8* (8), 909-917.
98. McBride, J.; Freeman, N.; Domingo, G.; Leatherbarrow, R. Selection of chymotrypsin inhibitors from a conformationally-constrained combinatorial peptide library. *Journal of Molecular Biology* **1996**, *259* (4), 819-827.
99. McBride, J.; Freeman, H.; Leatherbarrow, R. Identification of chymotrypsin inhibitors from a second-generation template assisted combinatorial peptide library. *Journal of Peptide Science* **2000**, *6* (9), 446-452.

100. McBride, J.; Brauer, A.; Nievo, M.; Leatherbarrow, R. The role of threonine in the P2 position of Bowman-Birk proteinase inhibitors: Studies on P2 variation in cyclic peptides encompassing the ractive site loop. *Journal of Molecular Biology* **1998**, *282* (2), 447-457.
101. Schwartz, L. Trypsase: a mast cell serine protease. *Methods in Enzymology* **1994**, *224*, 88-100.
102. Scarpi, D.; McBride, J.; Leatherbarrow, R. Inhibition of human b -trypsin by Bowman – Birk inhibitor derived peptides. *Journal of Peptide Research* **2002**, *59*, 90-91.
103. McBride, J.; Freeman, H.; Leatherbarrow, R. Selection of human elastase inhibitors from a conformationally-constrained combinatorial peptide library. *European Journal of Biochemistry* **1999**, *266* (2), 403-412.
104. Luckett, S.; García, R.; Barker, J.; Konarev, A.; Shewry, P.; Clarke, A.; Brady, R. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. *Journal of Molecular Biology* **1999**, *290* (2), 525-533.
105. Li, Y.; Aboye, T.; Breindel, L.; Shekhtman, A.; Camarero, J. Efficient recombinant expression of SFTI-1 in bacterial cells using intein-mediated protein trans-splicing. *Biopolymers* **2016**, *106* (6), 818-824.
106. Long, Y.; Lee, S.; Lin, C.; Enyedy, I.; Wang, S.; Li, P.; Dickson, R.; Roller, P. Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2001**, *11* (18), 2515-2519.
107. Fittler, H.; Depp, A.; Avrutina, O.; Dahms, S.; Than, M.; Empting, M.; Kolmar, H. Engineering a Constrained Peptidic Scaffold towards Potent and Selective Furin Inhibitors. *Chembiochem* **2015**, *16* (17), 2441-2444.
108. Debowski, D.; Cichorek, M.; Lubos, M.; Wójcik, S.; Łegowska, A.; Rolka, K. Non-covalent inhibitors of human 20S and 26S proteasome based on trypsin inhibitor SFTI-1 Dawid Dębowski. *Peptide Science* **2016**, *106* (5), 685-696.
109. Kumar, P.; Sreerama, Y.; Gowda, L. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). *Phytochemistry* **2002**, *60* (6), 581-588.
110. Kumar, P.; Rao, A.; Hariharaputran, S.; Chandra, N.; Gowda, L. Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors: Pivotal role of Asp76 in the dimerization. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (29), 30425-30432.

111. Domoney, C.; Welham, T.; Sidebottom, C.; Firmin, J. Multiple isoforms of Pisum trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *The FEBS Letters* **1995**, *360* (1), 15-20.
112. Muzquiz, M.; Welham, T.; Altares, P.; Goyoaga, C.; Cuadrado, C.; Romero, C.; Guillamon, E.; Domoney, C. The effect of germination on seed trypsin inhibitors in Vicia faba and Cicer arietinum. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2004**, *84* (6), 556-560.
113. Wilson, K.; Chen, J. Amino acid sequence of mung bean trypsin inhibitor and its modified forms appearing during germination. *Plant Physiology* **1983**, *71* (2), 341-349.
114. Ferrasson, E.; Quillien, L.; Gueguen, J. Amino acid sequence of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from pea seeds. *Journal of Protein Chemistry* **1995**, *14* (6), 467-475.
115. Quillien, L.; Ferrasson, E.; Molle, D.; Gueguen, J. Trypsin inhibitor polymorphism: multigene family expression and posttranslational modification. *Journal of Protein Chemistry* **1997**, *16* (3), 95-203.
116. Clemente, A.; Marín-Manzano, M.; Jiménez, E.; Arques, M.; Domoney, C. The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *British Journal of Nutrition* **2012**, *108* (Suppl 1), S135-S144.
117. Clemente, A.; Jiménez, E.; Marín-Manzano, M.; Rubio, L. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *Journal of Science of Food and Agriculture* **2008**, *88* (3), 513-521.
118. Domoney, C.; Welham, T. Limited proteolysis of enzyme inhibitor proteins during seed desiccation in Pisum. *Journal of Plant Physiology* **1998**, *152* (6), 692-695.
119. Silva, L.; Azevedo, R.; Morais, P.; Ventura, M.; Freitas, S. Oligomerization states of Bowman-Birk inhibitor by atomic force microscopy and computational approaches. *Proteins: Structure, Function and Genetics* **2005**, *61* (3), 642-648.
120. Muricken, D.; Gowda, L. Functional expression of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor and its self-association. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **2010**, *1804* (7), 1413-1423.
121. Kumar, V.; Murugeson, S.; Vithani, N.; Prakash, B.; Gowda, L. A salt-bridge stabilized C-terminal hook is critical for the dimerization of a Bowman Birk inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2015**, *566*, 15-25.

122. Tamburino, R.; Severino, V.; Sandomenico, A.; Ruvo, M.; Parente, A.; Chambery, A.; Di Maro, A. De novo sequencing and characterization of a novel Bowman–Birk inhibitor from *Lathyrus sativus* L. seeds by electrospray mass spectrometry. *Molecular BioSystems* **2012**, *8* (12), 3232–3241.
123. Liener, I.; Kakade, M. Proteasas inhibitors. In *Protease inhibitors*; IE, L., Ed.; Academic Press: New York, 1980; pp 7-71.
124. Lallés, J.; Jansman, A. Recent progress in the understanding of the mode of action and effects of antinutritional factors from legume seeds in non-ruminant farm animals. In *Recent advances of research in antinutritional factors in legume seeds and rapeseed*; 1998; pp 219-232.
125. Green, G.; Lyman, R. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion as a mechanism for trypsin inhibitor-induced hypersecretion in rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **1972**, *140* (1), 6-12.
126. Liener, I. Implications of antinutritional components in soybean foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1994**, *34* (1), 31-67.
127. Anderson, R.; Rackis, J.; Tallen, W. Biologically active substances in soy products. In *Soy Protein and Human Nutrition*; 1979; p 209.
128. Struthers, B.; MacDonald, J. Comparative inhibition of trypsins from several species by soybean trypsin inhibitors. *Journal of Nutrition* **1983**, *113* (4), 800-804.
129. Liener, I.; Goodale, R.; Deshmukh, A.; Satterberg, T.; Ward, G.; DiPietro, C.; Bankey, P.; Borner, J. Effect of a trypsin inhibitor from soybeans (Bowman-Birk) on the secretory activity of the human pancreas. *Gastroenterology* **1988**, *94* (2), 419-427.
130. Lajolo, F.; Genovese, M. Nutritional significance of lectins and enzyme inhibitors from legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50* (22), 6592-6598.
131. Belitz, H.; Weder, J. Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. *Foods Reviews International* **1990**, *6*, 151-211.
132. Gatel, F. Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology* **1994**, *45* (3-4), 317-348.
133. Kakade, M.; Hoffa, D.; Liener, I. Contribution of trypsin inhibitors to the deleterious effects of unheated soybeans fed to rats. *Journal of Nutrition* **1973**, *103* (12), 1772-1778.
134. Hedemann, M.; Welham, T.; Boisen, S.; Canibe, N.; Bilham, L.; Domoney, C. Studies on the biological responses of rats to seed trypsin inhibitors using near-isogenic lines of *Pisum sativum* L (pea). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79* (12), 1647-1653.

135. Wiseman, J.; Al-Mazooqi, W.; Welham, T.; Domoney, C. The apparent ileal digestibility, determined with young broilers, of amino acids in near-isogenic lines of peas (*Pisum sativum* L) differing in trypsin inhibitor activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83* (7), 644-651.
136. Jezierny, D.; Mosenthin, R.; Sauer, N.; Roth, S.; Piepho, H.; Rademacher, M.; Eklund, M. Chemical composition and standardised ileal digestibilities of crude protein and amino acids in grain legumes for growing pigs. *Livestock Science* **2010**, *138* (1-3), 229-243.
137. Lin, L.; Mick, R.; Ware, J.; Metz, J.; Lustig, R.; Vapiwala, N.; Rengan, R.; Kennedy, A. Phase I randomized double-blind placebo-controlled single-dose safety studies of Bowman-Birk inhibitor concentrate. *Oncology Letters* **2014**, *7* (4), 1151-1158.
138. Park, J.; Jeong, H.; De Lumen, B. In vitro digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (26), 10703-10706.
139. Hernández-Ledesma, B.; Fernández-Tomé, S.; Arques, M.; Amigo, L.; Recio, I.; Clemente, A.; Cruz-Huerta, E. The protective role of the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean lunasin digestion: the effect of released peptides on colon cancer growth. *Food & Function* **2015**, *6* (8), 2626-2635.
140. Trivedi, M.; Laurence, J.; Siahhan, T. The role of thiols and disulfides on protein stability. *Current Protein & Peptide Science* **2009**, *10* (6), 614-625.
141. Bateman, K.; James, M. Plant protein proteinase inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Current Protein and Peptide Science* **2011**, *12* (5), 340-347.
142. Hajós, G.; Gelencser, E.; Pusztai, A.; Grant, G.; Sakhri, M.; Bardocz, S. Biological Effects and Survival of Trypsin Inhibitors and the Agglutinin from Soybean in the Small Intestine of the Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 165-170.
143. Marín-Manzano, M.; Ruiz, R.; Jiménez, E.; Rubio, L.; Clemente, A. Anti-carcinogenic soyabean Bowman-Birk inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition in vitro. *British Journal of Nutrition* **2009**, *101* (7), 967-971.
144. Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Dikshit, R.; Eser, S.; Mathers, C.; Rebelo, M.; Parkin, D.; Forman, D.; Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer* **2015**, *136* (5), E359-E386.
145. de Mejía, E.; Bradford, T.; Hasler, C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin. *Nutrition Reviews* **2003**, *61*, 239-246.

146. Wang, Y.; Wang, Z.; Fu, L.; Chen, Y.; Fang, J. Legume Consumption and Colorectal Adenoma Risk: A Meta-Analysis of Observational Studies. *PLoS ONE* **2013**, *8* (6), 6-12.
147. Aune, D.; De Stefani, E.; Ronco, A.; Boffetta, P.; Deneo-Pellegrini, H.; Acosta, G.; Mendilaharsu, M. Legume intake and the risk of cancer: A multisite case-control study in Uruguay. *Cancer Causes and Control* **2009**, *20* (9), 1605-1615.
148. Clemente, A.; Olías, R. Beneficial effects of legumes in gut health. *Current Opinion in Food Science* **2017**, *14*, 32–36.
149. Billings, P.; Newberne, P.; Kennedy, A. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* **1990**, *11* (7), 1083-1086.
150. Kennedy, A.; Beazer-Barclay, Y.; Kinzler, K.; Newberne, P. Suppression of carcinogenesis in the intestines of Min mice by the soybean-derived Bowman-Birk inhibitor. *Cancer Research* **1996**, *56* (4), 679-682.
151. Kennedy, A.; Billings, P.; Wan, X.; Newberne, P. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* **2002**, *43* (2), 174-186.
152. St. Clair, W.; Billings, P.; Carew, J.; Keller-McGandy, C.; Newberne, P.; Kennedy, A. Suppression of Dimethylhydrazine-induced Carcinogenesis in Mice by Dietary Addition of the Bowman-Birk Protease Inhibitor. *Cancer Research* **1990**, *50* (3), 580-586.
153. Ware, J.; Wan, X.; Newberne, P.; Kennedy, A. Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* **1999**, *44* (5), 986-990.
154. Caccialupi, P.; Ceci, L.; Siciliano, R.; Pignone, D.; Clemente, A.; Sonante, G. Bowman-Birk inhibitors in lentils: Heterologous expression, functional characterisation and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. *Food Chemistry* **2010**, *120*, 1058-1066.
155. Fernandes, A.; Banerji, A. Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s). *Carcinogenesis* **1995**, *16* (8), 1843-1846.
156. Joanitti, G.; Azevedo, R.; Freitas, S. Apoptosis and lysosome membrane permeabilization induction on breast cancer cells by an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor from *Vigna unguiculata* seeds. *Cancer Letters* **2010**, *293* (1), 73-81.
157. McCormick, D.; Johnson, W.; Bosland, M.; Lubet, R.; Steele, V. Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by soy isoflavones and by Bowman-Birk inhibitor. *Nutrition and Cancer* **2007**, *57* (2), 184-193.

158. Tang, M.; Asamoto, M.; Ogawa, K.; Naiki-Ito, A.; Sato, S.; Takahashi, S.; Shirai, T. Induction of apoptosis in the LNCaP human prostate carcinoma cell line and prostate adenocarcinomas of SV40T antigen transgenic rats by the Bowman-Birk inhibitor. *Pathology International* **2009**, *59* (11), 790-796.
159. Wan, X.; Ware, J.; Zhang, L.; Newberne, P.; Evans, S.; Clark, L.; Kennedy, A. Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. *The Prostate* **1999**, *41* (4), 243-252.
160. Sun, X.; Donald, S.; Phang, J. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* **2001**, *22* (11), 1775-1780.
161. Dittmann, K.; Virsik-Kopp, P.; Mayer, C.; Rave-Frank, M.; Rodemann, H. The radioprotective effect of BBI is associated with the activation of DNA repair-relevant genes. *International Journal of Radiation Oncology* **2003**, *79*, 801-808.
162. Wan, X.; Meyskens, F.; Armstrong, W.; Taylor, T.; Kennedy, A. Relationship between protease activity and neu oncogene expression in patients with oral leukoplakia treated with the Bowman Birk Inhibitor. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **1999**, *8* (7), 601-608.
163. Armstrong, W.; Kennedy, A.; Wan, X.; Atiba, J.; McLaren, C.; Meyskens, F. Single-Dose Administration of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in Patients with Oral Leukoplakia Single-Dose Administration of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in Patients with Oral Leukoplakia 1. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2000**, *9*, 43-47.
164. Armstrong, W.; Kennedy, A.; Wan, X.; Taylor, T.; Nguyen, Q.; Jensen, J.; Thompson, W.; Lagerberg, W.; Meyskens, F. J. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clinical Cancer Research* **2000**, *6* (12), 4684-4691.
165. Bossola, M.; Muscaritoli, M.; Costelli, P.; Grieco, G.; Bonelli, G.; Pacelli, F.; Doglietto, G.; Doglietto, G.; Baccino, F. Increased muscle proteasome activity correlates with disease severity in gastric cancer patients. *Annals of Surgery* **2003**, *237* (3), 384-389.
166. Codony-Servat, J.; Tapia, M.; Bosch, M.; Oliva, C.; Domingo-Domenech, J.; Mellado, B.; Rolfe, M.; Ross, J.; Gascon, P.; Rovira, A.; Albanell, J. Differential cellular and molecular

- effects of bortezomib, a proteasome inhibitor, in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, 5 (3), 665-675.
167. Lopes, U.; Erhardt, P.; Yao, R.; Cooper, G. P53-Independent Induction of Apoptosis By Proteasome Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, 272, 12893-12896.
168. Voorhees, P.; Dees, E.; O'Neil, B.; Orłowski, R. The proteasome as a target for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2003**, 9 (17), 6316-6325.
169. Mehdad, A.; Brumana, G.; Souza, A.; Barbosa, J.; Ventura, M.; de Freitas, S. A Bowman–Birk inhibitor induces apoptosis in human breast adenocarcinoma through mitochondrial impairment and oxidative damage following proteasome 20S inhibition. *Cell Death Discovery* **2016**, 2, 1-10.
170. Soria, A.; Porras, P.; Moya, F.; Sánchez, N.; Rodríguez, B.; Ruíz, M.; Alché, J.; Arques, M.; Castro, A.; Clemente, A. Internalization of the anti-carcinogenic IBB1, a major Bowman-Birk isoinhibitor from soybean (*Glycine max*), in HT29 colon cancer cells. *High School Student for Agricultural Science Research* **2014**, 3, 59-67.
171. Bugge, T.; Antalis, T.; Wu, Q. Type II transmembrane serine proteases. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284 (35), 23177-23181.
172. Bhatt, A.; Takeuchi, T.; Ylstra, B.; Ginzinger, D.; Albertson, D.; Shuman, M.; Craik, C. Quantitation of Membrane Type Serine Protease 1. *The Journal of Biological Chemistry* **2003**, 384 (2), 257-266.
173. Lee, S.; Dickson, R.; Lin, C. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *The Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275 (47), 36720-36725.
174. List, K.; Kosa, P.; Szabo, R.; Bey, A.; Wang, C.; Molinolo, A.; Bugge, T. Epithelial integrity is maintained by a matriptase-dependent proteolytic pathway. *The American Journal of Pathology* **2009**, 175 (4), 1453-1463.
175. Malkowicz, S.; McKenna, W.; Vaughn, D.; Wan, X.; Propert, K.; Rockwell, K.; Marks, S.; Wein, A.; Kennedy, A. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *The Prostate* **2001**, 48 (1), 16-28.
176. Meyskens, F.; Taylor, T.; Armstrong, W.; Kong, L.; Gu, M.; González, R.; Villa, M.; Wong, V.; García, A.; Perloff, M.; Kennedy, A.; Wan, S.; Ware, J.; Messadi, D.; Lorch, J.; Wirth, L.; Jaffe, Z.; Goodwin, J.; Civantos, F.; Sullivan, M.; Reid, M.; Merciznu, M.;

- Jayaprakash, V.; Kerr, A.; Le, A. Phase IIb Randomized Clinical Chemoprevention Trial of a Soybean-derived Compound (Bowman-Birk Inhibitor Concentrate) for Oral Leukoplakia. *Cancer Prevention Research* **2010**, *3*, CN02-CN05.
177. Armstrong, W.; Taylor, T.; Kennedy, A.; Melrose, R.; Messadi, D.; Gu, M.; Le, A.; Perloff, M.; Civantos, F.; Goodwin, W.; Wirth, L.; Kerr, A.; Meyskens, F. J. Bowman Birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: A randomized phase IIb trial. *Cancer Prevention Research* **2013**, *6* (5), 410-418.
178. Lichtenstein, G.; Deren, J.; Katz, S.; Lewis, J.; Kennedy, A.; Ware, J. Bowman-Birk inhibitor concentrate: A novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences* **2008**, *53* (1), 175-180.
179. Betton, J.; Chaffotte, A. Replément er production de protéines recombinantes. *Medecine Sciences* **2005**, *21*, 613-617.
180. Palomares, L.; Estrada-Mondaca, S.; Ramírez, O. Production of Recombinant Proteins: Challenges and Solutions. In *Methods in Molecular Biology*; 2004; Vol. 267, pp 15-52.
181. Katoch, R.; Singh, S.; Thakur, N.; Dutt, S.; Yadav, S.; Shukle, R. Cloning, characterization, expression analysis and inhibition studies of a. *Gene* **2014**, *546* (2), 342–351.
182. MacKenzie, D.; Kraunsoe, J.; Chesshyre, J.; Lowe, G.; Komiyama, T.; Fuller, R.; Archer, D. Aberrant processing of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor secreted by *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* **1998**, *63* (2), 137-146.
183. Clemente, A.; MacKenzie, D.; Jeenes, D.; Domoney, C. The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein Expression and Purification* **2004**, *36* (1), 106-114.
184. Ogata, K.; Nishikawa, H.; Ohsugi, M. A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agricultural and Biological Chemistry* **1969**, *33* (10), 1519-1520.
185. Cereghino, J.; Cregg, J. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews* **2000**, *24* (1), 45-66.
186. Harder, W.; Veenhuis, M. Metabolism of one-carbon compounds. In *The Yeasts: Metabolism and Physiology of Yeasts*; 1989; Vol. 3, pp 289–316.
187. Cregg, J.; Madden, K. Use of site-specific recombination to regenerate selectable markers. *MGG Molecular & General Genetics* **1989**, *219* (1-2), 320-323.

188. Ellis, S.; Brust, P.; Koutz, P.; Waters, A.; Harpold, M.; Gingeras, T. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology* **1985**, 5 (5), 1111-1121.
189. Faber, K.; Harder, W.; Ab, G.; Veenhuis, M. Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **1995**, 11 (14), 1331-1344.
190. Cregg, J.; Barringer, K.; Hessler, A.; Madden, K. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology* **1985**, 5 (12), 3376-3385.
191. Hollenberg, C.; Gellissen, G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Current Opinion in Biotechnology* **1997**, 8 (5), 554-560.
192. Kodym, A.; Afza, R. Physical and chemical mutagenesis. *Methods in Molecular Biology* **2003**, 236, 189-204.
193. McCallum, C.; Comai, L.; Greene, E.; Henikoff, S. Targeted screening for induced mutations. *Nature America inc* **2000**, 18 (4), 455-457.
194. McCallum, C.; Comai, L.; Greene, E.; Henikoff, S. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiology* **2000**, 123 (2), 439-442.
195. Sega, G. A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **1984**, 134 (2-3), 113-142.
196. Green, E.; Codomo, C.; Taylor, N.; Henikoff, J.; Till, B.; Reynolds, S.; Enns, L.; Burtner, C.; Johnson, J.; Odden, A.; Comai, L.; Henikoff, S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* **2003**, 164 (2), 731-740.
197. Slade, A.; Fuertenberg, S.; Loeffler, D.; Steine, M.; Facciotti, D. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotechnology* **2005**, 23 (1), 75-81.
198. Cooper, J.; Till, B.; Laport, R.; Darlow, M.; Kleffner, J.; Jamai, A.; El-Mellouki, T.; Liu, S.; Ritchie, R.; Nielsen, N.; Bilyeu, K.; Meksem, K.; Comai, L.; Henikoff, S. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology* **2008**, 8 (9), 1471-2229.
199. Dalmais, M.; Schmidt, J.; Le Signor, C.; Moussy, F.; Burstin, J.; Savoie, V.; Aubert, G.; Brunaud, V.; de Oliveira, Y.; Guichard, C.; Thompson, R.; Bendahmane, A. UTILdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biology* **2008**, 9 (2), R43.1-R43.12.

200. Till, B.; Reynolds, S.; Greene, E.; Codomo, C.; Enns, L.; Johnson, J.; Burtner, C.; Odden, A.; Young, K.; Taylor, N.; Henikoff, J.; Comai, L.; Henikoff, S. Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With Large-Scale Discovery of Induced Point Mutations With High-Throughput TILLING. *Genome Research* **2003**, *13* (3), 524-530.
201. Brandon, D.; Friedman, M. Immunoassays of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 6635-6642.
202. de Vonis Bidlingmeyer, U.; Leary, T.; Laskowski, M. J. Identity of the tryptic and alpha-chymotryptic reactive sites on soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* **1972**, *11* (17), 3303-3310.
203. Xu, Z.; Chen, Y.; Zhang, C.; Kong, X.; Hua, Y. The heat-induced protein aggregate correlated with trypsin inhibitor inactivation in soymilk processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 8012-8019.
204. Rouhana, A.; Adler-Nissen, J.; Cogan, U.; Frøkiær, H. Heat Inactivation Kinetics of Trypsin Inhibitors During High Temperature-Short Time Processing of Soymilk. *Journal of Food Science* **1996**, *61* (2), 265 - 269.
205. Ferragut, V.; Hernández-Herrero, M.; Veciana-Nogués, M.; Borrás-Suárez, M.; González-Linares, J.; Vidal-Carou, M.; Guamis, B. Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2015**, *95*, 953-961.
206. Lu, L.; Zhao, L.; Zhang, C.; Kong, X.; Hua, Y.; Chen, Y. Comparative effects of ohmic, induction cooker, and electric stove heating on soymilk trypsin inhibitor inactivation. *Journal of Food Science* **2015**, *80* (3), C495-C503.
207. Nursten, H. *The Maillard Reaction: Chemistry, Biochemistry and Implications*, 2005.
208. Seiquer, I.; Díaz-Alguacil, J.; Delgado-Andrade, C.; López-Frías, M.; Muñoz-Hoyos, A.; Galdó, G.; Navarro, M. Diets rich in Maillard reaction products affect protein digestibility in adolescent males aged 11-14 y1-3. *The American Journal of Clinical Nutrition* **2006**, *83*, 1082-1088.
209. Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J.; Morales, F. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 725-731.

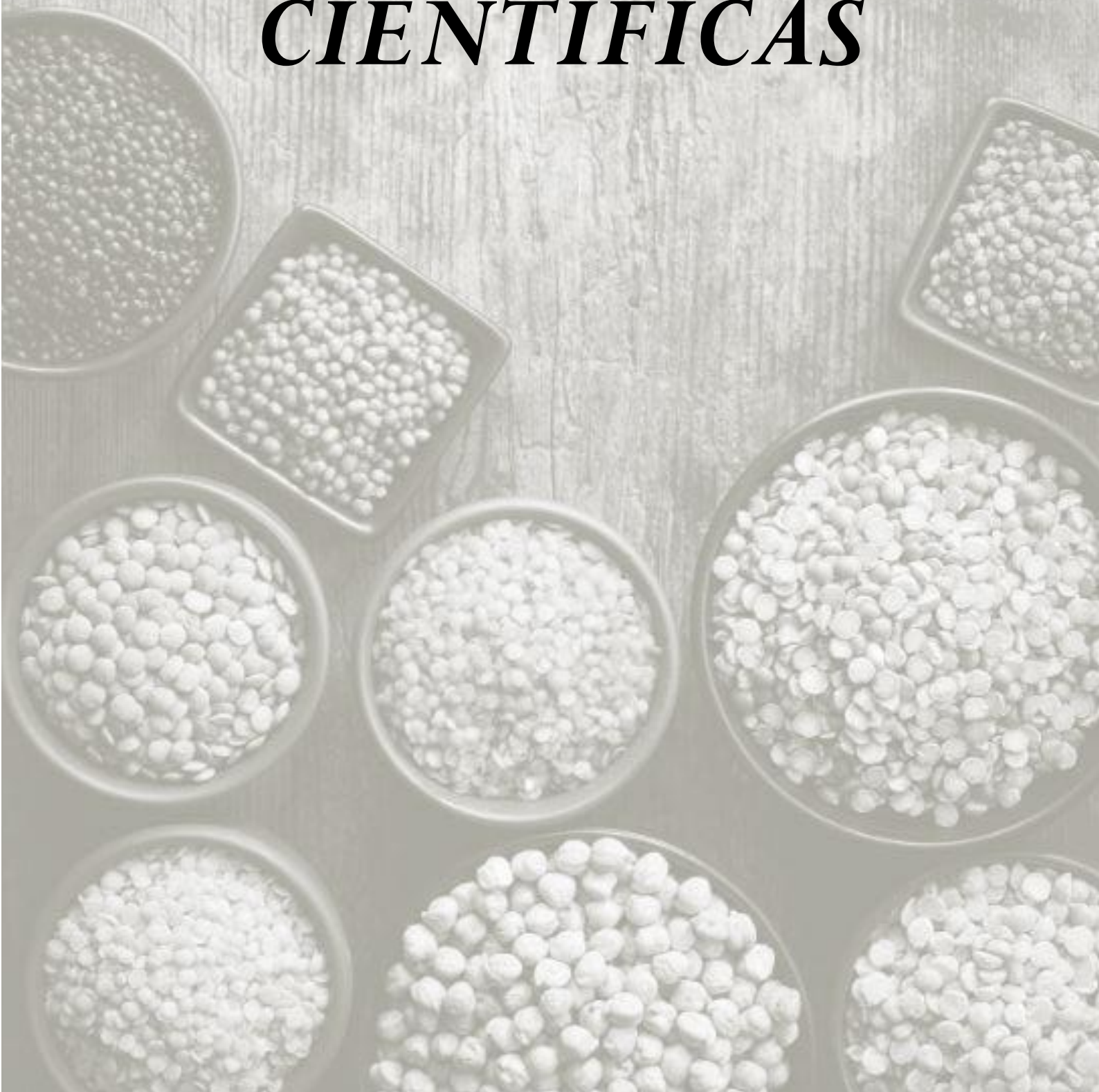
210. Rufián-Henares, J.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F. Relationship between acrylamide and thermal-processing indexes in commercial breakfast cereals: A survey of Spanish breakfast cereals. *Molecular Nutrition and Food Research* **2006**, *50*, 756-762.
211. Nursten, H. Recent developments in studies of the Maillard Reaction. *Food Chemistry* **1981**, *6*, 263-277.
212. Amigo-Benavent, M.; Nitride, C.; Bravo, L.; Ferranti, P.; del Castillo, M. Stability and bioactivity of a Bowman-Birk inhibitor in orange juice during processing and storage. *Food & Function* **2013**, *4*, 1051-1060.
213. Toro-Funes, N.; Bosch-Fusté, J.; Latorre-Moratalla, M.; Veciana-Nogués, M.; Videl-Carou, M. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilised soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. *Food Chemistry* **2015**, *167*, 78-83.
214. Wan, X.; Lu, L.; Anderson, K.; Ware, J.; Kennedy, A. Urinary excretion of Bowman-Birk inhibitor in humans after soy consumption as determined by a monoclonal antibody-based immunoassay. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **2000**, *9*, 741-747.
215. Hernández-Ledesma, B.; Hsieh, C.; de Lumen, B. Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry* **2009**, *115*, 574-580.
216. Jeong, H.; Jeong, J.; Kim, D.; De Lumen, B. Inhibition of core histone acetylation by the cancer preventive peptide Lunasin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 632-637.
217. Xiao, C.; Wood, C.; Robertson, P.; Gilani, G. Protease inhibitor activities and isoflavone content in commercial soymilks and soy-based infant formulas sold in Ottawa, Canada. *Journal of Food Composition and Analysis* **2012**, *25*, 130-136.
218. Camacho, E.; Casadesús, J. Regulation of traJ transcription in the Salmonella virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemimethylation. *Molecular Microbiology* **2005**, *57* (6), 1700-1718.
219. Clemente, A.; Vioque, J.; Sánchez-Vioque, R.; Pedroche, J.; Bautista, J.; Millán, F. Factors affecting the in vitro protein digestibility of chickpea albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 79-84.
220. Resmini, P.; Pagani, A.; Pellegrino, L. Evaluation of the thermal damage by determination of epsilon-furoylmethyl-lysine (furosine) by HPLC. *Tecnica Molitoria* **1991**, *41*, 821-826.

221. Rufián-Henares, J.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52* (17), 5354-5358.
222. Nelson, D.; Cox, M. *Lehninger. Principios de Bioquímica*; 2009.
223. Domoney, C.; Welham, T. Trypsin inhibitors in Pisum: variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Science Research* **1992**, *2* (1), 147-154.
224. Erlanger, B.; Edel, F.; Cooper, A. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1966**, *115* (1), 206-210.
225. Copeland, R.; Lombardo, D.; Giannaras, J.; Decicco, C. Estimating KI values for tight binding inhibitors from dose-response plots. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1995**, *5* (17), 1947-1952.
226. Volcippella, M.; Ceci, L.; Cordewener, J.; America, T.; Gallerani, R.; Bode, W.; Jongasma, M.; Beekwilder, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry* **2003**, *270*, 10-19.
227. Volcippella, M.; Schipper, A.; Jongasma, M.; Spoto, N.; Gallerani, R.; Ceci, L. Characterization of recombinant mustard trypsin inhibitor 2 (MTI2) expressed in *Pichia pastoris*. **2000**, *468* (2-3), 137-141.
228. Billings, P.; Brandon, D.; Habres, J. Internalisation of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. *European Journal of Cancer* **1991**, *27* (9), 1190.
229. Cui, X.; Wang, Z.; Li, Y.; Li, C. Buckwheat trypsin inhibitor enters Hep G2 cells by clathrin-dependent. *Food Chemistry* **2013**, *141* (3), 2625-2633.
230. Clemente, A.; Domoney, C. Therapeutic Properties of Legume Protease. In *Phytopharmacology & Therapeutic Values II*; 2007; Vol. 20, pp 397-417.
231. Singh, R.; Appu Rao, A. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for "hyperreactive" disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochimica et Biophysica Acta* **2002**, *1597* (2), 280-291.
232. Jofuku, K.; Goldberg, R. Trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the Soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* **1989**, *1* (11), 1079-1093.
233. Orf, J.; Hymowitz, T. Genetics of the Kunitz trypsin inhibitor: an antinutritional factor in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1979**, *56* (8), 722-726.

234. Cook, D.; Jensen, A.; Farley, J.; Hymowitz, T. Utilization by growing and finishing pigs of raw soybeans of low Kunitz trypsin inhibitor content. *Animal Science Journal* **1988**, *66* (7), 1686-1691.
235. Livingstone, D.; Beilinson, V.; Kalyaeva, M.; Schmidt, M.; Herman, E.; Nielsen, N. Reduction of protease inhibitor activity by expression of a mutant Bowman-Birk gene in soybean seed. *Plant Molecular Biology* **2007**, *64* (4), 397-408.
236. Muel, F.; Carrouée, B.; Grosjean, F. Trypsin inhibitor activity of pea cultivars: new data and a proposal strategy for breeding programmes. *AEP (eds) Proceedings of the 3rd European Conference on Grain Legumes*, Valladolid, España, 1998; pp 164-165.
237. Page, D.; Aubert, G.; Duc, G.; Welham, T.; Domoney, C. Combinatorial variation in coding and promoter sequences of genes at the Tri locus in *Pisum sativum* accounts for variation in trypsin inhibitor activity in seeds. *Molecular Genetics and Genomics* **2002**, *267* (3), 359-369.
238. Clemente, A.; Arques, M.; Dalmais, M.; Le Signor, C.; Chinoy, C.; Olías, R.; Rayner, T.; Isaac, P.; Lawson, D.; Bendahmane, A.; Domoney, C. Eliminating Anti-Nutritional Plant Food. *PLoS One* **2015**, *10* (8), e0134634.
239. Li, P.; Jiang, S.; Lee, S.; Lin, C.; Lin, M.; Dickson, R.; Michejda, C.; Roller, P. Design and synthesis of novel and potent inhibitors of the type II transmembrane serine protease, matriptase, based upon the sunflower trypsin inhibitor-1. *Journal of Medicinal Chemistry* **2007**, *50* (24), 5976-5983.
240. Philipp, S.; Kim, Y.; Dürr, I.; Wenzl, G.; Vogt, M.; Flecker, P. Mutational analysis of disulfide bonds in the trypsin-reactive subdomain of a Bowman-Birk-type inhibitor of trypsin and chymotrypsin. Cooperative versus autonomous refolding of subdomains. *European Journal of Biochemistry* **1998**, *251* (3), 854-862.
241. Brandon, D.; Bates, A.; Friedman, M. Immunoassays for Bowman-Birk and Kunitz Soybean Trypsin Inhibitors in Infant Formula. *Journal of Food Science* **2004**, *69* (1), FCT11-FCT15.
242. Morales, M.; Romero, C.; Jimenez-Perez, S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *International Journal of Food Science & Technology* **1996**, *31* (5), 411-438.
243. Chen, Y.; Xu, Z.; Zhang, C.; Kong, X.; Hua, Y. Heat-induced inactivation mechanisms of Kunitz trypsin inhibitor and Bowman-Birk inhibitor in soymilk processing. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 108-116.

244. Mateos-Aparicio, I.; Redondo-Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M.; Zapata-Revilla, M. Soybean, a promising health source. *Nutrición Hospitalaria* **2008**, *23* (4), 305-312.
245. Srinivasan, A.; Giri, A.; Harsulkar, A.; Gatehouse, J.; Gupta, V. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **2005**, *57* (3), 359-374.
246. Kim, D.; Lee, K.; Kim, J.; Kim, S.; Song, J.; Seo, Y.; Lee, B.; Kang, S. Identification of Kunitz trypsin inhibitor mutations using SNAP markers in soybean mutant lines. *Theoretical and Applied Genetics* **2010**, *121* (4), 751-760.
247. Wang, K.; Li, X.; Takahata, Y.; Yamashita, T. Allelic diversity and geographical pattern at soybean Kunitz trypsin inhibitor single locus in Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). *Plant Breeding* **2010**, *129* (3), 264–270.
248. Lu, W.; Apostol, I.; Qasim, M.; Warne, N.; Wynn, R.; Zhang, W.; Anderson, S.; Chiang, Y.; Ogin, E.; Rothberg, I.; Ryan, K.; Laskowski, M. J. Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *Journal of Molecular Biology* **1997**, *266* (2), 441-461.

7. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS



Relationship between Glycation and Polyphenol Content and the Bioactivity of Selected Commercial Soy Milks

M. Carmen Arques,[†] Silvia Pastoriza,[‡] Cristina Delgado-Andrade,[†] Alfonso Clemente,[†] and José A. Rufián-Henares^{*,‡}

[†]Departamento Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidin (EEZ-CSIC), 18008 Granada, Spain

[‡]Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja, Universidad de Granada, 18071 Granada, Spain

ABSTRACT: Soy milk is a health-promoting beverage of which consumption is steadily expanding. Different bioactivities have been associated with soy products such as antioxidant capacity, anti-inflammatory properties, or decrease of cancer development risk. These activities have been related to the presence of several compounds, including polyphenols and serine protease inhibitors, although factors influencing such activities have been scarcely studied. In this study, we have determined the antioxidant capacity (ABTS and FRAP methods measured with the global antioxidant response, GAR protocol), total phenolic content, serine protease inhibitory activity, and presence of heat damage indicators in commercial soy milks. Polyphenols were primarily responsible for the antioxidant capacity of soy milks, increasing their concentration after digestion. Glycation under heat treatment might be responsible for decreasing protease inhibitory activities in soy milks. The results obtained support a role for furosine, a known marker of Maillard reaction and glycation, as a potential indicator to monitor both thermal treatment and effects on protease inhibitory activities in soy milk. The contribution of soy milk consumption to the daily intake of antioxidants and serine protease inhibitory activities is discussed.

KEYWORDS: soy milk, antioxidant, polyphenols, Bowman–Birk inhibitors, furosine, thermal processing, estimated intake

INTRODUCTION

Soy milk-based beverages are a growing and promising food sector in Spain, with a volume growth of 26% in past three years and an economic value of 200 million €. ¹ Soy milk is a good alternative to cow's milk for vegetarians, lactose-intolerant people and consumers allergic to cow's milk due to the presence of high-quality proteins and essential fatty acids and the lack of cholesterol, gluten or lactose. ² Different studies indicate that soy products have positive effects on human health such as regulation of lipid metabolism, ³ antioxidant activity, ⁴ and capacity to prevent or block certain mammalian tumors. ⁵

The overproduction of free radicals and reactive oxygen species (ROS) in our organism, related with the current lifestyle, is the main cause for increasing physiological levels of oxidative stress with a concomitant decrease in the overall plasmatic antioxidant activity. ⁶ In healthy conditions, the human body is a source of ROS, such as singlet oxygen, hydroxyl radicals, superoxide anions and peroxy radicals, which can cause oxidative damage to functional macromolecules such as DNA, proteins and lipids. ⁷ Dietary antioxidants protect the human body from free radicals, preventing oxidative stress and associated diseases. ⁸ In soy milk, different bioactive compounds, such as isoflavones, gallic acid, 4-hydroxybenzoic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, hesperidin, naringenin, rutin, quercetin, and catechin, have been reported as antioxidant compounds with activities ranging from free radical scavenging to lipid oxidation inhibition. ⁹

Serine protease inhibitors, such as Bowman–Birk inhibitors (BBIs) and Kunitz inhibitors (KTI), are bioactive components present in soy milk at physiologically relevant levels. In

particular, soybean (*Glycine max*) BBIs have been reported to inhibit carcinogenesis ¹⁰ and inflammatory disorders ¹¹ due to their potential to modulate the aberrant functioning of serine proteases via protease inhibition. ¹² Specifically, the chymotrypsin inhibitory activity (CIA) associated with BBIs is responsible for preventing radiation- and chemical carcinogen-induced transformation in a wide variety of in vitro assays. Experimental human trials have shown a reduction in ulcerative colitis patients after soybean BBI intake, with better rates of remission and clinical response compared to placebo-treated patients. ¹³

The processing of soybean into soy milk involves three major steps. ¹⁴ Soybeans are soaked in water to remove the inedible soy husk. Then, the beans are dried, ground, sieved, and cooked into slurry. Finally, the cooked slurry is blended with flavorings, sugars and vitamins, followed by a sterilization and homogenization process. Thermal processing during cooking and sterilization could decrease the bioactivity of certain compounds. Xu and Chang ¹⁵ reported that thermal treatment significantly reduced the total phenolics content (TPC) in soy milks. KTIs and BBIs have demonstrated different behaviors in terms of thermal resistance. KTIs are thermally labile compounds, whereas BBIs are highly resistant to thermal treatment. Interestingly, Toro-Funes et al. ¹⁶ stated that protein glycation could affect lysine blockage within soybean BBI

Received: January 13, 2016

Revised: February 10, 2016

Accepted: February 15, 2016

Published: February 15, 2016

Table 1. Antioxidant Capacity (GAR_{ABTS}, GAR_{FRAP}) and Total Phenolic Content (TPC) of Digested and Undigested Commercial Soy Milks^a

sample	GAR _{ABTS} ^b		GAR _{FRAP} ^b		TPC ^c	
	undigested	digested	undigested	digested	undigested	digested
1	1.63 ± 0.17a	16.17 ± 1.32a	2.36 ± 0.20a	21.86 ± 2.25a	604 ± 46a	724 ± 40a
2	2.06 ± 0.24ab	19.79 ± 1.78b	2.53 ± 0.11a	26.22 ± 2.43b	857 ± 59b	945 ± 49b
3	1.76 ± 0.16a	18.15 ± 1.54ab	2.47 ± 0.23a	21.51 ± 1.98a	642 ± 24a	761 ± 28a
4	1.63 ± 0.20a	16.20 ± 1.35a	1.29 ± 0.11b	14.06 ± 1.06c	527 ± 86a	629 ± 65a
5	2.01 ± 0.19ab	18.52 ± 1.46ab	2.51 ± 0.23a	23.94 ± 2.04ab	698 ± 59a	812 ± 88a
6	2.34 ± 0.21b	22.53 ± 2.16c	3.27 ± 0.38c	29.07 ± 2.87b	960 ± 46b	1092 ± 53b
mean	1.91 ± 0.20	18.56 ± 2.19	2.41 ± 0.22	22.77 ± 4.68	715 ± 163	827 ± 166

^aData are expressed as the mean ± SD (*n* = 3). Values in a column marked with different letters are statistically different (*p* < 0.05). ^bGAR_{ABTS} and GAR_{FRAP} are expressed as mmol Trolox/L. ^cTPC is expressed as mg equiv gallic acid/L.

inhibitory domains, which in turn might decrease protease inhibitory activity.¹⁷ Scientific literature regarding the antioxidant capacity of soy milks is available; however, information concerning the effect of thermal treatment on bioactivity of soy milks as well as the relationship between soy milk intake and bioactivity is really scarce. Therefore, the main objective of this study was to investigate the bioactivity of commercial soy milks in terms of antioxidant and serine protease inhibitory activities. The relationship between bioactivity and thermal treatment damage was assessed using common markers such as furosine and 5-hydroxymethylfurfural (HMF). Finally, the contribution of soy milk consumption to the Spanish daily intake of antioxidants and protease inhibitory activity is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Samples. Folin–Ciocalteu reagent, gallic acid, and sodium carbonate were from Panreac (Madrid, Spain). 6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox), BBI from soybean, *N*- α -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), α -amylase from human saliva, pepsin (from porcine gastric mucosa), pancreatin (from porcine pancreas), bile salts, trypsin and chymotrypsin from bovine pancreas, and HMF were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2,2'-azobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl, and 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) were from Fluka Chemicals (Madrid, Spain). Furosine was from Polypeptide (Strasbourg, France). All other chemicals were of analytical grade.

Samples consisted of six commercial soy milks (samples 1–6), which were purchased in stores from the metropolitan area of Granada (Spain). Each sample was obtained from three different stores, being analyzed in triplicate. These samples reflect 93.4% of soy milk consumption in Spain in 2015.¹ The energy provided by these drinks ranged from 30 to 47 kcal/100 mL, and their nutritional composition as declared by the manufacturers was as follows (g/100 mL): 3–3.8 proteins; 2.6–4.6 carbohydrates; 1.7–5.5 lipids; 0–1.3 fiber.

To resemble the effect of the in-bottle sterilization process of soy milk on serine protease inhibitory activities of soybean BBI, a simple model system composed of commercial BBI (1 mg/mL) and glucose (1 mg/mL) was used. A BBI and glucose mixture was dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.5. Aliquots of 3 mL were placed in Pyrex screw-cap vials, which were immersed in a glycerol bath kept at 120 °C for a total time 30 min, monitoring the samples every 5 min to investigate the cumulative effect of thermal treatment on trypsin (TIA) and chymotrypsin inhibitory activity (CIA) (see below). The samples were then cooled in an ice bath and stored at –80 °C until analysis. The reported heating times exclude the heating-up period, which was estimated at 2 min. Control samples were obtained by heating BBI without glucose.

Sample Digestion. Soy milks were treated mimicking gastrointestinal digestion as described by Pastoriza et al.¹⁸ Briefly, soy milks

were sequentially digested with α -amylase, pepsin, pancreatin and bile salts to mimic oral, gastric, and intestinal digestion. After in vitro digestion, the bioaccessible (soluble) and the nonaccessible (or insoluble) fractions were separated and stored at –80 °C until analysis.

Antioxidant Capacity Analysis. The antioxidant capacity of digested soy milk samples was assessed by means of the GAR protocol,¹⁸ including the analysis of antioxidant activity with the ABTS and FRAP methods. The GAR value was calculated as the sum of the antioxidant activity from their soluble fractions plus the antioxidant activity trapped in the insoluble fractions. The analyses were performed by using a FLUOstar Omega microplate reader (BMG Labtech, Germany) with temperature control set at 37 °C. Trolox solutions were used to perform the calibration curve. The results were expressed as millimole equivalents of Trolox per liter of sample.

Total Phenolic Content. Total phenolics in undigested and digested soy milks were determined according to the Folin–Ciocalteu method.¹⁹ Measures were performed on a FLUOstar Omega microplate reader. Quantification was carried out on the basis of the standard curve of gallic acid, and results were expressed as milligrams of gallic acid equivalents per liter of sample.

Analysis of Serine Protease Inhibitory Activities. The inhibitory activity of soy milks against trypsin (TIA) and chymotrypsin (CIA) was assessed spectrophotometrically by using BAPNA and BTEE as specific substrates, respectively. One trypsin inhibitor unit (TIU) was defined as that which gives a reduction in absorbance at 410 nm of 0.01, relative to trypsin control reactions²⁰ whereas one chymotrypsin inhibitor unit (CIU) was defined as that which gives a reduction in absorbance at 256 nm of 0.01, relative to chymotrypsin control reactions.²¹ TIA and CIA were expressed as units per liter of soy milk.

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural and Furosine. HMF analysis was based on the reversed-phase HPLC method of Rufián-Henares et al.,²² whereas the analysis of furosine was performed with the ion-paired HPLC method of Rufián-Henares et al.²³ Results were expressed as milligrams of HMF or furosine per liter of soy milk.

Contribution of Antioxidant Capacity, Polyphenol and CIA Intakes from Soy Milks to the Spanish Diet. Dietary antioxidant capacity and polyphenol and CIA intakes were calculated as the mean value of soy milks by taking into account the amount of food per serving in Spain²⁴ and their daily consumption.¹ The contribution of soy milks to the daily intake of antioxidant capacity²⁵ and polyphenols²⁶ was referred to previously published results, whereas the contribution of these beverages to the daily CIA intake was referred to the effective dosage with evidenced colorectal anticarcinogenic properties in animal models.²⁷

Statistical Treatment. Homogeneity of variance was first assessed using the Levene test and a significance level of 5% (*p* < 0.05). Statistical significance of data was tested using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Duncan test to compare the means that presented a significant variation (*p* < 0.05). The evaluation of the relationship between different assays was carried out by computing the relevant correlation coefficient (Pearson linear

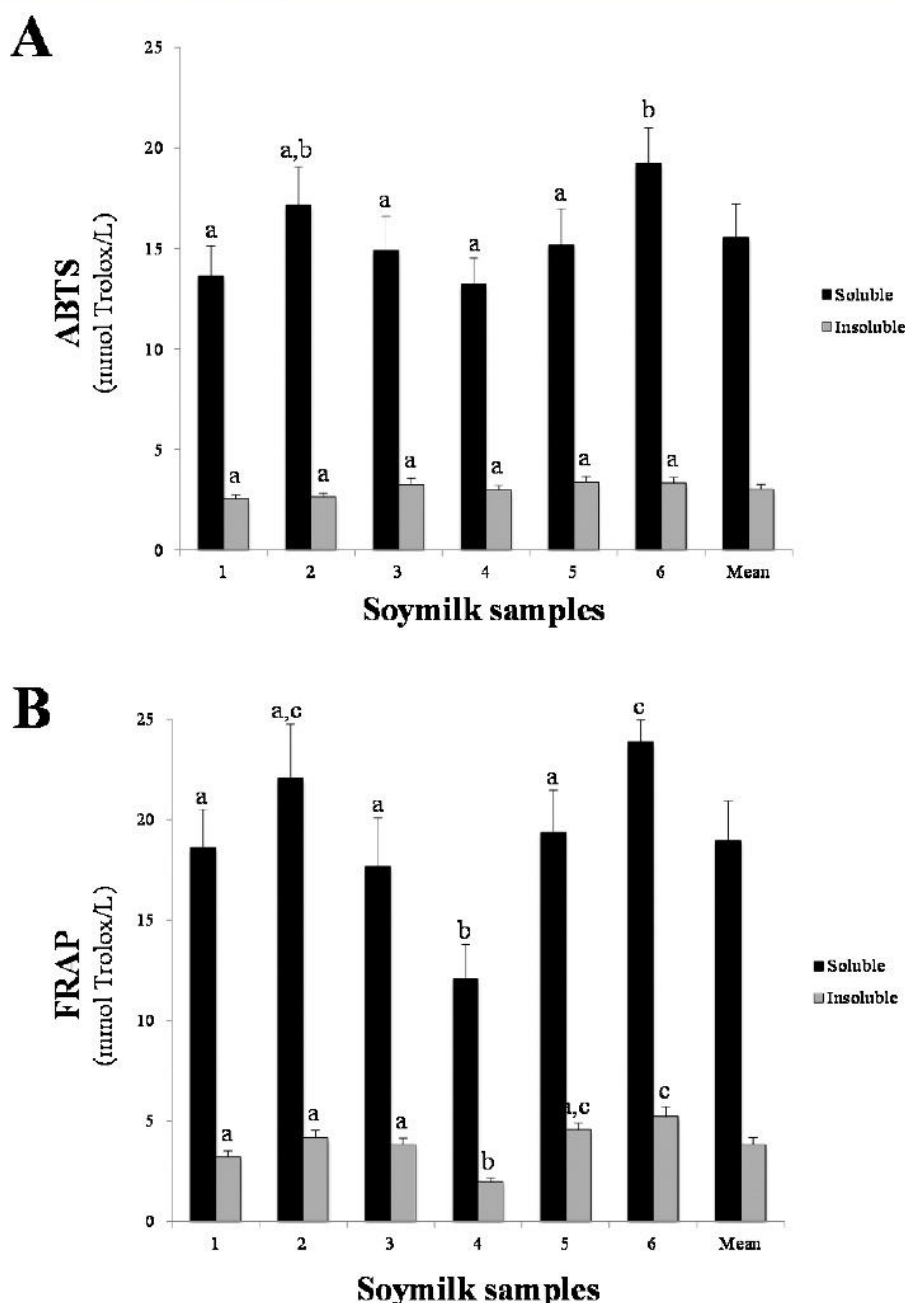


Figure 1. Antioxidant capacity of the isolated soluble and insoluble fractions of digested commercial soy milks. Different letters above bars of the same color indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

correlation) at the $p < 0.05$ confidence level. All of the statistical analyses were performed using Statgraphics Centurion XVI statistical software (2009).

RESULTS AND DISCUSSION

Antioxidant Capacity and Phenolic Content of Soy Milks. Table 1 shows the total antioxidant capacity measured by means of the GAR method. When the antiradical capacity was measured with the ABTS method in undigested samples, the mean activity was 1.91 mmol Trolox/L. No statistically significant differences were obtained for most of the undigested samples, except for sample 6, which showed a significantly higher antiradical capacity ($p < 0.05$). After digestion, the

antioxidant capacity of soy milks increased up to 10 times, as stated previously for different vegetable products,¹⁸ juices²⁸ and other soy milks.⁹ The mean antiradical activity obtained was 18.56 mmol Trolox/L, showing sample 6 the highest activity (22.53 mmol Trolox/L). These values are in line with those reported by Amigo-Benavent et al.,²⁹ although these authors measured antioxidant activity by using a different hydrophilic antiradical activity method (ORAC). After simulated gastrointestinal digestion, a liquid phase (potentially bioaccessible) and an insoluble one (nonaccessible) were obtained. Figure 1A shows the antioxidant activity associated with the isolated soluble and insoluble phases obtained after *in vitro* digestion measured by the ABTS method. These fractions were necessary

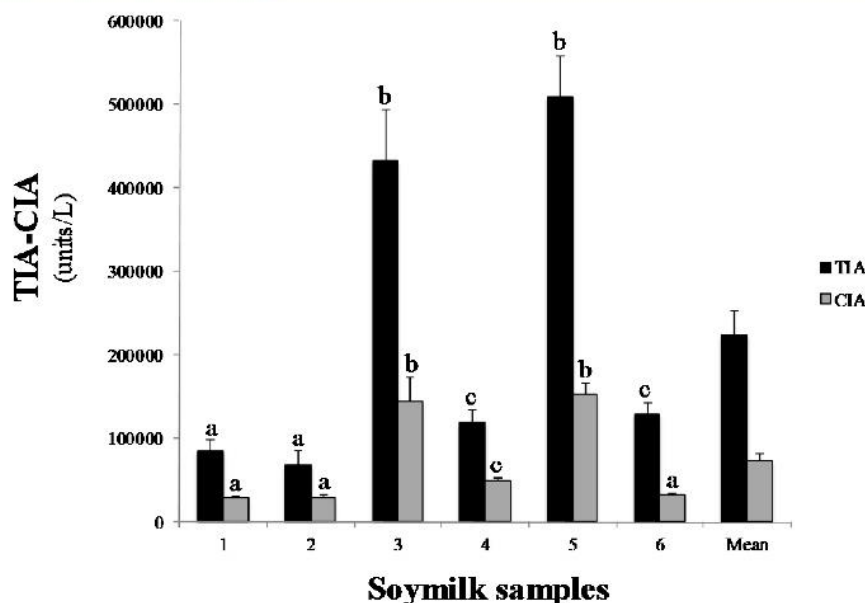


Figure 2. Trypsin inhibitory activity (TIA) and chymotrypsin inhibitory activity (CIA) of commercial soy milks. Different letters above bars of the same color indicate statistically significant differences ($p < 0.05$).

to perform the GAR protocol. The mean antioxidant activity of the soluble digested phase was 15.55 mmol Trolox/L, whereas the mean antiradical activity of the solid phase was 3.01 mmol Trolox/L, 84% of the total potential antiradical capacity being bioaccessible. These results are close to those previously reported by Ma et al.³⁰ for the ORAC assay; these authors found that the percentage of bioaccessible antioxidant activity, after dialysis with a 3 kDa cutoff membrane, had dropped to 50%.

Another way to exert antioxidant activity is the capability of a food to reduce metallic ions with oxidant properties. The reducing capacity of soy milks was evaluated by using the FRAP method (Table 1). The mean value of the undigested beverages was 2.41 mmol Trolox/L, which was significantly higher ($p < 0.05$) than the antiradical activity assessed with the ABTS method. As previously demonstrated by using the ABTS method, sample 6 was the most antioxidant soy milk, whereas sample 4 was the least reducing ($p < 0.05$) one. Ma et al.³⁰ found slightly lower reducing capacity in soy milks, although results were expressed in terms of millimoles of Fe^{2+} instead of Trolox. After digestion, the antioxidant values of soy milks increased almost 10 times ($p < 0.05$) up to 22.77 mmol Trolox/L as the mean value, which is a behavior documented by other authors.^{9,30} Samples 2 and 6 showed the highest values, whereas sample 4 was the lowest one ($p < 0.05$). Figure 1B shows the antioxidant activity associated with the isolated soluble and insoluble phases obtained after *in vitro* digestion measured by the FRAP method. The mean reducing capability of the soluble (18.94 mmol Trolox/L) and insoluble (3.84 mmol Trolox/L) fractions evaluated with the FRAP procedure also accounted for the 83 and 17% of the total reducing capacity, respectively, as in the case of the ABTS method. By using the FRAP method, similar percentages for several soy products were obtained.^{9,30}

Polyphenols are the chemical species mainly responsible for the antioxidant capacity of soy milk.⁹ Thus, the analysis of their content as well as the effect of *in vitro* digestion is important from a nutritional point of view. The mean TPC of the studied

soy milks was 715 mg equiv gallic acid/L, and samples 2 and 6 had the highest phenolic contents ($p < 0.05$) (Table 1). The mean phenolic content of digested soy milks increased to 827 mg equiv gallic acid/L. Such increase has been previously reported by other authors^{9,30} due to the release of soluble polyphenols attached to digestible proteins or carbohydrates.

As described at Phenol Explorer,³¹ the database on polyphenol content in foods, isoflavones, compounds within the family of flavonoids, are by far the major polyphenols present in soy milk, being accompanied by some other phenolic acids such as gallic, ferulic, and sinapic acids. Within them, it is worth mentioning that the most abundant structures are derived from genistein and daidzein, followed by glycitin. Thus, it can be suggested that these compounds, described as quickly absorbed,³² could be the major contributors to the antioxidant capacity measured in our soy milk samples. In this sense, given that TPC showed equivalences with the antioxidant capacity of soy milks, the linear correlation among them was studied. A statistically significant linear correlation ($p < 0.05$) was obtained between ABTS-TPC ($r = 0.9715$) and FRAP-TPC ($r = 0.9289$); a relationship between both antioxidant methods were also found ($r = 0.8543$). Similar correlation coefficients were reported by Tyug et al. in soybean byproducts.³³

Serine Protease Inhibitory Activities of Soy Milks.

Bowman–Birk inhibitors are small water-soluble proteins present in soybean that strongly inhibit serine proteases, trypsin- and chymotrypsin-like proteases, being potential contributors in the existing relationship between legume consumption and protective effect against certain types of cancers such as breast, prostate and colorectal cancer.^{34,35}

Figure 2 depicts the TIA and CIA of commercial soy milks analyzed. In soy milks, KTIs and BBIs are responsible for TIA, whereas CIA, specifically linked to their reported anti-inflammatory and anticarcinogenic properties, is associated with BBI only. In soy milks, TIA ranged from 69,000 to 510,000 units/L, with a mean value of 224,000 units/L, whereas CIA ranged from 28,000 to 154,000 units/L, with a mean value of 72,500 units/L. Samples 3 and 5 had the highest inhibitory

activities compared to the other samples ($p < 0.05$). These values are slightly higher than those reported for Canadian soy milks, with reported mean TIA and CIA values of 180,000 and 43,000 units/L, respectively, after proper transformation of the units reported in the study.³⁶ The soy varieties used as well as the processing conditions used might be responsible for the variability found in serine protease inhibitory activity among commercial soy milks.

Effect of Heat Treatment on Protein Damage and Its Relationship with Soy Milk Bioactivities. Soy milk production includes two main thermal processes: one cooking step after soy seeds have been soaked and another one for soy milk sterilization. Thus, thermal damage can affect the nutritional quality of soy milk due to degradation of isoflavones³⁰ or protein damage.¹⁶ This is a particularly relevant issue in soy milk because soy proteins are enriched in essential amino acids such as lysine, whose reactivity towards the Maillard reaction (MR) is significant even in the absence of thermal treatment.³⁷ Different MR products have been recognized to assess the extent of MR, such as furosine and HMF. Furosine is an indicator of the first steps of MR,³⁸ whereas HMF is an indicator of the intermediate steps of MR.³⁹ The furosine content of commercial soy milks ranged from 24.7 to 96.2 mg/L, with a mean value of 66.7 mg furosine/L (Table 2). These values are consistent with those previously reported

Table 2. Presence of Maillard Reaction Indicators (Furosine and HMF) in Commercial Soy Milks^a

sample	furosine ^b	HMF ^b
1	87.5 ± 2.9a	NDa
2	96.2 ± 1.2b	NDa
3	31.2 ± 3.3c	0.011 ± 0.002b
4	84.3 ± 2.0a	NDa
5	24.7 ± 1.3d	NDa
6	76.4 ± 2.1e	0.024 ± 0.003c
mean	66.7 ± 30.8	0.006 ± 0.001

^aData are expressed as the mean ± SD ($n = 3$). ND, not detected. Values in a column marked with different letters are statistically different ($p < 0.05$). ^bHMF and furosine are expressed as mg/L.

by Toro-Funes¹⁶ for a soy milk produced in a pilot plant, which showed a furosine value of 29.8 mg/L after whole soybeans had been ground for 20 min at 80 °C and increased to 54 mg/L after UHT sterilization. These authors reported that storage at 20 °C for 4 months increased the furosine content up to 100 mg/L; such an increased level was similar to those found in our study. It must be mentioned that processing conditions or storage time of commercial soymilks tested in this study are unknown to us, so we cannot speculate about the progress of heating damage markers. On the other hand, the values obtained for furosine in soy milks are similar to those reported for bovine milk (2–150 mg furosine/L), which has whey proteins enriched in lysine and is rather reactive under sterilization temperatures.⁴⁰ Thus, taking into account the data reported by Toro-Funes¹⁶ and ours, furosine could be a good indicator, as occurs in bovine milk, to follow-up both the production of soy milk (both the soaking process and sterilization) and its storage.

The analysis of HMF did not provide much information about soy milk processing, because only two samples showed measurable HMF (Table 2). These samples showed values

much lower (<0.025 mg HMF/L) compared to those reported for milk (0.2–1500 mg/L).⁴¹ The explanation for the absence/scarcely amounts of HMF in the studied soy milks could be related to the absence of reducing sugars in the final product. In the case of soy milk, sucrose is added prior to the sterilization process, whereas bovine milk contains high levels of lactose per se. That makes bovine milk prone to reach the intermediate stages of the MR and favors the presence of HMF and other furanic compounds, whereas soy milk remains in the initial stages of the MR, where only derivatives from the Amadori compounds can be detected.

Taking into account that the studied soy milks showed different furosine contents, it could be hypothesized that certain soy milk proteins, including BBIs, are likely glycosylated due to heat treatment and further development of MR. Then, if glycation takes part, the activity of BBIs could be decreased due to the presence of a lysine residue at the P1 position (reactive site peptide, according to the nomenclature of Schechter and Berger)⁴² within the first inhibitory domain with the ability to inhibit trypsin; however, no data are available regarding its potential collateral effect on its ability to inhibit chymotrypsin inhibitory activity. In addition, there are other lysine residues in the molecule that are reactive and could influence its ability to inhibit trypsin- and chymotrypsin-like proteases. In this study, we have evaluated the relationship between the amount of furosine and remaining TIA–CIA. As depicted in Figure 3A, there was a clear correlation between both parameters, obtaining statistically significant ($p < 0.05$) Pearson linear correlations of 0.9779 and 0.9925 for TIA–furosine and CIA–furosine, respectively. These results are coincident with those proposed by Xiao et al.,³⁶ who found a TIA reduction of 44.4% in heat-processed soy milk when compared to that contained in whole soybean. Thus, to gain knowledge of the effect of heat and glycation over BBI activity, a model system was performed by heating at 120 °C commercial soybean BBI in the presence/absence of glucose during 5, 10, 15, 20, 25, or 30 min. As depicted in Figure 3B, the behavior was similar to that observed in the selected soy milks, with both TIA and CIA decreasing as the furosine content increased during heating ($r = 0.9924$ and $r = 0.9859$ for TIA–furosine and CIA–furosine, respectively). Interestingly, no changes in furosine content or TIA–CIA were observed when BBI was heated alone without sugar (data not shown). BBIs from soybean have been reported to be remarkably stable when subjected to boiling, under either neutral or acidic conditions.⁴³ In processed legumes or their derived products, a high percentage of the serine protease inhibitory activity is associated with heat-stable BBI. Circular dichroism spectroscopy and fluorescence studies have revealed that the cysteine residues, involved in seven intramolecular disulfide bridges, provide extreme stability to high temperatures and resistance to proteolysis and help to maintain the structural and functional features of the inhibitory domains.^{44,45}

In our study, the results obtained point out to glycation as the main modulator of BBI activity during thermal treatment. It is likely that glycation of a specific lysine (Lys16) located at the P1 position within the trypsin inhibitory domains might affect trypsin–BBI interaction; however, it is not mechanistically clear how such glycation might influence CIA. Indeed, further studies to determine how glycation of Lys16 and additional lysine and arginine residues might influence the ability of BBIs to inhibit serine proteases are necessary.

Contrary to the clear relationship found between furosine content and BBI activity, no correlation of furosine with the

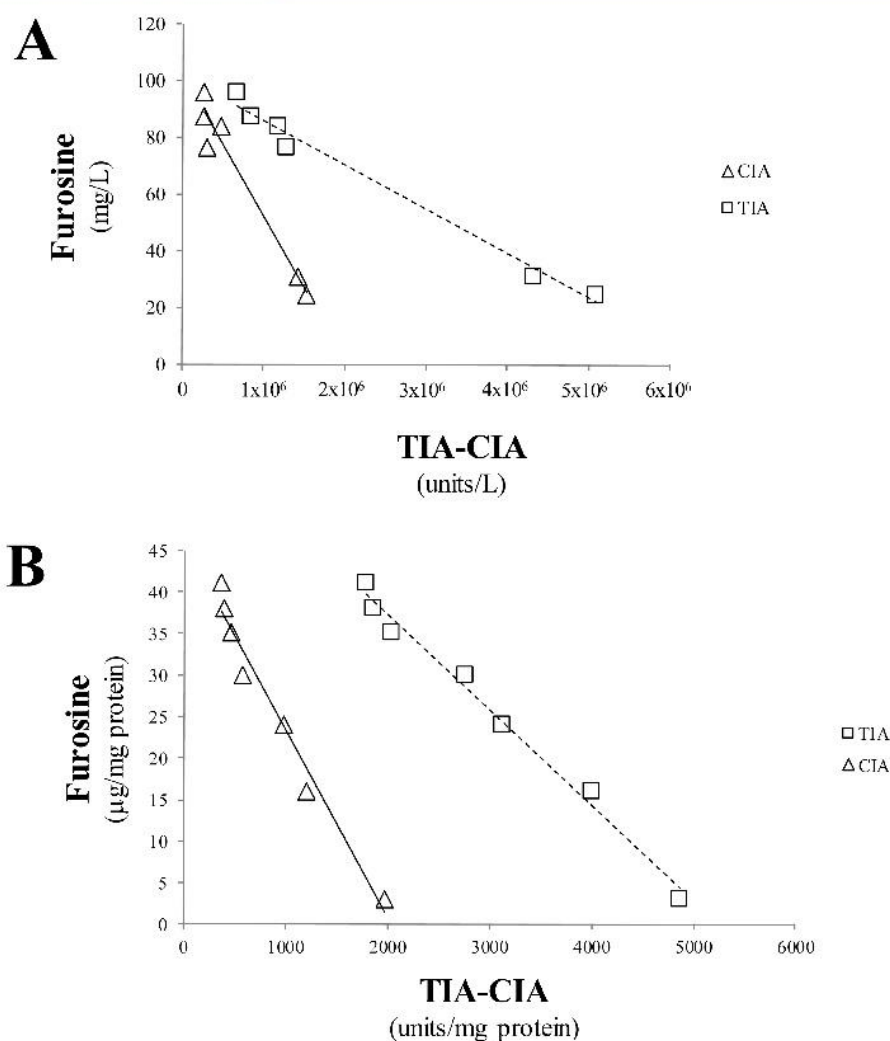


Figure 3. Linear correlation between TIA–furosine and CIA–furosine in commercial soy milks (A) and the model system BBI–glucose heated at 120 °C for 0, 5, 10, 15, 20, 25, or 30 min (B).

Table 3. Contribution of Soy Milk Consumption to the Daily Antioxidant Capacity and Polyphenol Intake in the Spanish Diet as well as Protective Effect against Colon Cancer Development

analytical assay	daily intake by national consumption			daily intake per portion		
	minimal	mean	maximum	minimal	mean	maximum
antioxidant capacity (μmol Trolox/day and % contribution to daily intake)						
ABTS	9.55 (0.27%)	11.19 (0.32%)	13.71 (0.39%)	326 (9.19%)	382 (10.76%)	468 (13.19%)
GAR _{ABTS}	94.76 (2.67%)	108.8 (3.06%)	132.0 (2.34%)	3234 (91.12%)	3712 (104.6%)	4506 (127.0%)
FRAP	7.56 (0.13%)	14.12 (0.23%)	19.16 (0.32%)	258 (4.29%)	482 (8.01%)	654 (10.87%)
GAR _{ABTS}	82.39 (1.37%)	133.4 (2.22%)	170.4 (3.27%)	2812 (46.76%)	4554 (75.72%)	5814 (96.67%)
TPC (mg equiv gallic acid/day and % contribution to daily intake)	4.13 (0.16%)	4.79 (0.19%)	6.33 (0.24%)	141 (5.44%)	164 (6.32%)	216 (8.34%)
CIA ^a (units/day and % contribution to effective dose)	36 (0.69%)	91 (1.76%)	193 (3.73%)	12134 (235%)	31049 (602%)	65723 (1274%)

^aContribution of CIA (chymotrypsin inhibitory activity) to the effective dose demonstrated as anticarcinogenic in animal models.

antioxidant capacity of soy milks was found (data not shown). Heat treatment can decrease to some extent those polyphenols present in soy milks; however, heat damage produced during sterilization is not so strong to decrease considerably the antioxidant activity.³⁰ Although heat damage produced during the soaking process could be higher compared to that of the

sterilization process, the release of polyphenols could increase the antioxidant capacity instead of decreasing.³³

Soy Milk Bioactivity As Related to Its Daily Intake within the Spanish Diet. As stated above, the main soy milks consumed in Spain show an interesting antioxidant capacity, mainly due to a high content of polyphenols. In addition, they also possess an appreciable chymotrypsin inhibitory activity,

which has been specifically linked to their potential chemopreventive properties.^{34,35} Thus, it is interesting to put into context these bioactivities within the regular Spanish diet. In this sense, Table 3 shows the daily intake of antioxidant capacity, CIA and polyphenols from soy milk in Spain taking into account the national consumption. The mean daily intake of antioxidant capacity from these beverages is 11.19–14.12 $\mu\text{mol Trolox/day}$, as measured by ABTS and FRAP methods, which accounts for 0.3% of the daily antioxidant capacity intake in the Spanish population. When the results are expressed by means of the GAR method, the antioxidant capacity intake can increase to 132–170 $\mu\text{mol Trolox/day}$, equivalent to 3% of the daily antioxidant capacity, which is an appreciable quantity. However, taking into account that the daily intake of the antioxidant activity was evaluated without previous *in vitro* digestion,²⁵ this estimation must be confirmed in the future. The polyphenols supplied by the consumption of soy milks reached 4.79 mg equiv gallic acid/day, corresponding to 0.2% of the daily intake of polyphenols in Spain.²⁶ The potential anticarcinogenic activity of soy milks (Table 3), which was calculated by taking into account CIA, was previously demonstrated to be effective in animal models (5158 units/day).⁴⁶ In this sense, the daily consumption of soy milk in Spain given rise to a mean intake 91 CIU, which means a 1.76% of the activity needed to reach anticarcinogenic activity in animal models.

Finally, the bioactivity of soy milks was also calculated by taking into account a more realistic consumption of a portion (200 mL). Thus, the antioxidant capacity intake increases to 3700–4500 $\mu\text{mol Trolox/day}$ (GAR_{ABTS} and GAR_{FRAP} methods, respectively), which accounts for 75–100% of the daily antioxidant capacity intake in the Spanish diet. Once again, it must be mentioned that this estimation needs to be recalculated in the future, after the application of the GAR protocol to assess the daily intake of antioxidant activity through the Spanish diet. In the case of polyphenols, one portion of soy milk accounts for 6.3% of the daily intake of polyphenols in Spain, being close to 170 mg equiv gallic acid/day. More interestingly, the intake of a glass of soy milk provides up to 31,000 CIA units, which is 6-fold the amount needed to produce anticarcinogenic effects in animal models.

In conclusion, this work emphasizes the bioactivity of the main soy milks commercialized in Spain. They are a good source of polyphenols and antioxidant capacity, which is even higher than that previously reported because the effect of the digestion process is considered. In this sense, the antioxidant capacity of soy milks is closely related with the polyphenol content present in the beverage. In addition, soy milks are also a good source of chymotrypsin inhibitory activity, which could be of clinical interest due to its association with anti-inflammatory⁴⁷ and anticarcinogenic⁴⁸ properties of BBI. It has been demonstrated that soy milks have a considerable amount of furosine, which is related to the intensity of heat treatment during processing. Even more, furosine content could be used as a tool to predict the effect of the thermal treatment over the potential anticarcinogenic potential of these beverages, because a direct correlation has been established between thermal damage and protease inhibitory activity associated with BBIs. It is suggested that glycation could regulate the protease inhibitory activity, probably by acting in the catalytic center of the protein. Thus, furosine could be a good tool to control the processing and storage of soy milks and also to evaluate the remaining protease inhibitory activity

in the foodstuff, which could not be useful in the case of infant formulas based in soy products.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(J.A.R.H.) Phone: +34 958 241000, ext. 20463. Fax: +34 958 24 95 77. E-mail: jarufian@ugr.es.

Funding

This work was supported by Project AGL2014-53895-R from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness and the European Fund of Regional Development (FEDER).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

M.C.A. carried out this work under the doctoral program in Nutrition and Food Sciences of the University of Granada.

REFERENCES

- (1) MERCASA. Productos lácteos. In *La Alimentación en España 2015*, 18th ed.; Mercasa: Madrid, Spain, 2015; pp 168–176.
- (2) Golbitz, P.; Jordan, J. Soyfoods: market and products. In *Soy Applications in Food*; Riaz, M. N., Ed.; Taylor & Francis: Boca Raton, FL, USA, 2006.
- (3) Torres, N.; Torre-Villalvazo, I.; Tovar, R. Regulation of lipid metabolism by soy protein and its implication in diseases mediated by lipid disorders. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, *17*, 365–373.
- (4) Friedman, M.; Brandon, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1069–1086.
- (5) Duranti, M. Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia* **2006**, *77*, 67–82.
- (6) Ward, N. C.; Hodgson, J. M.; Puddey, I. B.; Mori, T. A.; Beilin, L. J.; Croft, K. D. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radical Biol. Med.* **2004**, *36*, 226–232.
- (7) Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2004**, *55*, 373–399.
- (8) Yoo, K. M.; Lee, C. H.; Lee, H.; Moon, B.; Lee, C. Y. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chem.* **2008**, *106*, 929–936.
- (9) Rodríguez-Roque, M. J.; Rojas-Grau, M. A.; Elez-Martínez, P.; Marín-Belloso, O. Soymilk phenolic compounds, isoflavones and antioxidant activity as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2013**, *136*, 206–212.
- (10) de Paula Carli, A.; de Abreu Vieira, P. M.; Silva, K. T.; de Sá Cota, R. G.; Carneiro, C. M.; Castro-Borges, W.; de Andrade, M. H. Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectal pre-neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 1405–1412.
- (11) Safavi, F.; Rostami, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Exp. Mol. Pathol.* **2012**, *93*, 428–433.
- (12) Clemente, A.; Marín-Manzano, M. C.; Arques, M. C.; Domoney, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes: utilisation in disease prevention and therapy. In *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*; Hernández-Ledesma, B., Hsieh, C. C., Eds.; InTech-Open Access Publisher: Rijeka, Croatia, 2013; pp 23–44.
- (13) Lichtenstein, G. R.; Deren, J.; Katz, S.; Lewis, J. D.; Kennedy, A. R.; Ware, J. H. Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2008**, *53*, 175–180.
- (14) Mateos-Aparicio, I.; Redondo Cuenca, A.; Villanueva-Suárez, M. J.; Zapata-Revilla, M. A. Soybean, a promising health source. *Nutr. Hosp.* **2008**, *23*, 305–312.

- (15) Xu, B.; Chang, S. K. C. Isoflavones, flavan-3-ols, phenolic acids, total phenolic profiles, and antioxidant capacities of soy milk as affected by ultrahigh-temperature and traditional processing methods. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4706–4717.
- (16) Toro-Funes, N.; Bosch-Fusté, J.; Latorre-Moratalla, M. L.; Veciana-Nogués, M. T.; Vidal-Carou, M. C. Isoflavone profile and protein quality during storage of sterilised soymilk treated by ultra high pressure homogenisation. *Food Chem.* **2015**, *167*, 78–83.
- (17) Amigo-Benavent, M.; Nitride, C.; Bravo, L.; Ferranti, P.; del Castillo, M. D. Stability and bioactivity of a Bowman-Birk inhibitor in orange juice during processing and storage. *Food Funct.* **2013**, *4*, 1051–1060.
- (18) Pastoriza, S.; Delgado-Andrade, C.; Haro, A.; Rufián-Henares, J. A. A physiologic approach to test the global antioxidant response of foods. The GAR method. *Food Chem.* **2011**, *129*, 1926–1932.
- (19) Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* **1999**, *299*, 152–178.
- (20) Domoney, C.; Welham, T. Trypsin inhibitors in *Pisum*: variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Sci. Res.* **1992**, *2*, 147–154.
- (21) Clemente, A.; MacKenzie, D. A.; Jeenes, D. J.; Domoney, C. The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein Expression Purif.* **2004**, *36*, 106–114.
- (22) Rufián-Henares, J. A.; Garcia-Villanova, B.; Guerra-Hernandez, E. Determination of furfural compounds in enteral formula. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2001**, *24*, 3049–3061.
- (23) Rufián-Henares, J. A.; Garcia-Villanova, B.; Guerra-Hernandez, E. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5354–5358.
- (24) Salvador i Castells, G. Tabla de medidas caseras de alimentos. In *Nutrición y Dietética Clínica*; Salas-Salvadó, J., Bonada, A., Trallero, R., Saló, M. E., Eds.; Elsevier-Masson: Barcelona, Spain, 2000; pp 557–570, Annex 4.
- (25) Saura-Calixto, F.; Goñi, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. *Food Chem.* **2006**, *94*, 442–447.
- (26) Saura-Calixto, F.; Serrano, J.; Goñi, I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in whole diet. *Food Chem.* **2007**, *101*, 492–501.
- (27) Kennedy, A. R.; Billings, P. C.; Wan, X. S.; Newberne, P. M. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr. Cancer* **2002**, *43*, 174–186.
- (28) Álvarez, J.; Pastoriza, S.; Alonso-Olalla, R.; Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J. A. Nutritional and physicochemical characteristic of commercial Spanish citrus juices. *Food Chem.* **2014**, *164*, 396–405.
- (29) Amigo-Benavent, M.; Silván, J. M.; Moreno, F. J.; Villamiel, M.; del Castillo, M. D. Protein quality, antigenicity, and antioxidant activity of soy-based foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 6498–6505.
- (30) Ma, Y.; Zhou, M.; Huang, H. Changes of heat-treated soymilks in bioactive compounds and their antioxidant activities under in vitro gastrointestinal digestion. *Eur. Food Res. Technol.* **2014**, *239*, 637–652.
- (31) <http://phenol-explorer.eu/contents/food/472>.
- (32) Cassidy, A.; Brown, J. E.; Hawdon, A.; Faughnan, M. S.; King, L. J.; Millward, J.; Zimmer-Nechemias, L.; Wolfe, B.; Setchell, K. D. Factors affecting the bioavailability of soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *J. Nutr.* **2006**, *136*, 45–51.
- (33) Tyug, T. S.; Nagendra-Prasad, K.; Ismail, A. Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chem.* **2010**, *123*, 583–589.
- (34) Toyomura, K.; Kono, S. Soybeans, soy foods, isoflavones and risk of colorectal cancer: a review of experimental and epidemiological data. *Asian Pac. J. Cancer P.* **2002**, *3*, 125–132.
- (35) Yan, L.; Spitznagel, E. L. Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *89*, 1155–1163.
- (36) Xiao, C. W.; Wood, C. M.; Robertson, P.; Sawar-Gilani, G. Protease inhibitor activities and isoflavone content in commercial soymilks and soy-based infant formulas sold in Ottawa, Canada. *J. Food Compos. Anal.* **2012**, *25*, 130–136.
- (37) Ferragut, V.; Hernández-Herrero, M.; Veciana-Nogués, M. T.; Borrás-Suárez, M.; González-Linares, J.; Vidal-Carou, M. C.; Guamis, B. Ultra-high-pressure homogenization (UHPH) system for producing high-quality vegetable-based beverages: physicochemical, microbiological, nutritional and toxicological characteristics. *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *95*, 953–961.
- (38) Delgado-Andrade, C.; Rufián-Henares, J. A.; Morales, F. J. Lysine availability is diminished in commercial fibre-enriched breakfast cereals. *Food Chem.* **2007**, *100*, 725–731.
- (39) Rufián-Henares, J. A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F. J. Relationship between acrylamide and thermal-processing indexes in commercial breakfast cereals: a survey of Spanish breakfast cereals. *Mol. Nutr. Food Res.* **2006**, *50*, 756–762.
- (40) Resmini, P.; Pellegrino, L. Analysis of food heat damage by direct HPLC of furosine. *Int. Chrom. Lab.* **1991**, *6*, 7–11.
- (41) Morales, F. J.; Romero, C.; Jiménez-Pérez, S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Technol.* **1996**, *31*, 411–418.
- (42) Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–162.
- (43) Osman, M. A.; Reid, P. M.; Weber, C. W. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chem.* **2002**, *78*, 419–423.
- (44) Ramasarma, P. R.; Appu-Rao, A. G.; Rajagopal-Rao, D. Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from *Dolichos biflorus*. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1995**, *1248*, 35–42.
- (45) Singh, R. R.; Appu-Rao, A. G. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for 'hyperreactive' disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Struct. Mol. Enzymol.* **2002**, *1597* (2), 280–291.
- (46) St Clair, W.; Billings, P.; Carew, J.; Keller-McGandy, C.; Newberne, P.; Kennedy, A. R. Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res.* **1990**, *50*, 580–586.
- (47) Utrilla, M. P.; Peinado, M. J.; Ruiz, R.; Rodríguez-Nogales, A.; Algieri, F.; Rodríguez-Cabezas, M. E.; Clemente, A.; Galvez, J.; Rubio, L. A. Pea (*Pisum sativum* L.) seed albumin extracts show anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 807–819.
- (48) Clemente, A.; Moreno, F. J.; Marín-Manzano, M. C.; Jiménez, E.; Domoney, C. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Mol. Nutr. Food Res.* **2010**, *54*, 396–405.

RESEARCH ARTICLE

Eliminating Anti-Nutritional Plant Food Proteins: The Case of Seed Protease Inhibitors in Pea

Alfonso Clemente¹, Maria C. Arques¹, Marion Dalmais², Christine Le Signor³, Catherine Chinoy⁴, Raquel Olias¹, Tracey Rayner⁴, Peter G. Isaac⁵, David M. Lawson⁶, Abdelhafid Bendahmane², Claire Domoney^{4*}

1 Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain, **2** Unité de Recherche en Génétique Végétale (URGV), UMR INRA 1165—CNRS 8114—UEVE 2, Rue Gaston Crémieux—CP 5708—F-91000 Evry cedex, France, **3** UMR 1347 Agroécologie AgroSup/INRA/uB, Pôle Génétique & Ecophysiologie GEAPSI, 17 rue Sully BP 86510, 21065 Dijon cedex, France, **4** Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom, **5** IDna Genetics Ltd, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom, **6** Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, United Kingdom

* claire.domoney@jic.ac.uk



OPEN ACCESS

Citation: Clemente A, Arques MC, Dalmais M, Le Signor C, Chinoy C, Olias R, et al. (2015) Eliminating Anti-Nutritional Plant Food Proteins: The Case of Seed Protease Inhibitors in Pea. PLoS ONE 10(8): e0134634. doi:10.1371/journal.pone.0134634

Editor: Yvan Rahbé, UMR INRA/INSA, BF21, FRANCE

Received: May 19, 2015

Accepted: July 11, 2015

Published: August 12, 2015

Copyright: © 2015 Clemente et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was funded by European Regional Development Fund/The Ministry of Economy and Competitiveness AGL2011-26353 (AC, MA); EU COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion, <https://www.cost-infogest.eu> (AC); Biotechnology and Biological Sciences Research Council BB/J004561/1, <http://www.bbsrc.ac.uk/> (CC, TR, DML, CD); Department for Environment and Rural Affairs AR0711, www.defra.gov.uk (CC, CD); Department for Environment and Rural Affairs IF0147, www.defra.gov.uk (CC, CD); Sclay Plant

Abstract

Several classes of seed proteins limit the utilisation of plant proteins in human and farm animal diets, while plant foods have much to offer to the sustainable intensification of food/feed production and to human health. Reduction or removal of these proteins could greatly enhance seed protein quality and various strategies have been used to try to achieve this with limited success. We investigated whether seed protease inhibitor mutations could be exploited to enhance seed quality, availing of induced mutant and natural *Pisum* germplasm collections to identify mutants, whilst acquiring an understanding of the impact of mutations on activity. A mutant (TILLING) resource developed in *Pisum sativum* L. (pea) and a large germplasm collection representing *Pisum* diversity were investigated as sources of mutations that reduce or abolish the activity of the major protease inhibitor (Bowman-Birk) class of seed protein. Of three missense mutations, predicted to affect activity of the mature trypsin / chymotrypsin inhibitor TI1 protein, a C77Y substitution in the mature mutant inhibitor abolished inhibitor activity, consistent with an absolute requirement for the disulphide bond C77-C92 for function in the native inhibitor. Two further classes of mutation (S85F, E109K) resulted in less dramatic changes to isoform or overall inhibitory activity. The alternative strategy to reduce anti-nutrients, by targeted screening of *Pisum* germplasm, successfully identified a single accession (*Pisum elatius*) as a double null mutant for the two closely linked genes encoding the TI1 and TI2 seed protease inhibitors. The *P. elatius* mutant has extremely low seed protease inhibitory activity and introgression of the mutation into cultivated germplasm has been achieved. The study provides new insights into structure-function relationships for protease inhibitors which impact on pea seed quality. The induced and natural germplasm variants identified provide immediate potential for either halving or abolishing the corresponding inhibitory activity, along with associated molecular markers for

Sciences ANR-10-LABX-40, https://www6.inra.fr/saclay-plant-sciences_eng/ (MD, CLS, AB); Institut National de la Recherche Agronomique, Centre National de la Recherche Scientifique PeaMUST ANR-11-BTBR-0002, <http://www.inra.fr/en> (MD, CLS, AB); European Union FOOD-CT-2004-506223, <http://www.pcg.in.org/GLIP/pubrep.pdf> (CC, CD); European Union FOOD-CT-2004-506223, <http://www.pcg.in.org/GLIP/pubrep.pdf> (MD, CLS, AB). AC is involved in COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion. Additionally, IDna Genetics Ltd provided support in the form of salary for author Peter G. Isaac but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific role of this author is articulated in the 'author contributions' section.

Competing Interests: Co-author Peter G. Isaac is employed by IDna Genetics Ltd. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

breeding programmes. The potential for making large changes to plant protein profiles for improved and sustainable food production through diversity is illustrated. The strategy employed here to reduce anti-nutritional proteins in seeds may be extended to allergens and other seed proteins with negative nutritional effects. Additionally, the novel variants described for pea will assist future studies of the biological role and health-related properties of so-called anti-nutrients.

Introduction

Legume seeds are an excellent source of dietary protein but contain several protein classes which resist proteolysis to different degrees, retain biological activity during digestion due to their high level of stability and/or affinity for target enzymes or receptors, or are otherwise negatively associated with quality. *In vivo* studies have identified several of those protein classes resistant to digestion, including lectins, protease inhibitors and albumin proteins, which differ in type, abundance and relevance among legume species [1–5]. Here we have targeted the protease inhibitors, widespread among legume crops, with the aim of identifying mutations for fundamental studies of action mechanisms and with potential to enhance seed protein quality.

Protease inhibitors, specifically trypsin / chymotrypsin inhibitors (TI), in the seeds of legume crop species are regarded as a limitation to the exploitation of seeds, often leading to a requirement for heat-treatment of seed products during processing for feed uses [6]. The mode of activity of protease inhibitors involves the formation of a stoichiometric complex between the inhibitor and the target enzyme(s), mediated by an exposed binding loop inserted into the convex active site of the target protease in a substrate-like manner. The resulting non-covalent enzyme-inhibitor complex renders the protease(s) target inactive [7,8]. The development and exploitation of near-isogenic pea lines with distinct alleles at the *Tri* (trypsin inhibitor) locus controlling quantitative variation in protease inhibitory activity in pea seeds clearly demonstrated the correlation between allelic variants and amino acid availability of pea protein in poultry [9]. Pea seed TI are predominantly of the Bowman-Birk inhibitor (BBI) class, and qualitative and quantitative genetic variants have been described within a five-fold range of inhibitory activity [10]. Isoforms of the major pea seed-expressed BBI have been shown to be encoded by two genes, *T11* and *T12*, that are closely linked, and they inhibit both trypsin and chymotrypsin [11,12]. Minor pea BBI isoforms have predicted sites for trypsin inhibition only [12].

The BBI proteins show considerable variation between and within species, where seed and vegetative isoforms may be distinguished [11,12]. The expression of distinct genes, post-translational modification and differences in the oligomeric state of the inhibitors, are responsible for intra-specific variation and these may act in combination to affect inhibitory properties [13]. The BBI are synthesised as precursors of approximately 100 amino acid residues, giving rise to mature proteins with a molecular weight in the range 6000–9000. Mature BBI contain two protease binding loops, located at opposite sides of the molecule, stabilised by a characteristic highly conserved array of disulphide bridges involving 14 cysteine residues (see Fig 1, C50-C103, C51-C66, C54-C99, C56-C64, C73-C80, C77-C92 and C82-C90, amino acid numbering according to predicted pre-pro-protein). In combination, the disulphide bonds are likely responsible for the stability of BBI towards extreme conditions (high temperature, acid pH and attack of proteolytic enzymes) and for maintaining the structural and functional features of the binding sites [14,15].

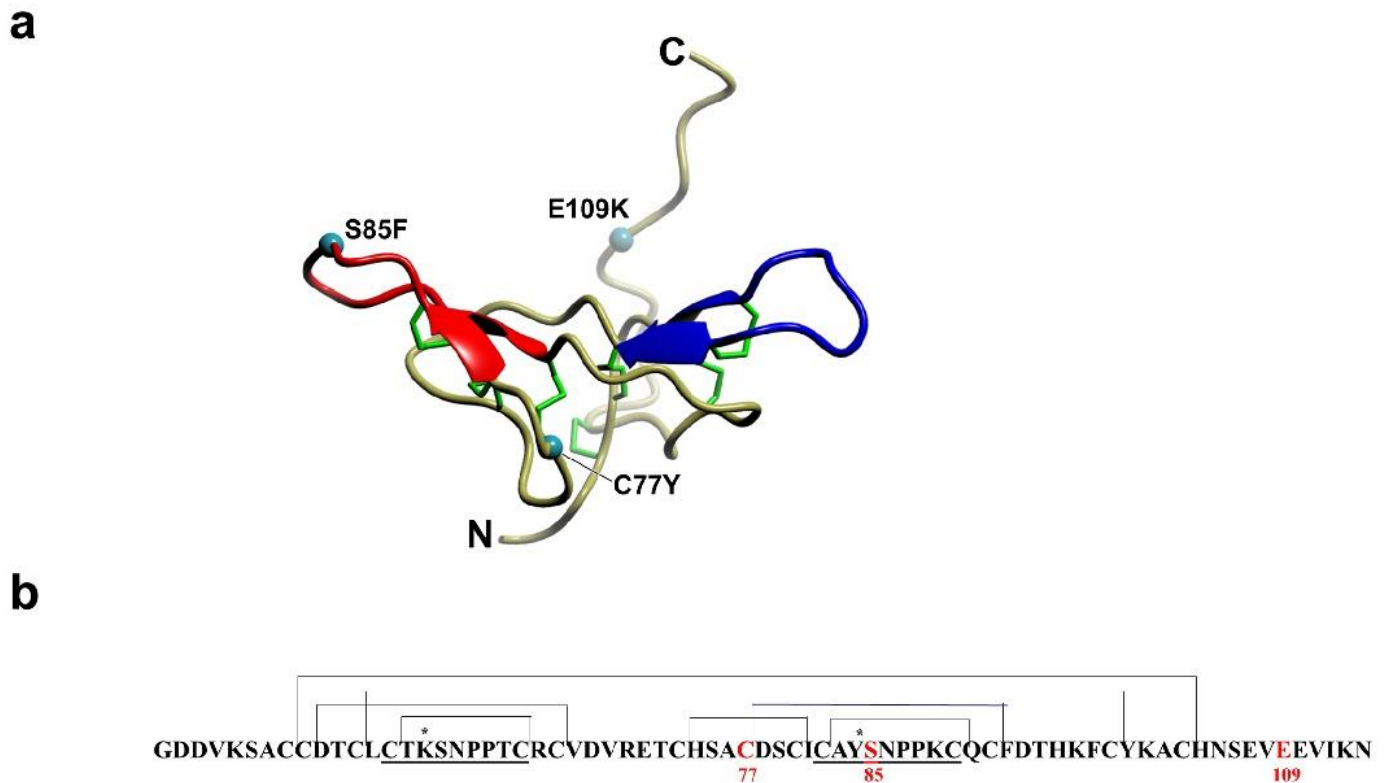


Fig 1. Impact of mutations on T11 structure. (a) Homology model of T11, a major Bowman-Birk inhibitor from pea. The trypsin (blue) and chymotrypsin (red) inhibitory domains are shown, with the identity and location of the mutations indicated by cyan spheres and the disulphide bonds in green. N and C refer to the amino- and carboxy-terminal ends, respectively. (b) Amino acid sequence deduced from the *T11* gene from the pea cultivar Cameor. The sequences of the inhibitory domains are underlined and the positions of the seven disulphide bonds are indicated with connecting lines. The disulphide bond affected by the mutation C77Y is highlighted in blue. K and Y at position P1 (*) determine specificity for trypsin and chymotrypsin, respectively. Letters and numbers in red indicate the positions of the mutations shown in (a). Amino acid numbers are based on the protein coding region of the gene, which includes a 42 amino acid pre-pro-peptide; carboxy-terminal processing removes the last nine amino acids from a subset of TI proteins in vivo.

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g001

In order to gain knowledge of the structure-function relationships within protease inhibitors and their variants, and to enhance seed quality, natural variants and mutations have been sought in a number of species with some success. Null mutants or variants for seed protease inhibitors (Kunitz, which is distinct from BBI, and some BBI) have been described in *Glycine max* (soybean) and *Glycine soja* (wild soja) [16–20]. An alternative approach to reducing seed inhibitor activity has generated transgenic lines of soybean expressing a mutant *BBI* transgene where both active sites have been interrupted with an inserted Gly residue. These lines showed a significant reduction in the amount of seed inhibitor overall (activity reduced by 20 to 50%), likely as a consequence of the earlier expression of the transgene and a limited available sulphur amino acid pool [20]. Soybean lines having combinations of these and additional mutations and around 15% of wild-type inhibitor activity are the subject of ongoing patent claims [21,22].

The availability of mutagenized resources in crop plants is accelerating the discovery of desired mutations affecting seed quality and facilitates fundamental studies of such mutations alongside establishing their pleiotropic effects on plant performance. Equally, high-throughput screening methods facilitate the exploitation of such resources and germplasm collections representing broad genetic diversity. Here we adopted two approaches to identify and study the effects of mutations that impact on the accumulation of the major seed inhibitors in *Pisum sativum* L. (pea). The first approach exploited a TILLING (Targeted Induced Local Lesions IN

Genomes) mutagenized resource, which has yielded a number of alleles for fundamental studies and has provided insights into the structure–function relationships of the targeted protein. The second approach involved targeted screening of the wider *Pisum* germplasm [23] to identify novel genetic variants. Both approaches have been successful in identifying mutations which have been characterised for their impact on inhibitor activity, and in delivering novel germplasm that can be exploited for improved seed products. The study has revealed the huge potential for making the large changes that are often desired in plant protein profiles through exploiting diversity, both natural and induced.

Results

The development of a TILLING platform for functional genomics in *Pisum sativum* L. has been described and its utility demonstrated [24–26]. Here screening for mutations in the *TII* gene of pea, encoding one of two major seed protease inhibitors, identified a total of 13 nucleotide changes; of these seven were in non-coding regions (four upstream of the 5' untranslated region and three downstream of the stop codon). Of the six changes affecting the coding sequence, two were silent and one missense mutation in the pre-pro-peptide region (T33I) was not investigated further. Null mutations were not identified; the probability of isolating a null mutation was reduced since *TII* is an intron-less gene and gene variants capable of generating mis-spliced transcripts were not expected. The three missense mutations within the mature protein were predicted to impact on the function of the encoded inhibitor, affecting amino acid residues involved in: one of the intramolecular disulphide bonds (C77Y), the chymotrypsin inhibitory active site (S85F), and the carboxy-terminal region (E109K) that is removed from a subset of mature inhibitors *in vivo* [27] (Table 1, Fig 1). The C77Y mutation was predicted to impact on one of the disulphides involved in stabilising the chymotrypsin inhibitory loop (C77-C92, Fig 1); the S85F mutation was predicted to impact on the chymotrypsin inhibitory activity whereas the E109K mutation was hypothesised not to impact seriously on inhibitory activity (Fig 1) but could potentially influence dimerization of the inhibitor, in which the carboxy-terminal domain has a suggested role [28].

Mutant and wild-type segregants were selected from backcrosses (BC) and bulked BC2F3 and BC2F4 seeds of validated mutant and wild-type lines of the three families used for biochemical assays. Analysis of total seed protein and albumin profiles by protein gel electrophoresis and measurement of the amounts of these protein fractions did not reveal any significant difference between the mutant and wild-type lines within any one family (S1a–S1d Fig).

Inhibitory activities are reduced differentially by the mutations in TII

Measurement of overall trypsin and chymotrypsin inhibitory activities of seed protein extracts revealed a number of significant differences between mutant and wild-type lines (Fig 2). For the C77Y family, a significant reduction of greater than 60% was apparent for both trypsin (TIA) and chymotrypsin inhibitory activity (CIA) in mutant compared with wild-type lines. For the S85F family, a small but significant increase in TIA and a decrease in CIA were apparent in mutant compared with wild-type lines. For the E109K family, a slight but not significant decrease in TIA and CIA was apparent in mutant compared with wild-type lines. The same trends were observed for mutant compared with wild-type lines for TIA (Fig 2a and 2c), CIA (Fig 2b and 2d) and when expressed on a seed meal (Fig 2a and 2b) or seed protein (Fig 2c and 2d) basis.

The differences in inhibitory activity among mutants were investigated further following fractionation of the different isoforms corresponding to the closely related *TII* and *TI2* genes in pea [12,27]. The major isoforms in seeds have been shown to correspond to mature and

Table 1. Missense *T11* gene mutants obtained by TILLING and used in this study.

<i>T11</i> mutation	<i>T11</i> mutation	Family	Mutant	Wild type
G230A	C77Y	2808	2/1/3	1/1/4
			2/1/6	1/1/6
C254T	S85F	671	19/4	19/6
			19/11	19/7
			19/19	19/13
			19/24	
G325A	E109K	895	1/1/15	1/2/6
			1/2/4	1/1/14
			1/2/9	1/2/7

Changes in encoded proteins are shown, and the BC2F3 and BC2F4 lineage identifiers for mutant and corresponding wild-type mutant alleles. Mutation positions for genes and proteins are given relative to the initiator methionine codon or amino acid, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0134634.t001

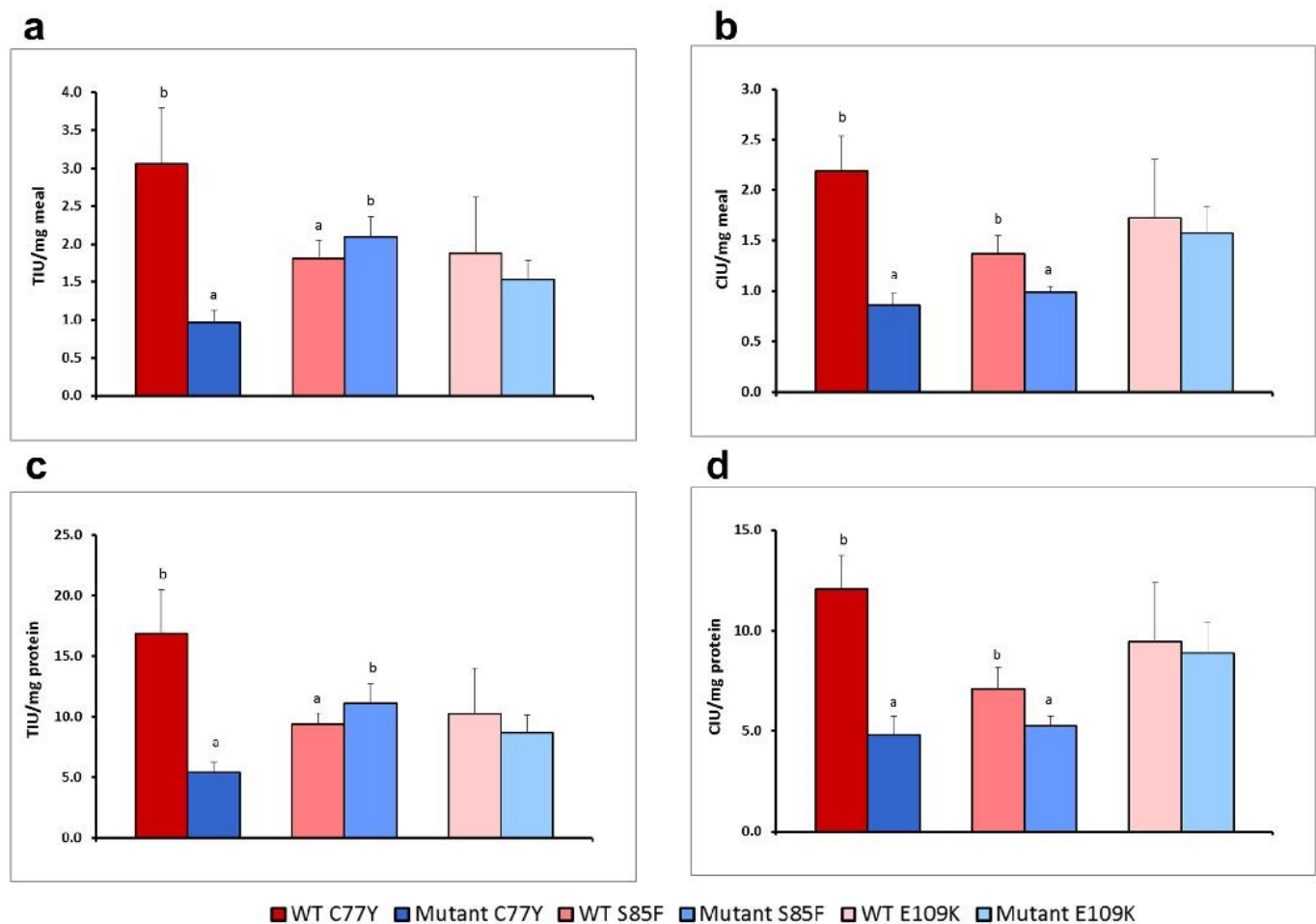


Fig 2. Impact of mutations on enzyme inhibition. Trypsin (TIU, a, c) and chymotrypsin (CIU, b, d) inhibitory units per mg of meal (a, b) or per mg of protein (c, d) of three TILLING mutants (C77Y, S85F, E109K) and their corresponding wild-type pea lines. For each plot, significant differences ($p < 0.01$) between wild-type and mutant lines within each pair are denoted (a, b, as appropriate on bars in each chart).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g002

carboxy-terminally processed forms for each gene product [11]. Figs 3–5 show the profiles of total protein extracts from mutant and wild-type families (C77Y, S85F and E109K, respectively), when seed proteins are separated by cation-exchange chromatography and assayed for their ability to inhibit trypsin and chymotrypsin. Four isoforms were apparent among the separated seed proteins from all wild-type control lines (Figs 3a–5a and 3b–5b, upper red traces); the four isoforms were evident as fractionated protein peaks (labelled 1–4) with the ability to inhibit both trypsin and chymotrypsin. Peptides from each of these four peaks were identified in seeds from wild-type families and the parent cultivar (cv.) Cameor as mature and processed products of the *TI1* and *TI2* pea genes (Table 2). Peaks 1 and 2 contain the *TI2* protein, with a diagnostic D residue at the P2' position of the trypsin inhibitory domain in the deduced sequences. Peaks 3 and 4 contain the *TI1* protein, with diagnostic N residues at the P2' position of both inhibitory domains as well as Y and K residues at P1 and P5' of the chymotrypsin inhibitory domains among deduced sequences. The presence of the *TI1* and *TI2* carboxy-terminal motif, CHNSEVEEVIKN, in peptides from peaks 2 and 4 indicates that these peaks contained the mature unprocessed *TI2* and *TI1* proteins, respectively (Table 2). The determined carboxy-terminal sequence includes the nonapeptide previously shown to be removed from a sub-set of the primary mature proteins *in vivo* [11,27]. We conclude, therefore, that the order of elution (Figs 3–5) is: *TI2* processed, *TI2* unprocessed, *TI1* processed and *TI1* unprocessed, at variance with predicted charges within each class (+4, +3, +6.5 and +6, respectively, at pH 4).

In contrast to the four isoforms distinguished in the wild-type inhibitor profiles, only two isoforms were evident among fractionated seed proteins from the C77Y mutant which showed inhibition of both target enzymes (Fig 3a and 3b). These data suggest that the two isoforms which are derived from the *TI1* gene, and which elute latest from the cation-exchange column separation of the wild-type inhibitors (peaks 3 and 4), show no activity in the C77Y mutant. Analysis of seed protein extracts on native gels that are stained for TIA and CIA (Fig 3c) supports the loss of one of three inhibitor isoforms from the C77Y mutant; the *TI2* isoforms common to both wild-type and mutant lines are more electronegative under the electrophoresis conditions used. Under these conditions, the carboxy-terminally processed product of the *TI1* gene is predicted to be uncharged and is not detected on the activity gels of wild-type seed extracts. Overall the loss of inhibitory activity associated with two *TI1* isoforms is in agreement with the C77Y mutation leading to a loss of inhibitor function at the two protein domains. The behaviour of *TI1* and *TI2* isoforms on cation-exchange columns and non-denaturing gels at pH 4.4 and pH 7.0, respectively, in the mutant is in agreement with the predicted charges of the two classes of proteins, where *TI1* isoforms are more positively charged than those corresponding to *TI2*. The reduction of more than 60% in both TIA and CIA (Fig 2) in the C77Y mutant implies a greater contribution of *TI1* to overall TIA. This could be because *TI1* is a more potent inhibitor or because *TI1* represents a greater proportion of total TI seed proteins. The first possibility may be supported by studies of the two individual pea seed inhibitors expressed in a heterologous system [29]; qPCR analyses were carried out to investigate the second possibility. The latter revealed that, although *TI2* was expressed more highly in early stages of seed development (C5, C6, C8 stages), both genes were equally expressed later in development (C9, C10 stages) when the bulk of the TI proteins were synthesised (S2a and S2b Fig). Genomic DNA amplifications using gene-specific primers in forward and reverse combinations gave rise to an amplicon of > 10 kb in two pea lines (cv. Cameor and JI1294), using primers designed on the *TI1* and *TI2* genes (sense strand), indicating a tail-to-tail orientation of the two genes (S2c Fig). This gene arrangement with more remote promoter regions than in a tandem array may provide an explanation for the marginally earlier expression of one gene compared with the other, as noted by qPCR analysis for *TI2*. Overall, however, there was no evidence that the *TI1* gene was expressed at a significantly higher level than *TI2*; based on this

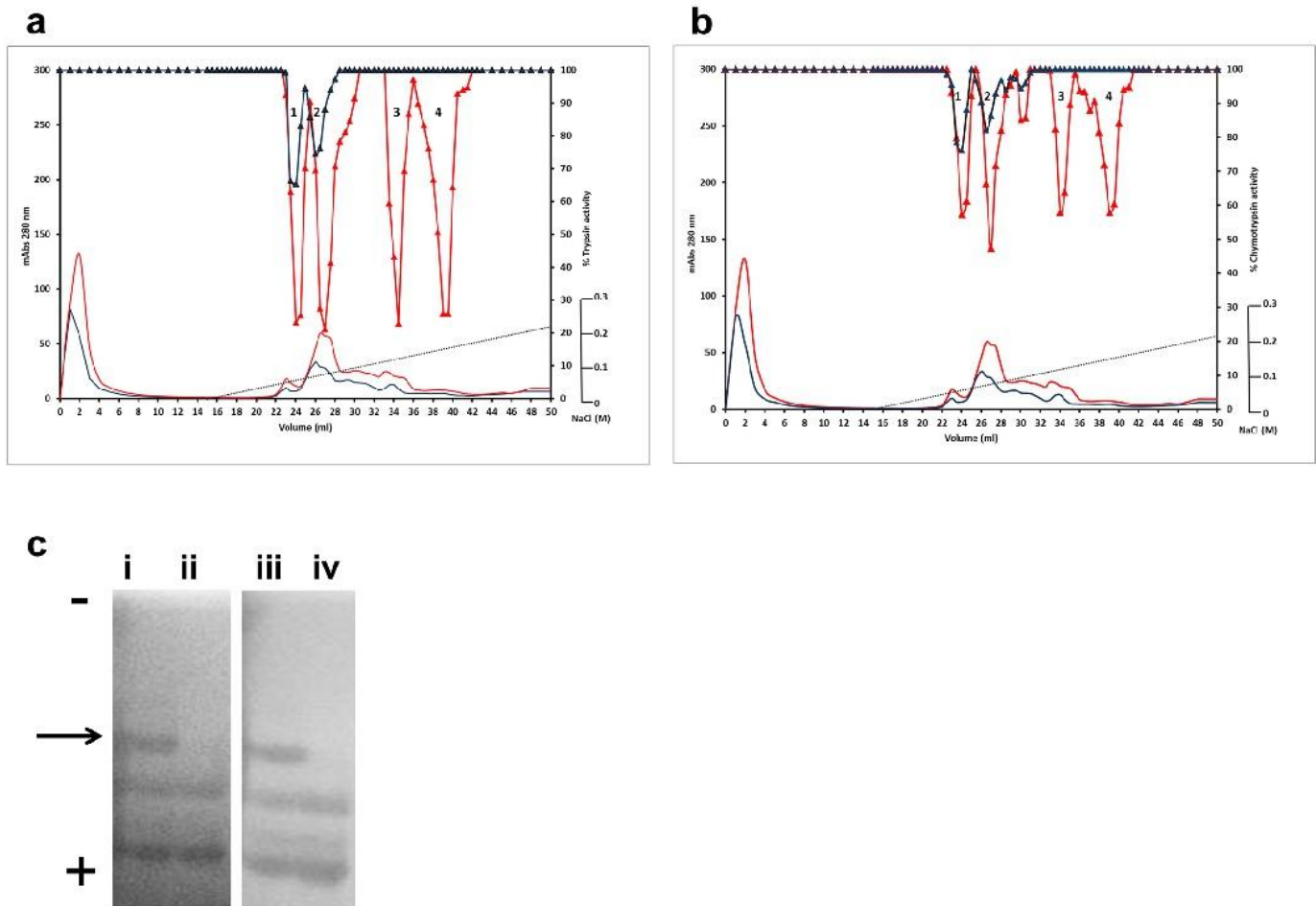


Fig 3. Enzyme inhibitory profile of the T11 C77Y mutation. Seed proteins from wild-type and mutant lines from the T11 C77Y family were separated by cation-exchange chromatography. Absorbance profiles at 280 nm are shown (a, b: red and blue lines without symbols; mAbs, left-hand scale). Using BAPNA and BTEE as specific substrates, the trypsin (a) and chymotrypsin inhibitory (b) activities of wild-type (red triangle) and mutant (blue triangle) protein fractions are shown, relative to assays where trypsin activity is 100% (control; right-hand scale). Numbers in peaks in each chromatogram correspond to the different forms of T11 and T12 (peak 1: T12 processed; Peak 2: T12 unprocessed; Peak 3: T11 processed; Peak 4: T11 unprocessed). (c) in-gel protease inhibitory activity of inhibitor isoforms from wild-type (i, iii) and C77Y mutant (ii, iv) lines. Zymogram blue casein gels were treated with the digestive enzymes, trypsin (i, ii) or chymotrypsin (iii, iv); dark areas indicate where the enzyme has been inhibited. The direction of electrophoresis on non-denaturing gels is indicated (-, +). The arrow indicates the position of the isoform that is missing from the mutant lines (tracks ii and iv).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g003

and earlier data [29], the loss of more than 60% TIA and CIA in the C77Y mutant likely reflects differences in the respective inhibitory activities of T11 and T12.

Four isoforms were apparent when seed proteins were separated from wild-type segregant lines corresponding to the S85F mutant family (Fig 4a and 4b). In contrast, among fractionated seed proteins from the S85F mutant lines, four isoforms showed inhibition of trypsin (Fig 4a) but the chymotrypsin inhibitory activity of peaks 3 and 4, corresponding to T11 isoforms, was completely abolished (Fig 4b). Analysis of seed protein extracts on native gels that are stained for TIA showed no difference in isoform pattern between wild-type and mutant lines but a loss of CIA was evident for one of three inhibitor isoforms in the S85F mutant lines (Fig 4c); this one corresponds to the T11 isoform that is evident on gels of wild-type lines. Its apparent loss in the S85F mutant is consistent with abolition of CIA as a consequence of loss of the active site serine residue; TIA is not affected negatively by this mutation. The decrease in overall CIA in

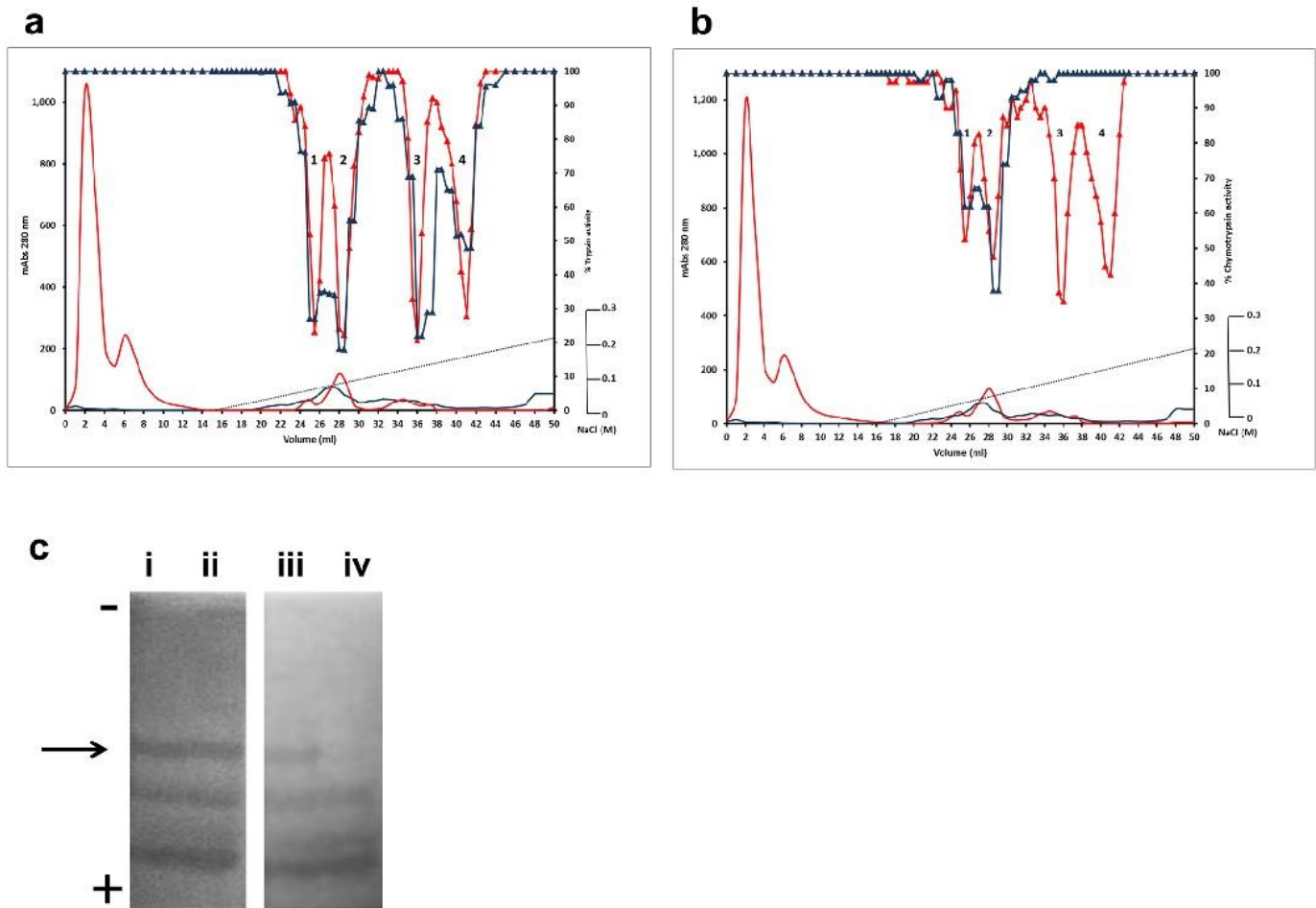


Fig 4. Enzyme inhibitory profile of the T11 S85F mutation. Seed proteins from wild-type and mutant lines from the T11 S85F family were separated by cation-exchange chromatography. Absorbance profiles at 280 nm are shown (a, b: red and blue lines without symbols; mAbs, left-hand scale). Using BAPNA and BTEE as specific substrates, the trypsin (a) and chymotrypsin inhibitory (b) activities of wild-type (red triangle) and mutant (blue triangle) protein fractions are shown, relative to assays where trypsin activity is 100% (control; right-hand scale). Numbers in peaks in each chromatogram correspond to the different forms of T11 and T12 (peak 1: T12 processed; Peak 2: T12 unprocessed; Peak 3: T11 processed; Peak 4: T11 unprocessed). (c) in-gel protease inhibitory activity of inhibitor isoforms from wild-type (i, iii) and S85F mutant (ii, iv) lines. Zymogram blue casein gels were treated with the digestive enzymes, trypsin (i, ii) or chymotrypsin (iii, iv); dark areas indicate where the enzyme has been inhibited. The direction of electrophoresis on non-denaturing gels is indicated (-, +). The arrow indicates the position of the isoform that is missing from the mutant lines (track iv).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g004

the S85F mutant compared with the control line was expected to be comparable to that observed for the C77Y mutant (Fig 2b); however the decrease was lower than expected, likely due to the lower overall activity in the wild-type line, compared with other controls. This may be explained by the mutant and corresponding wild-type lines being BC2; differences between control lines in the different mutant families would be expected to diminish with further backcrossing.

Fig 5 shows a similar analysis of the E109K mutation. This third TILLING mutation lies within the carboxy-terminal region that is removed from the processed T11 isoform, and so should not impact directly on its ability to inhibit target proteases. Since the E109K mutation leads to a change in overall charge of the unprocessed mutant protein, the inhibitor profile was expected to differ in the case of the mutant protein irrespective of any associated changes in activity. The predicted change (more positive charge) is in agreement with the apparent loss of

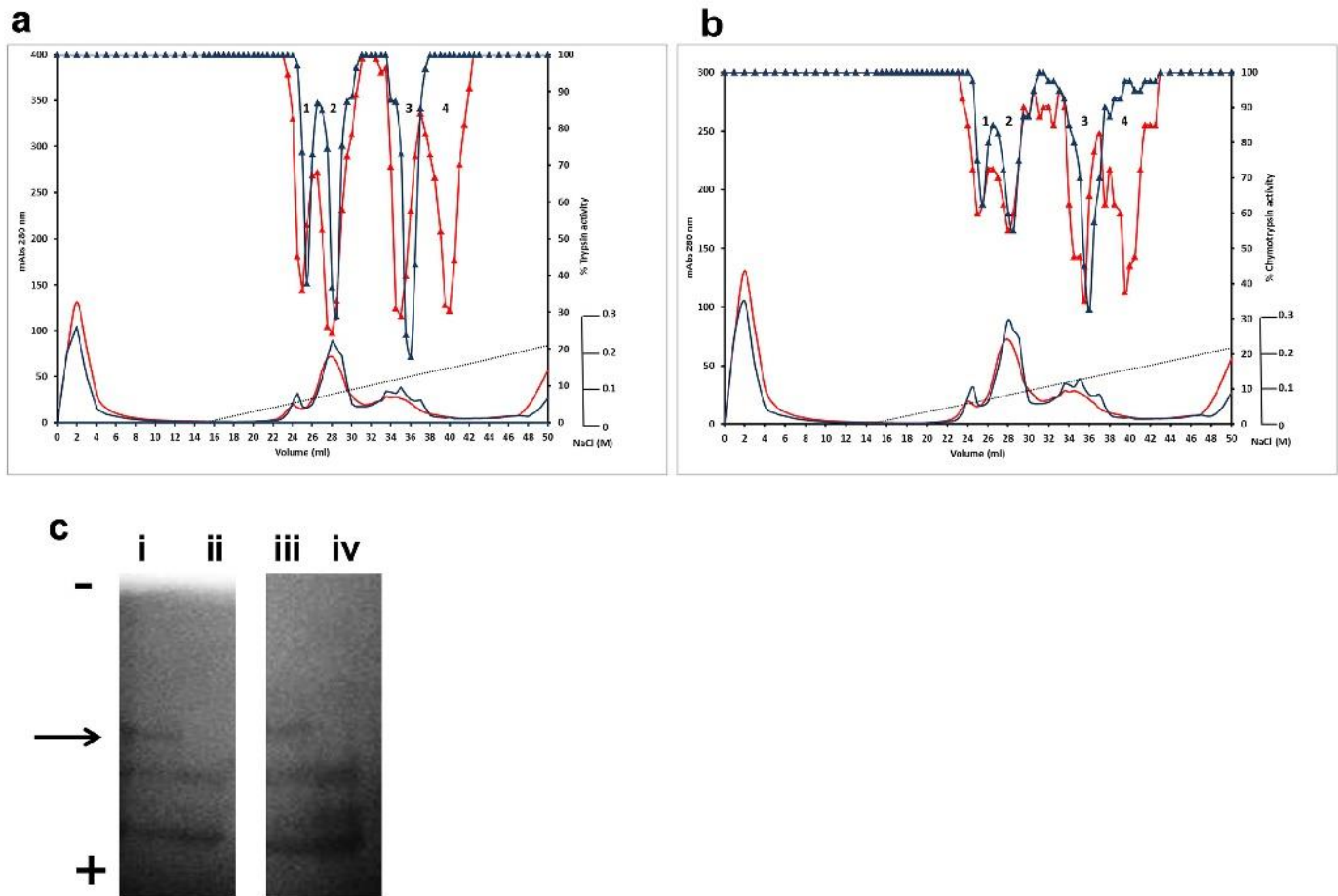


Fig 5. Enzyme inhibitory profile of the T11 E109K mutation. Seed proteins from wild-type and mutant lines from the T11 E109K family were separated by cation-exchange chromatography. Absorbance profiles at 280 nm are shown (a, b: red and blue lines without symbols; mAbs, left-hand scale). Using BAPNA and BTEE as specific substrates, the trypsin (a) and chymotrypsin inhibitory (b) activities of wild-type (red triangle) and mutant (blue triangle) protein fractions are shown, relative to assays where trypsin activity is 100% (control; right-hand scale). Numbers in peaks in each chromatogram correspond to the different forms of T11 and T12 (peak 1: T12 processed; Peak 2: T12 unprocessed; Peak 3: T11 processed; Peak 4: T11 unprocessed). (c) in-gel protease inhibitory activity of inhibitor isoforms from wild-type (i, iii) and E109K mutant (ii, iv) lines. Zymogram blue casein gels were treated with the digestive enzymes, trypsin (i, ii) or chymotrypsin (iii, iv); dark areas indicate where the enzyme has been inhibited. The direction of electrophoresis on non-denaturing gels is indicated (-, +). The arrow indicates the position of the isoform that is missing from the mutant lines (tracks ii and iv).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g005

activity that is associated with the last eluting inhibitor (peak 4) observed for wild-type lines, corresponding to unprocessed T11 (Fig 5a and 5b). Given that no additional or later chromatographic peak having protease inhibitory activity was found in the mutant protein, it is likely that both forms of the T11 protein co-eluted in peak 3 (see above regarding variance of actual vs. predicted charges). Analysis of seed protein extracts from the E109K mutant and corresponding wild-type lines on native gels (Fig 5c) confirms the apparent loss of the unprocessed T11 protein due to the change in overall charge. Here both processed and unprocessed T11 would be expected to be uncharged at pH 7.0.

The impact of the mutations on the likely interaction between protease inhibitors and target enzymes was studied in terms of protein structure. Fig 6 shows the model of the wild-type T11 in complex with trypsin, where the positions of the three mutations studied here are shown. The C77Y mutation, despite not being involved directly in the inhibitory domains, leads to a loss of one of the seven highly conserved disulphide bridges (C77-C92; Fig 1b), and may be

Table 2. Identification of T11 and T12 diagnostic peptides by mass spectrometry.

Peptide	**
T12	GDDVKSACCDTCL CTKSDPPTC RCVDV GETCHSACDSCI <u>CALSYPPQC</u> QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
T12 (P1)	GDDVKSACCDTCL CTKSDPPTC R
T12 (P2)	GDDVKSACCDTCL CTKSDPPTC R-----ACHNSEVEEVIKN
T11	GDDVKSACCDTCL CTKSNPPTC RCVDV RETCHSACDSCI <u>CAYSNPPKC</u> QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
T11 (P3)	---SACCDTCL CTKSNPPTC RCVDV RETCHSACDSCI <u>CAYSNPPK</u>
T11 (P4)	---SACCDTCL CTKSNPPTC RCVDV RETCHSACDSCI <u>CAYSNPPKC</u> QCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN

Identification of TI proteins eluted by cation-exchange chromatography (P, peaks 1–4) of wild-type seed extracts, as shown in Figs 3–5. The peptides obtained for P1 and P2 corresponded to the amino acid sequence for T12 (UniProt accession: Q41066), whereas those deduced for P3 and P4 corresponded to the amino acid sequence for T11 (UniProt accession: Q41065). The sequences of the inhibitory domains are underlined. The amino acid residues that distinguish T11 and T12 proteins are shown in bold. Lys (K) and Leu (L) or Tyr (Y) at position P1 (*) determine specificity for trypsin and chymotrypsin, respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0134634.t002

predicted from the model to lead to a loss of structural rigidity. In particular, this could adversely affect the presentation of the chymotrypsin inhibitory loop and therefore its efficacy as a substrate mimic. The S85F mutation affects the P1' position of the inhibitory site that engages directly with the chymotrypsin active site and the substitution introduces a bulky aromatic side chain that would be predicted from the model to abrogate binding (as supported by the absence of CIA in T11 peaks; Fig 4b). In the case of the E109K, this region of the structure is not visible in any of the complexes that are available in databases (PDB entries 2ILN, 3RU4, 3MYW, 1D6R, 1TAB and 2G81), suggesting that it is flexible or cleaved and plays no significant role in the interaction between protease inhibitor and target enzyme. The position of E109 in Fig 6 is based on the structure of the free homodimeric inhibitor (PDB entry 1PBI). However, it seems likely that E109 may be important in dimer formation, via an extended hydrogen-bonding network that would be important in such interactions (see inset to Fig 6). Although the E109K substitution may not disrupt these interactions, it could result in a different or disordered conformation for the carboxy-terminus and an overall weaker dimer interface. The mutation could therefore impact on the overall equilibrium among T11 monomers, dimers and enzyme bound isoforms, whether processed or unprocessed; however the activities measured for E109K mutant and wild-type lines do not suggest that any such impact will have major consequence for overall activity (Fig 2), at least under the assay conditions used.

Oligomerization pattern of the mutant E109K

The possible effect of the E109K mutation on the oligomerization pattern of T11 and T12 isoforms was investigated by size-exclusion chromatography. Under the conditions employed, a linear logarithmic response for elution of five standard proteins in the range 6,500 to 63,500 molecular weight was observed ($R^2 = 0.974$; S3 Fig). Analysis of albumin extracts from cv. Cameor (not shown), wild-type control and E109K mutant lines by size-exclusion chromatography showed three chromatographic peaks (named A, B and C) containing TIA (Fig 7a). Interestingly, the relative peak areas for TIA differed appreciably between the E109K mutant and wild-type control lines; in particular, the activity of peak A was significantly higher in the wild type than in the E109K mutant. This indicated that protein from the wild type showed a higher relative abundance of the oligomeric TI forms, deduced to be dimers [28,30], when compared with the E109K mutant. The composition of the three oligomeric TI forms was investigated by cation-exchange chromatography where, as shown earlier, four and three

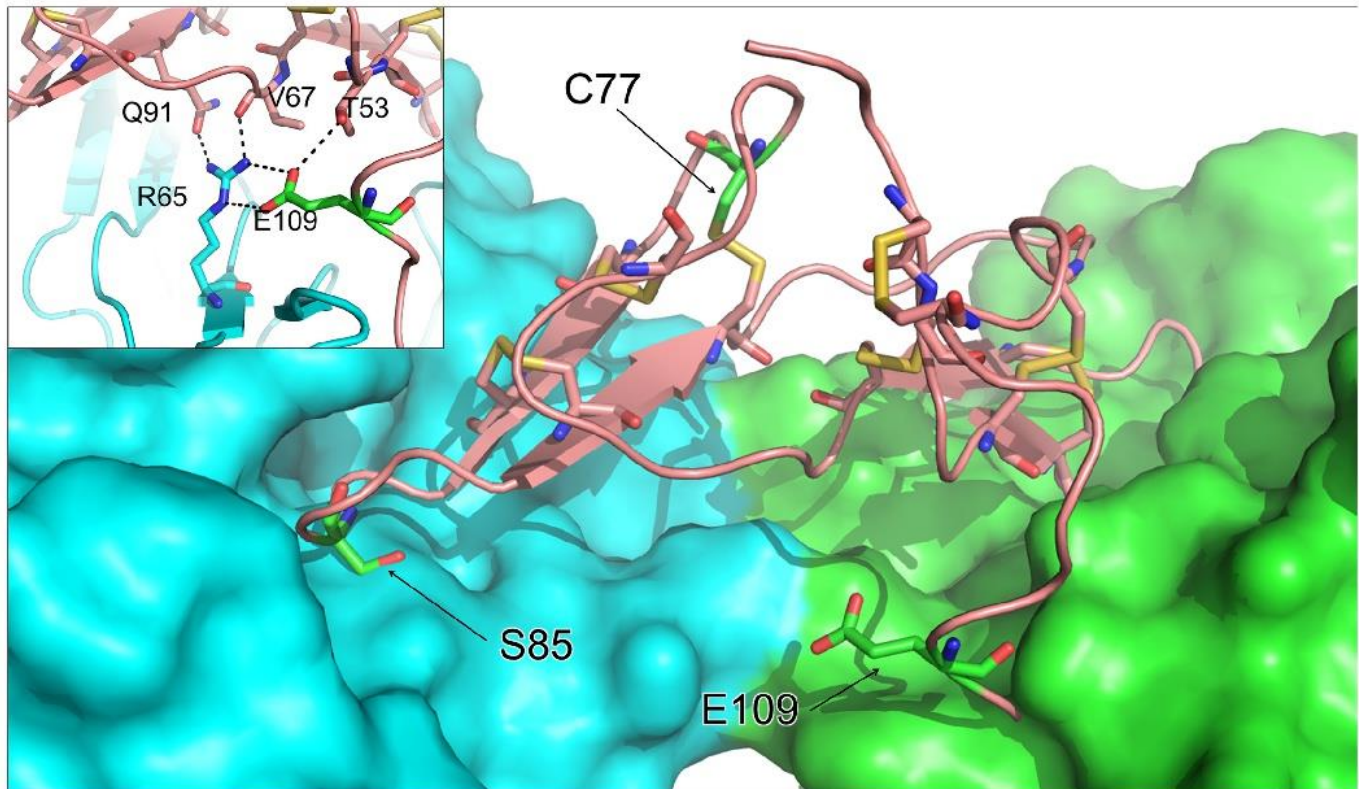


Fig 6. Structural impact of mutations. Homology model of pea TI1 (based on PDB entry 1PBI) is shown as a pink ribbon bound to bovine trypsin, shown as blue and green molecular surfaces (created by superposing the pea TI1 model onto the structure of the ternary complex of *Medicago scutellata* BBI (not shown) bound to bovine trypsin taken from PDB entry 2ILN). The positions of the three induced mutations are indicated and shown with green carbon atoms. **Inset:** The extended hydrogen-bonding network likely to be important in dimer formation, based on two copies of the pea TI1 model superposed onto the dimer of the template structure (PDB entry 1PBI), is indicated by dashed lines.

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g006

isoforms could be resolved for wild-type and E109K mutant lines, respectively (Fig 5a and 5b). In the wild-type lines, the size-excluded peak A was shown to be composed of unprocessed TI2 and TI1 proteins, whereas peaks B and C contained carboxy-terminally processed TI2 and TI1, respectively (peak numbers 2 and 4, 1 and 3, respectively, in Fig 7b–7d). In contrast, in the E109K mutant, the size-excluded peak A was shown to be composed of unprocessed TI2 protein only whereas, in agreement with analysis of the wild-type protein, size-excluded peaks B and C contained carboxy-terminally processed TI2 and TI1, respectively. In the E109K mutant, the unprocessed TI1 showed altered behaviour on cation-exchange chromatography due to the mutation (see earlier), so it might be concluded that both TI1 isoforms are present in the size-excluded peak C from the mutant.

The combined data suggest a reduction in the degree and type of oligomers that are formed from TI1 in the E109K mutant compared with wild type. The highest molecular weight form (Peak A) was reduced in relative amount and in complexity in the mutant, indicating strongly that the carboxy-terminus influences the extent to which dimers are formed and that the charge difference in the E109K mutant interferes with this process.

Identification of natural *Ti* mutants

In parallel with the isolation and analysis of induced TI mutants, natural germplasm variants were sought by performing a fluorescent multiplex genetic marker screen. The multiplex screen

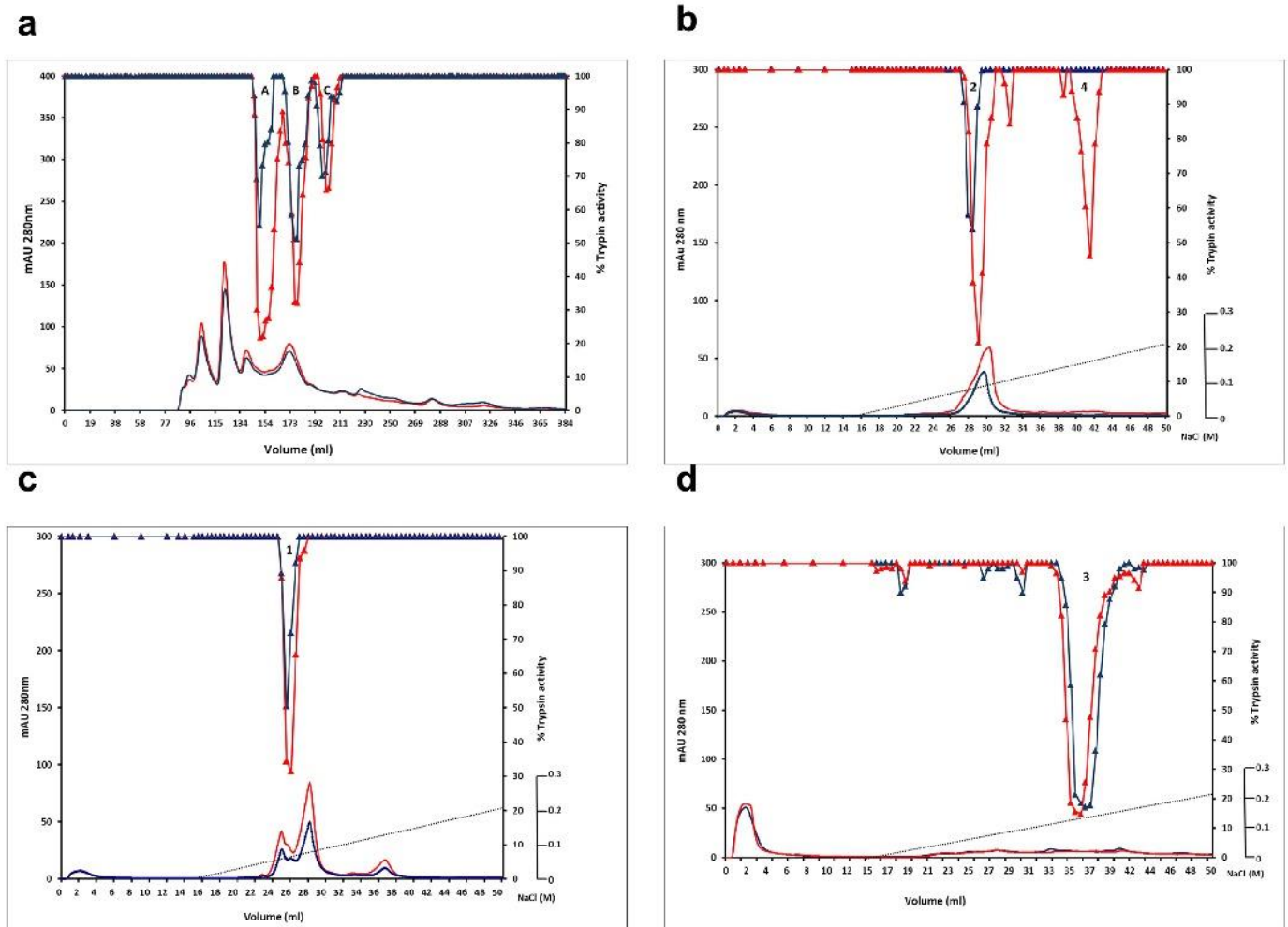


Fig 7. Oligomerization status of TI isoforms in the E109K mutant compared with wild type. (a) Wild-type (red) and E109K mutant (blue) albumin preparations were analyzed by size-exclusion chromatography. Absorbance at 280 nm (left-hand scale) is shown in lower traces; inhibition of trypsin activity in fractions from wild type (red) and E109K mutant (blue) are shown in upper traces, where the % residual trypsin activity is indicated on the right-hand scale. (b-d) Cation-exchange chromatography of the size-excluded peaks A, B and C, respectively, from wild type (red) and E109K mutant (blue) (see a). For each analysis, absorbance at 280 nm (left-hand scale) is shown in lower traces; inhibition of trypsin activity in fractions from wild type (red) and E109K mutant (blue) are shown in upper traces, where the % residual trypsin activity is indicated on right-hand scale. Numbers in peaks in each chromatogram correspond to the different forms of T11 and T12 (peak 1: T12 processed; Peak 2: T12 unprocessed; Peak 3: T11 processed; Peak 4: T11 unprocessed).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g007

of *Pisum* germplasm DNA led to the identification of lines showing a loss of some of the expected fluorescently-labelled amplicons for a number of seed protein genes. Since loss of an amplicon could reflect divergence of primer sites, rather than a deletion of a target gene or part of the gene, all variants were re-tested using the same and alternative outer primer pairs in single PCR; the alternative primer pair spanned the region covered by the multiplex screen. In the case of the targeted *TI* gene (*TI2*) amplicon, one variant was identified which lacked the expected 230 bp amplicon in the multiplex screen (Fig 8a). Further analysis of this variant (JI 262, a *Pisum elatius* accession) revealed that the *TI2* amplicon was 14 bp shorter than that of wild type (Fig 8b), predicting a TI protein which terminates early as a consequence of the deletion and consequent loss of reading frame within the pre-pro-peptide (Fig 8c). The variant was predicted to lack TI2.

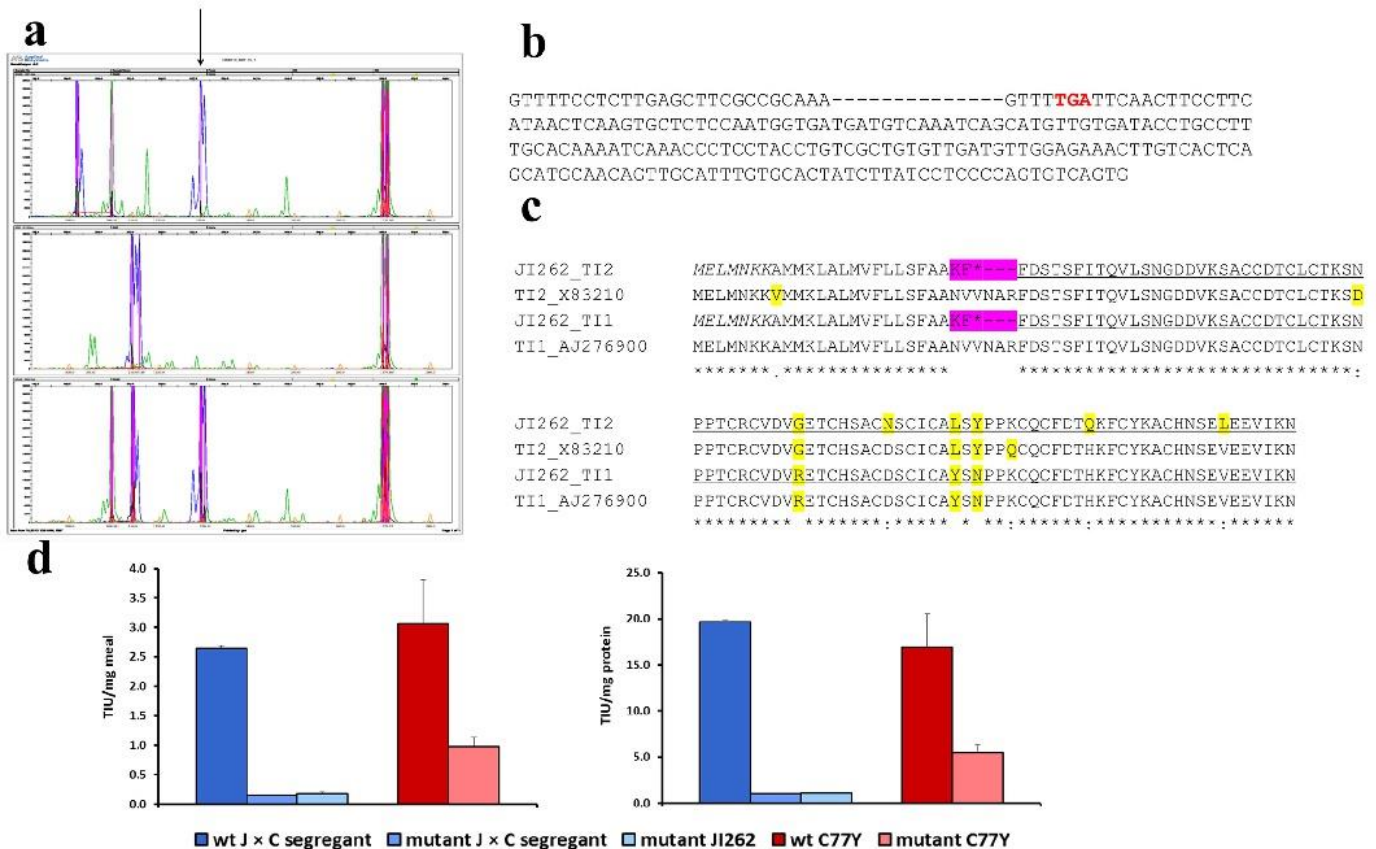


Fig 8. Identification of a *T11/T12* double null mutant in a pea germplasm collection. (a) Multiplex screening of pea germplasm DNA for seed protein gene variants. The predicted *T12* amplicon evident in top and lower panels is highlighted with an arrow; this amplicon is absent from the line analysed in the middle panel: JI 262. (b) *T12* sequence amplified from JI 262. The 14 bases missing are indicated with dashes, leading to a premature stop codon (red font). (c) Predicted amino acid sequence of the mutant JI 262 genes, compared with wild-type T11 and T12; the premature stop codons (*) occur within the 42 amino acid pre-pro-peptide (region affected by the mutation highlighted pink). Primer-encoded amino acids in italics; predicted amino acid sequences beyond deletions underlined; variant amino acids highlighted. (d) TIA of the mutant, JI 262, and a mutant F2 segregant compared with a wild-type F2 segregant from a cross between JI 262 and cv. Cameor (J x C). For comparison, the C77Y mutant and control lines (Fig 2) are plotted alongside. TIU per unit meal (left), per unit protein (right).

doi:10.1371/journal.pone.0134634.g008

Since measurements of protease inhibitory activity indicated a very extreme reduction in TIA and CIA in the natural variant, JI 262, much higher than expected for loss of *T12* gene function alone (see below), analysis was carried out on *T11* gene structure in JI 262. Using forward primers designed on the 14bp deleted region of *T12*, together with the *T11* and *T12* diagnostic reverse primers (At^{YSN} and At^{LSY}, respectively), yielded no amplicon from JI 262 but the expected two from the wild type, cv. Cameor. Further analysis of four independent plants of JI 262 and a F1 plant (JI 262 x Cameor) using the primer combinations above, or using an alternative forward primer designed on the conserved amino terminus of the proteins, indicated that both *T11* and *T12* genes in JI 262 have the same deletion (Fig 8c). Analysis of F1 (JI 262 x Cameor) plants using the forward primer based on the 14 bp deletion yielded a product that was identical to that of cv. Cameor with both *T11* and *T12* reverse primers, supporting the lack of amplification of either the JI 262 *T11* or *T12* allele in the F1. The F1 hybrid status was clear using primers that amplified outside of the deletion for either gene (not shown).

The TIA and CIA determined for seeds of JI 262 suggested that the overall inhibitory activity was significantly and very severely reduced (0.15–0.2 TIU/mg flour, with CIA being

undetectable), compared with cv. Cameor and other pea control samples. The extent of reduction was investigated further in the cross derived from JI 262 with cv. Cameor and by analyzing segregants having mutant or wild-type *TI* alleles. Fig 8d shows that F2 segregants with the mutant *TI* alleles had very low TIA, comparable to that of JI 262. Furthermore, mixing equal amounts of seed meals from a mutant segregant and cv. Cameor reduced the TIA of the latter by 50% (data not shown). In combination, these data are consistent with the low TIA of JI 262 being a consequence of *TI* genetic variation, rather than an additional seed component acting as an inhibitor of TIA. In JI 262, TIA is reduced at least 15–20-fold, compared with wild-type controls; for comparison, the TIA determined for the TILLING C77Y and wild-type controls are shown in Fig 8d.

The data presented above show unequivocally that a null mutant for the major pea seed protease inhibitors has been identified as a single accession within a diverse *Pisum* collection, as a consequence of a deletion within both the *TI1* and *TI2* genes.

Discussion

In this work, we describe the use of TILLING and germplasm resources to identify and characterise mutations which provide novel opportunities for understanding functional aspects of seed proteins and provide for seed quality improvement. The availability of a TILLING platform in pea has accelerated greatly the ability to carry out functional genomics in this important cool season legume crop. Trypsin-chymotrypsin inhibitor gene families have been a focus for seed improvement strategies in many legume crops and some successes noted for reducing their activity in soybean [16,17,19–22]. In pea, although quantitative variants had been identified and the molecular basis of variation in gene expression described for the major seed inhibitor class [31], null or other extreme variants had not been identified or generated hitherto. Here we describe and characterise four (three induced, one natural) mutations that provide novel allelic variation for *TI* genes in pea; of the induced mutations, two were associated with a dramatic reduction in inhibition of one or both of the target enzymes, trypsin and chymotrypsin, whereas a third impacted on the extent to which TI oligomers are formed. A naturally occurring *TI1/TI2* double null variant was identified and shown to have extremely reduced TIA and undetectable CIA in its seeds; this is a wild *Pisum* species (*Pisum elatius*) which has been crossed readily with cultivated *Pisum sativum*. The extremely low TIA (and no CIA) measured in seeds of this mutant is likely attributable to those genes that are expressed predominantly in vegetative organs of pea plants, and which are barely active in seed organs; these genes encode proteins that have two trypsin inhibitory domains and lack a chymotrypsin inhibitory domain [12].

The three induced mutant *TI1* genes described here enabled studies of the impact of i) loss of one of the 14 cysteine residues, which are highly conserved within proteins of this class (C77Y mutation, where C77 is predicted to participate in a disulphide bond close to the chymotrypsin inhibitory loop), ii) loss of the active site serine within the chymotrypsin inhibitory loop (S85F) and iii) altered charge within the carboxy-terminal domain (E109K) (Fig 1). The mutant lines were back-crossed twice to cv. Cameor to give BC2F2-derived mutant lines, ensuring that the effects of background mutations were reduced in the further analysis of the effects of individual mutations.

The results show the dramatic loss of both TIA and CIA associated with *TI1* in the C77Y mutant, when *TI1* and *TI2* isoforms were fractionated from mutant and corresponding wild-type lines (Fig 3). These data provide unequivocal evidence that, of the seven disulphide bonds predicted to stabilise the activity loops of double-headed inhibitors, at least that involving C77 is absolutely critical for overall inhibitory activity. The overall activity of the C77Y mutant was

reduced by more than 60% compared with wild type (Fig 2), indicating that the second major seed inhibitor, TI2, contributes less to overall activity than TI1. These data are in agreement with earlier studies of recombinant proteins representing TI1 and TI2, where TI1 isoforms showed greater inhibition of chymotrypsin than did TI2, hypothesised to reflect the active site sequences (AYSN in TI1 compared with ALSY in TI2), in agreement with tyrosine being a more effective amino acid at the P1' position [29,32]. As far as trypsin inhibition is concerned, there is some evidence to suggest that TI2 may also be less effective than TI1 (TKSN in TI1, compared with TKSD in TI2) [33], in agreement with the lower activity remaining in the C77Y (TI1) mutant (Fig 2). It is also possible, however, that dimers of TI1 and TI2 contribute significantly to activity and that a loss of functional TI1 leads to a disproportionate loss of overall activity; this theory is not supported by analysis of the E109K mutant, where a reduction in the extent to which oligomers are formed did not diminish TIA or CIA significantly. The expression of *TI1* and *TI2* genes was approximately equal during seed development at stages when protein is being maximally synthesised; the slightly earlier expression of *TI2* observed during seed development might reflect the genomic organisation of the two genes, which may be concluded not to influence their relative expression to any great degree (S2c Fig). In *Phaseolus*, it has been shown that two *TI* genes exist in a head-to-head arrangement [34] but this does not appear to hold for either pea (tail-to-tail; S2c Fig) or *Medicago truncatula* (see http://jcv.org/cgi-bin/medicago/manatee/genelist_display.cgi?db=mta4&user=access&password=access&file=results8509.orf&features=gene_name&ev_features=&at=gene_name&searchstr=Bowman for Bowman-Birk inhibitor genes (Medtr7g077160—Medtr7g077340), revealed by JBrowse as a tandem array on the *Medicago truncatula* chromosome 7, syntenic to pea linkage group V). The loss of the active site serine from the chymotrypsin inhibitory domain in the S85F mutant led to a total loss of CIA of the two TI1 fractionated isoforms (Fig 4b). In this case, TIA of the TI1 isoforms appeared to be unaffected (Fig 4a), although overall TIA was somewhat elevated (Fig 2a). The effect on TIA in the mutant is unexpected but may reflect structural changes in the protein overall as a consequence of the F85 residue, which could impact on steric effects in the binding of trypsin.

The E109K mutant showed marginal decreases in both TIA and CIA (Fig 2), consistent with the lack of direct participation of the carboxy-terminal domain in interactions with trypsin or chymotrypsin. Here, however, it was predicted that the charge variation might impact on interactions between monomers (Fig 6 inset). The data obtained from size-exclusion chromatography indicated that the E109K mutation had a profound effect on the participation of TI1 in oligomeric forms of TI. The composition of eluted peaks from size-exclusion chromatography of the E109K mutant (Fig 7) indicated that, whereas peak A from wild type consisted of unprocessed forms of TI1 and TI2, the TI1 unprocessed form was absent from peak A in the mutant E109K (Fig 7b), where peak A was reduced in proportion overall (Fig 7a). These data are supported by a suggested electrostatic interaction between the ϵ -amino group of K58 of one monomer and a negatively charged residue at the carboxy-terminal of the second monomer in the formation of dimers [35,36]. Although up to three glutamic acid residues are present in the carboxy-terminal tail of TI1 (Fig 1b), the residue E109 seems to be strictly necessary in the dimerization process of pea TI. Given the identical carboxy-terminal ends of TI1 and TI2 variants, the presence of heterodimers as well as homodimers in the wild type would be expected. The size-excluded chromatographic peaks B and C were shown to contain processed TI2 and TI1 isoforms (i.e. lacking the carboxy-terminal domain), respectively, and predicted to exist as monomers.

Monomeric and dimeric forms of pea TI are suggested to differ in shape, with the dimers being more compact [28]. In the present work, the monomeric processed TI1 and TI2 isoforms (size-excluded chromatographic peaks C and B) eluted with apparently different molecular

weights in the range 12–15 and 22–30 kDa, respectively); differences in their amino acid sequences and the lack of compactness of the monomeric forms, mainly due to the presence of exposed hydrophobic surface patches, might explain this anomalous behaviour. TI dimerization results in the presence of four inhibitory domains located at the molecular surface. The reported crystal structure of PsTI-IVb from pea [28] and functional studies carried out on HGI-III from horsegram [36] suggest that the dimeric state of the molecule is more stable than the monomeric state; most of the exposed hydrophobic residues of the monomeric molecule are shielded from the solvent by the second subunit in the dimer. The functionality and stability of monomeric and dimeric TI forms in terms of protease inhibition in mutants may become relevant in interactions with enzymes other than those used here in standard assays, for example, enzymes such as matriptase [37] and the proteasome [38] implicated in anti-carcinogenic responses.

Targeted-screening of pea germplasm has proven the utility of this approach in identifying sources of novel germplasm that would be difficult to detect by other means. The variant, JI 262, a wild *Pisum elatius* line originating from Turkey, revealed a deletion that was common to both *TI1* and *TI2*, with a premature stop codon predicted for both proteins within the pre-peptide region. The origin of such variation is intriguing, particularly as no other such variant was detected in the screening of 2822 *Pisum* lines. It is likely that the double mutation arose as a consequence of a gene conversion event involving the two related *TI* genes, one of which had acquired the original deletion. As a consequence, JI 262 showed an extreme reduction in TIA and no CIA. In this work, despite having extremely small seeds and a thick black testa, JI 262 has been readily crossed with a cultivar and mutant progeny lines used to show that the mutation is linked with low TIA. This variant may progress into breeding programmes, where progeny lines can be selected on the basis of phenotypes (short stature, lack of anthocyanins, round seeds), together with the molecular markers described here to follow the deletion. Beyond the opportunities for improved formulations for feed and food, and the higher inclusion of pea protein therein, the discovery of JI 262 opens possibilities for testing the function of TI proteins in seeds, and determining the extent to which these proteins contribute to plant and seed defence. The reductions in TIA/CIA achieved here for pea are higher than those obtained in soybean [21,22] and have the advantage of being conferred by a genetically linked pair of mutant alleles.

Studies in soybean have provided an alternative strategy for how seed protease inhibitor content may be manipulated. A soybean line expressing a mutant *BBI* transgene where both active sites have been interrupted with an inserted (glycine) residue showed a significant reduction in the amount of seed inhibitor; TIA was reduced from 20 to 50% in seeds of the transgenic soybeans [20]. The proposed explanation for the observed effects is that the more prevalent mRNA from the mutant gene, under the control of the phaseolin seed specific promoter, out-competed messenger RNA from the native genes during translation to decrease the amount of active BBI, possibly as a consequence of limiting sulphur amino acid content. Given the continuing lack of acceptance of transgenic technologies in Europe, the genetic improvement of seed quality by traditional mutagenesis and/or introgression of natural gene variants continue to be the most practical routes to breeding for improved feed and food.

The induced *TI1* mutant (C77Y) and the natural *TI* variant, JI 262, described in this study may be regarded as null mutants for one and two genes, respectively. The C77Y mutant retains *TI2* function and offers a compromise in reducing TIA but retaining TIA for potential health-promoting properties [39,40]. As such, both mutants provide opportunities for the combination of mutations in order to reduce the content of anti-nutritional proteins in seeds. Null mutations have been reported for albumin 2 [41] and a lipoxygenase enzyme [42] previously in pea. More recently, several null mutations were identified following high-throughput screens

of a population generated by fast neutron mutagenesis of pea [43]. Combinations of such mutations will provide an enhanced germplasm resource, predicted advantages in terms of protein quality, as well as novel variation to enable fundamental studies on the participation of seed protein gene families in indispensable plant functions that contribute to agronomic performance and ultimately yield.

This study demonstrates the potential for making major changes to the seed protein profiles of plant species, such that the demands for safe, high-quality, low allergenic protein sources can be met for an increasing world population as well as meeting the requirements of those with intolerance to cereal-based products.

Materials and Methods

Plant materials

The development of a mutagenized population as a TILLING resource in the pea cultivar (cv.) Cameor and its utilization (<http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb>), to isolate a number of allelic variants for several genes has been described [24,25]. M3 and M4 seeds from lines identified as carrying mutations in the *TII* gene were sown in glasshouses; homozygous mutant lines were back-crossed twice to the cv. Cameor. BC2 F3 and F4 seeds from confirmed segregant mutant and corresponding wild-type lines were used for the preparation of seed meals. For every mutant line selected, one having the corresponding wild-type allele was selected from the same family as the control for that family.

Natural variants of *Pisum* germplasm, linked to a corresponding DNA resource based on single plants, are maintained at the John Innes Centre (JIC), Norwich, UK (<http://www.jic.ac.uk/germplasm/>). A variant line, JI 262, was crossed with cv. Cameor, and an F2 population developed to generate mutant and control segregants.

Identification of *TII* TILLING mutants

TILLING mutants for the trypsin/chymotrypsin inhibitor (TI) gene, *TII*, were identified using primers based on the GenBank accession, AJ276900. Nested primers (N1, N2) were used to amplify the *TII* gene, including promoter and downstream sequences. N1 primers (5' GTAGCTTCATGCTATTGTTGCCT 3', -371 to -349 relative to initiator ATG, and 5' AAG TAATGActaaagtactatagatca 3', 222 to 196 relative to terminator TGA) generated an amplicon of 938bp. N2 primers (5' gcatggccttatgtctacagatgtgc 3', -230 to -205 relative to initiator ATG and 5' ttcacatgccacactgcacgatcatg 3', 137 to 112 relative to terminator TGA) generated an internal amplicon of 712bp. The generic screening methodologies for mutants among the TILLING population have been described [24].

Among a set of thirteen families with base changes in the *TII* amplicon, three encoding missense mutations within the mature TII protein regions were selected for further study (Table 1). Mutant and wild-type lines were selected among BC2F2 segregants and their progeny confirmed using N1 and N2 primers (see above) in nested PCR analyses, followed by sequencing. BC2F3 and BC2F4 seeds were bulked for protein analyses and assays. All analyses and assays were based on two or three independent mutant and wild-type segregant lines for every family.

Analysis of *TII* gene expression and organisation

Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using RNA samples prepared from developing seeds of cv. Cameor at different stages of development. The control gene for qPCR experiments was *eIF α* , and qPCR conditions were as described [44,45]. Preliminary experiments

were carried out to ensure that the dilutions of first strand cDNA used for qPCR were appropriate for comparisons and quantitative measurements of pea RNA for the target *TI1* and *TI2* genes. The primer pairs used to distinguish *TI1* and *TI2* cDNAs were: CTCTCCAATGGTGATGATGTC (QTI-CCf) and either TGACACTTGGGAGGATTAGAATA (At^{YSN}) or TGACACTGGG GAGGATAAGATAG (At^{LSY}) as reverse primer for *TI1* or *TI2*, respectively, where the At^{YSN} and At^{LSY} reverse primers are based on the distinct chymotrypsin inhibitory domains of the two proteins, respectively [31].

In order to ascertain the relative orientation of *TI1* and *TI2*, genomic PCR analysis was carried out under conditions appropriate to the generation of long products, using combinations of four primers: At^{YSN} and At^{LSY} primers (as above) and two primers complementary to At^{YSN} and At^{LSY} sequences [TATTCTAATCCTCCCAAGTGTC ($At5^{YSN}$ -RC) and CTATCTTAT CCTCCCAGTGTC ($At5^{LSY}$ -RC)]. PCR conditions were: 98°C for 1 min, (98°C for 10 sec, 55°C for 30 sec, 72°C for 7.5 min) x 35 cycles, and 72°C for 10 min, using ExTaq polymerase (Takara Bio Inc.), according to the manufacturer's instructions. Alternative PCR conditions were: 98°C 1 min, (98°C for 10 sec, 55°C for 10 sec, 72°C for 5 min) x 36 cycles, and 72°C for 10 min, using I-proof polymerase (Bio-Rad Laboratories Inc.) according to the manufacturer's instructions.

Screening for natural *TI* mutants

DNA from 2822 *Pisum* accessions (maintained at the John Innes Centre (JIC), Norwich, UK; <http://www.jic.ac.uk/germplasm/>) as described [23], was used for the preparation of printed DNA plates for high-throughput targeted genetic screening. The DNA was prepared from individual plants, from which seeds were retained to form an independent resource (TG lines), linked to the marker database developed by Jing *et al.* [23]. This resource represents the broad genetic diversity available across the JIC *Pisum* accessions. Multiplex PCR assays were designed and carried out by iDna Genetics (<http://www.idnagenetics.com/>) to yield amplicons of 50–300 bp, based on a range of discrete gene-specific products that could be identified by fluorescent label and size. One primer of every pair carried a fluorescently labelled tag detector probe (either *Fam*, *blue* or *Vic*, *green*), to facilitate the detection of products, and additional bases (T) added to primers as necessary to distinguish gene products of otherwise similar predicted sizes. A multiplex screen was carried out to identify variants for a number of discrete genes; *TI* gene primers were: GTTTTCCTCTTGAGCTTCGCC and CACTGACACTGGGAGGATAAGATAG (forward and reverse, nucleotides 88–108 and 317–292 of X83210, respectively, to yield a product of 230 bp). The details of the screening and detection of labelled amplicons were as described [43].

The variant, JI 262, was crossed with cv. Cameor, and F2 mutant and wild-type segregants identified by screening with *TI* gene-specific primers.

Protein and gel analyses of TILLING mutants

Meals were prepared from wild-type and mutant seeds of replicate lineages for analysis of total protein profile on gels, total protein determination, analysis and quantification of albumins, measurement of trypsin and chymotrypsin inhibitory activities, fractionation of protease inhibitors by size-exclusion and cation-exchange chromatography and non-denaturing gel electrophoresis for zymography. Albumins were prepared, based on solubility in ammonium acetate as previously described [41] and total protein and fractionated proteins quantified using bovine serum albumin as standard.

Denaturing gel analyses were carried out using 12% or gradient 4–12% Bis-Tris pre-cast gels (Invitrogen), as described [43,46] and according to the manufacturer's instructions, with

2-N-morpholine-ethane sulphonic acid (NuPAGE MES, Invitrogen) as running buffer. Immediately before loading, samples were reduced with DTT and NuPAGE antioxidant added to the upper buffer chamber to prevent re-oxidation of reduced proteins during electrophoresis. Gels were stained using InstantBlue (Expedeon, Harston, UK).

Non-denaturing gel separation of active protease inhibitor isoforms was carried out on 4–16% zymogram blue casein gels (Invitrogen) [47]. After electrophoresis, and following the manufacturer's instructions, gels were treated with zymogram renaturing buffer (Invitrogen) for 30 min at room temperature, equilibrated with zymogram developing buffer (Invitrogen), incubated with 25 mL of trypsin or chymotrypsin solution (0.08 mg/mL of zymogram developing buffer) at 37°C for 1.5 h, and washed with distilled water before the addition of acetic acid to stop the enzymatic reaction.

Measurement of protease inhibitory activities

Seeds were screened for their relative trypsin (TIA) and chymotrypsin inhibitory activity (CIA), as described previously [48]. Finely ground meal from 10–15 pooled seeds of every replicate pea line was used to measure TIA and CIA with *N*- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) [48] and *N*- α -benzoyl-L-tyrosine-*p*-nitroanilide (BTpNA) [49] as specific substrates, respectively. TIA and CIA, expressed as inhibitor units (IU) per mg of meal or protein, were calculated. One trypsin inhibitor unit (TIU) was defined as that which gives a reduction in absorbance at 410 nm of 0.01, relative to trypsin control reactions, in 10 min in a defined assay volume of 10 mL [10]. One chymotrypsin inhibitor unit (CIU) was defined as that which gives a reduction in absorbance at 410 nm of 0.01, relative to chymotrypsin control reactions, in 16 min in a defined assay volume of 10 mL.

Fractionation of protease inhibitors by cation-exchange chromatography

Finely ground meal (150 mg) was added to 3 mL of 50 mM HCl and stirred for 2 h at 4°C. The extracts were centrifuged at 15,000 *g* for 15 min and supernatants were dialysed extensively against 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.4, at 4°C. The protein extracts were fractionated on a MonoS 5/50 GL cation-exchange column. The elution was monitored at 280 nm and 0.5 mL fractions were collected. TIA measurements of eluted proteins were carried out in flat-bottom microtitre plates and assay products measured at OD_{405 nm}, as previously described [47]. CIA evaluation of fractionated proteins was carried out, using *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), as previously described [46].

Fractionation of protease inhibitors by size-exclusion chromatography

The oligomerization pattern of pea TI was investigated using albumin proteins extracted from cv. Cameor, wild-type and E109K mutant seeds. Freeze-dried albumins (60 mg dissolved in 3.5 mL 50 mM Tris-HCl pH 7.5) were filtered through a 0.22 μ m filter and 2 mL samples loaded onto a HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR column (flow rate of 0.3 ml per min) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5. Four replicates samples of each line were analysed. Size calibration of the column separation was based on three sets of standards, each in 2 mL buffer [set 1: blue dextran, ovalbumin (48.1 kDa), ribonuclease A (15.6 kDa); set 2: blue dextran, bovine serum albumin (63.5 kDa), chymotrypsinogen A (20.4 kDa); set 3: bovine serum albumin, aprotinin (6.5 kDa)]. Fractions containing TIA were identified, corresponding to three peaks (A, B and C in order of elution from size-exclusion chromatography); these were individually collected, dialysed against distilled water, freeze-dried and dissolved in 3 mL of 50 mM sodium acetate pH 4.4 for analysis by cation-exchange chromatography as above.

Identification of peptides by mass spectrometric fingerprinting

Following cation-exchange chromatography of some lines, samples from chromatographic peaks having TIA were precipitated with acetone, dissolved in NuPAGE lithium dodecyl sulphate sample buffer (Invitrogen), and the proteins separated by electrophoresis on Novex 12% Bis-Tris pre-cast gels as above. Bands were excised from Colloidal Blue (Invitrogen)-stained gels and subjected to in-gel trypsin digestion. Peptide fragments from digested proteins were desalted and concentrated using C-18 ZipTip columns (Millipore, Madrid, Spain) and then loaded directly onto MALDI plates, using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix for MALDI mass spectrometry (MS). MS spectra were obtained automatically in a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), operating in reflectron mode with delayed extraction. Peptide mass data were used for protein identification against the MS protein sequence database (www.matrixscience.com).

Homology modelling

The structural model of pea TII was generated using the Phyre2 server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>) [50], based on the deposited structure of the pea protein (PDB entry 1PBI) [28] from which it differs by only five amino acid substitutions. The template structure contains a biological homodimer in the crystallographic asymmetric unit and therefore could be used to generate a model of the TII homodimer by superposition of two copies of the Phyre2 model. The resultant monomer and dimer models of pea TII were not energy-minimised. The interactions at the homodimer interface of TII shown in the inset to Fig 6 are identical to those in the template structure. Interactions of TII with its target protein were predicted by superposing the monomer model onto the structure of *Medicago scutellata* BBI (with which it shares 48% amino acid sequence identity) bound to two copies bovine trypsin taken from PDB entry 2ILN [51]. The main part of Fig 6 shows this predicted complex with the structure of *M. scutellata* BBI removed.

Supporting Information

S1 Fig. (a) Analysis of *TII* mutants and their corresponding wild-type segregant lines (BC2F3) within each of three mutant families (671, mutation S85F; 895, mutation E109K; 2808, mutation C77Y). Total proteins were extracted from seed meal samples in gel loading buffer and analysed on 12% Bis-Tris gels. M, mutant; WT, wild-type control. The positions of markers are indicated on the left-hand gel (molecular weight $\times 10^{-3}$). **(b)** Total protein content of seeds of *TII* mutant and wild-type controls (BC2F4), for three mutant families (671, mutation S85F; 895, mutation E109K; 2808, mutation C77Y), using Bradford's assay. There was no significant difference among lines or mutants ($p = 0.05\text{--}0.42$). **(c)** Analysis of albumin preparations from *TII* mutants and their corresponding wild-type segregant lines (BC2F3) within each of three mutant families (671, mutation S85F; 895, mutation E109K; 2808, mutation C77Y) on 12% Bis-Tris gels. M, mutant; WT, wild-type control. The positions of markers are indicated on the left-hand gel (molecular weight $\times 10^{-3}$). **(d)** Albumin content of seeds of *TII* mutant and wild-type control lines (BC2F4), for three mutant families (671, mutation S85F; 895, mutation E109K; 2808, mutation C77Y), using Bradford's assay. There was no significant difference among lines or mutants ($p = 0.20\text{--}0.36$). (TIF)

S2 Fig. Expression of *TI* genes in immature seeds of cv. Cameor, using quantitative PCR of cotyledonary RNA at different stages of development. (a) Expression of *TII* and *TII2* or both, relative to the control gene, *EF1 α* , at six stages of increasing maturity (C1–C8). **(b)** Expression

of *Tl2*, relative to *Tl1* at five stages of increasing maturity (C5–C10), where C9 and C10 correspond to stages of maximum protein accumulation. (c) Amplification of genomic DNA from two pea genotypes (C, Cameor, J, JI 1294), using two primers designed on *Tl1* and *Tl2* genes (sense orientation) and I-proof polymerase, alongside DNA markers (M) of up to ~40 kb. Schematic shows *Tl1*-*Tl2* intergenic region, using gene-specific primers At^{YSN} RC (*Tl1*) and At^{LSY} RC (*Tl2*) to distinguish gene orientation. (TIF)

S3 Fig. Calibration of the HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 column, using five protein standards (bovine serum albumin, ovalbumin, chymotrypsinogen A, ribonuclease A, aprotinin), showing log molecular weight plotted against Kav, determined from elution volume. (TIF)

Acknowledgments

A.C. and M.C.A. acknowledge support from ERDF-co-financed grant from MINECO (AGL2011-26353), and from COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion. We are grateful to the proteomics services of the Institute of Parasitology and Biomedicine “López-Neyra” (IPBLN-CSIC, Granada, Spain) for carrying out the peptide analysis. C.C., T.R., D.M.L. and C.D. acknowledge support from BBSRC (BB/J004561/1) and the John Innes Foundation, and from Defra (AR0711 and IF0147, Pulse Crop Genetic Improvement Network). A.B., M.D. and C.L.S. acknowledge the Saclay Plant Sciences (SPS, ANR-10-LABX-40) and PeaMUST project (grant agreement number ANR-11-BTBR-0002). C.C., M.D., C.L.S., A.B. and C.D. acknowledge support from the European Union (Grain Legumes Integrated Project, a Framework Programme 6 project, grant no. FOOD-CT-2004-506223). The study is not subject to any conflict of interest.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AC CD. Performed the experiments: MCA MD CC RO TR PGI. Analyzed the data: AC MCA MD PGI DML CD. Contributed reagents/materials/analysis tools: CLS AB PGI. Wrote the paper: AC CD. Carried out the germplasm DNA screen and analysed data: PGI.

References

1. Crévieu I, Carré B, Chagneau AM, Quillien L, Guéguen J, Berot S (1997) Identification of resistant pea (*Pisum sativum* L.) proteins in the digestive tract of chickens. *J Agric Food Chem* 45: 1295–1300. doi: [10.1021/jf960806b](https://doi.org/10.1021/jf960806b)
2. Salgado P, Freire JPB, Ferreira RB, Teixeira A, Bento O, Abreu MC, et al. (2003) Immunodetection of legume proteins resistant to small intestinal digestion in weaned piglets. *J Sci Food Agric* 15: 1571–1580. doi: [10.1002/jsfa.1581](https://doi.org/10.1002/jsfa.1581)
3. Rubio LA, Pedrosa MM, Cuadrado C, Gelencser E, Clemente A, Burbano C, et al. (2006) Recovery at the terminal ileum of some legume non-nutritional factors in cannulated pigs. *J Sci Food Agric* 86: 979–987. doi: [10.1002/jsfa.2446](https://doi.org/10.1002/jsfa.2446)
4. Le Gall M, Quillien L, Sève B, Guéguen J, Lallés JP (2007) Weaned piglets display low gastrointestinal digestion of pea (*Pisum sativum* L.) lectin and albumin pea albumin 2. *J Anim Sci* 85: 2972–2981. doi: [10.2527/jas.2006-795](https://doi.org/10.2527/jas.2006-795) PMID: 17565068
5. Carbonaro M, Maselli P, Nucara A (2014) Structural aspects of legume proteins and nutraceutical properties. *Food Res Int* (in press). doi: [10.1016/j.foodres.2014.11.007](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.007)
6. Vaz Patto MC, Amarowicz R, Aryee AN, Boye JI, Chung HJ, Martín-Cabrejas MA, et al. (2015) Achievements and challenges in improving the nutritional quality of food legumes. *Crit Rev Plant Sci* 34: 105–143. doi: [10.1080/07352689.2014.897907](https://doi.org/10.1080/07352689.2014.897907)

7. Bode W, Huber R (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 204: 433–451. doi: [10.1111/j.1432-1033.1992.tb16654.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16654.x) PMID: 1541261
8. Perona JJ, Craik CS (1995) Structural basis of substrate-specificity in the serine proteases. *Protein Sci* 4: 337–360. PMID: [7795518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7795518/)
9. Wiseman J, Al-Mazooqi W, Welham T, Domoney C (2003) The apparent ileal digestibility, determined with young broilers, of amino acids in near-isogenic lines of peas (*Pisum sativum* L.) differing in trypsin inhibitor activity. *J Sci Food Agric* 83: 644–651. doi: [10.1002/jsfa.1340](https://doi.org/10.1002/jsfa.1340)
10. Domoney C, Welham T (1992) Trypsin inhibitors in *Pisum*: variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Sci Res* 2: 147–154. doi: [10.1017/S0960258500001276](https://doi.org/10.1017/S0960258500001276)
11. Domoney C. Inhibitors of legume seeds. In: Shewry PR, Casey R, editors. *Kluwer Academic Publishers. Seed Proteins*; 1999. pp. 635–655. doi: [10.1007/978-94-011-4431-5_27](https://doi.org/10.1007/978-94-011-4431-5_27)
12. Domoney C, Welham T, Ellis N, Mozzanega P, Turner L (2002) Three classes of proteinase inhibitor gene have distinct but overlapping patterns of expression in *Pisum sativum* plants. *Plant Mol Biol* 48: 319–329. doi: [10.1023/A:1013379430582](https://doi.org/10.1023/A:1013379430582) PMID: 11855733
13. Clemente A, Domoney C (2006) Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr Prot Pept Sci* 7: 201–216. doi: [10.2174/138920306777452349](https://doi.org/10.2174/138920306777452349) PMID: [16787260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16787260/).
14. Ramasarma PR, Rao AG, Rao DR (1995) Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochim Biophys Acta* 1248: 35–42. doi: [10.1016/0167-4838\(95\)00004-E](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00004-E) PMID: 7711055
15. Kumar V, Gowda LR (2013). The contribution of two disulphide bonds in the trypsin binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Arch Biochem Biophys* 537: 49–61. doi: [10.1016/j.abb.2013.06.002](https://doi.org/10.1016/j.abb.2013.06.002) PMID: 23791628
16. Jofuku KD, Schipper RD, Goldberg RB (1989) A frameshift mutation prevents Kunitz trypsin-inhibitor messenger-RNA accumulation in soybean embryos. *Plant Cell* 1: 427–435. doi: [10.1105/tpc.1.4.427](https://doi.org/10.1105/tpc.1.4.427) PMID: 2562563
17. Kim DS, Lee KJ, Kim JB, Kim SH, Song JY, Seo YW, et al. (2010) Identification of Kunitz trypsin inhibitor mutations using SNAP markers in soybean mutant lines. *Theor Appl Genet* 4: 751–760. doi: [10.1007/s00122-010-1346-1](https://doi.org/10.1007/s00122-010-1346-1) PMID: 20445958
18. Ha BK, Lee KJ, Velusamy V, Kim JB, Kim SH, Ahn JW, et al. (2014) Improvement of soybean through radiation-induced mutation breeding techniques in Korea. *Plant Genet Resour* 12: S54–S57. doi: [10.1017/S1479262114000264](https://doi.org/10.1017/S1479262114000264)
19. Wang KJ, Li XH, Takahata Y, Yamashita T (2010) Allelic diversity and geographical pattern at soybean Kunitz trypsin inhibitor single locus in Chinese wild soja (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). *Plant Breeding* 129: 264–270. doi: [10.1111/j.1439-0523.2009.01734.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01734.x)
20. Livingstone D, Beilinson V, Kalyaeva M, Schmidt MA, Herman EM, Nielsen NC (2007) Reduction of protease inhibitor activity by expression of a mutant Bowman-Birk gene in soybean seed. *Plant Mol Biol* 64: 397–408. doi: [10.1007/s11103-007-9163-x](https://doi.org/10.1007/s11103-007-9163-x) PMID: 17429741
21. Schillinger JA (2012) US patent application US2012/0317675. Ultra-low trypsin inhibitor soybean.
22. Wu K, Horejsi T, Byrum JR, Bringe N, Yang J, Pei D, et al. (2014) US patent application US2014/0259196. Agronomically elite soybeans with beta-conglycinin content.
23. Jing RC, Vershinin A, Grzebyta J, Shaw P, Smykal P, Marshall D, et al. (2010) The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis. *BMC Evol Biol* 10: 44. doi: [10.1186/1471-2148-10-44](https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-44) PMID: 20156342
24. Dalmais M, Schmidt J, Le Signor C, Moussy F, Burstin J, Savoie V, et al. (2008) UTILLdb, a *Pisum sativum* *in silico* forward and reverse genetics tool. *Genome Biol* 9: R43. doi: [10.1186/gb-2008-9-2-r43](https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-r43) PMID: 18302733
25. Hofer J, Turner L, Moreau C, Ambrose M, Isaac P, Butcher S, et al. (2009) Tendril-less regulates tendril formation in pea leaves. *Plant Cell* 21: 420–428. doi: [10.1105/tpc.108.064071](https://doi.org/10.1105/tpc.108.064071) PMID: 19208900
26. D'Erfurth I, Le Signor C, Aubert G, Sanchez M, Vernoud V, Darchy B, et al. (2012) A role for an endosperm-localized subtilase in the control of seed size in legumes. *New Phytol* 196: 738–751. doi: [10.1111/j.1469-8137.2012.04296.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04296.x) PMID: 22985172
27. Domoney C, Welham T, Sidebottom C, Firmin JL (1995) Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS Lett* 360: 15–20. doi: [10.1016/0014-5793\(95\)00070-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00070-P) PMID: 7875292
28. de la Sierra IL, Quillien L, Flecker P, Gueguen J, Brunie S (1999) Dimeric crystal structure of a Bowman-Birk protease inhibitor from pea seeds. *J Mol Biol* 285: 1195–1207. doi: [10.1006/jmbi.1998.2351](https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2351) PMID: 9887273

29. Clemente A, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Domoney C (2004) The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Prot Express Purific* 36: 106–114. doi: [10.1016/j.pep.2004.03.015](https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.03.015) PMID: [15177291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15177291/)
30. Rao KN, Suresh CG (2007) Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochim Biophys Acta* 1774: 1264–1273. doi: [10.1016/j.bbapap.2007.07.009](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.07.009) PMID: [17869196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17869196/)
31. Page D, Aubert G, Duc G, Welham T, Domoney C (2002) Combinatorial variation in coding and promoter sequences of genes at the *Tri* locus in *Pisum sativum* accounts for variation in trypsin inhibitor activity in seeds. *Mol Gen Genomics* 267: 359–369. PMID: [12073038](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12073038/)
32. Lu W, Apostol I, Qasim MA, Warne N, Wynn R, Zhang WL, et al. (1997) Binding of amino acid side-chains to S₁ cavities of serine proteinases. *J Mol Biol* 266: 441–461. doi: [10.1006/jmbi.1996.0781](https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0781) PMID: [9047374](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9047374/)
33. Gariani T, McBride JD, Leatherbarrow RJ (1999) The role of the P2' position of Bowman—Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochim Biophys Acta* 1431: 232–237. doi: [10.1016/S0167-4838\(99\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00035-7) PMID: [10209295](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10209295/)
34. Galasso I, Piergiovanni AR, Lioi L, Campion B, Bollini R, Spavoli F (2009) Genomic organization of Bowman-Birk inhibitor in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol Breeding* 23: 617–624.
35. Kumar P, Rao AG, Hariharaputran S, Chandra N, Gowda L (2004) Molecular mechanism of dimerization of Bowman-Birk inhibitors. *J Biol Chem* 29: 30425–30432. doi: [10.1074/jbc.M402972200](https://doi.org/10.1074/jbc.M402972200) PMID: [15123729](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15123729/)
36. Muricken DG, Gowda LR (2010) Functional expression of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor and its self-association. *Biochim Biophys Acta* 1804: 1413–1423. doi: [10.1016/j.bbapap.2010.02.012](https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.02.012) PMID: [20227530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20227530/)
37. Li P, Jiang S, Lee SL, Lin CY, Johnson MD, Dickson RB, et al. (2007) Design and synthesis of novel and potent inhibitors of the type II transmembrane serine protease, matriptase, based upon the sunflower trypsin inhibitor-1. *J Med Chem* 50: 5976–5983. doi: [10.1021/jm0704898](https://doi.org/10.1021/jm0704898) PMID: [17985858](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17985858/)
38. Chen YW, Huang SC, Lin-Shiau SY, Lin JK (2005) Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase-phosphatase-1. *Carcinogenesis* 26: 1296–1305. doi: [10.1093/carcin/bgi062](https://doi.org/10.1093/carcin/bgi062) PMID: [15746161](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15746161/)
39. Clemente A, Moreno FJ, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Domoney C (2010) The cytotoxic effect of Bowman-Birk iso inhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Mol Nutr Food Res* 54: 396–405. doi: [10.1002/mnfr.200900122](https://doi.org/10.1002/mnfr.200900122) PMID: [19885848](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19885848/)
40. da Costa Souza L, Camargo R, Demasi M, Santana JM, de Sá CM, de Freitas SM (2014). Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PLOS ONE* 9, e86600. doi: [10.1371/journal.pone.0086600](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086600) PMID: [24475156](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24475156/)
41. Vigeolas H, Chinoy C, Zuther E, Blessington B, Geigenberger P, Domoney C (2008) Combined metabolomics and genetic approaches reveal a link between the polyamine pathway and albumin 2 in developing pea seeds. *Plant Physiol* 146: 74–82. doi: [10.1104/pp.107.111369](https://doi.org/10.1104/pp.107.111369) PMID: [18024559](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18024559/)
42. Forster C, North H, Afzal N, Domoney C, Homostaj A, Robinson DS, et al. (1999) Molecular analysis of a null mutant for pea (*Pisum sativum* L.) seed lipoygenase-2. *Plant Mol Biol* 39: 1209–1220. doi: [10.1023/A:1006173313548](https://doi.org/10.1023/A:1006173313548) PMID: [10380807](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10380807/)
43. Domoney C, Knox M, Moreau C, Ambrose M, Palmer S, Smith P, et al. (2013) Exploiting a fast neutron mutant genetic resource in *Pisum sativum* (pea) for functional genomics. *Funct Plant Biol* 40: 1261–1270. doi: [10.1071/FP13147](https://doi.org/10.1071/FP13147)
44. Hellens RP, Moreau C, Lin-Wang K, Schwinn KE, Thomson SJ, Fiers MW, et al. (2010) Identification of Mendel's white flower character. *PLoS ONE* 5: e13230. doi: [10.1371/journal.pone.0013230](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013230) PMID: [20949001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20949001/)
45. Chinoy C, Welham T, Turner L, Moreau C, Domoney C (2011). The genetic control of seed quality traits: effects of allelic variation at the *Tri* and *Vc-2* genetic loci in *Pisum sativum* L. *Euphytica* 180: 107–122. doi: [10.1007/s10681-011-0363-8](https://doi.org/10.1007/s10681-011-0363-8)
46. Arques MC, Marín-Manzano MC, Clarissa-Brito L, Hernandez-Ledesma B, Recio I, Clemente A (2014) Quantitative determination of active Bowman-Birk iso inhibitors, IBB1 and IBB2, in commercial soy-milks. *Food Chem* 155: 24–30. doi: [10.1016/j.foodchem.2014.01.024](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.024) PMID: [24594149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24594149/)
47. Clemente A, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Arques MC, Domoney C (2012) The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk iso inhibitor from pea (*Pisum sativum* L.) on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *Br J Nutr* 108: 135–144. doi: [10.1017/S000711451200075X](https://doi.org/10.1017/S000711451200075X) PMID: [22916809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22916809/)

48. Clemente A, Gee JM, Johnson IT, Mackenzie DA, Domoney C (2005) Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells *in vitro*. *J Agric Food Chem* 53: 8979–8986. doi: [10.1021/jf051528w](https://doi.org/10.1021/jf051528w) PMID: [16277391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16277391/)
49. Erlanger BF, Edel F, Cooper AG (1966) The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. *Arch Biochem Biophys* 115: 206–210. PMID: [5966518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5966518/)
50. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10: 845–858. doi: [10.1038/nprot.2015.053](https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053) PMID: [25950237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25950237/)
51. Capaldi S, Perduca M, Faggion B, Carrizo ME, Tava A, Ragona L, Monaco HL (2007) Crystal structure of the anticarcinogenic Bowman-Birk inhibitor from snail medic (*Medicago scutellata*) seeds complexed with bovine trypsin. *J Struct Biol* 158: 71–79. doi: [10.1016/j.jsb.2006.10.017](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.10.017) PMID: [17142058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17142058/)

WJG 20th Anniversary Special Issues (5): Colorectal cancer**Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents**

Alfonso Clemente, Maria del Carmen Arques

Alfonso Clemente, Maria del Carmen Arques, Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), 18008 Granada, Spain

Author contributions: Clemente A and Arques MC designed and wrote the paper.

Supported by ERDF-co-financed grant from the Spanish CI-CYT, No. AGL2011-26353 to Clemente A; Clemente A involved in COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion

Correspondence to: Alfonso Clemente, PhD, Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain. alfonso.clemente@eez.csic.es

Telephone: +34-958-572757 Fax: +34-958-572753

Received: November 13, 2013 Revised: February 21, 2014

Accepted: April 21, 2014

Published online: August 14, 2014

Abstract

Aberrant functioning of serine proteases in inflammatory and carcinogenic processes within the gastrointestinal tract (GIT) has prompted scientists to investigate the potential of serine protease inhibitors, both natural and synthetic, as modulators of their proteolytic activities. Protease inhibitors of the Bowman-Birk type, a major protease inhibitor family in legume seeds, which inhibit potently and specifically trypsin- and chymotrypsin-like proteases, are currently being investigated as colorectal chemopreventive agents. Physiologically relevant amounts of Bowman-Birk inhibitors (BBI) can reach the large intestine in active form due to their extraordinary resistance to extreme conditions within the GIT. Studies in animal models have proven that dietary BBI from several legume sources, including soybean, pea, lentil and chickpea, can prevent or suppress carcinogenic and inflammatory processes within the GIT. Although the therapeutic targets and the action mechanism of BBI have not yet been elucidated, the emerg-

ing evidence suggests that BBI exert their preventive properties *via* protease inhibition; in this sense, serine proteases should be considered as primary targets in early stages of carcinogenesis. The validation of candidate serine proteases as therapeutic targets together with the identification, within the wide array of natural BBI variants, of the most potent and specific protease inhibitors, are necessary to better understand the potential of this protein family as colorectal chemopreventive agents.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key words: Bowman-Birk inhibitors; Cell proliferation; Chemoprevention; Colorectal cancer; Legumes; Serine proteases

Core tip: Bowman-Birk inhibitors (BBI) from legumes, such as soybean, pea, lentil and chickpea, are a class of naturally-occurring serine protease inhibitors with potential anti-inflammatory and chemopreventive properties within the gastrointestinal tract (GIT). BBI are extensively disulphide-linked within proteins and have been demonstrated to be structurally and functionally resistant to the challenges of the GIT *in vivo*. Recent data suggest that trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in early stages of carcinogenesis should be primary targets in investigating the potential of BBI as colorectal chemopreventive agents; so far, the therapeutic targets as well as action mechanism of BBI remain unknown.

Clemente A, Arques MC. Bowman-Birk inhibitors from legumes as colorectal chemopreventive agents. *World J Gastroenterol* 2014; 20(30): 10305-10315 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v20/i30/10305.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10305>

INTRODUCTION

Proteases are hydrolytic enzymes acting on peptide bonds, in a process termed proteolysis. The serine proteases constitute one of the largest families of proteolytic enzymes and are well recognized for their pivotal roles in a wide range of physiological processes as diverse as digestion, blood coagulation, fibrinolysis, immune responses, cell cycle progression and apoptosis. Their proteolytic activities are tightly controlled by an array of regulatory mechanisms, such as gene expression, substrate recognition, activation of inactive protease precursors (zymogens) by specific and limited proteolysis, localization of both enzyme and substrate, cofactor binding, post-translational modifications and interaction with other proteins and/or protease inhibitors than can form tight complexes with target enzymes^[1]. Aberrant functioning of certain serine proteases underlies pathological disorders such as cancer, angiogenesis, rheumatoid arthritis, neurodegenerative and cardiovascular diseases^[2-4]. Understanding the fundamental role played by serine proteases and their cognate inhibitors in pathological disorders offers challenging opportunities for preventive and/or therapeutic intervention^[5]. Naturally-occurring plant protease inhibitors are being investigated for their potential in the prevention and/or treatment of a diverse set of human pathologies, including cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases, muscle atrophy and inflammatory processes^[6,7]. In this context, the United States Food and Drug Administration (FDA) granted a protein extract of soybean (*Glycine max*) enriched in Bowman-Birk inhibitors (BBI), namely Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC), as investigational new drug. Up to six clinical trials has been accomplished in patients with benign prostatic hyperplasia^[8], oral leukoplakia^[9-12] and ulcerative colitis (UC)^[13]. The inherent ability of BBI to inhibit serine proteases has been related to their potential health benefits; however, the mechanism/s of action and the identity of their therapeutic targets remain unknown^[14]. Herein, we report recent evidences regarding the contribution of BBI from legumes as colorectal chemopreventive agents.

BOWMAN-BIRK FAMILY IN LEGUMES

Legumes seeds, compared to other vegetative organs and botanical families, are particularly rich in protease inhibitors of the Bowman-Birk family. BBI from legumes, such as soybean, pea (*Pisum sativum*), lentil (*Lens culinaris*), field bean (*Vicia faba*) or chickpea (*Cicer arietinum*), are canonical serine protease inhibitors of molecular weight in the range 7-9 kDa and usually contain two protease inhibitory domains, located in the external loops of the so-called "bow tie" motif, centred around residues 16 and 43^[15]; each inhibitory domain is located within a nonapeptide region joined *via* a disulphide bond between flanking cysteine residues^[16]. The inhibitory domains of BBI are very exposed and easily accessible to proteolytic enzymes (Figure 1A). This structural arrangement allows the interaction of BBI with two enzyme molecules, not

necessarily identical, simultaneously and independently, without any significant conformational adjustment^[17]; the resulting non-covalent complex renders the protease target inactive. Molecular recognition of serine proteases is governed by the P₁ residue^[18]; this residue inserts into the S₁ cavity of the cognate enzyme upon protease-inhibitor formation^[19]. In legume seeds, the target enzyme for the N-terminal inhibitory domain is trypsin with BBI having a positively charged residue, either Arg or Lys, at the P₁ position; the presence of Ala determines inhibition for elastase, as reported in wild soybean (*Glycine soja*)^[20] and grass pea (*Lathyrus sativus*)^[21]. Greater variation exists at the P₁ position for the C-terminal inhibitory domain, with Arg, Phe, Tyr or Leu at this position, with predictions of either trypsin or chymotrypsin inhibition. The high affinity of chymotrypsin-like proteases for aromatic residues within substrates (Tyr or Phe at position P₁) is well documented, as is reflected in their inhibitors, with Tyr showing the strongest binding^[22,23]. A limited number of amino acids located within the inhibitory domains of BBI seem to be responsible for their primary functional and biological properties. By using synthetic cyclic peptides mimicking the inhibitory domains of BBI, the significance of additional residues adjacent to the reactive site peptide bond (P₁-P_{1'}) on potency and resistance to hydrolysis against specific target proteases has been revealed^[24,25]. BBI from legumes exert extremely potent inhibitory activity against both trypsin and chymotrypsin enzymes, with *K_i* values within the nanomolar range reported for different legume species, such as soybean^[26], pea^[27,28], lentil^[29,30] and lupin (*Lupinus albus*) BBI^[31].

Protease inhibitors of the Bowman-Birk family show considerable variation between and within legume species where seed and vegetative isoforms may be distinguished^[32,33]. The expression of distinct genes, together with the post-translational modifications of primary gene products, which mainly occurs during seeds desiccation, is responsible for the wide array of isoforms reported for different legume species. As an example, protease inhibitors from winter pea seeds (*cv. Frilene*) comprise up to six isoforms (PSTI I, II, III, IVa, IVb and V) which all belong to the Bowman-Birk family^[34]. An amino acid sequence alignment of major BBI isoforms from soybean and those from other representative legume species shows that there is a high sequence homology among BBI isoforms (Table 1). For the N-terminal inhibitory domain, there is a consensus amino acid sequence, P₃-P₆: CTP₁SXPPQC, where P₁ is the position providing specificity for trypsin inhibition, and X (at P₂ position) can be any amino acid but with predicted significant effect on inhibitory potency and hydrolysis rates. Within the C-terminal inhibitory domain, amino acid sequence variation profoundly affects inhibitory potency against trypsin- or chymotrypsin-like enzymes^[35] (Table 1).

BBI from legume seeds contain high levels of cysteine residues involved in a conserved network of disulphide bridges (Figure 1B). Circular dichroism spectroscopy and fluorescence studies have revealed that the cysteine resi-

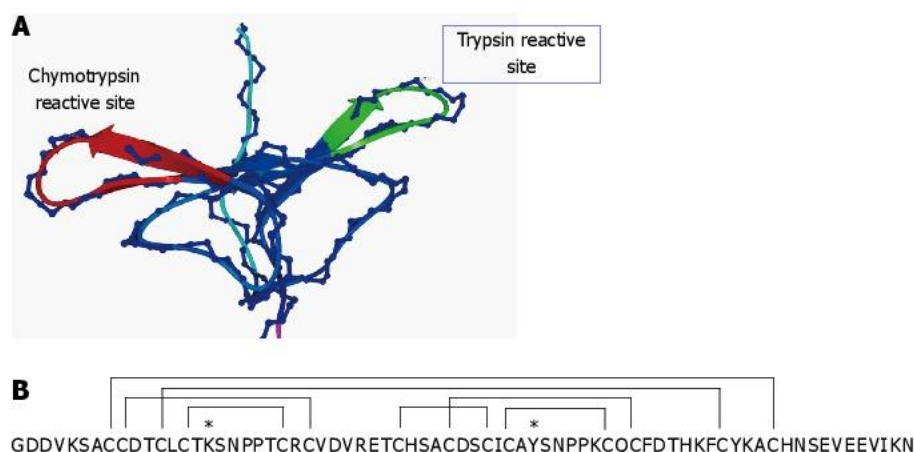


Figure 1 Bowman-Birk family in legumes. A: Homology model of T11, a major pea Bowman-Birk inhibitor (BBI) isoform, showing the trypsin and chymotrypsin inhibitory domains^[35]; B: Amino acid sequence deduced from the T11 gene from the pea cultivar Birle. The sequence of both inhibitory domains are underlined and the positions of the seven disulphide bonds are indicated by connecting lines^[36]. K and Y at position P1(*) determines specificity for trypsin and chymotrypsin, respectively.

Table 1 Amino acid sequence alignment of Bowman-Birk inhibitor-like proteins from several legumes species		
Species	Entry name (accession number)	Amino acid sequence
<i>Dolichos biflorus</i>	IBB_DOLBI (Q9S9E3)	EPSESSKPCCDQCTCTKSIPPQCRCTDVRLNSCHSACSSCVCTFSIPAQCVCVDMKDFCYAPCKSSHDD
<i>Glycine max</i>	IBB1_SOYBN (P01055)	DDESSKPCCDQC ACTKSNPPQCRCSMDRLNSCHSACKSCICALSYP AQCFVCVDITDFCYEPCKPSEDDKEN
	IBBD2_SOYBN (P1064)	DDEYSKPCCDLCMCTRSMPQCSCEDIRLNSCHSDCKSCMCTRSQPGQCRCLDITNDFCYKPKSRDD
	IBBC2_SOYBN (P01063)	DDESSKPCCDLCMCTASMPQCHCADIRLNSCHSACDRCACTRSMPGQCRCLDITDFCYKPKSSDEDDDD
<i>Lens culmaris</i>	IBB_LENCU (Q8W4Y8)	GDDVKSACCDTCLCTRSQPPTCRCVDVRESCHSACDKVCVAYSNPPQCQCYDTHKFCYKACHNSEIEE
<i>Lupinus albus</i>	IBB1_LUPAL (P85172)	SLASKPCCDSCICTRSIPPQCRCTDIGETCHSACKSCICTRSFPPQCRCSDIHFICYKPCCTSS
<i>Phaseolus vulgaris</i>	IBB2_PHAVU (P01060)	EPSESEPCCDICVCTASIPPICQCTDVRLNSCHSACKSCMCTRSMPGKCRCLDITDYCYKCKSSGEDDD
	IBB3_PHAVU (P81484)	ASXSSKPCCBHC ACTKSIPPQCRCSBLRLNSCHSECKGCICTFSIPAQCICTDINNFCYEPCKSSHGPBBNN
<i>Pisum sativum</i>	IBBA_PEA (Q41065)	GDDVKSACCDTCLCTKSNPPTCRCVDVRETCHSACDSCICAYSNPPKCQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
	IBB2_PEA (Q41066)	GDDVKSACCDTCLCTKSDPPTCRCVDVGETCHSACDSCICALSYPQCFDTHKFCYKACHNSEVEEVIKN
	IBBB_PEA (P56679)	GDDVKSACCDTCLCTKSNPPTCRCVDVGETCHSACLSCICAYSNPPKCQCFDTQKFCYKACHNSELEEVIKN
<i>Vicia faba</i>	IBB_VICFA (P24661)	GDDVKSACCDTCLCTKSEPTCRCVDVGERCHSACNSVCVRYSNPPKCQCFDTHKFCYKSCHN
<i>Vigna unguiculata</i>	IBB_VIGUN (P17734)	ZASZSSKPCRZCACTKSIPPZCRCSZVRLNSCHSACKSCACTFSIPAZFCGBIBFCYKPKSSHBBBBWN

The primary accession numbers below are reported in UniProtKB database. P₁-P₇ are the reactive peptide bond sites, in bold text. Either K or R at P₁ position determines specificity for trypsin, whereas L, Y or F determines specificity against chymotrypsin; A determines specificity for elastase.

dues, involved in seven intramolecular disulphide bridges, provide extreme stability to high temperatures and resistance to proteolysis and help to maintain the structural and functional features of the inhibitory domains^[35,36]. Mutational studies of the disulphide bonds in the N-terminal inhibitory domain of soybean BBI and the consequences of such mutations on inhibitory activity against serine proteases have been reported^[37]. In particular, the

mutations induced a dramatic effect on trypsin inhibition, with *K_i* values diminishing more than one order of magnitude in most of the mutants, compared with native BBI. A significant contribution of disulphide bonds in the anti-trypsin domain of BBI from horsegram (*Dolichos biflorus*) to thermal stability and control of the inhibitory activities, towards both trypsin and chymotrypsin, has been recently reported^[38].

SURVIVAL OF BBI TO GUT DIGESTION

In order to exert any physiological effect in large intestine, physiologically relevant amounts of dietary BBI must survive, after food processing and further passage through the GIT, in biologically active form(s)^[39]. *In vitro* and *in vivo* studies have demonstrated that BBI are functionally and structurally resistant to the extreme conditions within the GIT. Under acidic conditions, BBI are highly resistant to severe heat treatment, retaining their ability to inhibit serine proteases^[40]. In processed legumes or their derived products, a high percentage of the trypsin inhibitory activity is associated to heat-stable BBI. In addition, soybean BBI have demonstrated to be remarkably resistant to the action of proteolytic enzymes under simulated gastric and intestinal digestion^[41]. Soybean BBI is active at low pH in the presence of pepsin with no significant loss of protease inhibitory activity^[42]. The structural rigidity provided by the disulphide bridge network play an essential role in maintaining both correct folding and functional structure of BBI^[38,43,44]. Reduction of disulphide bridges and subsequent alkylation of the cysteinyl sulfhydryl groups abolishes almost completely both trypsin and chymotrypsin inhibitory activity of soybean BBI due to conformational changes and/or unfolding^[26]; these structural changes increase the vulnerability of BBIs to digestive proteases and decrease thermal stability. The survival of functional BBI in the small intestine of animal models (rodent and pig) has been clearly demonstrated. Hajós *et al*^[45] reported the presence of immunological reactive forms (5% of total ingested) of soybean BBI in the small intestine of rats; similar results were shown for cowpea (*Vigna unguiculata*) BBI in rat feeding trials^[46]. Due to methodological difficulties, the protease inhibitory activities of BBI were not evaluated in these experiments. In pigs, generally held as a suitable model for human digestive physiology^[47], it has been demonstrated that significant amounts of ingested chickpea BBI (5%-8%) can survive the extreme conditions within the GIT; chromatographic, electrophoretic and enzymatic data obtained from ileal samples revealed that both trypsin and chymotrypsin inhibitory activities were associated to a protein core comprising the two binding loops. Although processing at both N- and C-terminal ends of BBI during passage within the GIT was revealed, the network of disulphide bridges seems to exert a protective effect, avoiding an extensive proteolysis. By using mixed faecal samples from pigs, fermentation assays for a period of 24 h demonstrated that soybean BBI remained active and their ability to inhibit trypsin and chymotrypsin were not significantly diminished by the enzymatic and/or metabolic activity of faecal microbiota^[48]. All of these results make protease inhibitors of the Bowman-Birk family attractive for further pharmacological and pre-clinical studies in order to assess their potential as colorectal chemopreventive agents.

COLORECTAL CHEMOPREVENTIVE PROPERTIES OF BBI

Colorectal carcinogenesis is one of the major causes of cancer-related mortality worldwide in both men and women, with over 1.2 million new cases diagnosed globally^[49]. In recent years, substantial evidence has pointed to the link between dietary patterns and lifestyle in primary prevention and control of colorectal cancer (CRC). The anti-cancer effects of legumes have been explored extensively, although the evidence is still limited, several studies have claimed that a high intake of legumes may decrease risk of CRC. In a case-control study, Aune *et al*^[50] reported that the level of legume intake necessary for being protective against different types of cancer, including CRC, is easily achievable by populations by including two small portions or 100 g of legumes per week. A meta-analysis of three cohort studies and eleven case control studies suggested an inverse association between legume intake levels and CRC risk^[51]. It has been hypothesized that the direct contact of potential cancer preventive constituents of legumes with organs of the digestive system may be responsible of such beneficial effects. In particular, several studies suggest that dietary BBI from different legumes sources are effective at preventing or suppressing radiation- and chemical carcinogen-induced transformation *in vitro*, as well as carcinogenic and associated inflammatory processes within the mammalian GIT^[14,39] (Table 2). The anti-carcinogenic properties of soybean BBI has been extensively investigated, both in purified form and as a BBIC. Soybean BBI exerted a protective role in dimethylhydrazine (DMH)-treated rats when ingested at low concentrations (10 mg/100 g diet), decreasing the frequency and incidence rates of colorectal tumours; no adverse effects on animal growth and organ/tissue morphology were observed^[52]. These results are consistent to those reported previously on the suppression of colon carcinogenesis in DMH-treated mice when BBIC was administered^[53]. Autoclaved BBIC, in which the protease inhibitory activity was abolished, had no significant suppressive effects on DMH-induced colon carcinogenesis in rats, suggesting that the inherent ability of BBI to inhibit serine proteases is required for their reported chemopreventive properties^[52].

Immortalized human epithelial cell lines are well-established models to investigate the action mechanism/s by which certain bioactive compounds might exert a chemoprotective effect in early stages of colorectal carcinogenesis. Recent studies have demonstrated a significant concentration- and time-dependent decrease in the proliferation of colorectal human adenocarcinoma cells (HT29, Caco2, LoVo), following treatment with BBI variants from pea^[54], lentil^[30] and soybean^[26]. The BBI concentration that reduced cell viability by 50% (IC₅₀), as compared with untreated controls, ranged from 32 to

Table 2 Preclinical studies showing colorectal chemopreventive properties of Bowman-Birk inhibitor-like proteins from several legume species

Species (common name)	Model system (carcinogen)	Effect and/or mechanisms of action	Ref.
<i>Glycine max</i> (soy)	Rodent colon carcinogenesis (DMH)	Soybean BBI is effective at concentrations as low as 10 mg/100 g diet in reducing the incidence and frequency of colorectal tumors. Its ability to inhibit serine proteases is required for their chemopreventive properties. No adverse effects are observed in treated animals	[52,53]
	Mouse colorectal carcinogenesis (DMH)	Soybean BBI, when simultaneously treated with DMH, prevent the development of neoplastic lesions and protect against the onset of severe inflammatory processes	[79]
	Mouse colon inflammation (DSS)	A soybean Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with induced ulcerative colitis. Lower mortality rates and delayed onset of mortality are observed	[58]
	Colon cancer cell proliferation	The antiproliferative properties of BBI isoforms, IBBI and IBBD2, reveal that both trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in carcinogenesis should be considered as potential targets	[26]
<i>Lens culmaris</i> (lentil)	Colon cancer cell proliferation	Lentil BBI is able to inhibit the growth of HT29 colon cancer cells at concentrations as low as 19 $\mu\text{mol/L}$, in a concentration-dependent manner; by contrast, colonic fibroblast CCD-18Co cells are unaffected	[30]
<i>Pisum sativum</i> (pea)	Colon cancer cell proliferation	TIIB, a major pea protease inhibitor, affect in a dose-dependent manner the growth of HT29 colon cancer cells whereas an inactive mutant did not show any significant effect	[55]
<i>Vicia faba</i> (field bean)	Mouse stomach carcinogenesis (benzopyrene)	BBI proves to be biologically active, under acidic conditions, in suppressing benzopyrene-induced forestomach carcinogenesis in mice following oral treatment; the oncopreventive properties are related to its protease inhibitory activity	[93]

DMH: Dimethylhydrazine; DSS: Dextran sulphate sodium; BBI: Bowman-Birk inhibitor.

73 $\mu\text{mol/L}$. Neither protein affected the growth of non-malignant colonic fibroblastic CCD18-Co cells. By using reducing and alkylating agents, the inhibitory activity of soybean BBI against serine proteases was abolished; inactive BBI was unable to inhibit cell proliferation of HT29 colon cancer cells suggesting that, in order to exert anti-proliferative effect on colon cancer cells, BBI need to be in active form(s)^[26]. Nevertheless, when severe disruptive treatments are used, the native conformation of BBI is irreversibly affected, alongside significant reduction in both trypsin and chymotrypsin inhibitory activities, making the relationship between protease inhibitory activities, protein structure and health beneficial effects unclear. To answer this crucial question, a comparative study with rTI1, a major BBI from pea seeds expressed heterologously in *Pichia pastoris*, and a related synthetic mutant derivative lacking trypsin and chymotrypsin inhibitory activity was carried out^[55]. rTI1 inhibited both trypsin and chymotrypsin, with K_i values at nanomolar concentrations, whereas the mutant protein was inactive against both enzymes. The proliferation of HT29 colon adenocarcinoma cells was significantly affected by rTI1 in a dose-dependent manner; in contrast, the inactive derivative did not show any suppressive effect on cell growth. Although the molecular mechanism(s) of such anti-proliferative activity remains unknown, the reported data indicate that cellular serine proteases should be considered as BBI primary targets in early stages of colorectal carcinogenesis.

The scission of soybean BBI with cyanogen bromide followed by pepsin treatment results in two active fragments, one having trypsin inhibitory activity and the other having chymotrypsin inhibitory activity. In early studies, Yavelow *et al.*^[56] using these two active fragments concluded that the chymotrypsin inhibitory domain of soybean BBI was responsible for suppression of

radiation-induced transformation *in vitro* whereas the BBI fragment having only ability to inhibit trypsin-like proteases was ineffective. These observations led to the hypothesis that chymotrypsin-like proteases are potential therapeutic targets of BBI in clinical research; however, the enzymatically modified soybean BBI may have been impaired in the inhibition of several molecular targets compared with the native protein. Later on, it was demonstrated that a major soybean BBI isoform, IBBD2, which inhibits trypsin-like proteases only, exerts anti-proliferative effect against HT29 colon cancer cells in a dose-dependent manner^[26] (Figure 2). These studies revealed that both trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in the early stages of carcinogenesis should be considered as potential targets of BBI. No data regarding the effectiveness of BBI variants having elastase inhibitory activity^[20,21] on colon cancer cell proliferation has been reported so far.

A growing body of evidence suggests that dietary BBI may exert anti-inflammatory properties within the GIT. Soybean BBI and BBIC appears to exert a potent suppressive effect on colon and anal gland inflammation of carcinogen-treated rodents^[57], or when assessed in the dextran sulfate sodium (DSS) model of UC^[58]. Histological studies and mortality rates show that the DSS treatment induced a severe inflammatory condition in mice that was reduced in extent and severity by soybean BBIC. These preclinical studies suggest that soybean BBI might exert beneficial effects in inflammatory processes. In order to evaluate safety and efficacy of soybean BBI in patients with active UC, a randomized double-blind placebo-controlled trial was performed^[13]. A daily dose of 800 chymotrypsin inhibitor units was administered in patients receiving 12 wk of therapy. The BBIC treatment exerted a potential benefit over placebo in terms of

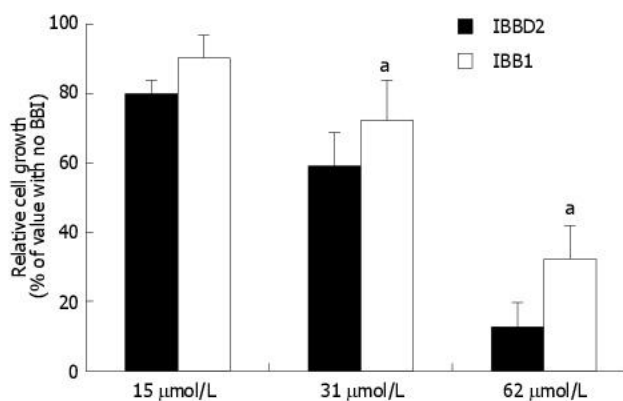


Figure 2 Effect of the major soybean isoinhibitors, IBBD2 and IBB1, on the *in vitro* growth of HT29 human colorectal adenocarcinoma cells. Growth media were supplemented with protein in the concentration range 0–62 μmol/L and cells harvested after a period of 96 h. Values are means, with standard deviations represented by vertical bars of at least three independent experiments, each having four technical replicates. ^aP < 0.05 vs IBBD2 group (Bonferroni's test)^[26].

clinical response and induction of remission in patients with active UC, as assessed by the Sutherland Disease Activity Index (an index that consist of four major criteria as follows: stool frequency, rectal bleeding, mucosal appearance, and physician rating of disease activity)^[59]. After BBIC treatment, no adverse side-effects or apparent toxicity in UC patients were observed. Approximately 50% of patients responded clinically and 36% showed remission of disease; in contrast, only 29% and 7.1% on the placebo group achieved a partial response or remission, respectively.

Although not fully understood, several mechanisms of action have been proposed to explain the anti-inflammatory properties of BBI within the GIT. Soybean BBI or BBIC has been shown to decrease the production and release of superoxide anion radicals and hydrogen peroxide, mediators of acute and chronic inflammation, in purified human polymorphonuclear leukocytes^[60] and in differentiated HL60 cells^[61]. The decrease in superoxide radical levels might reduce levels of oxidative damage to DNA, lipid peroxidation of cellular membranes and incidence of malignant transformation. Although BBI do not function as free radical-scavenging agents, they prevent the release of oxygen free radicals from cells, which would be expected to contribute to their reported anti-inflammatory properties^[62]. Serine proteases are key components of the inflammatory response, as they can trigger hypersensitivity and may cause severe proteolytic damage to the extracellular matrix^[63,64]. Dysregulation of the epithelial barrier function play a central role in either the etiology or the pathology of intestinal inflammation. Currently, there is a strong interest in identifying candidate serine proteases involved in pathogenesis and in designing selective protease inhibitors to regulate their proteolytic activities^[65]. In this sense, the use of anti-tryptase therapy on human inflammatory bowel disease and experimental colitis has been demonstrated^[65]. In intestinal lesions and faecal samples from UC patients, a significant

increase of serine protease activity when compared to healthy controls was observed^[66,67]; these proteolytic activities can be completely abolished by soybean BBI^[68].

SERINE PROTEASES AS POTENTIAL TARGETS OF BBI IN COLORECTAL CHEMOPREVENTION

The homeostatic control between proteolytic enzymes and their cognate inhibitors plays a fundamental role in a number of physiological as well as pathological processes, where their activities become dysregulated. Serine proteases are involved in crucial biological functions associated to tumor development, such as cell growth (dys)regulation, cell invasion, angiogenesis and inflammatory processes. Some of these serine proteases have been proposed as candidate cancer biomarkers^[69–71] (Table 3). An understanding of the role played by certain serine proteases in pathological processes may suggest modes of therapeutic intervention^[1,72]. In eukaryotes, the ubiquitin-proteasome pathway regulates many fundamental cellular processes such as protein quality control, cell cycle, signal transduction and DNA repair^[73]. The 20/26S proteasome complex is the most downstream element of the ubiquitin-proteasome pathway. Inhibition of proteasome activity leads to accumulation of poly-ubiquitinated and misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress, reduction in cell proliferation rates and induction of apoptosis through multiple mechanisms^[74,75]. The proteasome complex is currently considered an important intracellular target for the treatment of cancer; proteasome inhibition results in cellular homeostasis disruption and in the induction of apoptosis. Until now, only a few studies have demonstrated the use of BBIs as potential inhibitors of proteasomal activities. BBI from soybean inhibits the chymotrypsin-like proteasomal activity of MCF7 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*^[76]. The proteasomal inhibition results in the accumulation of ubiquitinated proteins and proteasome substrates, p21^{Cip1/WAF1} and p27^{Kip1}, and the consequent down-regulation of cyclin D1 and cyclin E that modulate the G1/S phase progression, suggesting that BBI might induce cell-cycle arrest. Soybean BBI decrease proteasomal function and results in up-regulation of MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), which in turn suppresses phosphorylation coupled to extracellular signal-related kinase activity in MCF7 treated cells. The inhibition of proteasomal chymotrypsin-like activity *in vivo* reveals that MCF7 cellular membranes are very permeable to soybean BBI facilitating the inhibition of intracellular target proteases. Soybean BBI has been demonstrated to be taken up by intestinal epithelia cells in a time-dependent manner, being the bulk of the internalised protease inhibitor present in the cytosol in active form^[77]. It has been also reported that soybean BBI is internalised into NIH/3T3 mouse embryo fibroblastic cells and is localized in the nucleus^[41]. More recently, confocal microscopy studies have demonstrated

Table 3 Serine proteases as potential therapeutic targets of Bowman-Birk inhibitor-like proteins in pathological processes

Serine protease	Function	Pathological processes	Evidence of interaction with BBI-like proteins
Proteasome	Control of the turn-over of regulatory proteins involved in critical cellular processes including cell cycle progression, cell development and differentiation, apoptosis, angiogenesis and signaling pathways	Cancer, inflammatory processes, autoimmune diseases and aging	Soybean BBI specifically and potently inhibits the proteasomal chymotrypsin-like activity <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> in MCF7 cancer breast cells ^[76] Mice treated simultaneously with BBI and DMH show a significant decrease in the chymotrypsin- and trypsin-like proteasomal activity in comparison with those treated with DMH only ^[79] Soybean BBI suppress proteasomal chymotrypsin-like activity in U2OS human osteosarcoma cells <i>in vitro</i> ^[80]
Matriptase	Differentiation and function of epithelial tissues	Activator of critical molecules associated with tumor invasion and metastasis	SFTI-1, a cyclic peptide from sunflower having similar features to the trypsin inhibitory binding domain of BBI, is a very potent inhibitor (Ki: 0.92 nmol/L) ^[83] BBI from soybean and lima bean have been reported to inhibit matriptase activity <i>in vitro</i> ^[86]
Chymase	Key mediator in inflammatory cell signaling pathways	Inflammatory processes, allergic reactions and pulmonary fibrosis	Soybean BBI strongly inhibits chymase from rat mast cells (Ki: 13.2 nmol/L) ^[94] Soybean BBI is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase, being not effective against human trypsin ^[88] Soybean BBI inhibits strongly cathepsin G (Ki: 1.2 nmol/L) ^[86]
Cathepsin G	Degradation of extracellular matrix components, regulates inflammatory response and promotes apoptosis	Inflammatory processes, cancer and aging	
Duodenase	Morphogenesis and tissue repair; inflammatory and mitogenic role; participation in activation cascade of digestive proteases	Inflammatory processes	Duodenase interacts specifically with the chymotrypsin inhibitory domain of soybean BBI (Ki: 4 nmol/L) ^[87]
Elastase	Degradation of extracellular matrix components	Pulmonary emphysema, cystic fibrosis, infections, inflammation and atherosclerosis	Soybean BBI inhibits hydrolysis of extracellular matrix components by leukocyte enzymes ^[95] Soybean BBI inhibit human leukocyte elastase (Ki: 2.3 nmol/L) ^[94]

BBI: Bowman-Birk inhibitor; DMH: Dimethylhydrazine; Ki: Constant of inhibition; SFTI-1: Sunflower trypsin inhibitor.

that black-eyed pea BBI crosses the membrane of breast MCF7 cancer cells, likely *via* endocytosis, and co-localizes with the proteasome in cytoplasm and mainly in nucleus, inhibiting the chymotrypsin-, trypsin- and caspase-like activities of the 20S proteasome^[76]. Further studies to determine the correct localization of BBI in colon cancer cells will be relevant in order to identify serine proteases as potential therapeutic targets. Either soybean or perennial horsegram BBIs, when administrated at a dose of 30 mg/kg during 12 wk, exerted a protective role in the development of pre-neoplastic lesions induced by intraperitoneal injections of DMH in mice; such effect seems to be associated to the inhibition of both the lysosomal and proteasome-dependent proteolytic pathways^[79]. Although soybean BBI has been demonstrated to inhibit the proteasomal activity of MCF7 breast cancer cells^[76] and U2OS osteosarcoma cells^[80], the proteasomal inhibition in colon cancer cells need to be unambiguously demonstrated. Another potential therapeutic target of BBI is matriptase (also known as MT-SP1 or epithin), an epithelial-specific member of the type II transmembrane

serine protease family, which is a key activator of multiple signaling pathways associated with cell proliferation and modification of the extracellular matrix. Matriptase is recognized as a cancer-associated trypsin-like protease, being over-expressed in malignant prostate, ovarian, uterine and colon tumors^[81,82]. This serine protease contributes to the epithelial integrity and upstream activation of cellular regulatory proteins, including urokinase-plasminogen activator, hepatocyte-growth factor/scatter factor and protease-activated receptor, being also involved in cancer invasion and metastasis^[83,84]. Although the ability of naturally-occurring protease inhibitors, including soybean BBI, lima bean trypsin inhibitor and sunflower trypsin inhibitor (SFTI-1), to inhibit a secreted form of recombinant MT-SP1 has been demonstrated^[85,86], the clinical relevance of such inhibition has not been yet elucidated.

Serine proteases are extensively involved in immunological responses and pro-inflammatory actions; therefore, there is a growing interest towards determining the therapeutic potential of serine protease inhibitors in treatment of inflammatory diseases by modifying vari-

ous inflammatory pathways^[4]. The inhibition of serine proteases involved in inflammatory processes, such as cathepsin G^[87,88], elastase and mast cell chymase^[89] by soybean BBI has been reported (Table 3). Secreted chymases promote inflammation^[90], matrix destruction, tissue remodelling as well as the regulation of collagenase^[91] and interleukin 1 β (IL-1 β)^[92]. Nevertheless, a clinical correlation between the inhibition of these serine proteases and the anti-inflammatory properties associated with soybean BBI and homologous proteins is still far of being elucidated.

CONCLUSION

In vitro and *in vivo* studies have demonstrated that soybean BBI and homologous proteins can exert a protective and/or suppressive effect on cancer development and inflammatory processes within the GIT; so far, the therapeutic targets and the action mechanism of BBI as colorectal chemopreventive agents remain unknown. Recent investigations suggest that cellular serine proteases should be considered as potential targets of BBI in further investigations of their chemopreventive properties. The validation of serine proteases as clinical targets together with the identification and elucidation of the molecular basis for variation in the biological activity of natural BBI variants and/or design of selective potent inhibitors against their putative protease targets will contribute to the assessment of BBI as colorectal chemopreventive agents for preventive and/or therapeutic medicine^[39].

REFERENCES

- 1 Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 785-799 [PMID: 16955069 DOI: 10.1038/nrd2092]
- 2 Soreide K, Janssen EA, Körner H, Baak JP. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J Pathol* 2006; **209**: 147-156 [PMID: 16691544 DOI: 10.1002/path.1999]
- 3 Sharony R, Yu PJ, Park J, Galloway AC, Mignatti P, Pintucci G. Protein targets of inflammatory serine proteases and cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond)* 2010; **7**: 45 [PMID: 20804552 DOI: 10.1186/1476-9255-7-45]
- 4 Safavi F, Rostami A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Exp Mol Pathol* 2012; **93**: 428-433 [PMID: 23022357 DOI: 10.1016/j.yexmp.2012.09.014]
- 5 Deu E, Verdoes M, Bogoy M. New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nat Struct Mol Biol* 2012; **19**: 9-16 [PMID: 22218294 DOI: 10.1038/nsmb.2203]
- 6 Clemente A, Domoney C. Therapeutic properties of legume protease inhibitors from the Bowman birk class. In: Govil JN, Singh VK, Sharma RK, editors. *Recent Progress in Medicinal Plants*. Houston: Studium Press, 2007: 345-365
- 7 Oliva ML, Ferreira Rda S, Ferreira JG, de Paula CA, Salas CE, Sampaio MU. Structural and functional properties of Kunitz proteinase inhibitors from Leguminosae: a mini review. *Curr Protein Pept Sci* 2011; **12**: 348-357 [PMID: 21418019 DOI: 10.2174/138920311796391061]
- 8 Malkowicz SB, McKenna WG, Vaughn DJ, Wan XS, Propert

- KJ, Rockwell K, Marks SH, Wein AJ, Kennedy AR. Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 2001; **48**: 16-28 [PMID: 11391683 DOI: 10.1002/pros.1077]
- 9 Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Atiba J, McLaren CE, Meyskens FL. Single-dose administration of Bowman-Birk inhibitor concentrate in patients with oral leukoplakia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; **9**: 43-47 [PMID: 10667462]
- 10 Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QA, Jensen J, Thompson W, Lagerberg W, Meyskens FL. Clinical modulation of oral leukoplakia and protease activity by Bowman-Birk inhibitor concentrate in a phase IIa chemoprevention trial. *Clm Cancer Res* 2000; **6**: 4684-4691 [PMID: 11156220]
- 11 Meyskens FL, Taylor T, Armstrong W, Kong L, Gu M, Gonzalez R, Villa M, Wong V, Garcia A, Perloff M, Kennedy A, Wan S, Ware JH, Messadi D, Lorch J, Wirth L, Jaffe Z, Goodwin J, Civantos F, Sullivan M, Reid M, Merciznu M, Jayaprakash V, Kerr AR, Le A. Phase IIb randomized clinical chemoprevention trial of a soybean-derived compound (Bowman-Birk inhibitor concentrate) for oral leukoplakia. *Cancer Prev Res* 2010; **3**: CN02-05 [DOI: 10.1158/1940-6207.PREV-10-CN02-05]
- 12 Armstrong WB, Taylor TH, Kennedy AR, Melrose RJ, Messadi DV, Gu M, Le AD, Perloff M, Civantos F, Goodwin WJ, Wirth LJ, Kerr AR, Meyskens FL. Bowman birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: a randomized phase IIb trial. *Cancer Prev Res (Phila)* 2013; **6**: 410-418 [PMID: 23639862 DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-13-0004]
- 13 Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, Ware JH. Bowman-Birk inhibitor concentrate: a novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2008; **53**: 175-180 [PMID: 17551835 DOI: 10.1007/s10620-007-9840-2]
- 14 Clemente A, Marín-Manzano MC, Arques MC, Domoney C. Bowman-Birk inhibitors from legumes: utilisation in disease prevention and therapy. In: Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, editors. *Bioactive food peptides in health and disease*. Rijeka (Croatia): InTech-Open Access Publisher, 2013: 23-44
- 15 Chen P, Rose J, Love R, Wei CH, Wang BC. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *J Biol Chem* 1992; **267**: 1990-1994 [PMID: 1730730]
- 16 Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 1992; **204**: 433-451 [PMID: 1541261 DOI: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb16654.x]
- 17 Li de la Sierra I, Quillien L, Flecker P, Gueguen J, Brunie S. Dimeric crystal structure of a Bowman-Birk protease inhibitor from pea seeds. *J Mol Biol* 1999; **285**: 1195-1207 [PMID: 9887273 DOI: 10.1006/jmbi.1998.2351]
- 18 Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. 1967. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; **425**: 497-502 [PMID: 22925665 DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.08.015]
- 19 Koepke J, Ermler U, Warkentin E, Wenzl G, Flecker P. Crystal structure of cancer chemopreventive Bowman-Birk inhibitor in ternary complex with bovine trypsin at 2.3 Å resolution. Structural basis of Janus-faced serine protease inhibitor specificity. *J Mol Biol* 2000; **298**: 477-491 [PMID: 10772864 DOI: 10.1006/jmbi.2000.3677]
- 20 Deshimaru M, Hanamoto R, Kusano C, Yoshimi S, Terada S. Purification and characterization of proteinase inhibitors from wild soja (Glycine soja) seeds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; **66**: 1897-1903 [PMID: 12400689 DOI: 10.1271/bbb.66.1897]
- 21 De Paola D, Blanco E, Pierri CL, Sonnante G. Isolation and characterization of novel variants of BBI coding genes from the legume *Lathyrus sativus*. *Plant Physiol Biochem* 2012; **57**: 45-53 [PMID: 22677449 DOI: 10.1016/j.plaphy.2012.05.001]
- 22 Perona JJ, Craik CS. Structural basis of substrate specificity

- in the serine proteases. *Protein Sci* 1995; **4**: 337-360 [PMID: 7795518 DOI: 10.1002/pro.5560040301]
- 23 Lu W, Apostol I, Qasim MA, Warne N, Wynn R, Zhang WL, Anderson S, Chiang YW, Ogin E, Rothberg I, Ryan K, Laszkowski M. Binding of amino acid side-chains to S1 cavities of serine proteinases. *J Mol Biol* 1997; **266**: 441-461 [PMID: 9047374 DOI: 10.1006/jmbi.1996.0781]
 - 24 Gariani T, Leatherbarrow RJ. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. *J Pept Res* 1997; **49**: 467-475 [PMID: 9266473 DOI: 10.1111/j.1399-3011.1997.tb01153.x]
 - 25 Gariani T, McBride JD, Leatherbarrow RJ. The role of the P2' position of Bowman-Birk proteinase inhibitor in the inhibition of trypsin. Studies on P2' variation in cyclic peptides encompassing the reactive site loop. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1431**: 232-237 [PMID: 10209295 DOI: 10.1016/S0167-4838(99)00035-7]
 - 26 Clemente A, Moreno FJ, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Domoney C. The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean (*Glycine max*) on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Mol Nutr Food Res* 2010; **54**: 396-405 [PMID: 19885848 DOI: 10.1002/mnfr.200900122]
 - 27 Ferrasson E, Quillien L, Gueguen J. Proteinase inhibitors from pea seeds: purification and characterization. *J Agric Food Chem* 1997; **45**: 127-131 [DOI: 10.1021/jf9603442]
 - 28 Clemente A, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Domoney C. The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein Expr Purif* 2004; **36**: 106-114 [PMID: 15177291 DOI: 10.1016/j.pep.2004.03.015]
 - 29 Ragg EM, Galbusera V, Scarafoni A, Negri A, Tedeschi G, Consonni A, Sessa F, Duranti M. Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman-Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. *FEBS J* 2006; **273**: 4024-4039 [PMID: 16889634 DOI: 10.1111/j.1742-4658.2006.05406.x]
 - 30 Caccialupi P, Ceci LR, Siciliano RA, Pignone D, Clemente A, Sonnante G. Bowman-Birk inhibitors in lentil: heterologous expression, functional characterization and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. *Food Chem* 2010; **120**: 1058-1066 [DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.051]
 - 31 Scarafoni A, Consonni A, Galbusera V, Negri A, Tedeschi G, Rasmussen P, Magni C, Duranti M. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochemistry* 2008; **69**: 1820-1825 [PMID: 18474386 DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.03.023]
 - 32 Domoney C, Welham T, Ellis N, Mozzanega P, Turner L. Three classes of proteinase inhibitor gene have distinct but overlapping patterns of expression in *Pisum sativum* plants. *Plant Mol Biol* 2002; **48**: 319-329 [PMID: 11855733 DOI: 10.1023/A:1013379430582]
 - 33 Clemente A, Domoney C. Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Curr Protein Pept Sci* 2006; **7**: 201-216 [PMID: 16787260 DOI: 10.2174/138920306777452349]
 - 34 Quillien L, Ferrasson E, Molle D, Gueguen J. Trypsin inhibitor polymorphism: multigene family expression and post-translational modification. *J Protein Chem* 1997; **16**: 195-203 [PMID: 9155090 DOI: 10.1023/A:1026326808553]
 - 35 Ramasarma PR, Rao AG, Rao DR. Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochim Biophys Acta* 1995; **1248**: 35-42 [PMID: 7711055 DOI: 10.1016/0167-4838(95)00004-E]
 - 36 Singh RR, Appu Rao AG. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for "hyperreactive" disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1597**: 280-291 [PMID: 12044906 DOI: 10.1016/S0167-4838(02)00301-1]
 - 37 Philipp S, Kim YM, Dürr I, Wenzl G, Vogt M, Flecker P. Mutational analysis of disulfide bonds in the trypsin-reactive subdomain of a Bowman-Birk-type inhibitor of trypsin and chymotrypsin—cooperative versus autonomous refolding of subdomains. *Eur J Biochem* 1998; **251**: 854-862 [PMID: 9490061 DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510854.x]
 - 38 Kumar V, Gowda LR. The contribution of two disulfide bonds in the trypsin binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Arch Biochem Biophys* 2013; **537**: 49-61 [PMID: 23791628 DOI: 10.1016/j.abb.2013.06.002]
 - 39 Clemente A, Sonnante G, Domoney C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Curr Protein Pept Sci* 2011; **12**: 358-373 [PMID: 21418025 DOI: 10.2174/138920311796391133]
 - 40 Muricken DG, Gowda LR. Functional expression of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor and its self-association. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1804**: 1413-1423 [PMID: 20227530 DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.02.012]
 - 41 Park JH, Jeong HJ, Lumen BO. In vitro digestibility of the cancer-preventive soy peptides lunasin and BBI. *J Agric Food Chem* 2007; **55**: 10703-10706 [PMID: 18038984 DOI: 10.1021/jf072107c]
 - 42 Weder JK. Inhibition of human proteinases by grain legumes. *Adv Exp Med Biol* 1986; **199**: 239-279 [PMID: 3799279 DOI: 10.1007/978-1-4757-0022-0_16]
 - 43 Trivedi MV, Laurence JS, Siahhan TJ. The role of thiols and disulfides on protein stability. *Curr Protein Pept Sci* 2009; **10**: 614-625 [PMID: 19538140 DOI: 10.2174/138920309789630534]
 - 44 Bateman KS, James MN. Plant protein protease inhibitors: structure and mechanism of inhibition. *Curr Protein Pept Sci* 2011; **12**: 340-347 [PMID: 21418022 DOI: 10.2174/138920311796391124]
 - 45 Hajós G, Gelencsér E, Pusztai A, Grant G, Sakhri M, Bardocz S. Biological effects and survival of trypsin inhibitors and the agglutinin from soybean in the small intestine of the rat. *J Agric Food Chem* 1995; **43**: 165-170 [DOI: 10.1021/jf00049a030]
 - 46 Pusztai A, Grant G, Brown DJ, Stewart JC, Bardocz S, Ewen SW, Gatehouse AM, Hilder V. Nutritional evaluation of the trypsin (EC 3.4.21.4) inhibitor from cowpea (*Vigna unguiculata* Walp.). *Br J Nutr* 1992; **68**: 783-791 [PMID: 1493140]
 - 47 Clemente A, Jiménez E, Marín-Manzano MC, Rubio LA. Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *J Sci Food Agric* 2008; **88**: 523-531 [DOI: 10.1002/jsfa.3115]
 - 48 Marín-Manzano MC, Ruiz R, Jiménez E, Rubio LA, Clemente A. Anti-carcinogenic soybean Bowman-Birk inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition in vitro. *Br J Nutr* 2009; **101**: 967-971 [PMID: 19353764 DOI: 10.1017/S0007114508057590]
 - 49 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; **61**: 69-90 [PMID: 21296855 DOI: 10.3322/caac.20107]
 - 50 Aune D, De Stefani E, Ronco A, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Acosta G, Mendilaharsu M. Legume intake and the risk of cancer: a multisite case-control study in Uruguay. *Cancer Causes Control* 2009; **20**: 1605-1615 [PMID: 19653110 DOI: 10.1007/s10552-009-9406-z]
 - 51 Wang Y, Wang Z, Fu L, Chen Y, Fang J. Legume consumption and colorectal adenoma risk: a meta-analysis of observational studies. *PLoS One* 2013; **8**: e67335 [PMID: 23826270 DOI: 10.1371/journal.pone.0067335]
 - 52 Kennedy AR, Billings PC, Wan XS, Newberne PM. Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* 2002; **43**: 174-186 [PMID: 12588698 DOI: 10.1207/S15327914NC432_8]
 - 53 St Clair WH, Billings PC, Carew JA, Keller-McGandy C, Newberne P, Kennedy AR. Suppression of dimethylhydra-

- zine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Res* 1990; **50**: 580-586 [PMID: 2297699]
- 54 **Clemente A**, Gee JM, Johnson IT, Mackenzie DA, Domoney C. Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2005; **53**: 8979-8986 [PMID: 16277391 DOI: 10.1021/jf051528w]
- 55 **Clemente A**, Carmen Marín-Manzano M, Jiménez E, Carmen Arques M, Domoney C. The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *Br J Nutr* 2012; **108** Suppl 1: S135-S144 [PMID: 22916809 DOI: 10.1017/S000711451200075X]
- 56 **Yavelow J**, Collins M, Birk Y, Troll W, Kennedy AR. Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress x-ray-induced transformation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; **82**: 5395-5399 [PMID: 3860869 DOI: 10.1073/pnas.82.16.5395]
- 57 **Billings PC**, Newberne PM, Kennedy AR. Protease inhibitor suppression of colon and anal gland carcinogenesis induced by dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 1990; **11**: 1083-1086 [PMID: 2372868 DOI: 10.1093/carcin/11.7.1083]
- 58 **Ware JH**, Wan XS, Newberne P, Kennedy AR. Bowman-Birk inhibitor concentrate reduces colon inflammation in mice with dextran sulfate sodium-induced ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 1999; **44**: 986-990 [PMID: 10235608 DOI: 10.1023/A:1026616832119]
- 59 **Sutherland LR**, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuk E, Borgen L. 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* 1987; **92**: 1894-1898 [PMID: 3569765]
- 60 **Frenkel K**, Chrzan K, Ryan CA, Wiesner R, Troll W. Chymotrypsin-specific protease inhibitors decrease H2O2 formation by activated human polymorphonuclear leukocytes. *Carcinogenesis* 1987; **8**: 1207-1212 [PMID: 3621459 DOI: 10.1093/carcin/8.9.1207]
- 61 **Ware JH**, Wan XS, Kennedy AR. Bowman-Birk inhibitor suppresses production of superoxide anion radicals in differentiated HL-60 cells. *Nutr Cancer* 1999; **33**: 174-177 [PMID: 10368813 DOI: 10.1207/S15327914NC330209]
- 62 **Baturay NZ**, Roque H. In vitro reduction of peroxidation in UVC-irradiated cell cultures by concurrent exposure with Bowman-Birk protease inhibitor. *Teratog Carcinog Mutagen* 1991; **11**: 195-202 [PMID: 1685807 DOI: 10.1002/tcm.1770110404]
- 63 **Shimoda N**, Fukazawa N, Nononura K, Fairchild RL. Cathepsin G is required for sustained inflammation and tissue injury after reperfusion of ischemic kidneys. *Am J Pathol* 2007; **170**: 930-940 [PMID: 17322378 DOI: 10.2353/ajpath.2007.060486]
- 64 **Annaházi A**, Gecse K, Dabek M, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Róka R, Molnár T, Theodorou V, Wittmann T, Bueno L, Eutamene H. Fecal proteases from diarrheic-IBS and ulcerative colitis patients exert opposite effect on visceral sensitivity in mice. *Pain* 2009; **144**: 209-217 [PMID: 19450926 DOI: 10.1016/j.pain.2009.04.017]
- 65 **Yoshida N**, Isozaki Y, Takagi T, Takenaka S, Uchikawa R, Arizono N, Yoshikawa T, Okanoue T. Anti-tryptase therapy in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther Symp Ser* 2006; **2**: 249-255 [DOI: 10.1111/j.1365-2036.2006.00053.x]
- 66 **Róka R**, Rosztóczy A, Leveque M, Izbéki F, Nagy F, Molnár T, Lonovics J, Garcia-Villar R, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L. A pilot study of fecal serine-protease activity: a pathophysiologic factor in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; **5**: 550-555 [PMID: 17336590 DOI: 10.1016/j.cgh.2006.12.004]
- 67 **Gecse K**, Róka R, Ferrier L, Leveque M, Eutamene H, Cartier C, Ait-Belgnaoui A, Rosztóczy A, Izbéki F, Fioramonti J, Wittmann T, Bueno L. Increased faecal serine protease activity in diarrhoeic IBS patients: a colonic luminal factor impairing colonic permeability and sensitivity. *Gut* 2008; **57**: 591-599 [PMID: 18194983 DOI: 10.1136/gut.2007.140210]
- 68 **Hawkins JV**, Emmel EL, Feuer JJ, Nedelman MA, Harvey CJ, Klein HJ, Rozmiarek H, Kennedy AR, Lichtenstein GR, Billings PC. Protease activity in a hapten-induced model of ulcerative colitis in rats. *Dig Dis Sci* 1997; **42**: 1969-1980 [PMID: 9331164 DOI: 10.1023/A:1018887832465]
- 69 **Weldon S**, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, Wartelle J, Belaouaj A, Levine RL, Taggart CC. Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the *Pseudomonas*-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation. *J Immunol* 2009; **183**: 8148-8156 [PMID: 20007580 DOI: 10.4049/jimmunol.0901716]
- 70 **Inoue Y**, Yokobori T, Yokoe T, Toyama Y, Miki C, Mimori K, Mori M, Kusunoki M. Clinical significance of human kallikrein7 gene expression in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2010; **17**: 3037-3042 [PMID: 20544292 DOI: 10.1245/s10434-010-1132-y]
- 71 **Petraki C**, Dubinski W, Scorilas A, Saleh C, Pasic MD, Kombozoz V, Khalil B, Gabril MY, Streutker C, Diamandis EP, Yousef GM. Evaluation and prognostic significance of human tissue kallikrein-related peptidase 6 (KLK6) in colorectal cancer. *Pathol Res Pract* 2012; **208**: 104-108 [PMID: 22285222 DOI: 10.1016/j.prp.2011.12.010]
- 72 **Scott CJ**, Taggart CC. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents. *Biochimie* 2010; **92**: 1681-1688 [PMID: 20346385 DOI: 10.1016/j.biochi.2010.03.010]
- 73 **Latonen L**, Moore HM, Bai B, Jäämaa S, Laiho M. Proteasome inhibitors induce nucleolar aggregation of proteasome target proteins and polyadenylated RNA by altering ubiquitin availability. *Oncogene* 2011; **30**: 790-805 [PMID: 20956947 DOI: 10.1038/onc.2010.469]
- 74 **Kisselev AF**, Callard A, Goldberg AL. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J Biol Chem* 2006; **281**: 8582-8590 [PMID: 16455650 DOI: 10.1074/jbc.M509043200]
- 75 **Wu WK**, Cho CH, Lee CW, Wu K, Fan D, Yu J, Sung JJ. Proteasome inhibition: a new therapeutic strategy to cancer treatment. *Cancer Lett* 2010; **293**: 15-22 [PMID: 20133049 DOI: 10.1016/j.canlet.2009.12.002]
- 76 **Chen YW**, Huang SC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis* 2005; **26**: 1296-1306 [PMID: 15746161 DOI: 10.1093/carcin/bgi062]
- 77 **Billings PC**, Brandon DL, Habres JM. Internalisation of the Bowman-Birk protease inhibitor by intestinal epithelial cells. *Eur J Cancer* 1991; **27**: 903-908 [PMID: 1834126 DOI: 10.1016/0277-5379(91)90144-3]
- 78 **Souza Lda C**, Camargo R, Demasi M, Santana JM, de Sá CM, de Freitas SM. Effects of an anticarcinogenic Bowman-Birk protease inhibitor on purified 20S proteasome and MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2014; **9**: e86600 [PMID: 24475156 DOI: 10.1371/journal.pone.0086600]
- 79 **de Paula Carli A**, de Abreu Vieira PM, Silva KT, de Sá Cota RG, Carneiro CM, Castro-Borges W, de Andrade MH. Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectal pre neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice. *Food Chem Toxicol* 2012; **50**: 1405-1412 [PMID: 22326805 DOI: 10.1016/j.fct.2012.01.036]
- 80 **Saito T**, Sato H, Virgona N, Hagiwara H, Kashiwagi K, Suzuki K, Asano R, Yano T. Negative growth control of osteosarcoma cell by Bowman-Birk protease inhibitor from soybean; involvement of connexin 43. *Cancer Lett* 2007; **253**: 249-257 [PMID: 17343982 DOI: 10.1016/j.canlet.2007.01.021]
- 81 **Bhatt AS**, Takeuchi T, Ylstra B, Ginzinger D, Albertson D, Shuman MA, Craik CS. Quantitation of membrane type serine protease 1 (MT-SP1) in transformed and normal cells. *Biol Chem* 2003; **384**: 257-266 [PMID: 12675519 DOI: 10.1515/

- BC.2003.029]
- 82 **Bugge TH**, Antalis TM, Wu Q. Type II transmembrane serine proteases. *J Biol Chem* 2009; **284**: 23177-23181 [PMID: 19487698 DOI: 10.1074/jbc.R109.021006]
- 83 **Lee SL**, Dickson RB, Lin CY. Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36720-36725 [PMID: 10962009 DOI: 10.1074/jbc.M007802200]
- 84 **List K**, Kosa P, Szabo R, Bey AL, Wang CB, Molinolo A, Bugge TH. Epithelial integrity is maintained by a matriptase-dependent proteolytic pathway. *Am J Pathol* 2009; **175**: 1453-1463 [PMID: 19717635 DOI: 10.2353/ajpath.2009.090240]
- 85 **Long YQ**, Lee SL, Lin CY, Enyedy IJ, Wang S, Li P, Dickson RB, Roller PP. Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; **11**: 2515-2519 [PMID: 11549459 DOI: 10.1016/S0960-894X(01)00493-0]
- 86 **Yamasaki Y**, Satomi S, Murai N, Tsuzuki S, Fushiki T. Inhibition of membrane-type serine protease 1/matriptase by natural and synthetic protease inhibitors. *J Nutr Sci Vita-minol (Tokyo)* 2003; **49**: 27-32 [PMID: 12882393]
- 87 **Larionova NI**, Gladysheva IP, Tikhonova TV, Kazanskaia NF. [Inhibition of cathepsin G and elastase from human granulocytes by multiple forms of the Bowman-Birk type of soy inhibitor]. *Biokhimiia* 1993; **58**: 1437-1444 [PMID: 8218567]
- 88 **Gladysheva IP**, Zamolodchikova TS, Sokolova EA, Larionova NI. Interaction between duodenase, a proteinase with dual specificity, and soybean inhibitors of Bowman-Birk and Kunitz type. *Biochemistry (Mosc)* 1999; **64**: 1244-1249 [PMID: 10611528 DOI: 10.1023/A:1010267500296]
- 89 **Ware JH**, Wan XS, Rubin H, Schechter NM, Kennedy AR. Soybean Bowman-Birk protease inhibitor is a highly effective inhibitor of human mast cell chymase. *Arch Biochem Biophys* 1997; **344**: 133-138 [PMID: 9244390 DOI: 10.1006/abbi.1997.0182]
- 90 **Tani K**, Ogushi F, Kido H, Kawano T, Kunori Y, Kamimura T, Cui P, Sone S. Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 585-589 [PMID: 10770293]
- 91 **Saarinen J**, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem* 1994; **269**: 18134-18140 [PMID: 8027075]
- 92 **Mizutani H**, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *J Exp Med* 1991; **174**: 821-825 [PMID: 1919436]
- 93 **Fernandes AO**, Banerji AP. Inhibition of benzopyrene-induced forestomach tumors by field bean protease inhibitor(s). *Carcinogenesis* 1995; **16**: 1843-1846 [PMID: 7634412 DOI: 10.1093/carcin/16.8.1843]
- 94 **Fukusen N**, Kato Y, Kido H, Katunuma N. Kinetic studies on the inhibitions of mast cell chymase by natural serine protease inhibitors: indications for potential biological functions of these inhibitors. *Biochem Med Metab Biol* 1987; **38**: 165-169 [PMID: 3479119 DOI: 10.1016/0885-4505(87)90076-4]
- 95 **Tikhonova TV**, Gladysheva IP, Larionova NI. Retardation by the soybean Bowman-Birk inhibitor of elastin hydrolysis catalyzed by leukocyte proteinases. *FEBS Lett* 1995; **362**: 225-228 [PMID: 7720877 DOI: 10.1016/0014-5793(95)00202-K]
- 96 **Larionova NI**, Gladysheva IP, Gladyshev DP. Human leukocyte elastase inhibition by Bowman-Birk soybean inhibitor. Discrimination of the inhibition mechanisms. *FEBS Lett* 1997; **404**: 245-248 [PMID: 9119072 DOI: 10.1016/S0014-5793(97)00089-6]

P- Reviewer: Chen JL, Serafino A S- Editor: Gou SX
L- Editor: A E- Editor: Ma S





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**

8226 Regency Drive, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-223-8242

Fax: +1-925-223-8243

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

Help Desk: <http://www.wjgnet.com/esps/helpdesk.aspx>

<http://www.wjgnet.com>



ISSN 10 07 - 9 327



Internalization of the anti-carcinogenic IBB1, a major Bowman-Birk isoinhibitor from soybean (*Glycine max*), in HT29 colon cancer cells

Marta Soria¹, Patricia Porras², Francisco J. Moya³, Nerea Sánchez⁴, Belén Rodríguez⁵, María L. Ruiz⁵, Juan de Dios Alché⁶, María del Carmen Arques⁶, Antonio J. Castro⁷ and Alfonso Clemente^{6*}

¹CPD Lux Mundi. Calle de Durán, 18199 Cájar, Granada, Spain

²CPD Sagrado Corazón. Paseo de los Basílios 3, 18008 Granada, Spain

³IES Fray Luis de Granada. Calle Huerta del Rasillo s/n, 18004 Granada, Spain

⁴IES La Zafra. Calle Vicente Aleixandre 6, 18600 Motril, Granada, Spain

⁵IES ACCI. Avenida Buenos Aires 68, 18500 Guadix, Granada, Spain

⁶Department of Biochemistry and Physiology of Animal Nutrition and ⁷Department of Biochemistry and Molecular and Cellular Biology of Plants; Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

*Corresponding author: **e-mail:** alfonso.clemente@eez.csic.es

HIGHLIGHTS

- IBB1, a major serine protease isoinhibitor of the Bowman-Birk family from soybean, exerts an anti-proliferative effect on HT29 colon cancer cells in a dose-dependent manner.
- IBB1 crosses the membrane of HT29 colon cancer cells over a time-course of 1 h, being localized in cytoplasm.

SUMMARY

Protease inhibitors of the Bowman-Birk type, a major protease inhibitor family in legume seeds, which inhibit potently trypsin- and chymotrypsin-like proteases, are currently being investigated as colorectal chemopreventive agents. Although the therapeutic target/s and the action mechanism/s of Bowman-Birk inhibitors (BBI) have not yet been elucidated, the emerging evidence suggests that BBI exert their chemopreventive properties *via* protease inhibition; in this sense, serine proteases should be considered as primary targets in early stages of carcinogenesis. In this work, we have demonstrated that IBB1, a major protease inhibitor of the Bowman-Birk family in soybean (*Glycine max*), exerts anti-proliferative effect in human colorectal HT29 cancer cells at concentrations higher than 15 μ M, in a dose dependent manner. By using confocal microscopy, we have demonstrated that IBB1 is taken up by HT29 colon cancer cells in a time-dependent manner, being the bulk of the internalized protease inhibitor localized in the cytoplasm where might interact with their potential therapeutic target/s.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the major causes of cancer-related mortality worldwide, with over 1.2 million new cases diagnosed globally per year [1]. In recent years, substantial evidence has pointed to the link between dietary patterns and lifestyle in primary prevention and control of CRC. Within this framework, there is a growing interest in naturally-occurring serine proteases of the Bowman-Birk family due to their potential chemopreventive and/or therapeutic properties which can impact positively in pathological disorders, including cancer, muscle atrophy and neurodegenerative diseases [2]. In particular, several studies suggest that

dietary BBI from different legume sources are effective at preventing or suppressing radiation- and chemical carcinogen-induced transformation *in vitro*, as well as carcinogenic and associated inflammatory disorders within the mammalian gastrointestinal tract [3, 4]. Soybean BBI exerted a protective role in dimethylhydrazine (DMH)-treated rodents when ingested at low concentrations (10 mg/100g diet), decreasing the frequency and incidence rates of colorectal tumours [5]. In patients with active ulcerative colitis, intake of BBIC -a protein extract of soybean enriched in BBI- was associated with a clinical response and induction of disease remission, as assessed by the Sutherland Disease Activity Index [6]. By using colon cancer cells as models, we are currently investigating the action mechanism/s by which BBI might exert a chemoprotective effect in early stages of colorectal carcinogenesis. A significant concentration- and time-dependent decrease in the proliferation of colon cancer cells, following treatment with BBI from several legume sources, including pea (*Pisum sativum*) [7], lentil (*Lens culinaris*) [8] and soybean [9] has been reported; neither BBI affected the growth of non-malignant colonic fibroblastic CCD18-Co cells. We demonstrated that such suppressive effect on growth of colon cancer cells was related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases [10]. In order to gain insight about the action mechanism of BBI as colorectal chemopreventive agents, the aim of this study was to determine if IBB1, a major protease isoinhibitor from soybean, is internalized by HT29 colorectal adenocarcinoma cells facilitating the inhibition of intracellular target proteases.

MATERIALS AND METHODS

Materials

BBI from soybean, trypsin (type III) from bovine pancreas, N- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), neutral red (NR) and additional high-grade chemicals for cell culture were obtained from Sigma. The Cy5 fluorochrome was purchased from GE Healthcare. The human colorectal adenocarcinoma HT29 cell line was supplied by the Cell Bank of the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada (CIC-UGR). Culture flasks and flat bottom ninety-six-well microtitre plates were purchased from Corning Costar and Nunc, respectively. All other chemicals were of analytical grade.

Isolation of soybean BBI isoinhibitors

IBB1, a major BBI isoinhibitor from soybean, was purified from commercial soybean BBI consisting in a mixture of IBB1 and IBBD2 [9]. The mixture was fractionated on a MonoS 5/50 GL cation exchange column (GE Healthcare), connected to an AKTA FPLC system (GE Healthcare), using a linear gradient of 0-0.22 M NaCl in 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.4, at a flow rate of 1 ml/min. The elution was monitored at 280 nm and 0.5 ml fractions were collected. Measurements of trypsin inhibitory activity (TIA) of eluted samples were carried out in flat-bottom microtitre plates by using BAPNA as specific substrate, and assay products measured at OD_{405nm} as previously described [11]. The unbound sample, containing both trypsin and chymotrypsin inhibitory activity –measured by using BTEE as specific substrate [12]-, was dialysed extensively against distilled water and freeze-dried until use.

Identification of IBB1 by peptide mass fingerprinting

The unbound freeze-dried sample (10 μ g) was dissolved in NuPAGE[®] lithium dodecyl sulphate sample buffer (Invitrogen) and separated by electrophoresis on Novex 12% Bis-Tris pre-cast gels using NuPAGE[®] 2-N-morpholine-ethane sulphonic acid (NuPAGE, MES, Invitrogen) as running buffer. Immediately before use, the sample was reduced with dithiothreitol (DTT) and NuPAGE antioxidant added to the upper buffer chamber to prevent reduced proteins from re-oxidation during electrophoresis. The electrophoretic band was excised from Colloidal Blue

(Invitrogen)-stained gels and subjected to in-gel trypsin digestion. Peptide fragments from digested proteins were desalted and concentrated using C-18 ZipTip columns (Millipore) and then directly loaded onto the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) plate, using α -cyanohydroxycinnamic acid as the matrix for MALDI-MS analysis. MS spectra were obtained automatically in a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) operating in reflectron mode with delayed extraction. Peptide mass data were used for protein identification against the MS protein sequence database (www.matrixscience.com).

Fluorescent covalent labeling of IBB1 protein

IBB1 was covalently labeled with the Cy5 fluorochrome using the minimal labeling protocol according to manufacturer's instructions. This method ensures that only a single lysine residue per protein molecule is labeled, avoiding a major effect on its protease inhibitory activity. Briefly, 200 μ g of freeze-dried IBB1 was dissolved in 200 μ l of lysis buffer (30 mM Tris-HCl, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, pH 8.5), and mixed with 1,600 pmol of dye and leave on ice for 30 min in the dark. The reaction was stopped by adding 4 μ l of 10 mM lysine followed by incubation for 10 min at 4 °C on the dark. Samples were then centrifuged through an Amicon® Ultra-0.5 3K device (Millipore) at 14,000g for 30 min. The concentrated Cy5-labeled IBB1 protein (~50 μ l) was diluted in ultrapure H₂O to a final volume of 500 μ l and then centrifuged again as above. This step was repeated three times and the final retentate was transferred to a microcentrifuge tube and stored at -80 °C in the dark until use. To check the quality of labeling, 1 μ g of Cy5-labeled IBB1 protein was electrophoresed by SDS-PAGE according to standard procedures and visualized in a Pharos Molecular Imager (Bio-Rad) by exciting at 635 nm. The specificity of the fluorescence signal was confirmed by scanning the same gel at 532 nm.

Western blotting

A polyclonal Ab was generated by immunizing a healthy rabbit using purified IBB1 as antigen. The immunization and antiserum collection was carried out by Biomedal SL. The polyclonal anti-IBB1 Ab was affinity-purified by using a protein-A column (BioRad) following standard protocols. In order to evaluate its specificity, equal amounts of IBB1, IBB2 and Kunitz inhibitor from soybean were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to a PVDF membrane using a Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (BioRad). When the transfer was completed, the nonspecific binding sites were blocked by immersing the membrane in 1% (w/v) BSA in Tris-buffered saline (TBS), 0.3% (v/v) Tween 20 (TBST) at 4 °C for 2 h. The membrane was washed with TBST and then incubated using the rabbit polyclonal anti-IBB1 Ab (diluted 1:1000) at 4 °C overnight. After three washes with TBST, the membrane was incubated with a secondary goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated Ab (diluted 1:2500) for 2 h at 4 °C in the dark. The image was visualized in a Pharos Molecular Imager (Bio-Rad).

Cell viability assays

Human colorectal adenocarcinoma HT29 cells were maintained by serial passage in 75 cm² plastic culture flasks. HT29 cells were cultured in DMEM, supplemented with 5% (v/v) fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Sigma), all at final concentration. Optimal assay conditions for colonic cells were reported previously [7]. Briefly, ninety-six-well microtitre plates were inoculated at a density of 2,000 HT29 cells *per* well in 200 μ l of growth media. Plates were incubated under 5% CO₂ in humidified air for 24 h to allow the cells to adhere to the wells. Purified IBB1 was dissolved in growth media at a range of concentrations (15-93 μ M) and added to the cells under sterile conditions. Control cells received no IBB1. At the end of the growth period (96 h), the viability of HT29 cells was assessed by the NR (3-amino-7-dimethylamino-2-methyl-phenazine hydrochloride) cytotoxicity assay, based on the ability of viable uninjured cells to incorporate and actively bind NR, a supravital dye, into lysosomes. Cells were stained with NR solution (2 h at 37 °C), followed by cell fixation [0.5% (v/v) formaldehyde, 0.1% (w/v) CaCl₂ for 30 s] at room temperature. Plates

were washed by two brief immersions in PBS (0.01 M-sodium phosphate buffer, 0.15 M NaCl) and the dye extracted from the viable cells using an acidified ethanol solution [50% (v/v) ethanol, 1% (v/v) acetic acid] at 4 °C overnight. The absorbance of the solubilized dye was quantified at 550 nm using a BioRad Model 550 microplate reader (BioRad). Cell viability data, expressed as a percentage of the values determined for control cells grown in the absence of IBB1, were obtained from at least three independent experiments, having each at least three technical replicates. The concentration of IBB1 that reduced cell viability by 50% (IC₅₀), as compared with untreated controls, was calculated by non-linear regression fit using the GraFit software (Erithacus Software Ltd.). The data were analysed statistically by the Bonferroni's test to compare means and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Time-lapse confocal laser scanning microscopy

To study the internalization of IBB1 into human colorectal adenocarcinoma HT29 cells, we carried out time-lapse confocal laser scanning microscopy (CLSM) experiments in triplicate. For this purpose, HT29 cells were grown *in vitro* as described above. A 1 μ -slide microscopy chamber (Ibidi) was inoculated at a density of 25,000 HT29 cells per well in 700 μ l of growth media. Microscopy chambers were incubated overnight under 5% CO₂ in humidified air to allow the cells to adhere to the surface of the chamber. Fifty μ g of Cy5-labeled IBB1 was added to the microscopy chamber and immediately placed on a C1 confocal laser microscope (Nikon). Z-series images of HT29 cells were recorded at different time (min) intervals after the onset of the experiment and processed with the software EZ-C1 Gold v2.10 build 240 (Nikon). Fluorescence images were obtained by exciting the sample with a red diode (633 nm). The signal corresponding to the Cy5-labeled IBB1 protein was visualized as discrete red fluorescent spots.

RESULTS AND DISCUSSION

Purification and molecular characterization of a major soybean BBI isoinhibitor, IBB1

Commercial soybean BBI, consisting in a mixture of IBB1 and IBBD2, was fractionated by MonoS cation exchange chromatography. The elution pattern of IBB1 and IBBD2, monitored by TIA measurements, are shown in **Fig 1**. At pH 4.4, IBB1 was not retained by the MonoS column, whereas IBBD2 was bound and eluted as a single broad chromatography peak in the range 0.04-0.13 M NaCl. The chromatographic fractions containing IBB1 were pooled and analysed by SDS-PAGE, showing a single band of appropriate molecular mass (12 kDa) (**Fig 2**, lane 1). The polyclonal Ab recognized the electrophoretic band corresponding to IBB1 (**Fig 2**, lane 2). Further studies by peptide mass fingerprinting were carried out in order to confirm the identity of IBB1. The purified protein, corresponding to the unbound chromatographic peak, was identified as Bowman-Birk proteinase inhibitor (Swiss-Prot entry: IBB1_SOYBN). The amino acid sequence of IBB1 is shown in **Fig. 3**, where the peptide sequences that contributed to protein identification by MS are indicated. Like others BBI proteins, IBB1 contain 14 Cys residues in conserved positions [3], with Lys and Leu in position P₁ in the N- and C-terminal inhibitory domains, respectively. In agreement with the identity of the P₁ residues, IBB1 inhibited both trypsin and chymotrypsin (data not shown). IBB1 was labelled with Cy5 fluorochrome in order to determine if the protease inhibitor is internalised by HT29 colorectal adenocarcinoma cells in a time-dependent manner. Cy5-labelled IBB1 was electrophoresed by SDS-PAGE and visualized in a Pharos Molecular Imager by exciting at 635 nm (**Fig 2**, lane 3); only an electrophoretic band was visualized, revealing the effectiveness of the minimal labelling protocol. To confirm the specificity of the signal, the same gel was also scanning at 532 nm (**Fig 3**, lane 4) in which the signal was completely abolished.

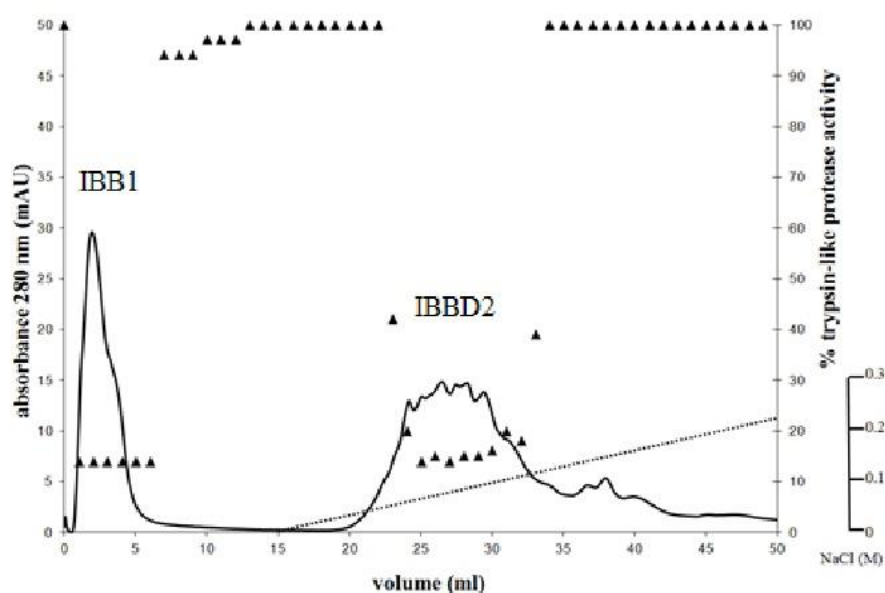


Figure 1. Elution profile of a mixture of Bowman-Birk iso-inhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean on a MonoS 5/50 GL cation exchange column. Absorbance (mAU) at 280 nm of the chromatographic elution and the linear gradient of NaCl (0-0.22 M) are shown (solid and dotted lines, respectively). Using BAPNA as specific substrate, the trypsin inhibitory activity, measured on every fraction, is shown.

Effects of IBB1 on the proliferation of human colorectal adenocarcinoma cells HT29

The effect of IBB1 on the growth of human colon adenocarcinoma HT29 cells was determined by comparing the cell viability of cells cultured in the absence or presence of IBB1 (15-93 μ M), monitored by the cytotoxic NR cell assay. IBB1 exerted a significant effect on growth of HT29 cells at concentrations as low as 15 μ M. A statistically significant ($p < 0.05$) and dose-dependent decrease of the growth of HT29 colon cells was observed (**Fig 4**); the IC_{50} value for IBB1 was 47 ± 5 μ M, in agreement with those obtained for BBI from others plant sources, including lentil [8] and pea [10].

Internalization of IBB1 into human colorectal adenocarcinoma cells HT29

HT29 human colorectal adenocarcinoma cells were incubated with about 50 μ g of Cy5-labelled IBB1 for 50 minutes (**Fig 5**). Fluorescent images were obtained by exciting the sample with red diode (633 nm), being the signal corresponding to IBB1 visualized as red fluorescent spots. Although additional biochemical assays are necessary, these results clearly demonstrated that IBB1 is internalized by HT29 cells. To further analyse the IBB1 internalization dynamics, images were taken at different time intervals (19, 32, 43 and 54 minutes). Labelled IBB1 crossed the cellular membrane of HT29 cells very rapidly and was gradually accumulated, forming fluorescent patches randomly distributed across the cytoplasm (**Fig 6**).

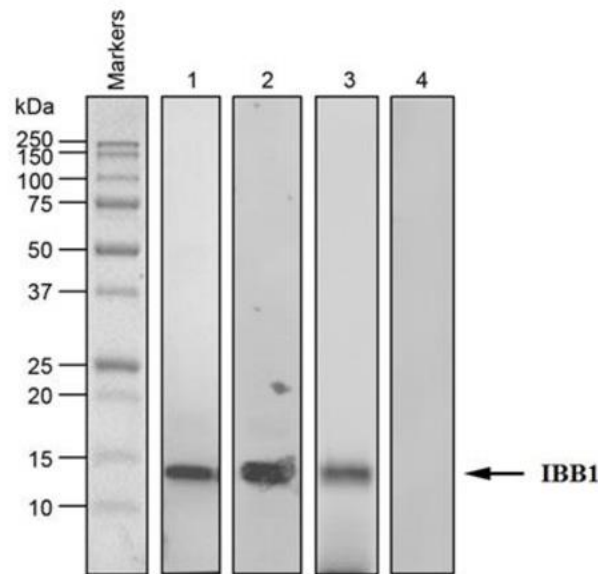


Figure 2. Electrophoretic characterization and fluorescent covalent labelling of IBB1. *Lane 1*, analysis of the electrophoretic mobility of IBB1 by SDS-PAGE. One microgram of purified protein was loaded on a 4-20% gradient gel. A single band of about 12 kDa was visible on the gel after Coomassie staining. Molecular weight markers are shown on the left. *Lane 2*, IBB1 protein was blotted to a PVDF membrane and probed with a rabbit polyclonal anti-IBB1 Ab followed by a secondary goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488-conjugated Ab. The primary Ab was able to bind to the IBB1 protein. Negative control with preimmune serum did not show any signal (data not shown). *Lanes 3-4*, fifty micrograms of IBB1 were covalently labelled with the Cy5 fluorochrome using the minimal labelling protocol. One microgram of Cy5-labelled IBB1 was electrophoresed by SDS-PAGE and visualized in a Pharos Molecular Imager by exciting at 635 nm (lane 3). The specificity of the signal was confirmed by scanning the same gel at 532 nm (lane 4).

IBB1 *DDESSKPCCDQCACT****KS****NPPQCRCSDMRLNSCHSACKSCICALSYPAQCFCVDITDFCYEPCKPSEDDKEN*

Figure 3. Identification of IBB1 protein by peptide mass fingerprinting. The protein band from the Coomassie-stained gel (Figure 3, lane 1) was excised and processed for MALDI-TOF/MS analysis. Amino acid sequences of inhibitory domains are underlined. The reactive peptide bond sites are in bold. **K** (Lysine) determines specificity for trypsin whereas **L** (Leucine) determines specificity against chymotrypsin. The peptides that contributed to protein identification are indicated in italics.

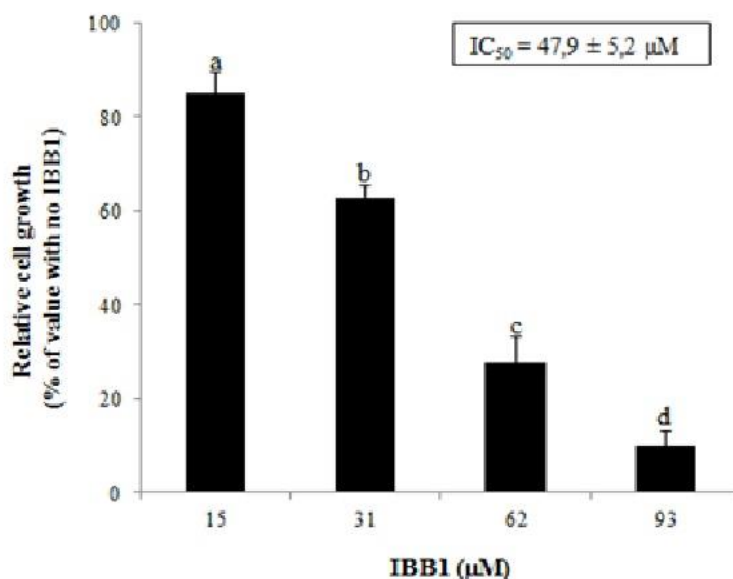


Figure 4. Effect of IBB1 on the *in vitro* growth of HT29 human colorectal adenocarcinoma cells. Growth media were supplemented with concentrations of IBB1 in the range 0-93 µM and cells harvested after a period of 96h. Data are means of three experiments, each having three technical replicates; bars represent SD. Mean values with different letters were significantly different ($p < 0.05$; Bonferroni's test).

Soybean BBI has been shown to inhibit, specifically and potently, the chymotrypsin-like proteasomal activity in MCF7 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [13]. The ability of soybean BBI to inhibit the proteasomal activity in intact MCF7 cells reveals that the cellular membranes are permeable to soybean BBI facilitating the inhibition of intracellular target proteases. Soybean BBI has been demonstrated to be taken up by colonic epithelial cells in a time-dependent manner, being the bulk of the internalised protease inhibitor present in the cytosol in active form [14]. These authors showed that soybean BBI was present in the cells for 12 h following 2h incubation. It has been also reported that soybean BBI is internalised into NIH/3T3 mouse embryo fibroblastic cells and is localized in the nucleus, even after simulated gastrointestinal digestion [15]. More recently, confocal microscopy studies have demonstrated that black-eyed pea (*Vigna unguiculata*) BBI crosses the membrane of breast MCF7 cancer cells, likely *via* endocytosis, and co-localizes with the proteasome in cytoplasm and in nucleus, inhibiting the chymotrypsin-, trypsin- and caspase-like activities of the 20S proteasome [16]. In order to determine the mechanism of internalization of BBI in human hepatoma Hep G2 cells, fluorescein isothiocyanate-labelled buckwheat (FITC-BTI) (*Fagopyrum esculentum*) protease inhibitor was used [17]. FITC-BTI colocalised with labelled transferrin implying that BTI enters Hep G2 cells by clathrin-dependent endocytosis. Further studies to determine the internalization mechanism and correct localization of BBI in colon cancer cells will be relevant in order to identify serine proteases as potential therapeutic targets.

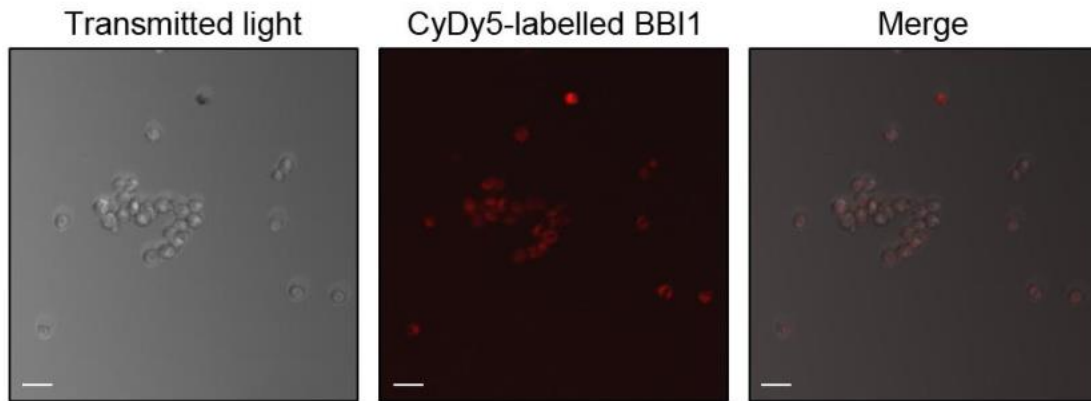


Figure 5. Internalization of IBB1 into human colorectal adenocarcinoma HT29 cells. About fifty micrograms of Cy5-labelled IBB1 were added to the culture medium. Transmitted light (left), fluorescence (middle) and merge (right) images represent a Z-stack projection of 20 optical sections of a group of HT29 cells cultured *in vitro* for 50 min. Images were captured using a confocal laser scanning microscope C1 (Nikon). Fluorescent image was obtained by exciting the sample with a red diode (633 nm). Red fluorescence corresponds to IBB1. Bars= 50 μ m.

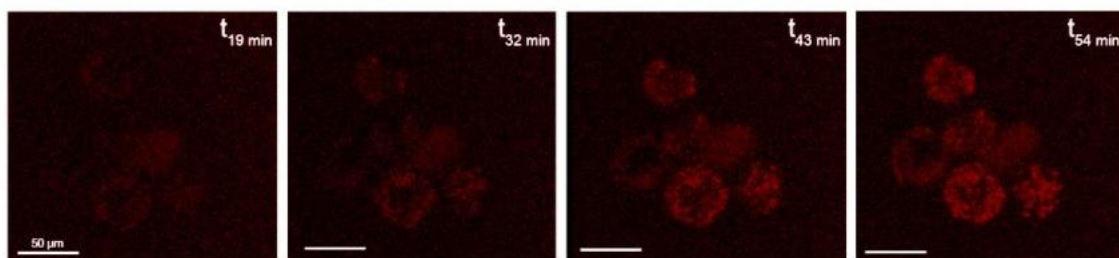


Figure 6. Analysis of IBB1 internalization dynamics in human colorectal adenocarcinoma HT29 cells using time-course CLSM microscopy. About fifty micrograms of Cy5-labelled IBB1 were added to the culture medium. Transmitted light (A) and fluorescence images (B-D) represent Z-stack projections of 20 optical sections of a group of HT29 cells cultured *in vitro*. Images were taken at different time (min) intervals using a C1 confocal laser scanning microscope (Nikon). Fluorescence images were obtained by exciting the sample with a red diode (633 nm). The signal corresponding to IBB1 was visualized as red fluorescent spots. We observed that the labelled protein entered the HT29 cells very rapidly (data not shown) and gradually accumulated, forming fluorescent patches randomly distributed across the cytoplasm. Bars= 50 μ m.

CONCLUSIONS

1. IBB1, a major Bowman-Birk isoinhibitor from soybean, exerts anti-proliferative effect on HT29 human colorectal adenocarcinoma cells.
2. IBB1 crossed the membrane of HT29 colon cancer cells over a time-course of 1 h and is localized in cytoplasm, where might interact with their potential therapeutic targets.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by ERDF-co-financed grants AGL2011-26353 (Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) and PE2010-CVI-5767 (Junta de Andalucía). A.C. is involved in COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion.

REFERENCES

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) *Global cancer statistics* 61: 69-90
- [2] Clemente A, Marín-Manzano MC, Arques MC, Domoney C (2013) In: Hernández-Ledesma B, Hsieh CC. *Bioactive food peptides in health and disease*. Rijeka (Croatia): InTech-Open Access Publisher, 23-44
- [3] Clemente A, Sonnante G, Domoney C. (2011) *Current Protein and Peptide Science* 12: 358-373
- [4] Clemente A, Arques MC (2014) *World Journal of Gastroenterology* (in press) doi: 10.3748/wjg.v20.i0.0000
- [5] Kennedy AR, Billings PC, Wan XS, Newberne PM (2002) *Nutrition and Cancer* 43: 174-186
- [6] Lichtenstein GR, Deren JJ, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, Ware JH (2008) *Digestive Diseases and Sciences* 53: 175-180
- [7] Clemente A, Gee JM, Johnson IT, Mackenzie DA, Domoney C (2005) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 8979-8986
- [8] Caccialupi P, Ceci LR, Siciliano RA, Pignone D, Clemente A, Sonnante G (2010) *Food Chemistry* 120: 1058-1066
- [9] Clemente A, Moreno FJ, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Domoney C (2010) *Molecular Nutrition and Food Research* 54: 396-405
- [10] Clemente A, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Arques, MC, Domoney C (2012) *British Journal of Nutrition* 108: S135-S144
- [11] Clemente A, Jiménez E, Marín-Manzano MC, Rubio LA (2008) *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88: 523-531
- [12] Clemente A, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Domoney C (2004) *Protein Expression and Purification* 36: 106-114
- [13] Chen YW, Huang S, Lin-Shiau, S, Lin J (2005) *Carcinogenesis* 26: 1296-1306
- [14] Billings PC, Brandon DL, Habres JM (1991) *European Journal of Cancer* 27 (7): 903-908
- [15] Park JH, Jeong HJ, De Lumen BO (2007) *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 10703-10706
- [16] da Costa Souza L, Camargo R, Demasi M, Santana JM, de Sá CM, de Freitas SM (2014) *PloS One* 9 (1): e86600.
- [17] Cui X, Wang Z, Li Y, Li C (2013) *Food Chemistry* 141: 2625-2633

MY OWN IDEAS

Marta Soria

Hello, my name is Marta and I am studying in the Lux Mundi School, in Granada and I have been involved in the PIIISA project. This project has given me the opportunity to know in depth a little part of the scientific world. I have enjoyed this scientific project so much, being an awesome experience. I have worked in a research group having incredible people and everybody gets along very well with each other. I have made really good friends, and I wouldn't have met them if I had not been part of the project. Being in the laboratory was an awesome experience and I felt super comfortable when I was working there. It was my favorite part of

the project without a doubt! The project gives you the idea of how do people work in the laboratories. When I heard the word 'science' I used to think of a laboratory, but I have learnt that there are so many things besides the fact of being in a laboratory using goggles. I don't know yet what I want to study. However, being part of the PIISA project has helped me to have it a little bit clearer. Hopefully one day I will be part of this huge scientific world. I'm so thankful I had this opportunity as it has made me grow. It has helped me to put my shyness aside. It has taught me a very important idea, and it is that if you want to fulfill your dreams you must run after them. You have to work really hard. If you really want to achieve your goals the effort will worth it. And the most important thing in life: you should never give up just because you failed the first time.

Patricia Porras

I'm Patricia Porras and I participated in PIISA Project 2014. Before enrolling, I heard a lot of good things about PIISA, so I didn't hesitated in becoming part of this. In my opinion, PIISA is a fantastic opportunity for young people who want to study a scientist career. I learnt a lot here, such as laboratory techniques, working in a team a how a scientist's life is. In addition, PIISA helped me to practice my English and it taught me how to explain what I did and the results of my work. At last, I want to thank PIISA for give me this opportunity, the researches for thinking all time about us and my teammates for doing this experiment more joyful.

Francisco J. Moya

Initially I chose this project because it seemed very interesting and is closely related to what I want to study in a few years so since I thought this was going to serve me to know more closely the procedures, tools and discipline of scientific research, although at first I was a little frightened by the thought of having to make a presentation to many people in the same field of study. My first day on the project PIISA research center Zaidin was fabulous, I felt like a little boy in a sweet shop , as the days passed I was giving me realize that my interest in matters related to my project was greater than I thought. Why not? Undoubtedly imagine me working on this, discovering new drug against deadly diseases and going to conferences around the world. Are already drawing conclusions from our research and about ten Congress expected the PIISA in which we will reveal these fantastic data obtained after much effort. Now I can say I do not feel those nerves that I felt at the beginning of the project and no doubt I would repeat next year, because it has been a very constructive and didactic experience in which I have met wonderful people and researchers fantastic which have enabled us better understand these materials. I want to thank everyone who has made this project could take over.



Quantitative determination of active Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, in commercial soymilks



M. Carmen Arques^a, M. Carmen Marín-Manzano^a, L. Clarissa Brito da Rocha^b, Blanca Hernandez-Ledesma^c, Isidra Recio^c, Alfonso Clemente^{a,*}

^a Department of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

^b Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil

^c Department of Food Analysis and Bioactivity, Institute of Food Science (CIAL, CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 September 2013

Received in revised form 28 November 2013

Accepted 10 January 2014

Available online 23 January 2014

Keywords:

Bowman-Birk inhibitors

Chemoprevention

Kunitz

Protease inhibitors

Serine proteases

Soymilk

ABSTRACT

Naturally-occurring serine protease inhibitors of the Bowman-Birk family exert their potential chemopreventive and/or therapeutic properties via protease inhibition. In this study, we have quantified the amounts of active BBI isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, in six commercial soymilks. By using cation exchange chromatography, the BBI isoinhibitors were isolated and their specific trypsin inhibitory activity was used to estimate their amounts in soymilk samples. IBB1 and IBBD2 concentrations ranged from 0.44 to 5.20 and 0.27 to 4.60 mg/100 ml of soymilk, respectively; total BBI, considered as the sum of both isoinhibitors, ranged from 0.60 to 9.07 mg/100 ml of soymilk. These data show that physiologically relevant amounts of active BBI are present in commercial soymilk and may exert potential health-promoting effects.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

In humans, aberrant functioning of certain serine proteases underlies pathological and physiological disorders. The therapeutic value of protease inhibitors, both natural and synthetic, as modulators of such proteolytic activities in disease is well-recognised (Deu, Verdoes, & Bogyo, 2012; Drag & Salvesen, 2010; Turk, 2006). Within this framework, there is a growing interest in naturally-occurring serine protease inhibitors of the Bowman-Birk family due to their potential chemopreventive and/or therapeutic properties which can impact on several human diseases, including cancer, neurodegenerative disorders and inflammatory processes (Clemente, Marín-Manzano, Arques, & Domoney, 2013). Bowman-Birk inhibitors (BBIs) from soybean (*Glycine max*) are the most extensively studied members of this protein family.

Abbreviations: BAPNA, *N*- α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide; BBI, Bowman-Birk inhibitors; BBIC, Bowman-Birk inhibitor concentrate; BTEE, *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester; CIA, chymotrypsin inhibitor activity; CIU, chymotrypsin inhibitor units; CRC, colorectal cancer; DMH, dimethylhydrazine; GIT, gastrointestinal tract; IU, inhibitor units; K_i , inhibition constant; KTI, Kunitz trypsin inhibitor; SM, soymilk; TIA, trypsin inhibitor activity; TIU, trypsin inhibitor units.

* Corresponding author. Address: Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain. Tel.: +34 958 57 27 57; fax: +34 958 57 27 53.

E-mail address: alfonso.clemente@eez.csic.es (A. Clemente).

Soybean BBI and homologous proteins have been demonstrated to be effective at preventing or suppressing radiation- and chemical carcinogen-induced transformation, in a wide variety of *in vitro* assays and, carcinogenesis and inflammatory disorders in *in vivo* model systems (Carli et al., 2012; Clemente & Domoney, 2006; Kennedy, 1998; Magee, Owusu-Apenten, McCann, Gill, & Rowland, 2012; Safavi & Rostami, 2012). Experimental human trials utilising BBI concentrate (BBIC), a protein extract of soybean enriched in BBI, have been completed in patients with oral leukoplakia, benign prostatic hyperplasia and ulcerative colitis. The strength of BBI doses in such intervention studies, measured in chymotrypsin inhibitory units (CIU), ranges from 25 to 800 CIU/d for a total of 6 months of BBIC treatment (Kennedy, 1998). The results of phase I clinical trials carried out with nineteen male patients with benign prostatic hyperplasia have shown that BBIC reduced prostate-specific antigen levels and prostate volume (Malkowicz et al., 2001). In the case of patients with ulcerative colitis, intake of BBIC was associated with a clinical response and induction of remission, as assessed by the Sutherland Disease Activity Index (an index that consists of four major criteria as follows: stool frequency, rectal bleeding, mucosal appearance, and physician rating of disease activity) (Lichtenstein, Deren, Katz, Lewis, & Kennedy, 2008); on the contrary, no clinical effects of BBIC in patients with oral leukoplakia were observed (Armstrong et al., 2013). Although the anti-nutritional effects of BBI cannot be ignored, these intervention

studies revealed that BBIC, orally administrated to human volunteers, was well-tolerated and no apparent toxicity or adverse side effects were elicited after long-term treatment.

In soybean, two major classes of protease inhibitors, Kunitz (KTI) and BBI, accounts for about 6% of the total seed protein (Brandon & Friedman, 2002). KTI is a 21 kDa protein with a single reactive site that binds trypsin. Soybean BBIs are proteins with molecular masses in the range of 6–9 kDa and comprise two distinct binding loops, responsible for the inhibition of two enzyme molecules, which may be the same or distinct types of enzymes (Birk, 1985). Two BBI isoinhibitors, IBB1 and IBB2, showing considerable amino acid sequence divergence within their inhibitory domains, are predominant in soybean cultivars; IBB1 inhibits both trypsin and chymotrypsin whereas IBB2 inhibits trypsin only (Clemente, Moreno, Marín-Manzano, Jiménez, & Domoney, 2010).

In order to quantify BBI in soy foods, enzymatic and immunological assays have been developed; however, no comprehensive information on the concentration of BBI in soy foods is currently available. The occurrence of BBI in soy foods (soymilk, soy infant formula, tofu, bean curd, soybean cake, and fermented soy products, among others) present in the US market is noteworthy, where BBI may be present in different amounts (Hernandez-Ledesma, Hsieh, & de Lumen, 2009). The soy varieties used, the products themselves and the technological processes used in their preparations all contribute to variation in BBI concentration (Xiao, Wood, Robertson, & Gilani, 2012). In a recent study, BBI concentrations of twelve soymilk samples, ranging from 7.2 to 55.9 mg BBI/100 mL of soymilk, were reported (Hernandez-Ledesma et al., 2009). Such amounts seem to be physiologically relevant in order to exert anticancer effects in humans (Kennedy, 1998); nevertheless, these data are based on immunoreactive forms of BBI that could be functionally inactive. The emerging evidence suggests that soybean BBI exert their preventive and therapeutic properties via protease inhibition (Clemente, Sonnante, & Domoney, 2011). Thus, treatment of soybean BBI with reducing and alkylating agents, which substantially reduces inhibitory activity against serine proteases, renders these dietary proteins unable to inhibit cell proliferation of colon cancer cells (Clemente et al., 2010). More recently, the anti-proliferative effect of rTI1B, a major pea BBI isoinhibitor expressed heterologously in *Pichia pastoris*, compared with those observed using a related inactive mutant, was evaluated (Clemente, Marín-Manzano, Jiménez, Arques, & Domoney, 2012). The proliferation of HT29 colon cancer cells was significantly affected by rTI1B in a dose-dependent manner, whereas the inactive mutant did not show any significant effect on colon cancer cell growth. These findings suggest that serine proteases should be considered as important targets in investigating the potential chemopreventive role of BBI during the early stages of colorectal carcinogenesis.

Although active BBI seems to be necessary to exert their reported anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties, quantitative data regarding their presence in commercial soymilks has not been previously reported. Consequently, the aim of this study was to develop a suitable methodology that combines separation of serine protease isoinhibitors by liquid chromatography and further enzymatic determination of trypsin and chymotrypsin inhibitory activity in order to quantify the amounts of active BBI isoinhibitors, IBB1 and IBB2, present in commercial soymilks that could exert potential health benefits to consumers.

2. Materials and methods

2.1. Materials

BBI (T9777) and KTI (T2327) from soybean, trypsin (type III) and α -chymotrypsin (type VII) from bovine pancreas, *N*- α -benzoyl-

D-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) and *N*-benzoyl-*L*-tyrosine ethyl ester (BTEE) were obtained from Sigma (Alcobendas, Spain). All other chemicals were of analytical grade.

2.2. Isolation of soybean protease inhibitors

A mixture of soybean BBI and KTI was prepared by dissolving 1 mg of each in 6 mL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.4. The mixture was fractionated on a MonoS 5/50 GL cation exchange column (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), connected to an AKTA FPLC system (GE Healthcare), using a linear gradient of 0–0.16 M NaCl in 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.4, at a flow rate of 1 mL/min. The elution was monitored at 280 nm and 0.5 mL fractions were collected. Trypsin inhibitory activity (TIA) measurements of eluted samples were carried out in flat-bottom microtitre plates by using BAPNA as specific substrate; the assay products were measured at 405 nm, as previously described (Clemente, Jiménez, Marín-Manzano, & Rubio, 2008). Chymotrypsin inhibitory activity (CIA) evaluation of eluted samples was carried out by using BTEE as specific substrate, as described below (see Section 2.5).

2.3. Preparation of soymilk extracts

Six commercial soymilks (SM-1 to SM-6) were purchased from local stores in Granada, Spain. Four samples (500 mL each) from the same lot/brand were individually freeze-dried and stored at -20°C . Freeze-dried soymilk (500 mg) were added to 10 mL of 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.4, and stirred for 1 h at room temperature. The extracts were centrifuged at 3500g for 15 min and the supernatants were dialysed extensively against 50 mM sodium acetate buffer, pH 4.4, at 4°C . The soymilk preparations were fractionated on a MonoS 5/50 GL cation exchange column and monitored by TIA and CIA (see Sections 2.2 and 2.5, respectively). The trypsin inhibitory profile of soymilks was used to define the chromatographic elution of their major protease inhibitors.

2.4. Mass peptide fingerprinting

Isolated soybean protease inhibitors (10 μg) were dissolved in NuPAGE lithium dodecyl sulphate sample buffer (Invitrogen, Paisley, UK) and separated by electrophoresis on Novex 12% Bis-Tris pre-cast gels using 2-*N*-morpholine-ethane sulphonic acid (NuPAGE MES, Invitrogen) as running buffer. Immediately before use, samples were reduced with dithiothreitol (DTT) and NuPAGE antioxidant added to the upper buffer chamber to prevent re-oxidation of reduced proteins during electrophoresis. Bands were excised from Colloidal Blue (Invitrogen)-stained gels and subjected to in-gel trypsin digestion. Peptide fragments from digested proteins were desalted and concentrated using C-18 ZipTip columns (Millipore, Madrid, Spain) and then, loaded directly onto the matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) plate, using *a*-cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix for MALDI-mass spectrometry (MS) analysis. MS spectra were obtained automatically in a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Cheshire, UK) operating in reflectron mode with delayed extraction. Peptide mass data were used for protein identification against the MS protein sequence database (www.matrixscience.com).

2.5. Measurement of protease inhibitory activities

The major BBI isoinhibitors, IBB1 and IBB2, and Kunitz inhibitor were assessed for TIA and CIA. TIA was measured using a modified small-scale quantitative assay with BAPNA as specific substrate, and using 50 mM Tris, pH 7.5 as enzyme assay buffer. One trypsin inhibitor unit (TIU) was defined as that which gives

a reduction in absorbance at 410 nm of 0.01, relative to trypsin control reactions, in 10 min in a defined assay volume of 10 mL (Domoney & Welham, 1992). CIA was measured using BTEE as specific substrate. One chymotrypsin inhibitor unit (CIU) was defined as that which gives a reduction in absorbance at 256 nm of 0.01, relative to chymotrypsin control reactions, in 5 min in a defined assay volume of 10 mL, as previously described (Clemente, MacKenzie, Jeenes, & Domoney, 2004). Specific TIA and CIA of IBB1, IBBD2 and KTI, expressed as inhibitor units (IU) per mg of protein, were calculated. Such values were used to estimate the amount of individual protease inhibitors present in commercial soymilks.

3. Results

3.1. Isolation and functional characterisation of major soybean BBI isoinhibitors, IBB1 and IBBD2

As previously demonstrated by chromatographic, electrophoretic and mass peptide fingerprinting analyses, commercially available BBI consisted in a mixture of two major isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, showing considerable amino acid sequence divergence within their inhibitory domains (Clemente et al., 2010). In the present study, a mixture of commercial BBI and KTI from soybean was fractionated by MonoS cation exchange chromatography. The elution pattern of the mixture of protease inhibitors, monitored by TIA and CIA measurements, is shown in Fig. 1a. Up to three major chromatographic peaks were resolved; at pH 4.4, peak 1 was not retained by the MonoS column whereas peaks 2 and 3 were bound and eluted in the range 0.05–0.08 M NaCl and 0.11–0.14 M NaCl, respectively. Regarding their protease inhibitory activities, peak 1 showed both TIA and CIA whereas peaks 2 and 3 demonstrated TIA only. The chromatographic fractions containing the three proteins were pooled individually and analysed by SDS–PAGE, and showed to correspond to the main electrophoretic bands present in the starting material (Fig. 1b). When alkylated, the purified peaks 1 and 2 showed proteins with apparent molecular masses

in the range 10–12 kDa whereas peak 3 showed a single electrophoretic band of 21 kDa. Further studies by mass peptide fingerprinting were carried out in order to reveal the identity of the three protease inhibitors. In-gel tryptic digestion of excised electrophoretic bands was performed followed by separation of the peptides generated and MS based analysis. A search of peptide mass data against the MS protein sequence database enabled the unambiguous identification of the protease inhibitors. The purified proteins, corresponding to the chromatographic peaks 1, 2 and 3 (see Fig. 1a), were identified as Bowman-Birk proteinase inhibitor (Swiss-Prot entry: IBB1_SOYBN), Bowman-Birk type proteinase inhibitor D-II (Swiss-Prot entry: IBBD2_SOYBN) and Kunitz inhibitor (Swiss-Prot entry: 1BA7_A), respectively, with sequence coverage ranging from 52 to 86% (Table 1). An amino acid sequence comparison of IBBD2 and IBB1 proteins is shown in Table 2, where the peptide sequences that contributed to protein identification by MS are indicated. As described for other BBI proteins, IBB1 and IBBD2 contain 14 Cys residues in conserved positions (Clemente et al., 2011). Following the nomenclature of Schechter and Berger (1967), IBBD2 showed almost identical amino acid sequences within the inhibitory domains, except for positions P₂ and P₄; in both inhibitory domains, the P₁ position is occupied by Arg, conferring specificity for inhibition of trypsin-like proteases. In the case of IBB1, variation at several positions within the two inhibitory domains was observed; the presence of Lys or Leu in position P₁ confers specific inhibition of trypsin- or chymotrypsin-like proteases, respectively. In agreement with the identity of the P₁ residues of their inhibitory domains, IBB1 inhibited both trypsin and chymotrypsin, whereas IBBD2 inhibited trypsin only (Table 3). IBB1 showed a high specific CIA (2917 ± 292 CIU/mg of protein), in contrast to IBBD2, where CIA was not detected. IBBD2 showed a higher specific TIA than IBB1 (4919 ± 101 and 3828 ± 209 TIU/mg of protein, respectively). When compared with the BBI isoinhibitors, KTI showed lower specific TIA (2147 ± 105 TIU/mg of protein), being its ability to inhibit chymotrypsin almost null (Table 3). These significant differences in specific inhibitory activities are likely to reflect the variation in the amino acid sequences of the

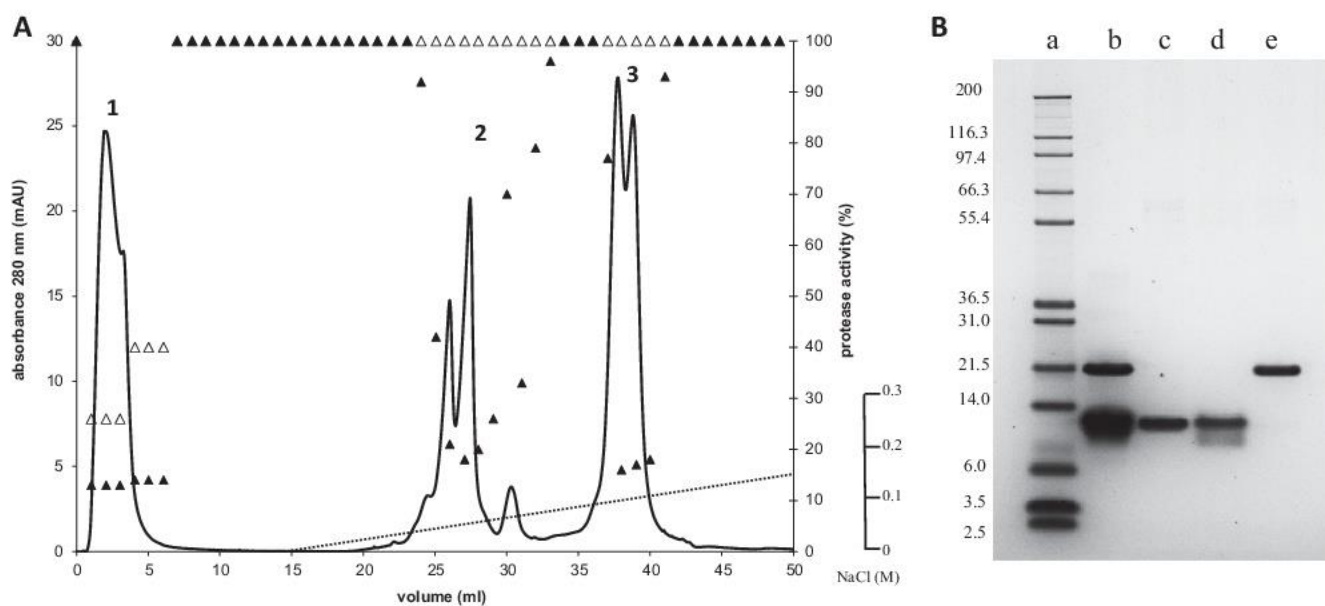


Fig. 1. (A) Elution profile of a mixture of commercially available Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, and Kunitz inhibitor (KTI) from soybean on a MonoS 5/50 GL cation exchange column. Absorbance (mAU) at 280 nm of the chromatographic elution and the linear gradient of NaCl (0–0.16 M) are shown (solid and dotted lines, respectively). Using BAPNA and BTEE as specific substrates, the trypsin (▲) and chymotrypsin (△) inhibitory activities, measured on every fraction, are shown. (B) SDS–PAGE under denaturing and reducing conditions of the mixture (lane a) and the chromatographic peaks 1 (lane c), 2 (lane d) and 3 (lane e) that contain purified protease inhibitors. Molecular weight markers are shown in lane a.

Table 1

Identification of major Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, and Kunitz inhibitor (KTI) separated by cation-exchange chromatography.

Chromatographic ID	Protein name	NCBI accession number	Entry name	Sequence coverage (%)	Matched peptides	Protein score ^a
1	Bowman-Birk proteinase inhibitor	GI:157830209	IBBI_A	52	3	123
2	Bowman-Birk proteinase inhibitor type D-II	GI:350045	IBBDII	86	5	228
3	Trypsin Inhibitor A (Kunitz type)	GI:3318877	1BA7_A	72	16	775

Database searching was performed using the MASCOT database (<http://www.matrixscience.com>).^a Protein scores greater than 57 were significant ($P < 0.05$).**Table 2**

Amino acid sequence alignment of IBB1 and IBBD2.

	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----
IBB1_SOYBN (GI:157830209)	----- <i>DDESSKPCCDQCA</i> <i>CTKSNPPQC</i> <i>RCSMDRLNSCHSACKSCICALSYP</i> <i>AQCFCVDITDFCYE</i> <i>PCKPSEDDKEN</i>
IBBD2_SOYBN (GI:350045)	<i>SDQSSSYDDDEYSKPCD</i> <i>LCMCTRSMPPQC</i> <i>SCEDIRLNSCHSDCKSCMCTRSQ</i> <i>PGQCRCLDTNDFCYK</i> <i>PCKSRDD-----</i>
	1-----10-----20-----30-----40-----50-----60-----70-----

Accession numbers are from MASCOT database (<http://www.matrixscience.com>). Amino acid sequences of inhibitory domains are underlined. P₁ – P_{1'}, are the reactive peptide bond sites, in bold text. Either K or R at position P₁ determines specificity for trypsin, whereas L determines specificity against chymotrypsin. The peptides that contributed to protein identification are indicated in italics.

Table 3

Specific inhibitory activity for trypsin (T) and chymotrypsin (C) of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, and Kunitz inhibitor (KTI).

Protease inhibitor	Amino acid sequence of inhibitory domains		Specific inhibitory activity (IU/mg protein)	
	Domain 1	Domain 2	TIA	CIA
IBB1	CTKSNPPQC	CALSYP AQC	3828 ± 209	2917 ± 292
IBBD2	CTRSMP PQC	CTRSQ PGQC	4819 ± 101	ND
KTI	SPYRIR		2147 ± 105	78 ± 5

Specific activities values represent means ± SD from at least three independent determinations. P₁ – P₂, are the reactive peptide bond sites, in bold text. Either K or R at position P₁ determines specificity for trypsin, whereas L determines specificity against chymotrypsin. ND, not detected.

inhibitory domains that play an essential role in determining specificity and potency (Clemente & Domoney, 2006).

3.2. Evaluation of protease inhibitors in soymilks

When monitored by TIA and CIA, the elution pattern of the six commercial soymilks was similar to that obtained for the mixture of protease inhibitors on cation exchange chromatography (Fig. 2). The three chromatographic peaks obtained from the different soymilks were collected, being the protein identification of electrophoretic bands confirmed by mass peptide fingerprinting (not shown). The specific TIA was used to estimate the content of individual protease inhibitors (IBB1, IBBD2 and KTI) in commercial soymilks. IBB1 and IBBD2 concentrations ranged from 0.44 to 5.20 and 0.27 to 4.60 mg/100 ml of soymilk, respectively; total BBI, considered as the sum of both isoinhibitors, ranged from 0.59 to 9.18 mg/100 ml of soymilk. In the case of KTI, its concentrations ranged from 1.82 to 5.50 mg/100 ml of soymilk (Table 4).

4. Discussion

BBI appears to exert a protective effect against inflammatory disorders and cancer development; such beneficial effect has been specifically attributed to their intrinsic ability to inhibit serine proteases (Clemente et al., 2013; Safavi & Rostami, 2012). Inactive BBI forms render these dietary proteins unable to inhibit cell proliferation of colon cancer cells (Clemente et al., 2010, 2012). These findings reveal the need to evaluate the amounts of active BBI present in soy foods that could potentially exert a beneficial effect to consumers. To quantify BBI in soy foods, enzymatic and

immunological methods using polyclonal or monoclonal antibodies have been developed (Brandon, Bates, & Friedman, 2004). By using western blotting analysis, Hernandez-Ledesma et al. (2009) reported BBI concentrations ranging from 7.2 to 55.9 mg/100 ml of soymilk, showing most of the tested soymilks values higher than 23 mg/100 ml of soymilk. Although immunoassays offer the specificity and sensitivity necessary to recognise BBI in complex samples, they are unable to distinguish among active or inactive forms. In addition, unusual patterns of temperature-dependent binding displayed by monoclonal antibodies towards soybean BBI have been reported (Brandon, Bates, & Friedman, 1989). Indeed, the lack of commercially available antibodies against BBI makes difficult to measure this protein quantitatively in soybean products that claim their reported health benefits (Losso, 2008). In the case of enzymatic inhibition, only functional BBI proteins with the ability to form complexes with digestive proteases, trypsin and chymotrypsin, can be evaluated (Clemente et al., 2008). Although enzymatic methods offer useful information about the overall protease inhibitory activity in complex samples, it gives no indication about which type of protease inhibitor is responsible of such activity (DiPietro & Liener, 1989). To distinguish the inhibitory activities among major soybean protease inhibitors, BBI and KTI, chromatographic fractionation of commercial soymilks prior to enzymatic inhibition measurements is strictly necessary. In view of that, we have isolated KTI and two major BBI isoinhibitors, IBB1 and IBBD2, from six commercial soymilks and quantified the corresponding amounts taken into account their specific TIA (Fig. 2). The concentrations of active BBI, considered as the sum of IBB1 and IBBD2, ranged from 0.59 to 9.18 mg/100 ml of soymilk whereas KTI ranged from 1.82 to 5.50 mg/100 ml of soymilk. The reported data reflects a significant variation on protease inhibitor concentrations

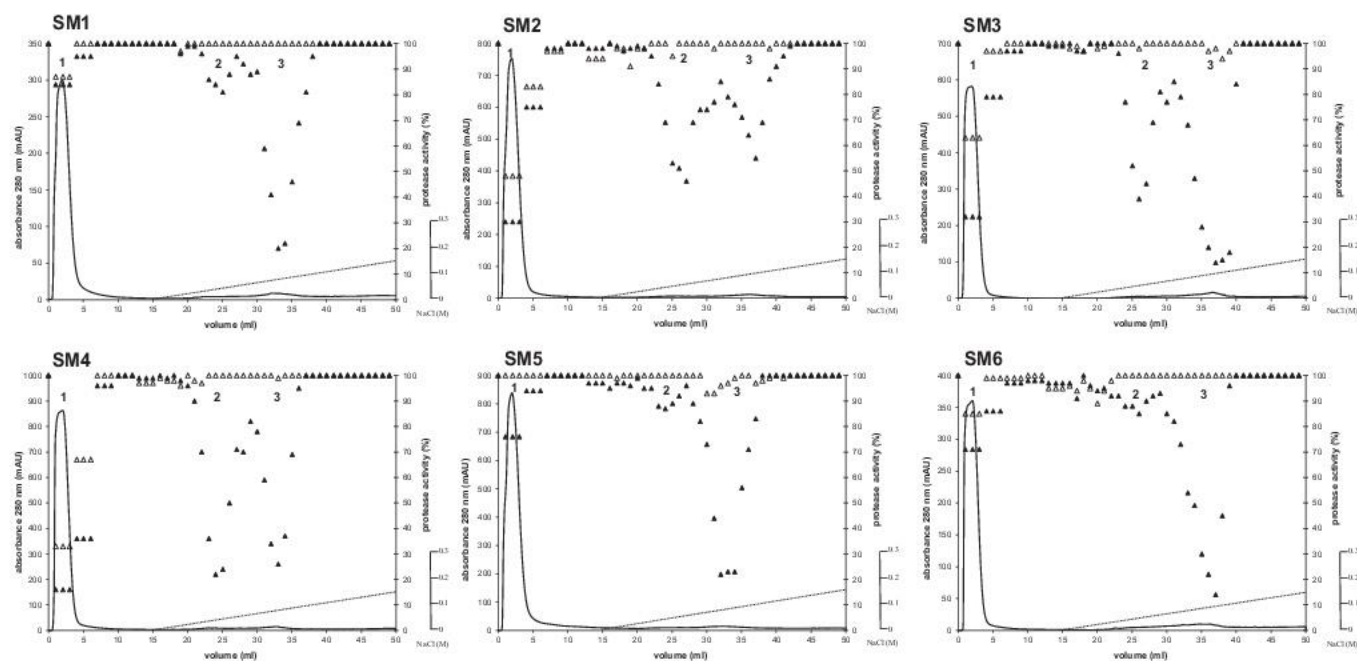


Fig. 2. Elution profile of six commercial soymilks on a Mono S 5/50 GL cation exchange column. Absorbance (mAU) at 280 nm of the chromatographic elution and the linear gradient of NaCl (0–0.16 M) are shown (solid and dotted lines, respectively). Using BAPNA and BTEE as specific substrates, the trypsin (\blacktriangle) and chymotrypsin (\triangle) inhibitory activities, measured on every fraction, are shown.

Table 4
Protease inhibitory activity and quantitative determination of Bowman-Birk isolectin, IBB1 and IBB2, and Kunitz inhibitor (KTI) in six commercial soymilks.

	Total TIA	Total CIA	IBB1 (mg)	IBBD2 (mg)	Total BBI ^a (mg)	KTI (mg)
SM-1	6853 ± 1727	2857 ± 382	0.44 ± 0.08	0.27 ± 0.05	0.71 ± 0.14	1.82 ± 0.58
SM-2	50857 ± 4895	15356 ± 1308	4.63 ± 0.62	4.44 ± 0.71	9.07 ± 1.18	5.50 ± 0.39
SM-3	11858 ± 1630	4913 ± 305	1.11 ± 0.15	0.67 ± 0.15	1.77 ± 0.23	1.98 ± 0.20
SM-4	43295 ± 6012	14368 ± 2888	5.20 ± 0.82	3.54 ± 0.46	8.74 ± 1.25	2.96 ± 0.17
SM-5	8495 ± 1364	2835 ± 171	0.49 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.60 ± 0.05	2.84 ± 0.48
SM-6	12839 ± 1408	3198 ± 251	0.80 ± 0.11	0.33 ± 0.04	1.12 ± 0.11	3.74 ± 0.44

Data are mean ± SD per 100 ml of soymilk from at least three independent determinations. Quantitative data of an individual protease inhibitor was calculated taking into account their corresponding specific inhibitory activities for trypsin (see Table 2).

^a Total BBI is the sum of IBB1 and IBB2.

among soymilks. The soy varieties used as well as the processing conditions might be responsible for the variability found in protease inhibitory activity among commercial soymilks. Given that beneficial effects of soybean BBI in humans seem to be dose-dependent, qualitative and quantitative differences on protease inhibitory activities among soymilks might be physiologically relevant and deserves further research.

The amounts of protease inhibitors reported in this study points out their significant resistance to processing conditions during soymilk preparation. Heat treatment, a basic step of soymilk preparation, may reduce TIA content at some extent. In a recent study, Xiao et al. (2012) reported a TIA reduction of 44.4% in soymilk when compared to that contained in whole soybean; unfortunately, no data regarding the survival rates of KTI and BBI were available. Whereas KTI is considered a heat-labile inhibitor, the ability of BBI to inhibit serine proteases seem not to be significantly diminished (Rouhana, Adler-Nissen, Cogan, & Frokiaer, 1996) except when prolonged heat treatment at high temperature is applied (Osman, Reid, & Weber, 2002; Rayas-Duarte, Bergeron, & Nielsen, 1992). The rigid structure provided by the seven intra-molecular disulphide bridges that maintain the structural and functional features of the binding sites by adding covalent attachment to the inhibitor core are responsible of such high stability (Bateman & James, 2011; Kumar & Gowda, 2013; Trivedi, Laurence, &

Siannah, 2009). It has been demonstrated that BBI from chickpea seeds can resist both acidic conditions and the action of digestive enzymes, and transit through the stomach and small intestine of pigs, generally held as a suitable model for human digestive physiology (Clemente et al., 2008). The presence of active BBI (at least 5–8% of the total ingested BBI) at the terminal ileum revealed the resistance of a significant proportion of these proteins to the extreme conditions of the gastrointestinal tract *in vivo*. Chromatographic, electrophoretic and enzymatic data obtained from ileal samples suggested that most of the BBI activity is derived from a protein core containing the two binding domains, and resistant to proteolysis. *In vitro* incubation studies of soybean BBI with mixed fecal samples of pigs showed that BBI remained active and their intrinsic ability to inhibit serine proteases was not significantly affected by the enzymatic or metabolic activity of fecal microbiota (Marin-Manzano, Ruiz, Jimenez, Rubio, & Clemente, 2009).

Purified BBI and BBIC has demonstrated to exert a protective and/or suppressive effect in dimethylhydrazine (DMH)-treated animals when used at concentrations as low as 10 mg/100 g diet, reducing the incidence and frequency of colon tumours in mice (St. Clair, Billings, Carew, Keller-McGandy, Newberne, & Kennedy, 1990) and rats (Kennedy, Billings, Wan, & Newberne, 2002). Such amount would be equivalent to that present in a single serving of SM-2 and SM-4 and suggest that a single cup of soymilk could

have some protective effect against cancer development if the results from animal studies are extrapolated to humans. Autoclaved BBIC, in which serine protease inhibitory activity was abolished, did not show any significant suppressive effect on colon tumour development in rodents, suggesting that the intrinsic ability of BBI to inhibit serine proteases may be required for their anti-cancer properties (Kennedy et al., 2002). Recent studies have demonstrated a significant concentration- and time-dependent decrease in the growth of HT29 human colon adenocarcinoma cells when treated with a mixture of IBB1 and IBB2 (Clemente et al., 2010). These proteins have been shown to exert strong anti-proliferative effects of colon cancer cells at concentration as low as 20 μM and IC_{50} values in the range 40–50 μM ; in contrast, the growth of non-malignant colonic fibroblastic CCD18-Co cells was unaffected. Interestingly, chemically inactivated soybean BBI did not demonstrate any significant effect of the proliferation of colon cancer cells suggesting that BBI exert their anti-proliferative properties via protease inhibition. In a recent study, a comparative study with rT11B, a major pea BBI isoinhibitor expressed heterologously in *P. pastoris*, and a related synthetic mutant derivative lacking trypsin and chymotrypsin inhibitory activity was carried out (Clemente et al., 2012). Whereas the proliferation of HT29 colon cancer cells was inhibited significantly by rT11B in a dose-dependent manner, the inactive mutant did not show any significant effect on colon cancer cell growth. These results support the relevance of quantifying active BBI in soy-foods.

The anti-carcinogenic properties of soybean BBI have been linked to the chymotrypsin inhibitory domain, leading to the hypothesis that chymotrypsin-like proteases are potential targets of BBI in anti-cancer effects (Kennedy et al., 2002). Yavelow, Collins, Birk, Troll, and Kennedy (1985) reported that an enzymatically modified soybean BBI having only chymotrypsin inhibitory activity was still fully effective as an inhibitor of radiation-induced transformation *in vitro*, whereas the BBI form which inhibits trypsin-like proteases only was ineffective. In contrast, it has been demonstrated recently that IBB2, with ability to inhibit trypsin only, exerts anti-proliferative effects on colon cancer cells (Clemente et al., 2012). This is the first indication of the involvement of the trypsin inhibitory domain of BBI on health benefits and reveals that both trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in carcinogenic processes should be considered as potential targets of BBI. Due that both therapeutic targets and the action mechanism of soybean isoinhibitors – IBB1 and IBB2 – remain unknown, it is difficult to recognise the biological relevance of differences in terms of qualitative and quantitative inhibitory capacities among soymilks. Finally, recent studies suggest that BBI may play an important role in the protection of other bioactive compounds present in soymilk against degradation or gut proteolysis. An example of such is lunasin, a 43-amino acid peptide with demonstrated chemopreventive action in both culture and animal models (Hernandez-Ledesma et al., 2009; Hsieh, Hernandez-Ledesma, Jeong, Park, & de Lumen, 2010).

In summary, this paper reports for first time the amounts of active protease inhibitors, distinguishing between KTI and two major BBI isoinhibitors, present in commercial soymilks. The results obtained in this study suggest that soymilk might be considered as a rich source of active BBI to exert potential health benefits. Research is needed to investigate the bioavailability of active BBI present in soymilks and to study their contribution in chronic disease prevention in healthy subjects.

Acknowledgements

A.C. acknowledges support by ERDF-co-financed Grant from the Spanish CICYT (AGL2011-26353). A.C. is involved in COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion. L.C.B.R. acknowledges

support from CAPES (Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior–PDSE process number 9004-11-4), Brazil. We are grateful to the proteomics Facility of University of Cordoba (Spain) for carrying out peptide mass fingerprinting. B.H.-L. thanks Ministry of Economy and Competitiveness for her “Ramón y Cajal” contract. The study is not subject to any conflicts of interest.

References

- Armstrong, W. B., Taylor, T. H., Kennedy, A. R., Melrose, R. J., Messadi, D. V., Gu, M., et al. (2013). Bowman-Birk inhibitor concentrate and oral leukoplakia: A randomized Phase IIb trial. *Cancer Prevention Research*, 6, 410–418.
- Bateman, K. S., & James, M. N. G. (2011). Plant proteinase inhibitors: Structure and mechanism of inhibition. *Current Protein & Peptide Science*, 12, 341–347.
- Brandon, D. L., Bates, A. H., & Friedman, M. (1989). Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 1192–1196.
- Brandon, D. L., Bates, A. H., & Friedman, M. (2004). Immunoassays for Bowman-Birk and Kunitz soybean trypsin inhibitors in infant formula. *Journal of Food Science*, 69, 11–15.
- Brandon, D. L., & Friedman, M. (2002). Immunoassays of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6635–6642.
- Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor – trypsin inhibitor and chymotrypsin inhibitor from soybeans. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 25, 113–131.
- Carli, A. D., Vieira, P. M., Silva, K. T., Cota, R. G., Carneiro, C. M., Castro-Borges, W., et al. (2012). Bowman-Birk inhibitors, proteasome peptidase activities and colorectal pre-neoplasias induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss mice. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1405–1412.
- Clemente, A., & Domoney, C. (2006). Biological significance of polymorphism in plant protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Current Protein & Peptide Science*, 7, 201–216.
- Clemente, A., Jiménez, E., Marín-Manzano, M. C., & Rubio, L. A. (2008). Active Bowman-Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 523–531.
- Clemente, A., MacKenzie, D. A., Jeenes, D. J., & Domoney, C. (2004). The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman-Birk class. *Protein Expression and Purification*, 36, 106–114.
- Clemente, A., Marín-Manzano, M. C., Arques, M. C., & Domoney, C. (2013). Bowman-Birk inhibitors from legumes: Utilisation in disease prevention and therapy. In B. Hernández-Ledesma & C. C. Hsieh (Eds.), *Bioactive food peptides in health and disease* (pp. 23–44). Rijeka: InTech-Open Access Publisher.
- Clemente, A., Marín-Manzano, M. C., Jiménez, E., Arques, M. C., & Domoney, C. (2012). The anti-proliferative effect of T11B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *British Journal of Nutrition*, 108, 135–144.
- Clemente, A., Moreno, F. J., Marín-Manzano, M. C., Jiménez, E., & Domoney, C. (2010). The cytotoxic effect of Bowman-Birk isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from soybean on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54, 396–405.
- Clemente, A., Sonnante, G., & Domoney, C. (2011). Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: Current status and perspectives. *Current Protein & Peptide Science*, 12, 358–373.
- Deu, E., Verdoes, M., & Bogyo, M. (2012). New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19, 9–16.
- DiPietro, C. M., & Liener, E. I. (1989). Heat inactivation of the Kunitz and Bowman-Birk soybean protease inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 39–44.
- Domoney, C., & Welham, T. (1992). Trypsin inhibitors in *Pisum*: Variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Science Research*, 2, 147–154.
- Drag, M., & Salvesen, G. S. (2010). Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9, 690–701.
- Hernandez-Ledesma, B., Hsieh, C.-C., & de Lumen, B. O. (2009). Lunasin and Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) in US commercial soy foods. *Food Chemistry*, 115, 574–580.
- Hsieh, C.-C., Hernandez-Ledesma, B., Jeong, H. J., Park, J. H., & de Lumen, B. O. (2010). Complementary roles in cancer prevention: Protease inhibitor makes the cancer preventive peptide lunasin bioavailable. *PLoS One*, 5, e8890.
- Kennedy, A. R. (1998). Chemopreventive agents: Protease inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 78, 167–209.
- Kennedy, A. R., Billings, P. C., Wan, X. S., & Newberne, P. M. (2002). Effects of Bowman-Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, 43, 174–186.
- Kumar, V., & Gowda, L. R. (2013). The contribution of two disulfide bonds in the trypsin binding domain of horsegram (*Dolichos biflorus*) Bowman-Birk inhibitor to thermal stability and functionality. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 537, 49–61.

- Lichtenstein, G. R., Deren, J., Katz, S., Lewis, J. D., Kennedy, A. R., & Ware, J. H. (2008). Bowman-Birk inhibitor concentrate: A novel therapeutic agent for patients with active ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Sciences*, *53*, 175–180.
- Losso, J. N. (2008). The biochemical and functional food properties of the Bowman-Birk inhibitor. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *48*, 94–118.
- Magee, P. J., Owusu-Apenten, R., McCann, M. J., Gill, C. I., & Rowland, I. R. (2012). Chickpea (*Cicer arietinum*) and other plant-derived protease inhibitor concentrates inhibit breast and prostate cancer cell proliferation in vitro. *Nutrition and Cancer*, *64*, 741–748.
- Malkowicz, S. B., McKenna, W. G., Vaughn, D. J., Wan, X. S., Propert, K. J., Rockwell, K., et al. (2001). Effects of Bowman-Birk inhibitor concentrate (BBIC) in patients with benign prostatic hyperplasia. *Prostate*, *48*, 16–28.
- Marin-Manzano, M. C., Ruiz, R., Jimenez, E., Rubio, L. A., & Clemente, A. (2009). Anticarcinogenic soyabean Bowman-Birk inhibitors survive fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition in vitro. *British Journal of Nutrition*, *101*, 967–971.
- Osman, M. A., Reid, P. M., & Weber, C. W. (2002). Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: Effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry*, *78*, 419–423.
- Rayas-Duarte, P., Bergeron, D., & Nielsen, S. S. (1992). Screening of heat-stable trypsin inhibitors in dry beans and their partial purification from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*) using anhydrotrypsin-Sepharose affinity chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *40*, 32–42.
- Rouhana, A., Adler-Nissen, J., Cogan, U., & Frokiaer, H. (1996). Heat inactivation kinetics of trypsin inhibitors during high temperature-short time processing of soymilk. *Journal of Food Science*, *61*, 256–269.
- Safavi, F., & Rostami, A. (2012). Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. *Experimental Molecular Pathology*, *93*, 428–433.
- Schechter, I., & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *27*, 157–162.
- St Clair, W., Billings, P., Carew, J., Keller-McGandy, C., Newberne, P., & Kennedy, A. R. (1990). Suppression of dimethylhydrazine-induced carcinogenesis in mice by dietary addition of the Bowman-Birk protease inhibitor. *Cancer Research*, *50*, 580–586.
- Trivedi, M. V., Laurence, J. S., & Siahann, T. J. (2009). The role of thiols and disulfides on protein stability. *Current Protein & Peptide Science*, *10*, 614–625.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: Successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*, 785–799.
- Xiao, C. H., Wood, C. M., Robertson, P., & Gilani, G. S. (2012). Protease inhibitor activities and isoflavone content in commercial soymilks and soy-based infant formulas sold in Ottawa, Canada. *Journal of Food Composition and Analysis*, *25*, 130–136.
- Yavelow, J., Collins, M., Birk, Y., Troll, W., & Kennedy, A. R. (1985). Nanomolar concentrations of Bowman-Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation in vitro. *Proceedings of National Academy of Sciences, United States of America*, *82*, 5395–5399.

Bowman-Birk Inhibitors from Legumes: Utilisation in Disease Prevention and Therapy

Alfonso Clemente, Maria del Carmen Marín-Manzano,
Maria del Carmen Arques and Claire Domoney

Additional information is available at the end of the chapter

<http://dx.doi.org/10.5772/51262>

1. Introduction

Serine proteases have long been recognized as major players in a wide range of biological processes including cell signaling, cell cycle progression, digestion, immune responses, blood coagulation and wound healing. Their role in the physiology of many human diseases, ranging from cancer and inflammatory disorders to degenerative diseases, now represents an increasingly important feature of this family of enzymes. Proteases are tightly controlled through a number of different mechanisms, including regulation of gene expression, recognition of the substrate by the active site, activity regulation by small molecules, changes in cellular location, post-translational modifications, interaction with other proteins and/or through inhibition of proteolysis by protease inhibitors (PI) [1-3]. This last mechanism usually involves competition with substrates for access to the active site of the enzyme and the formation of tight inhibitory complexes. An understanding of the role played by serine proteases and their specific inhibitors in human diseases offers novel and challenging opportunities for preventive and/or therapeutic intervention [4].

Within this framework, there is a growing interest in naturally-occurring serine protease inhibitors of the Bowman-Birk family due to their potential chemopreventive and/or therapeutic properties which can impact on several human diseases, including cancer, neurodegenerative diseases and inflammatory disorders. In light of the Food and Drug Administration (FDA) approval for trials of Bowman-Birk inhibitors (BBI) concentrate (BBIC), a protein extract of soybean (*Glycine max*) enriched in BBI, as an 'Investigational New Drug', human trials have been completed in patients with benign prostatic hyperplasia [5], oral leukoplakia [6-8] and ulcerative colitis [9] (Table 1). Although, in most of these cases, the intrinsic ability of BBI to inhibit serine proteases has been related to beneficial health properties, the mechanisms of action and the identity of their therapeutic targets are

largely unknown. In this chapter, we describe the emerging evidence for the positive contribution of BBI from legumes to disease prevention and therapy.

Disease	Type of trial	Experimental design	Main results	Ref.
Benign prostatic hyperplasia	Phase I trial	Duration: 6 months. 19 patients. Daily doses up to 800 CIU ^a	Significant decrease (up to 43 %) in PSA ^b levels after treatment. Decrease of prostate volume in patients. No dose-limiting toxicity	[5]
Oral leukoplakia	Phase I trial	Duration: 1 month. 24 patients. Single daily dose: 800 CIU	BBI was well tolerated. No clinical evidence of toxicity or any adverse reaction	[6]
	Phase II trial	Duration: 1 month. 32 patients. Administration: twice daily, up to 1066 CIU	31 % of patients achieved clinical response and lesion area decreased after treatment. Dose-dependent effect. BBI was non-toxic. The positive clinical effect of BBIC could be due to the inhibition of serine proteases involved in the cleavage of neu-oncogen protein on the cell surface, preventing the release of the extracellular domain of the protein into the bloodstream	[7]
	Double-blind randomized, Placebo-controlled phase IIb trial	148 patients. Daily dose: 600 CIU	Although this study has not been completed yet, preliminary results suggest that BBIC is not fully effective in patients	[8]
Ulcerative colitis	A randomized, double blind, placebo-controlled trial	12 weeks of therapy. 28 patients. Daily dose: 800 CIU	BBIC might be associated with the regression of disease without apparent toxicity or adverse side effects	[9]

^aCIU: chymotrypsin inhibitory units; ^bPSA: prostate specific antigen

Table 1. Clinical trials utilizing a protein extract of soybean enriched in Bowman-Birk inhibitors (BBIC)

2. The Bowman-Birk family

2.1. Sources and occurrence

Plant PI can be categorized into at least 12 different families with 10 of these targeting serine proteases and adopting the standard mechanism of inhibition [10]. Members of the

Bowman-Birk family are canonical serine PI of low molecular weight, being particularly abundant in legume seeds. Soybean BBI represent the most extensively studied members of the Bowman-Birk family, but related BBI from other dicotyledonous legumes [including chickpea (*Cicer arietinum*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), lentil (*Lens culinaris*) and pea (*Pisum sativum*)] and from monocotyledonous grasses (*Poaceae*) [including wheat (*Triticum aestivum*), rice (*Oryza sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*) species], have been identified and characterized.

The BBI that are expressed in seeds are the products of multi-gene families. Several isoforms have been identified in seeds of individual species [11, 12]. The expression of distinct genes, together with the post-translational modifications of primary gene products, combine to give rise to the array of BBI-like variants described for many legume species. Variants in overall and active site sequences, size, functional properties and spatial pattern of expression have been described [13]. As a result, qualitative and quantitative differences in protease inhibitory activities have been shown in comparisons of pea genotypes [14, 15]. The close linkage of the genes encoding BBI, demonstrated for a number of legume species [16], allows the development of near-isolines having distinct haplotypes. In pea, the co-segregation of quantitative and qualitative variation has been used to develop a series of near-isolines, which have allowed the biological significance of a five-fold variation in seed protease inhibitory activity to be investigated at the level of ileal digestibility [17, 18]. These lines now facilitate related studies on the positive contribution of seed BBI to the prevention of disease states.

The occurrence of BBI in soy foods (soymilk, soy infant formula, defatted soy meal, oilcake, tofu, soybean protein isolate and soybean protein concentrate, among others) is noteworthy, where BBI may be present in different amounts. The soy varieties used, the products themselves and the technological processes used in their preparations all contribute to variation in BBI concentration. In order to quantify BBI in soy foods, enzymatic and immunological methods have been developed; however, no comprehensive information on the concentration of BBI in soy foods is available currently. Recently, Hernández-Ledesma *et al.* [19] reported BBI concentrations in 12 soymilk samples ranging from 7.2 to 55.9 mg BBI/100 mL of soymilk, while BBI was not detected in a soy-based infant formula. BBI was also reported in tofu samples, with concentrations ranging between 2.9 and 12.4 mg/100 g product. Since BBI could not be detected in natto and miso samples, it may be assumed that BBI were degraded during the fermentation process.

2.2. Inhibitory properties

The inhibitory activity of BBI is due to the formation of stable complexes between the inhibitor and target proteases. The conformation of the reactive site loop is complementary to the active site of the protease inhibited and allows BBI to bind tightly to proteases in a substrate-like manner [20, 21]; the resulting non-covalent complex renders the target

protease inactive. Upon complex formation, BBI may be cleaved very slowly (low K_{cat}). In legumes, the enzyme inhibitory activity is associated with two subdomains of the BBI, located at opposite sides of the molecule; each canonical loop is contained within a nonapeptide region joined via a disulphide bond between flanking cysteine residues. The double-headed BBI have a characteristic highly conserved array of intra-molecular disulphide bridges occurring among 14 Cys residues [22]. The two binding loops can each inhibit independently and simultaneously an enzyme molecule, which may be the same or distinct types of enzyme [13]. The specificity of each reactive site is determined by the identity of the amino acid residue in position P_1 [23]. In double-headed BBI, the first active site is usually involved in trypsin inhibition, with the P_1 position being occupied by Arg or Lys. The presence of an Ala residue at the P_1 position has been reported to be associated with inhibition of elastase [24]. Chymotrypsin is often the target of the second inhibitory domain as it has a hydrophobic amino acid in its P_1 position [13, 25]. Additional residues adjacent to the reactive site peptide bond (P_1 - P_1') can have a significant effect on the affinity of BBI for particular protease targets [13]. BBI from legumes include potent inhibitors of both trypsin and chymotrypsin, with K_i values within the nanomolar range reported for different members, including soybean [26], pea [27, 28], lentil [29, 30] and lupin (*Lupinus albus*) BBI [31].

3. Bioavailability and metabolism of BBI

In order to exert any local or systemic health benefits, dietary BBI must resist degradation and maintain biological activity, at least to some extent, after food processing and further passage through the gastrointestinal tract (GIT) [22]. BBI from several legume sources have been shown to resist thermal treatment (up to 100 °C), under either neutral or acidic conditions [32]. Most of the heat-resistant trypsin inhibitory activity in processed legumes is attributable to BBI. At temperatures of 80 °C or lower, chickpea BBI were found to be stable and their inhibitory activities to be unaffected by thermal treatment [33]. Soybean BBI do not lose activity at pH values as low as 1.5 in the presence of pepsin at 37 °C for 2 h [34]; these proteins are also stable to both the acidic conditions and the action of digestive enzymes under simulated gastric and intestinal digestion [35]. Such stability is associated with the rigid structure provided by the seven intra-molecular disulphide bridges that maintain the structural and functional features of the binding sites by adding covalent attachment to the inhibitor core [10, 36]. BBI are fully inactivated by autoclaving or reduction of their disulphide bridges followed by alkylation of the cysteinyl sulphhydryl groups [26].

The resistance of BBI to extreme conditions within the GIT may favour the transport of biologically active BBI across the gut epithelium and could allow their distribution to target organs or tissues in order to exert their beneficial effects locally. The uptake and distribution of soybean BBI, following oral administration, has been examined in rodents. By using [125 I] BBI, it was demonstrated that BBI becomes widely distributed in

mice 3 h after oral administration [37]. Labelled BBI was detected in the luminal contents of the small and large intestine; analysis of tissue homogenates revealed also the presence of active BBI in internal organs where soybean BBI have been shown to exert anti-carcinogenic effects (see next section). By using inverted sacs from different sections of the small intestine, it was demonstrated that active BBI could be transported effectively across the gut epithelium. It has been shown that soybean BBI have a serum half-life of 10 h in rats and hamsters, and are excreted in urine and faeces [38]. In humans, BBI are taken up rapidly and can be detected in the urine within 24-48 h [6]. These findings suggest that BBI are absorbed after oral administration and can reach several tissues and organs.

BBI have potential health-promoting properties within the GIT [22]. *In vivo* studies have demonstrated the presence of active BBI in the small intestine. Hajós *et al.* [39] reported the survival (~ 5 % of total ingested) of soybean BBI in an immunological reactive form in the small intestine of rats; unfortunately, the inhibitory activities of BBI were not evaluated in these experiments. More recently, it has been demonstrated that BBI from chickpea seeds can resist both acidic conditions and the action of digestive enzymes, and transit through the stomach and small intestine of pigs, generally held as a suitable model for human digestive physiology [40]. The presence of active BBI (5-8 % of the total ingested BBI) at the terminal ileum revealed the resistance of at least some, or a significant proportion, of these proteins to the extreme conditions of the GIT *in vivo*. Chromatographic, electrophoretic and enzymatic data obtained from ileal samples suggested that most of the BBI activity is derived from a protein core containing the two binding domains, and resistant to proteolysis. *In vitro* incubation studies of soybean BBI with mixed fecal samples of pigs showed that BBI remained active and their intrinsic ability to inhibit serine proteases was not significantly affected by the enzymatic or metabolic activity of fecal microbiota [41]. All of these results are significant to investigations of the potential uses of BBI in preventive or therapeutic medicine.

4. Chemopreventive properties of Bowman-Birk inhibitors

Chemoprevention is the use of natural agents or synthetic drugs to halt or reverse the carcinogenesis process before the emergence of invasive cancer. The fact that certain dietary constituents can exert chemopreventive properties has major public health implications and the widespread, long-term use of such compounds should be promoted in populations at normal risk, based on understanding the scientific basis of their beneficial effects. In particular, BBI have been linked to a possible protective effect against both inflammatory disorders and cancer development (Table 2).

4.1. Colorectal cancer

Nutritional intervention and/or dietary manipulation have been suggested as key strategies to prevent and/or control colorectal carcinogenesis [42, 43], one of the major causes of

cancer-related mortality worldwide in both men and women [44]. There is now robust preclinical evidence to suggest that dietary BBI from several legume sources can prevent or suppress cancer development and associated inflammatory disorders within the GIT [22]. Soybean BBI have been reported to be effective at concentrations as low as 10 mg/100 g diet, in reducing the incidence and frequency of colorectal tumors, in studies based on the dimethylhydrazine (DMH) rat model, where no adverse effect of BBI was documented for animal growth or organ physiology [45]. When the inhibitory activity of BBI is abolished, any suppressive effect on colorectal tumor development disappears, suggesting that the inhibitory properties of BBI against serine proteases may be required for their reported chemopreventive properties. Proteases play a critical role in tumorigenesis, where their activities become dysregulated in colorectal cancer and neoplastic polyps [46]. In particular, serine proteases are key players in several biological functions linked to tumor development, including cell growth (dys)regulation and cell invasion as well as angiogenesis and inflammatory disorders. Some of these proteases have been reported as promising cancer biomarkers [47-49] (Table 3). An understanding of the role played by specific serine proteases in the biological processes associated with disease may suggest modes of therapeutic intervention [1, 50]. Successful examples of therapeutic intervention using PI include ubiquitin-proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma [51]. The ubiquitin-proteasome pathway is essential for most cellular processes, including protein quality control, cell cycle, transcription, signalling pathways, protein transport, DNA repair and stress responses [52]. Inhibition of proteasome activity leads to accumulation of poly-ubiquitinated and misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and eventually apoptosis. Although soybean BBI has been demonstrated to inhibit the proteasomal activity of MCF7 breast cancer cells (see section 4.4), the proteasomal inhibition in colon cancer cells need to be unambiguously demonstrated. Another potential therapeutic target of BBI is matriptase (also known as MT-SP1 or epithin), an epithelial-specific member of the type II transmembrane serine protease family, which plays a critical role in differentiation and function of the epidermis, gastrointestinal epithelium and other epithelial tissues. Several studies suggest that matriptase is over-expressed in a wide variety of malignant tumors including prostate, ovarian, uterine, colon, epithelial-type mesothelioma and cervical cell carcinoma [53]. It has been proposed to have multiple functions, acting as a potential activator of critical molecules associated with tumor invasion and metastasis. MT-SP1 contributes to the upstream activation of tumor growth and its progression through the selective degradation of extracellular matrix proteins and activation of cellular regulatory proteins, such as urokinase-type plasminogen activator, hepatocyte-growth factor/scatter factor and protease-activated receptor [54]. Although the ability of soybean BBI to inhibit a secreted form of recombinant MT-SP1 has been demonstrated [55], the clinical relevance of such inhibition has not been proven yet. The validation of specific serine proteases as BBI targets, together with the identification of natural BBI variants, and the design of specific potent inhibitors of these proteases, will contribute to the assessment of BBI as colorectal chemopreventive agents for preventive and/or therapeutic medicine [22].

Cancer type	BBI source	Carcinogen	Model system	Effect and/or mechanisms of action	Refs.
Colorectal	Soybean	DMH ^a	Colon carcinogenesis in rodents	Reduction of incidence and frequency of tumors likely via protease inhibition	[45]
	Soybean	DMH	Mouse colon and anal inflammation	Suppression of adenomatous tumors of the GIT	[56]
	Soybean	DSS ^b	Mouse colon inflammation	Suppression of histological inflammation parameters, lower mortality rate and delayed onset of mortality	[57]
	Horsegram	DMH	Colorectal carcinogenesis	Protective role against inflammation and pre-neoplastic lesions	[58]
	Lentil	-	Colon cancer cells	Proliferation of HT29 colon cancer cells was decreased (IC ₅₀ = 32 μM), whereas the non-malignant fibroblastic CCD18Co cells were unaffected	[30]
	Pea	-	Colon cancer cells	The anti-proliferative effect of BBI in colon cancer cells are demonstrated	[15]
	Soybean	-	Colon cancer cells	Time- and concentration-dependent anti-proliferative effect on HT29 cells, arrest at G ₀ -G ₁ phase; trypsin- and chymotrypsin-like proteases are potential targets	[26]
Gastric	Recombinant proteins	-	Colon cancer cells	rTIIb, a major BBI isoinhibitor from pea, having trypsin and chymotrypsin inhibitory activity, affected the proliferation of colon cancer cells; however, a derived inactive mutant did not show any anti-proliferative effect	[68]
	Field bean	Benzo-pyrene	Mouse stomach carcinogenesis	BBI was more effective in prevention than in therapeutic treatment, with activity related to its protease inhibitory ability	[100]

Cancer type	BBI source	Carcinogen	Model system	Effect and/or mechanisms of action	Refs.
Breast	Black-eyed pea	-	Breast cancer cells	BBI induced apoptosis, cell death and lysosome membrane permeabilization	[79]
	Soybean	-	Breast cancer cells	Proteasome was reported as potential therapeutic target in MCF-7 cells	[78]
Prostate	Soybean	-	Prostate cancer cells and rat prostate carcinogenesis	BBI exerted chemopreventive activity associated with induction of connexin-43 expression and apoptosis	[76,77]
	Soybean	-	Prostate cancer xeno-grafts in nude mice	BBI and BBIC inhibited the growth of LNCaP cells	[72]
	Soybean	-	Prostate cancer cells	BBI prevented the generation of activated oxygen species and activated DNA repair through a p53-dependent mechanism	[74, 75]
Oral	Soybean	-	Oral leukoplakia	BBIC exerted a dose-dependent reduction in oral lesion size in 31% of patients without any adverse effects; modulation of protease activity and <i>neu</i> oncogene levels was observed	[6,7,69]

^aDMH: dimethylhydrazine; ^bDSS: dextran sulphate sodium

Table 2. *In vitro* and *in vivo* studies showing chemopreventive properties of Bowman-Birk inhibitors

A strong interest exists in investigating the potential of BBI as anti-inflammatory agents within the GIT. In rodents, soybean BBI treatment appears to have a potent suppressive effect on colon and anal gland inflammation, following exposure to carcinogenic agents [56], or when assessed in an acute injury/colitis model [57]. The protective effect of BBI from soybean or those from perennial horsegram (*Macrotyvola axillare*) against inflammation and development of pre-neoplastic lesions induced in the DMH mouse model was reported recently [58]. Given the lack of toxicity as well as the reported anti-inflammatory properties in animals, the potential for BBIC to benefit patients with ulcerative colitis has been evaluated. In a randomized double-blind placebo-controlled trial, a dose of 800 chymotrypsin inhibitor units (CIU) per day over a three-month treatment period was associated with a clinical response and induction of remission, as assessed by the Sutherland Disease Activity Index score [59], in patients with ulcerative colitis, without apparent toxicity [9]. Approximately 50 % of patients responded clinically and 36 % showed

remission of disease. Several mechanisms have been proposed to explain the anti-inflammatory properties of BBI. The ability of BBI to decrease the production and release of superoxide anion radicals, mediators of inflammatory processes, in purified human polymorphonuclear leukocytes [60] and in differentiated HL60 cells [59] has been reported. The decrease in superoxide radical levels may reduce free radical-induced DNA damage and transformation to malignant phenotypes. In addition, superoxide radicals can initiate a wide range of toxic oxidative reactions, including lipid peroxidation. In this regard, it has been demonstrated that BBI can reduce the content of lipid peroxides in irradiated cells *in vitro* [61], a reduction that is presumed to be linked to the anti-inflammatory activity of BBI. The role that certain serine proteases play during proteolysis in acute and chronic inflammatory processes is well recognized. The ability of soybean BBI to inhibit serine proteases involved in inflammatory processes, such as cathepsin G [62, 63], elastase [64] and mast cell chymase [64] has been reported. The last enzyme acts as a chemo-attractant and may play a role in the accumulation of inflammatory cells during development of allergic and non-allergic diseases [65]. The interaction of chymase and BBI may impact on other processes involved in anti-inflammatory responses, such as the regulation of collagenase [66] and interleukin 1 β (IL-1 β) [67]. Nevertheless, a clear correlation between the inhibition of these serine proteases and the anti-inflammatory properties associated with soybean BBI has not been demonstrated clearly [22].

Serine protease	Function	Pathological process	Refs.
Tryptase	Phagocytosis, degradation of ECM ^a compounds, regulation of inflammatory responses, blood coagulation	Atherosclerosis, asthma, inflammatory disorders	[97, 98]
Cathepsin G	ECM degradation, migration, regulation of inflammatory disorders	Inflammation, metastasis	[62]
Matriptase	Matrix degradation, regulation of intestinal barrier, iron metabolism	Pathogenesis of epithelial tissues, tumor growth and progression	[55]
Human elastase	Pathogen killing, ECM degradation, inflammatory disorders	Pulmonary disease, inflammation	[62, 99]
Chymase	Degradation of ECM compounds, regulation of inflammatory responses	Inflammation, asthma, gastric cancer	[64]
Proteasome	Protein degradation, cell proliferation, differentiation, angiogenesis and apoptosis	Carcinogenesis, inflammation, neurodegeneration	[58, 78]

^aECM: extracellular matrix

Table 3. Serine proteases involved in pathological processes as potential therapeutic targets of soybean BBI and related proteins (adapted from Clemente et al., 2011 [22]).

In previous studies, a significant concentration- and time-dependent decrease in the growth of an array of colon cancer cells (HT29, Caco2, LoVo) has been demonstrated *in vitro*, following treatment with BBI variants from several legume sources, including pea, lentil and soybean; in contrast, the growth of non-malignant colonic fibroblastic CCD18-Co cells was unaffected by BBI [15, 26, 30]. Recently, the anti-proliferative effect of rTIIB, a major pea iso inhibitor expressed heterologously in *Pichia pastoris*, has been evaluated using colon cancer cells grown *in vitro*. Comparisons of the effects of rTIIB with those observed using a related synthetic mutant derivative, showed that the proliferation of HT29 colon cancer cells was inhibited significantly by rTIIB in a dose-dependent manner, whereas the mutant which lacked trypsin and chymotrypsin inhibitory activity did not show any significant effect on colon cancer cell growth (Figure 1) [68]. Although the molecular mechanism(s) of this chemopreventive activity remains unknown, the reported data indicate that both trypsin- and chymotrypsin-like serine proteases involved in carcinogenesis are likely primary targets for BBI.

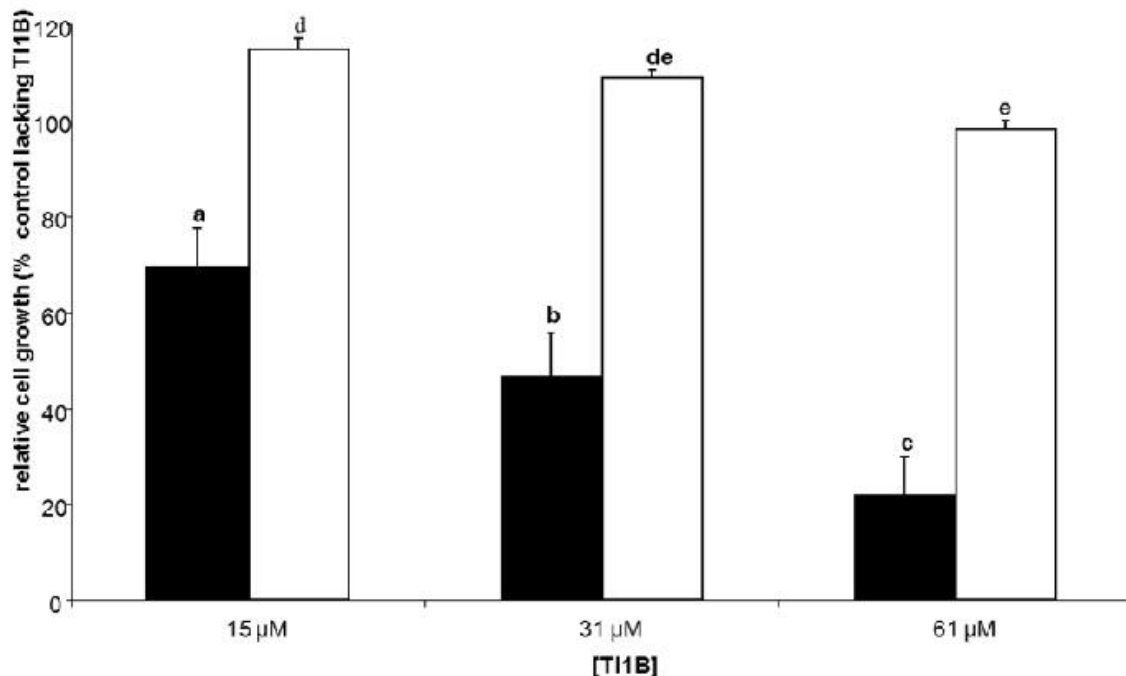


Figure 1. Dose–response effects of rTIIB (closed bars), a major pea iso inhibitor expressed in *Pichia pastoris*, and the corresponding inactive mutant (open bars), having amino acid substitutions at the P₁ positions in the two inhibitory domains, on the *in vitro* growth of HT29 human colorectal adenocarcinoma cells. Growth media were supplemented with rTIIB in the concentration range 15–61 μM and cells harvested after a period of 96 h. Data are means of at least three independent experiments, each having four technical replicates; bars represent standard deviations. Means not sharing superscript letters differ significantly ($p < 0.05$; Bonferroni’s test) (Adapted from Clemente et al., (2012) [68]).

4.2. Oral leukoplakia

Leukoplakia in the oral cavity is considered a suitable model for the study of chemoprevention because the precancerous lesions are readily accessible to visual

examination, diagnostic sampling and evaluation of response to treatment. In a Phase I clinical trial, no clinical evidence of toxicity or any adverse effect was apparent when BBIC was administered as a single oral dose of up to 800 CIU to twenty-four patients with oral leukoplakia over one month-period [6]. The study revealed that BBIC was well-tolerated and no allergic reactions, gastrointestinal side-effects or other clinical symptoms were elicited. In a non-randomized phase IIa clinical trial, treatment with BBIC for one month resulted in a dose-dependent reduction in oral lesion size in 31% of patients [7]. The positive clinical effect of BBIC was associated with modulation of protease activity and *neu* oncogene levels (as the surrogate endpoint biomarker for the trial) in exfoliated oral mucosal cells [7, 69]; however, this evidence is indirect and the specific target proteases inhibited were not reported. A recent phase IIb randomized, double-blind, placebo-controlled trial involving patient treatment with BBIC for six months was performed. Even though this multi-institutional study has not been completed yet, BBIC does not seem to be fully effective as chemopreventive agent for the management of oral leukoplakia [8].

4.3. Prostate cancer

Prostate cancer is the second most frequently diagnosed cancer in men although the incidence of cancer varies greatly throughout the world. Dietary habits and lifestyle have been identified as major risk factors in prostate cancer growth and progression, suggesting that prostate cancer might be preventable [70]. Epidemiological studies have shown an inverse association between soy intake and the risk of developing prostate cancer [71]. Preclinical and clinical studies have shown the potential chemopreventive properties of BBI in prostate cancer. Purified soybean BBI and BBIC have been shown to inhibit the growth of LNCaP human prostate cancer xenografts in nude mice [72], and to decrease the growth, invasion and clonogenic survival of several human prostate cancer cells [73]. The effectiveness of soybean BBI in preventing the generation of activated oxygen species in prostate cancer cells [74] and in activating DNA repair through a p53-dependent mechanism has been reported [75]. More recently, BBIC has prevented the growth of prostate tumors in transgenic rats developing adenocarcinoma, most likely as a consequence of its anti-proliferative activity via induction of connexin 43 expression [76, 77]. In humans, a double-blind, randomized, phase I trial was carried out in nineteen male subjects with benign prostatic hyperplasia, which is a precursor condition for prostate cancer, and lower urinary tract symptoms [5]. In this study, the authors demonstrated that BBIC treatment for six months reduced levels of prostate-specific antigen (PSA), a clinical marker for prostate cancer, and prostate volume in patients. Additional clinical studies will be necessary to determine the potential of BBIC as prostate cancer chemopreventive agent.

4.4. Breast cancer

Breast cancer is one of the most frequent cancer types and is responsible for the highest mortality rate among women. Novel complementary strategies, including chemoprevention, have been suggested. As ^{125}I -BBI, when orally administered in rodents, has been

demonstrated in the bloodstream and distributed through the body [37-38], its chemopreventive properties could occur in breast tissue. *In vitro* studies have reported the potential of BBI as chemopreventive agents in breast cancer. Soybean BBI has been shown to inhibit, specifically and potently, the chymotrypsin-like proteasomal activity in MCF7 breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [78]. The proteasomal inhibition was associated with an accumulation of ubiquitinated proteins and the proteasome substrates, p21^{Cip1/WAF1} and p27^{Kip1}; a down-regulation of cyclin D1 and E was also observed. These authors suggested that soybean BBI abates proteasome function and, dependent on dose and time, up-regulates MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), which in turn suppresses phosphorylation coupled to extracellular signal-related kinase activity in MCF7 treated cells. The ability of soybean BBI to inhibit the proteasomal chymotrypsin-like activity in intact MCF7 cells suggests that the protease inhibitor can penetrate cells and facilitate the inhibition of intracellular target proteases. Recent findings have demonstrated that BBI from black-eye pea (*Vigna unguiculata*) induced apoptotic cell death in MCF7 breast cancer cells associated with severe cell morphological alterations, including the alteration of the nuclear morphology, plasma membrane fragmentation, cytoplasm disorganization, presence of double-membrane vesicles, mitochondrial swelling and lysosome membrane permeabilization [79].

4.5. Radioprotection

Radiotherapy is used in the treatment of a broad range of malignant tumors with the aim to inflict maximal damage on the tumor tissue. Exposure of surrounding normal tissue to therapeutic radiation should be minimized to avoid side effects that can have a significant impact on general status and quality of life of patients. The use of radioprotective agents to reduce the damage in normal tissue may improve the therapeutic benefit of radiotherapy. The radioprotective properties of BBI have been tested on cell cultures; so far, no data regarding efficacy in humans are available. Soybean BBI have shown potent and selective radioprotection of normal tissue *in vitro* [80] and *in vivo* [81], without protecting tumor tissue. Dittmann *et al.* [81] showed that soybean BBI increased clonogenic survival after irradiation only in cells, either normal or transformed, having a wild-type *p53* tumor suppressor gene. In a cell line with inducible expression of mutated *p53*, the radioprotective effect of BBI was only detected when the expression of the mutated *p53* was switched off [75]. The activation of the DNA-repair machinery, induced by pre-treatment of fibroblastic cells with soybean BBI, suggests a possible BBI-mediated *p53*-dependent mechanism for radioprotection [82, 83]. Since a high number of tumors have lost *p53* function during their development, the clinical application of BBI to protect normal tissue from radiation damage would effectively improve the therapeutic outcome of radiotherapy.

The involvement of BBI in radiation-induced signaling cascades, and their role in stabilizing a specific tyrosine phosphatase that interferes with the activation of an epidermal growth factor receptor in response to radiation exposure, could be responsible for such protection [84]. Experiments carried out with linear forms of BBI demonstrated that the secondary structure of BBI, required for the protease inhibitory activity, was not necessary for its

radioprotective properties [85]. The radioprotective effect of soybean BBI was mainly associated with the chymotrypsin inhibitory site [86] and could be mimicked using a synthetic linearized nonapeptide (CALSYPAQC), corresponding to the active site for chymotrypsin inhibition, but lacking protease inhibitor activity [85]. These observations provide opportunities for the use of synthetic peptides for protecting against ionizing radiation. BBI, when applied topically, once a day for 5 days, to SKH-1 hairless mice with a high risk of developing UV-induced skin tumors, inhibited the formation and growth of skin tumors [85]. In addition, topical application of nondenatured soymilk, once a day for a period of five days prior to UV irradiation, to mini-swine skin reduced or completely eliminated UV-induced formation of thymine dimers and apoptotic cells. Finally, BBIC appears to play a radioprotective role in radiation-induced cataract formation reducing the prevalence and severity of the lens opacifications in mice exposed to high-energy protons [88].

5. Beneficial properties of Bowman-Birk inhibitors in non-related cancer diseases

The loss of muscle protein due to inactivity, disease or aging is a process known as muscular atrophy or wasting. Skeletal muscular atrophy in response to disuse involves both a decrease in protein synthesis and increased protein degradation, predisposing humans to undergo a substantial loss of muscle mass. In connection with this, complex proteolytic cascades may provide a mechanism for the initiation of protein degradation during atrophy. Dietary intervention suggests possible therapeutic strategies *via* protease inhibition to diminish muscular atrophy and loss of strength following unloading. Skeletal muscular atrophy can be reproduced experimentally in rodents by hind-limb unloading. Dietary supplementation containing 1% BBIC has been reported to inhibit unloading-induced weakness in mice [89], promoting redox homeostasis in muscle fibers and blunting atrophy-induced weakness [90]. Morris *et al.* [89] suggested that inhibiting muscle degrading proteases may provide a new pharmacological strategy in treating skeletal muscular atrophy; however, such proteases remain uncharacterized. More recently, oral administration of BBIC was reported to improve muscle mass and function and to modulate pathological processes in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy (mdx mouse) [91]. Chymase, a serine protease that is released from mast cells, is involved in inflammatory processes and is susceptible to inhibition by BBI, and hence has been suggested as a BBI target in mdx mice. Additional studies are necessary to elucidate the potential therapeutic role of BBI in muscular dystrophy.

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system characterized by progressive demyelination of the brain and spinal cord. Available therapeutic treatments have only limited efficacy and show significant side effects. The search for novel therapeutic agents that can be administered orally, and act synergistically with existing therapies, would be useful for patients with MS. Purified soybean BBI and BBIC have been shown to be effective in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents, a model to study the pathogenic mechanisms of MS and to test potential therapies [92]. The oral administration of BBI in mice caused an improvement

of several disease parameters (onset, severity, weight loss, inflammation, neuronal loss and demyelination), with no apparent adverse effects [93, 94]. Interestingly, BBI ameliorated disease, even when treatment was initiated after disease onset, *via* an IL-10-dependent mechanism [94]; the molecular basis for the induction of IL-10 production by BBI remains to be elucidated. Recent studies have demonstrated that BBI is responsible for delayed onset of disease but did not stop disease development, which became similarly severe in treated mice as in control animals [95, 96]. The ability of soybean BBI to delay both inflammatory and neurodegenerative aspects of autoimmune encephalomyelitis suggests that it may be useful for treating acute MS exacerbations and neurological dysfunction.

6. Concluding remarks

In recent years, much effort has focused on clarifying the potential chemopreventive properties of BBI. Preclinical and clinical studies have clearly demonstrated that BBI uptake is well-tolerated and no side-effects were elicited. This is particularly relevant and lack of toxicity is a major consideration, given the necessity for prolonged duration of administration. Consistently, several studies have shown that serine proteases are potential BBI targets in prevention and therapy; however, these targets have not been proven thus far. The validation of specific serine proteases as BBI targets will contribute to the assessment of BBI as chemopreventive agents that may be used in preventive and/or therapeutic medicine.

Author details

Alfonso Clemente*, María del Carmen Marín-Manzano and María del Carmen Arques
*Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín,
Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Granada, Spain*

Claire Domoney

Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, UK

Acknowledgement

A.C. acknowledges support by ERDF-co-financed grants from the Spanish CICYT (AGL2010-15877AGL and AGL2011-26353). A.C. is involved in COST Action FA1005 INFOGEST on Food Digestion. C.D. acknowledges support from the European Union (Grain Legumes Integrated Project, a Framework Programme 6 project, grant no. FOOD-CT-2004-506223) and from Defra, United Kingdom (grant nos. AR0105 and AR0711).

7. References

- [1] Turk B. Targeting Proteases: Successes, Failures and Future Prospects. *Nature Reviews Drug Discovery* 2006; 5: 785-799.

* Corresponding Autor

- [2] Shen A. Allosteric Regulation of Protease Activity by Small Molecules. *Molecular Biosystems* 2010; 6: 1431-1443.
- [3] Drag M, Salvesen GS. Emerging Principles in Protease-based Drug Discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* 2010; 9: 690-701.
- [4] Deu E, Verdoes M, Bogyo M. New Approaches for Dissecting Protease Functions to Improve Probe Development and Drug Discovery. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012; 19: 9-16.
- [5] Malkowicz SB, McKenna WG, Vaughn DJ, Wan XS, Prokert KJ, Rockwell K, Marks SHF, Wein AJ, Kennedy AR. Effects of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate (BBIC) in Patients with Benign Prostatic Hyperplasia. *Prostate* 2001; 48: 16-28.
- [6] Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Atiba J, McLaren CE, Meyskens FL. Single-dose Administration of Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in Patients with Oral Leukoplakia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 43-47.
- [7] Armstrong WB, Kennedy AR, Wan XS, Taylor TH, Nguyen QA, Jensen J, Thompson W. Clinical Modulation of Oral Leukoplakia and Protease Activity by Bowman-Birk Inhibitor Concentrate in a Phase IIa Chemoprevention Trial. *Clinical Cancer Research* 2000; 6: 4684-4691.
- [8] Meyskens FL, Taylor T, Armstrong W, Kong L, Gu M, Gonzalez R, Villa M, Wong V, Garcia A, Perloff M, Kennedy A, Wan S, Ware JH, Messadi D, Lorch J, Wirth L, Jaffe Z, Goodwin J, Civantos F, Sullivan M, Reid M, Merciznu M, Jayaprakash V, Kerr AR, Le A. Phase IIb Randomized Clinical Chemoprevention Trial of a Soybean-derived Compound (Bowman-Birk Inhibitor Concentrate) for Oral Leukoplakia. *Cancer Prevention Research* 2010; 3: CN02-05.
- [9] Lichtenstein GR, Deren J, Katz S, Lewis JD, Kennedy AR, Ware JH. Bowman-Birk Inhibitor Concentrate: A Novel Therapeutic Agent for Patients with Active Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2008; 53: 175-180.
- [10] Bateman KS, James MNG. Plant Proteinase Inhibitors: Structure and Mechanism of Inhibition. *Current Protein & Peptide Science* 2011; 12: 341-347.
- [11] Domoney C, Welham T, Ellis N, Mozzanega P, Turner L. Three Classes of Proteinase Inhibitor Gene Have Distinct but Overlapping Patterns of Expression in *Pisum sativum* Plants. *Plant Molecular Biology* 2002; 48: 319-329.
- [12] De Almeida B, Garcia da Silva W, Alves M, Gonzalves E. *In silico* Characterization and Expression Analysis of the Multigene Family Encoding the Bowman-Birk Protease Inhibitor in Soybean. *Molecular Biology Reports* 2012; 39: 327-334.
- [13] Clemente A, Domoney C. Biological Significance of Polymorphism in Legume Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Family. *Current Protein & Peptide Science* 2006; 7: 201-216.
- [14] Domoney C, Welham T. Trypsin Inhibitors in *Pisum*: Variation in Amount and Pattern of Accumulation in Developing Seed. *Seed Science Research* 1992; 2: 147-154.
- [15] Clemente A, Gee JM, Johnson IT, Domoney C. Pea (*Pisum sativum* L.) Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Class Influence the Growth of Human Colorectal Adenocarcinoma HT29 Cells *in vitro*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 8979-8986.

- [16] Page D, Aubert G, Duc G, Welham T, Domoney C. Combinatorial Variation in Coding and Promoter Sequences of Genes at the *Tri* Locus in *Pisum sativum* Accounts for Variation in Trypsin Inhibitor Activity in Seeds. *Molecular Genetics and Genomics* 2002; 267: 359-369.
- [17] Wiseman J, Al-Mazooqi W, Welham T, Domoney C. The Apparent Ileal Digestibility, Determined with Young Broilers, of Amino Acids in Near-isogenic Lines of Peas (*Pisum sativum* L.) Differing in Trypsin Inhibitor Activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2003; 83: 644-651.
- [18] Wiseman J, Al-Marzooqi W, Hedley C, Wang TL, Welham T, Domoney C. The Effects of Genetic Variation at *r*, *rb* and *Tri* Loci in *Pisum sativum* L. on Apparent Ileal Digestibility of Amino Acids in Young Broilers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006; 86: 436-444.
- [19] Hernández-Ledesma B, Hsieh CC, de Lumen BO. Lunasin and Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI) in US Commercial Soy Foods. *Food Chemistry* 2009; 115: 574-580.
- [20] Bode W, Huber R. Natural Protein Proteinase-Inhibitors and their Interaction with Proteinases. *European Journal of Biochemistry* 1992; 204: 433-451.
- [21] Chen P, Rose J, Love R, Wei CH, Wang BC. Reactive Sites of an Anticarcinogenic Bowman-Birk Proteinase Inhibitor are Similar to Other Trypsin Inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 1990-1994.
- [22] Clemente A, Sonnante G, Domoney C. Bowman-Birk Inhibitors from Legumes on Human Gastrointestinal Health: Current Status and Perspectives. *Current Protein & Peptide Science* 2011; 12: 358-373.
- [23] Schechter I, Berger A. On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1967; 27: 157-162.
- [24] Rocco M, Marloni L, Chambery A, Poerio E, Parente A, Di Maro A. A Bowman-Birk Inhibitor with Anti-elastase Activity from *Lathyrus sativus* L. Seeds. *Molecular Biosystems* 2011; 7: 2500-2507.
- [25] Piergiovanni AR, Galasso I. Polymorphism of Trypsin and Chymotrypsin Binding Loops in Bowman-Birk Inhibitors from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 2004; 166: 1525-1531.
- [26] Clemente A, Moreno J, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Domoney C. The Cytotoxic Effect of Bowman-Birk Isoinhibitors, IBB1 and IBB2, from Soybean (*Glycine max*) on HT29 Human Colorectal Cancer Cells is Related to their Intrinsic Ability to Inhibit Serine Proteases. *Molecular Nutrition & Food Research* 2010; 54: 396-405.
- [27] Ferrasson E, Quillien L, Gueguen J. Proteinase Inhibitors from Pea Seeds: Purification and Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 127-131.
- [28] Clemente A, MacKenzie DA, Jeenes DJ, Domoney C. The Effect of Variation within Inhibitory Domains on the Activity of Pea Protease Inhibitors from the Bowman-Birk Class. *Protein Expression and Purification* 2004; 36: 106-114.
- [29] Ragg EM, Galbusera V, Scarafoni A, Negri A, Tedeschi G, Consoni A, Sessa F, Duranti M. Inhibitory Properties and Solution Structure of a Potent Bowman-Birk Protease Inhibitor from Lentil (*Lens culinaris*, L.) Seeds. *FEBS Journal* 2006; 273: 4024-4039.

- [30] Caccialupi P, Ceci LR, Siciliano RA, Pignone D, Clemente A, Sonnante G. Bowman-Birk Inhibitors in Lentil: Heterologous Expression, Functional Characterisation and Anti-proliferative Properties in Human Colon Cancer Cells. *Food Chemistry* 2010; 120: 1058-1066.
- [31] Scarafoni A, Consonni A, Galbusera V, Negri A, Tedeshi G, Rasmussen P, Magni C, Duranti M. Identification and Characterization of a Bowman-Birk Inhibitor Active Towards Trypsin but not Chymotrypsin in *Lupinus albus* Seeds. *Phytochemistry* 2008; 69: 1820-1825.
- [32] Osman MA, Reid PM, Weber CW. Thermal Inactivation of Tepary Bean (*Phaseolus acutifolius*), Soybean and Lima Bean Protease Inhibitors: Effect of Acidic and Basic pH. *Food Chemistry* 2002; 78: 419-423.
- [33] Clemente A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Pedroche J, Bautista J, Millán F. Factors Affecting the *in vitro* Protein Digestibility of Chickpea Albumins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 79-84.
- [34] Weder JK. Inhibition of Human Proteinases by Grain Legumes. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1986; 199: 239-279.
- [35] Park JH, Jeong HJ, Lumen BOD. *In Vitro* Digestibility of the Cancer-Preventive Soy Peptides Lunasin and BBI. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 10703-10706.
- [36] Trivedi MV, Laurence JS, Siahann TJ. The Role of Thiols and Disulfides on Protein Stability. *Current Protein & Peptide Science* 2009; 10: 614-625.
- [37] Billings PC, St Clair WH, Maki PA, Kennedy AR. Distribution of the Bowman-Birk Protease Inhibitor in Mice Following Oral Administration. *Cancer Letters* 1992; 62: 191-197.
- [38] Kennedy AR. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics* 1998; 78: 167-209.
- [39] Hajós G, Gelencser E, Pustzai A, Grant G, Sakhri M, Bardocz S. Biological Effects and Survival of Trypsin Inhibitors and the Agglutinin from Soybean in the Small Intestine of the Rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43: 165-170.
- [40] Clemente A, Jiménez E, Marín-Manzano MC, Rubio LA. Active Bowman-Birk Inhibitors Survive Gastrointestinal Digestion at the Terminal Ileum of Pigs fed Chickpea-Based Diets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2008; 88: 513-521.
- [41] Marín-Manzano MC, Ruiz R, Jiménez E, Rubio LA, Clemente A. Anti-carcinogenic Soyabean Bowman-Birk Inhibitors Survive Fermentation in their Active Form and do not Affect the Microbiota Composition *In Vitro*. *The British Journal of Nutrition* 2009; 101: 967-971.
- [42] Reddy BS. Novel Approaches in the Prevention of Colon Cancer by Nutritional Manipulation and Chemoprevention. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 239-247.
- [43] Pan MH, Lai CS, Wu JC, Ho CT. Molecular Mechanisms for Chemoprevention of Colorectal Cancer by Natural Dietary Compounds. *Molecular Nutrition & Food Research* 2011; 55: 32-45.

- [44] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao YP, Xu JQ, Thun MJ. Cancer Statistics, 2009. *Cancer Journal for Clinicians* 2009; 59: 225-249.
- [45] Kennedy AR, Billings OC, Wan XS, Newberne PM. Effects of Bowman-Birk Inhibitor on Rat Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* 2002; 43: 174-186.
- [46] Chan AT, Baba Y, Sima K, Nosho K, Chung DC, Hung KE, Mahmood U, Madden K, Poss K, Ranieri A, Shue D, Kucherlapati R, Fuch CS, Ogino S. Cathepsin B Expression and Survival in Colon Cancer: Implications for Molecular Detection of Neoplasia. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2010; 19: 2777-2785.
- [47] Weldon S, McNally P, McElvaney NG, Elborn JS, McAuley DF, Wartelle J, Belaouaj A, Levine RJ, Taggart CC. Decrease Levels of Secretory Leukoprotease Inhibitor in the *Pseudomonas*-Infected Cystic Fibrosis Lung are Due to Neutrophil Elastase Degradation. *Journal of Immunology* 2009; 183: 8148-8156.
- [48] Inoue Y, Yokobori T, Yokoe T, Toiyama Y, Miki C, Mimori K, Mori M, Kusunoki M. Clinical Significance of Human Kallikrein7 Gene Expression in Colorectal Cancer. *The Annals of Surgical Oncology* 2010; 17: 3037-3042.
- [49] Petraki C, Dubinski W, Scorilas A, Saleh C, Pasic MD, Komborozo V, Khalil B, Gabril MY, Streutker C, Diamandis EP, Yousef GM. Evaluation and Prognostic Significance of Human Tissue Kallikrein-related Peptidase 6 (KLK6) in Colorectal Cancer. *Pathology Research and Practice* 2012; 208: 104-108.
- [50] Scott CJ, Taggart CC. Biologic Protease Inhibitors as Novel Therapeutic Agents. *Biochimie* 2010; 92: 1681-1688.
- [51] Wu WKK, Cho CH, Lee CW, Wu K, Fan D, Yu J, Sung JY. Proteasome Inhibition: a New Therapeutic Strategy to Cancer Treatment. *Cancer Letters* 2010; 293: 15-22.
- [52] Latonen L, Moore HM, Bai B, Jaamaa S, Laiho M. Proteasome Inhibitors Induce Nucleolar Aggregation of Proteasome Target Proteins and Polyadenylated RNA by Altering Ubiquitin Availability. *Oncogene* 2011; 30: 790-805.
- [53] Bugge TH, Antalis TM, Wu Q. Type II Transmembrane Serine Proteases. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 23177-23181.
- [54] Lee SL, Dickson RB, Lin CY. Activation of Hepatocyte Growth Factor and Urokinase/Plasminogen Activator by Matriptase, an Epithelial Membrane Serine Protease. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 36720-36725.
- [55] Yamasaki Y, Satomi S, Murai N, Tsuzuki S, Fushiki T. Inhibition of Membrane-Type Serine Protease 1/Matriptase by Natural and Synthetic Protease Inhibitors. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 2003; 49: 27-32.
- [56] Billings PC, Newberne P, Kennedy AR. Protease Inhibitor Suppression of Colon and Anal Gland Carcinogenesis Induced by Dimethylhydrazine. *Carcinogenesis* 1990; 11: 1083-1086.
- [57] Ware HW, Wan S, Newberne P, Kennedy AR. Bowman-Birk Concentrate Reduces Colon Inflammation in Mice with Dextran Sulphate Sodium-Induced Ulcerative Colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 1999; 44: 986-990.
- [58] de Paula A, de Abreu P, Santos KT, Guerra R, Martins C, Castro-Borges W, Guerra MH. Bowman-Birk Inhibitors, Proteasome Peptidase Activities and Colorectal Pre-neoplasias

- Induced by 1,2-dimethylhydrazine in Swiss Mice. *Food and Chemical Toxicology* 2012; 50: 1405-1412.
- [59] Sutherland LR, Martin F, Greer S, Robinson M, Greenberger N, Saibil F, Martin T, Sparr J, Prokipchuck E, Borgen L. 5-aminosalicylic Acid Enema in the Treatment of Distal Ulcerative Colitis, Proctosigmoiditis and Proctitis. *Gastroenterology* 1987; 92: 1894-1898.
- [60] Frenkel K, Chranzan K, Ryan CA, Wiesner R, Troll W. Chymotrypsin-specific Protease Inhibitors Decrease H₂O₂ Formation by Activated Human Polymorphonuclear Leukocytes. *Carcinogenesis* 1987; 8: 1207-1212.
- [61] Baturay NZ, Roque H. *In vitro* Reduction of Peroxidation in UVC Irradiated Cell Cultures by Concurrent Exposure with Bowman-Birk Protease Inhibitor. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 1991; 11: 195-202.
- [62] Larionova NI, Gladysheva IP, Tikhonova TV, Kazanskaya NF. Inhibition of Cathepsin G and Human Granulocyte Elastase by Multiple Forms of Bowman-Birk Type Soybean Inhibitor. *Biochemistry-Moscow* 1993; 58: 1046-1052.
- [63] Gladysheva IP, Zamolodchikova TS, Sokolova EA, Larionova NI. Interaction Between Duodenase, a Proteinase with Dual Specificity, and Soybean Inhibitors of Bowman-Birk and Kunitz Type. *Biochemistry-Moscow* 1999; 64: 1244-1249.
- [64] Ware JH, Wan XS, Rubin H, Schechter NM, Kennedy AR. Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor is a Highly Effective Inhibitor of Human Mast Cell Chymase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997; 344: 133-138.
- [65] Tani K, Ogushi K, Kido H, Kawano T, Kumori Y, Kamikura T, Cui P, Sone S. Chymase is a Potent Chemoattractant for Human Monocytes and Neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2000; 67: 585-589.
- [66] Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of Human Interstitial Procollagenase through Direct Cleavage of the Leu83- Thr84 Bond by Mast Cell Chymase. *Journal of Biological Chemistry* 1994; 269: 18134-18140.
- [67] Mizutani H, Schechter NM, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and Specific Conversion of Precursor Interleukin 1beta (IL-beta) to an Active IL-1 Species by Human Mast Cell Chymase. *Journal of Experimental Medicine* 1991; 174: 821-825.
- [68] Clemente A, Marín-Manzano MC, Jiménez E, Arques MC, Domoney C. The Anti-proliferative Effects of TIIB, a Major Bowman-Birk isoinhibitor from Pea (*Pisum sativum* L), on HT29 Colon Cancer Cells are Mediated Through Protease Inhibition. *The British Journal of Nutrition* 2012 (doi.10.1017/S000711451200075X).
- [69] Wan XS, Meyskens FL, Armstrong WB, Taylor TH, Kennedy AR. Relationship Between Protease Activity and *neu* Oncogene Expression in Patients with Oral Leukoplakia Treated with the Bowman-Birk Inhibitor. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1999; 8: 601-608.
- [70] Shirai T. Significance of Chemoprevention for Prostate Cancer Development: Experimental *in vivo* Approaches to Chemoprevention. *Pathology International* 2008; 58: 1-6.
- [71] Yan L, Spitznagel EL. Meta-analysis of Soy Food and Risk of Prostate Cancer in Men. *International Journal of Cancer* 2005; 117: 667-669.

- [72] Wan XS, Ware JH, Zhang L, Newberne PM, Evans SM, Clark CL, Kennedy AR. Treatment with Soybean-derived Bowman Birk Inhibitor Increases Serum Prostate-specific Antigen Concentration while Suppressing Growth of Human Prostate Cancer Xenografts in Nude Mice. *Prostate* 1999b; 41: 243-252
- [73] Kennedy AR, Wan XS. Effects of the Bowman-Birk Inhibitor on Growth, Invasion, and Clonogenic Survival of Human Prostate Epithelial Cells and Prostate Cancer Cells. *Prostate* 2002; 50: 125-133.
- [74] Sun XY, Donald SP, Phang JM. Testosterone and Prostate Specific Antigen Stimulate Generation of Reactive Oxygen Species in Prostate Cancer Cells. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1775-1780.
- [75] Dittmann K, Virsik-Kopp P, Mayer C, Rave-Frank M, Rodemann HP. The Radioprotective Effect of BBI Is Associated with the Activation of DNA Repair-Relevant Genes. *International Journal of Radiation Oncology* 2003; 79: 801-808.
- [76] McCormick DL, Johnson WD, Bosland MC, Lubet RA, Steele VE. Chemoprevention of Rat Prostate Carcinogenesis by Soy Isoflavones and Bowman-Birk Inhibitor. *Nutrition and Cancer* 2007; 57: 184-193.
- [77] Tang MX, Asamoto M, Ogawa K, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, Shirai T. Induction of Apoptosis in the LNCaP Human Prostate Carcinoma Cell Line and Prostate Adenocarcinomas of SV40T Antigen Transgenic Rats by the Bowman-Birk. *Pathology International* 2009; 59: 790-796.
- [78] Chen YW, Huang SC, Lin-Shiau SY, Lin JK. Bowman-Birk Inhibitor Abates Proteasome Function and Suppresses the Proliferation of MCF7 Breast Cancer Cells Through Accumulation of MAP Kinase Phosphatase-1. *Carcinogenesis* 2005; 26: 1296-1305.
- [79] Joanitti GA, Azevedo RB, Freitas SM. Apoptosis and Lysosome Membrane Permeabilization Induction on breast Cancer Cells by an Anticarcinogenic Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds. *Cancer Letters* 2010; 293: 73-81.
- [80] Dittmann K, Löffler H, Bamberg M, Rodemann HP. Bowman-Birk Proteinase Inhibitor (BBI) Modulates Radiosensitivity and Radiation-Induced Differentiation of Human Fibroblasts in Culture. *Radiotherapy and Oncology* 1995; 34: 137-143.
- [81] Dittmann K, Toulany M, Classen J, Heinrich V, Milas L. Selective Radioprotection of Normal Tissues by Bowman-Birk Proteinase Inhibitor (BBI) in Mice. *Strahlentherapie Und Onkologie* 2005; 181: 191-196.
- [82] Dittmann KH, Gueven N, Mayer C, Ohneseit P, Zell P, Begg AC, Rodemann HP. The Presence of Wild-Type TP53 is Necessary for the Radioprotective Effect of the Bowman-Birk Proteinase Inhibitor in Normal Fibroblasts. *Radiation Research* 1998; 150: 648-655.
- [83] Dittmann K, Mayer C, Kehlbach R, Rodemann HP. The Radioprotector Bowman-Birk Proteinase Inhibitor Stimulates DNA Repair via Epidermal Growth Factor Receptor Phosphorylation and Nuclear Transport. *Radiotherapy and Oncology* 2008; 86: 375-382.
- [84] Gueven N, Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. Bowman-Birk Protease Inhibitor Reduces the Radiation-Induced Activation of the EGF Receptor and Induces Tyrosine Phosphatase Activity. *International Journal of Radiation Oncology* 1998; 73: 157-162.

- [85] Gueven N, Dittmann K, Mayer C, Rodemann HP. The Radioprotective Potential of the Bowman-Birk Protease Inhibitor is Independent of its Secondary Structure. *Cancer Letters* 1998; 125: 77-82.
- [86] Yavelow J, Collins M, Birk Y, Troll W, Kennedy AR. Nanomolar Concentrations of Bowman-Birk Soybean Protease Inhibitor Suppress X-ray Induced Transformation *In Vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985; 82: 5395-5399.
- [87] Huang MT, Xie JG, Lin CB, Kizoulis M, Seiberg M, Shapiro S, Conney A. Inhibitory Effect of Topical Applications of Non-denatured Soymilk on the Formation and Growth of UVB-Induced Skin Tumors. *Oncology Research* 2004; 14: 387-397.
- [88] Davis JG, Wan XS, Ware JH, Kennedy AR. Dietary Supplements Reduce the Cataractogenic Potential of Proton and HZE-Particle Radiation in Mice. *Radiation Research* 2010; 173: 353-361.
- [89] Morris CA, Morris LD, Kennedy AR, Sweeney HL. Attenuation of Skeletal Muscle Atrophy via Protease Inhibition. *Journal of Applied Physiology* 2005; 99: 1719-1727.
- [90] Arbogast S, Smith J, Matuszczak Y, Hardin BJ, Moylan JS, Smith JD, Ware J, Kennedy AR, Reid MB. Bowman-Birk Inhibitor Concentrate Prevents Atrophy, Weakness, and Oxidative Stress in Soleus Muscle of Hindlimb-Unloaded Mice. *Journal of Applied Physiology* 2007; 102: 956-964.
- [91] Morris CA, Selsby JT, Morris LD, Pendrak K, Sweeney HL. Bowman-Birk Inhibitor Attenuates Dystrophic Pathology in mdx Mice. *Journal of Applied Physiology* 2010; 109: 1492-1499.
- [92] Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, McCandless EE, Patel JR, Luker GD, Littmann DR, Rusell JH, Klein RS. CXCR7 Influences Leukocyte Entry into the CNS Parenchyma by Controlling Abluminal CXCL12 Abundance During Autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 2011; 208: 327-339.
- [93] Gran B, Tabibzadeh N, Martin A, Ventura ES, Ware JH, Zhang GX, Parr JL, Kennedy AR, Rostami AM. The Protease Inhibitor, Bowman-Birk inhibitor, Suppresses Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: a Potential Oral Therapy for Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis* 2006; 12: 688-697.
- [94] Touil T, Ciric B, Ventura E, Shindler KS, Gran B, Tostami A. Bowman-Birk Inhibitor Suppresses Inflammation and Neuronal Loss in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 2008; 271: 191-202.
- [95] Dai H, Ciric B, Zhang GX, Rostami A. Bowman-Birk Inhibitor Attenuates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Delaying Infiltration of Inflammatory Cells into the CNS. *Immunologic Research* 2011; 51: 145-152.
- [96] Dai H, Ciric B, Zhang GX, Rostami A. Interleukin-10 Plays a Crucial Role in Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Bowman-Birk Inhibitor. *Journal of Neuroimmunology* 2012; 245: 1-7.
- [97] Scarpi D, McBride JD, Leatherbarrow RJ. Inhibition of Human Beta-Trypsin by Bowman-Birk Inhibitor Derived Peptides: Creation of a New Tri-Functional Inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2004; 12: 6045-6052.

- [98] Muricken DG, Gowda LR Molecular Engineering of a Small Trypsin Inhibitor Based on the Binding Loop of Horsegram Seed Bowman-Birk Inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 2011; 26: 553-560.
- [99] Rocco M, Malorni L, Chambery A, Poerio E, Parente A, Di Maro A. A Bowman-Birk Inhibitor with Anti-Elastase Activity from *Lathyrus sativus* L. Seeds. *Molecular Biosystems* 2011; 7: 2500-2507.
- [100] Fernandes AO, Banerji AP. Inhibition of Benzopyrene-Induced Forestomach Tumors by Field Bean Protease Inhibitor. *Carcinogenesis* 1995; 16: 1843-1846.

The anti-proliferative effect of TI1B, a major Bowman–Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition

Alfonso Clemente^{1*}, M. Carmen Marín-Manzano¹, Elisabeth Jiménez¹, M. Carmen Arques¹ and Claire Domoney²

¹Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Professor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

²Department of Metabolic Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich NR4 7UH, UK

(Submitted 15 September 2011 – Accepted 24 October 2011)

Abstract

Bowman–Birk inhibitors (BBI) from legumes, such as soyabean, pea, lentil and chickpea, are naturally occurring plant protease inhibitors which have potential health-promoting properties within the mammalian gastrointestinal tract. BBI can survive both acidic conditions and the action of proteolytic enzymes within the stomach and small intestine, permitting significant amounts to reach the large intestine in active form to exert their reported anti-carcinogenic and anti-inflammatory properties. In a previous study, we reported the ability of a recombinant form of TI1B (rTI1B), representing a major BBI isoinhibitor from pea, to influence negatively the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells *in vitro*. In the present study, we investigate if this effect is related directly to the intrinsic ability of BBI to inhibit serine proteases. rTI1B and a novel engineered mutant, having amino acid substitutions at the P₁ positions in the two inhibitory domains, were expressed in the yeast *Pichia pastoris*. The rTI1B proved to be active against trypsin and chymotrypsin, showing K_i values at nanomolar concentrations, whereas the related mutant protein was inactive against both serine proteases. The proliferation of HT29 colon cancer cells was significantly affected by rTI1B in a dose-dependent manner (IC₅₀ = 31 (SD 7) μM), whereas the inactive mutant did not show any significant effect on colon cancer cell growth. In addition, neither recombinant protein affected the growth of non-malignant colonic fibroblast CCD-18Co cells. These findings suggest that serine proteases should be considered as important targets in investigating the potential chemopreventive role of BBI during the early stages of colorectal carcinogenesis.

Key words: Bowman–Birk inhibitors: Cell proliferation: Colorectal cancer cells: Pea: Protease inhibition: Serine proteases

Colorectal cancer has become one of the leading causes of cancer-related deaths worldwide and is currently increasing in Western countries⁽¹⁾; consequently, much attention has been focused on preventive and therapeutic strategies. The beneficial effects of certain bioactive compounds, mainly present in fruits and vegetables, in preventing and treating colorectal cancer have become a major focus of research^(2–4). Among these, Bowman–Birk inhibitors (BBI) from legumes, such as soyabean (*Glycine max*), pea (*Pisum sativum*), lentil (*Lens culinaris*) and chickpea (*Cicer arietinum*), have been shown to have potential in protecting against inflammatory disorders and cancer development within the mammalian gastrointestinal tract^(5–8). BBI are naturally occurring

protease inhibitors with the ability to inhibit specifically serine (predominantly trypsin- and chymotrypsin-like) proteases. BBI are extensively disulphide-linked within proteins and have been demonstrated to be structurally and functionally resistant to the challenges (acidic conditions and the action of proteolytic enzymes) of the gastrointestinal tract *in vivo*. The conformational rigidity of BBI linked to the number and distribution of intramolecular disulphide bonds is mostly responsible for the high stability of these proteins towards extreme conditions and helps to maintain the structural and functional features of their binding loops^(9–11). BBI transit through the stomach and small intestine without major degradation, permitting significant amounts (5–8% of

Abbreviations: BAPNA, *N*-α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide; BBI, Bowman–Birk inhibitors; BTEE, *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester; cDNA, complementary DNA; CIA, chymotrypsin inhibitor activity; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; IC₅₀, inhibitory concentration showing 50% effect; NR, neutral red; rTI1B, recombinant TI1B; TIA, trypsin inhibitor activity.

*Corresponding author: Dr A. Clemente, fax +34 958 57 27 53, email alfonso.clemente@eez.csic.es

total ingested) to reach the large intestine in active form⁽¹²⁾. In addition, the biological activity of BBI is largely unaffected by the enzymatic and metabolic activity of faecal microbiota, retaining significance as a bioactive compound in the large intestine⁽¹³⁾.

In vitro and *in vivo* studies suggest that soyabean BBI can exert a protective and/or suppressive effect on cancer development within the gastrointestinal tract. Purified soyabean BBI and BBI concentrate, a protein extract of soyabean enriched in BBI⁽¹⁴⁾, were both effective at concentrations as low as 10 mg/100 g of diet in reducing the incidence and frequency of colorectal tumours in the dimethylhydrazine rat model, without any adverse side effects documented for animal growth or organ physiology⁽⁵⁾. Autoclaved BBI concentrate, in which the serine protease inhibitory activity of BBI was abolished, did not show any significant suppressive effect on colon tumour development, suggesting that the intrinsic ability of soyabean BBI to inhibit serine proteases may be required for their colorectal chemopreventive properties. Human epithelial cell lines derived from colon carcinoma are well-established models to investigate *in vitro* the action mechanism by which dietary compounds function in a chemoprotective role during the early stages of carcinogenesis. Recent studies have demonstrated a significant concentration- and time-dependent decrease in the growth of HT29 human colon adenocarcinoma cells *in vitro*, following treatment with soyabean BBI⁽¹⁵⁾. Similar effects have been reported for BBI from other legume sources, including those from pea⁽¹⁶⁾ and lentil⁽¹⁷⁾; the IC₅₀ values (inhibitory concentration showing 50% effect) for these protease inhibitors ranged from 32 to 73 µM. Interestingly, soyabean BBI that had been chemically inactivated did not demonstrate any significant effect on the proliferation of colon cancer cells, suggesting that a native conformation is necessary for BBI to exert anti-proliferative effects on such cells⁽¹⁵⁾.

In pea, the *T11* gene class encodes BBI that are expressed predominantly within seeds. T11 is synthesised as a precursor protein of 114 amino acids, with a deduced mature peptide region of seventy-two amino acids having the ability to inhibit potently trypsin- and chymotrypsin-like proteases at the first and second inhibitory domains, respectively^(18,19). In a previous study, we reported the inhibition of the growth *in vitro* of HT29 colon adenocarcinoma cells by a recombinant form of T11 from the pea cv. Birte (rT11B)⁽¹⁶⁾. In the present study, we have evaluated the functional properties and anti-proliferative effects of rT11B, expressed heterologously in *Pichia pastoris*, on colon cancer cells. We have compared the effects of rT11B with those observed using a related mutant protein, obtained by site-directed mutagenesis of the P₁ amino acid position in both inhibitory domains of T11B. These novel data demonstrate the unambiguous relationship between the intrinsic ability of BBI to inhibit serine proteases and the associated negative effects on colon cancer cell growth, suggesting that serine proteases involved in early stages of carcinogenesis should be considered important targets in investigating the potential of BBI and related proteins as colorectal chemopreventive agents.

Experimental methods

Materials

Trypsin (type III) and α-chymotrypsin (type VII) from bovine pancreas, *N*-α-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE), high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), neutral red (NR) and additional high-grade chemicals for cell culture were obtained from Sigma. The *P. pastoris* host strain GS115 and the pPIC9 vector for expression and secretion of recombinant BBI were obtained from Invitrogen. The human colorectal adenocarcinoma HT29 and the normal colon fibroblastic CCD-18Co cell lines were supplied by the Cell Bank of the Scientific Instrumentation Centre at the University of Granada (CIC-UGR). Culture flasks and flat bottom ninety-six-well microtitre plates were purchased from Corning Costar and Nunc, respectively. All other chemicals were of analytical grade.

Growth media composition for *Pichia pastoris*

The *P. pastoris* GS115 (Invitrogen) host strain was maintained in yeast extract peptone dextrose broth (10 g yeast extract, 20 g peptone, 20 g dextrose per litre). Minimal dextrose plates (13.4 g yeast N base, 10 g glucose, 0.4 mg biotin and 15 g agar per litre) were used for the selection of putative transformants. Buffered minimal glycerol broth (13.4 g yeast N base, 0.4 mg biotin, 100 ml of 1 M-K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 6.0 and 1% glycerol) was used until cultures reached log-phase growth. Buffered minimal methanol broth (identical to buffered minimal glycerol except for 0.5% methanol instead of 1% glycerol) was used to induce expression of the recombinant proteins.

Cloning, mutagenesis and expression of T11B and derivative in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*

A sequence encoding a mature form of T11B, a major BBI identified in pea seeds *in vivo*, was amplified from a cloned complementary DNA (cDNA) (pT112-36)⁽¹⁹⁾, using specific primers (N_{pea}T11B and C_{pea}T11B) (Table 1). The N and C primers incorporated *Xho*I and *Eco*RI cleavage sites, respectively, to allow directional cloning of the amplified DNA into the pPIC9 expression vector, used for in-frame integration of the *T11* gene into the *P. pastoris* genome. The N_{pea}T11B primer was designed to encode a Kex2 processing site (Lys-Arg) followed by two Glu-Ala repeats, just before the N-terminus of T11B, in order to increase the efficiency of Kex2 cleavage; an endogenous STE13 dipeptidyl aminopeptidase is predicted to remove both Glu-Ala dipeptides to yield the final recombinant proteins. PCR conditions were an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by thirty-five cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 68°C for 1 min, and a final elongation step at 68°C for 5 min. The amplicon obtained was digested with both *Xho*I and *Eco*RI enzymes, ligated into pPIC9 vector previously digested with the same enzymes and used to transform *Escherichia coli* DH5α competent cells.

In order to obtain an inactive T11B-like protein, mutations were introduced by PCR into the active-site domains, using

Table 1. List of primers used*

Primer name	Sequence 5'-3'
N_peaT11B	GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTGGTGATGATGTCAAATC
C_peaT11B	CCTAGGGAATTCCTCAGTTCTTAATGACCTCCT
F1	GCCTTTGCACAGGATCAAACCCTCC
R1	GGAGGGTTTGATCCTGTGCAAAGGC
F2	GCATTTGTGCAGGTTCTAATCCTCC
R2	GGAGGATTAGAACCTGCACAAATGC
5'/AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
3'/AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC

* The *Xho*I and *Eco*RI cleavage sites are underlined, the Kex2 processing site encoding Lys-Arg is in bold text, the Glu-Ala repeats are italicised and the mutations are in grey boxes. 5'/AOX1 and 3'/AOX1 are the sequencing primers.

the overlap expression method⁽²⁰⁾. The cDNA encoding T11B was used as a template; the specific mutagenic primer pairs (F1-R1 and F2-R2, see Table1) were designed to introduce the amino acid Gly instead of Lys¹⁶ and Tyr⁴² at the P₁ positions of the trypsin and chymotrypsin inhibitory domains, respectively. The N_peaT11B and C_peaT11B primers were used to amplify the final PCR amplified product, which was digested with *Xho*I and *Eco*RI, ligated into pPIC9 vector and used to transform DH5 α cells as described previously. All PCR experiments were performed using a mixture of Platinum Pfx (Invitrogen) and MBL-Taq DNA polymerase (Dominion-MBL).

Plasmids containing inserts were selected with ampicillin (100 μ g/ml medium) and the sequences verified by using the 5'/AOX1 and 3'/AOX1 primers (Table 1) on the pPIC9 vector. For efficient integration into the *bis4* locus of the *P. pastoris* genome, pPIC9-derived plasmids were first linearised by overnight digestion with *Sal*I at 37°C, and digested DNA (5 μ g) used to transform *P. pastoris* GS115 strain by electroporation (Gene Pulser XCell, Bio-Rad Laboratories). As a control, expression vector without any insert was used to transform *P. pastoris*. Transformants were selected on minimal dextrose agar plates without histidine, according to the *Pichia* expression kit manual (Invitrogen, a manual of methods for expression of recombinant proteins in *P. pastoris*, K1710-01). Up to sixteen individual colonies containing T11B or its derivative mutant were grown overnight at 30°C in 100 ml of buffered minimal glycerol; cells were pelleted and resuspended in 20 ml of buffered minimal methanol. Incubation was carried out in an orbital shaker (250 rpm, 28°C) for 6 d, with methanol being added (0.5 %, v/v) every 24 h to compensate for consumption and evaporation. Strains secreting the highest levels of rT11B or the corresponding mutant protein were selected for large-scale protein expression; selection was based on SDS-PAGE analysis and, where appropriate, trypsin inhibitor activity (TIA) and chymotrypsin inhibitor activity (CIA) assays (see the following text).

Protein expression and purification

The selected yeast transformants were inoculated in 40 ml of yeast extract peptone dextrose medium, cultured overnight at 28°C and then used to inoculate 4 litres of buffered minimal glycerol. When an OD_{600 nm} in the range 2–6 was reached,

cells were pelleted and resuspended in 800 ml of buffered minimal methanol medium. Cultures were then grown for 6 d at 28°C, and supplemented daily with 0.5 % (v/v) methanol to maintain the induced protein expression. Cells were pelleted and the supernatants (spent media) dialysed extensively against distilled water and freeze-dried. Protein extracts from freeze-dried dialysates were fractionated on a MonoS 5/50 GL cation exchange column (GE Healthcare), connected to an AKTA FPLC system (GE Healthcare), using a linear gradient of 0–0.22 M-NaCl in 50 mM-sodium acetate buffer, pH 4.4, at a flow rate of 1 ml/min. The elution was monitored at 280 nm and 0.5 ml fractions were collected. TIA measurements of eluted samples were carried out in flat-bottom microtitre plates and assay products measured at OD_{405 nm} as previously described⁽¹²⁾. CIA evaluation of eluted samples was carried out as described below. For rT11B, column fractions containing inhibitory activity were pooled, dialysed extensively against distilled water and freeze-dried until use. In the case of the mutant form of rT11B, where TIA and CIA were expected to be low or completely abolished, monitoring of the elution profile was carried out by SDS-PAGE.

Peptide mass fingerprinting and molecular mass determination of recombinant proteins

The recombinant proteins (10 μ g) were dissolved in NuPAGE lithium dodecyl sulphate sample buffer (Invitrogen) and separated by electrophoresis on Novex 12% Bis-Tris pre-cast gels using 2-N-morpholine-ethane sulphonic acid (NuPAGE MES, Invitrogen) as running buffer. Immediately before use, samples were reduced with dithiothreitol (DTT) and NuPAGE antioxidant added to the upper buffer chamber to prevent re-oxidation of reduced proteins during electrophoresis. Bands were excised from Colloidal Blue (Invitrogen)-stained gels and subjected to in-gel trypsin digestion. Peptide fragments from digested proteins were desalted and concentrated using C-18 ZipTip columns (Millipore) and then loaded directly onto the matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) plate, using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid as the matrix for MALDI-MS analysis. MS spectra were obtained automatically in a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems) operating in reflectron mode with delayed extraction. Peptide mass data were used for protein identification against the MS protein sequence database

(www.matrixscience.com). Additionally, a further attempt to identify the peptide mass data against the theoretical mass peptides derived from trypsin digestion of the rT11B mutant, not included in databases, was carried out.

Freeze-dried purified proteins were dissolved in 1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA), mixed with an equal volume of matrix (3 mg/ml of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 70% (v/v) acetonitrile/0.1% TFA), deposited onto a MALDI sample probe and dried under ambient conditions. MS spectra were obtained automatically in a 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems), in the 800–10 000 m/z range, and average molecular masses of recombinant proteins were determined.

Measurement of protease inhibitory activities

rT11B and its mutant derivative were assessed for TIA and CIA. TIA was measured using a modified small-scale quantitative assay with BAPNA as specific substrate, and using 50 mM-Tris, pH 7.5 as enzyme assay buffer. One trypsin inhibitor unit was defined as that which gives a reduction in absorbance at 410 nm of 0.01, relative to trypsin control reactions, in 10 min in a defined assay volume of 10 ml⁽²¹⁾. CIA was measured using BTEE as specific substrate. One chymotrypsin inhibitor unit was defined as that which gives a reduction in absorbance at 256 nm of 0.01, relative to chymotrypsin control reactions, in 5 min in a defined assay volume of 10 ml, as described previously⁽²²⁾. Specific TIA and CIA of the recombinant proteins, expressed as inhibitor units per mg of protein, were calculated. The inhibition constants (K_i) of rT11B for trypsin (pH 7.5) and chymotrypsin (pH 7.8), were determined from dose–response curves by competitive assays, using the chromogenic substrates BAPNA and BTEE, respectively⁽²²⁾. The reactions were initiated by adding trypsin (108 nM) or chymotrypsin (28 nM) with the respective substrate concentrations determined by K_m measurements. The concentration of rT11B required to achieve a half-maximal degree of inhibition (IC_{50}) was determined for each protease, using the GraFit software (GraFit version 5, Erithacus Software Limited). K_i were calculated from IC_{50} values using the tight-binding equations for competitive inhibitors⁽²³⁾. The trypsin and chymotrypsin inhibitory patterns of rT11B and its mutant derivative were analysed on 4–16% zymogram blue casein gels (Invitrogen), in comparisons with the native proteins present in an albumin fraction from pea seeds⁽²²⁾. After electrophoresis, and following the manufacturer's instructions, gels were treated with zymogram renaturing buffer (Invitrogen) for 30 min at room temperature, equilibrated with zymogram developing buffer (Invitrogen), incubated with 25 ml of trypsin or chymotrypsin solution (0.08 mg/ml of zymogram developing buffer) at 37°C for 1.5 h, and washed with distilled water before the addition of acetic acid to stop the enzymatic reaction.

Cell viability assays

Human colorectal adenocarcinoma HT29 and normal colon fibroblastic CCD-18Co cells were maintained by serial passage in 75 cm² plastic culture flasks. HT29 cells were cultured in

DMEM, supplemented with fetal bovine serum (10%), 2 mM-glutamine and 1% antibiotic-antimicotic solution (Sigma, A5955), all at final concentration. In the case of CCD-18Co fibroblastic cells, media were supplemented additionally with non-essential amino acids to 1% (final w/v; Sigma, M7145). Optimal assay conditions for rapidly dividing unpolarised, undifferentiated colonic cells were reported previously⁽¹⁶⁾. The NR (3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride) assay was validated by performing calibration assays, where HT29 and CCD18-Co cells were seeded in ninety-six-well microtitre plates at several cell densities. Accordingly, ninety-six-well microtitre plates were inoculated at a density of 2000 HT29 cells per well in 200 μ l of growth media; in the case of CCD-18Co cells, 5000 cells per well were added. Plates were incubated under 5% CO₂ in humidified air for 24 h to allow the cells to adhere to the wells. rT11B and its mutant derivative were dissolved in growth media at a range of concentrations (0–61 μ M) and added to the cells under sterile conditions. Control cells received neither form of rT11B. At the end of the growth period (96 h), the viability of HT29 and CCD-Co18 cells was assessed by the NR cytotoxicity assay, based on the ability of viable uninjured cells to incorporate and actively bind NR, into lysosomes. Cells were stained with NR solution (2 h at 37°C), followed by cell fixation (0.5% formaldehyde, 0.1% CaCl₂ for 30 s) at room temperature. Plates were washed by two brief immersions in PBS (0.01 M-sodium phosphate buffer, 0.15 M-NaCl) and the dye extracted from the viable cells using an acidified ethanol solution (50% ethanol, 1% acetic acid overnight at 4°C). The absorbance of the solubilised dye was quantified at OD_{550 nm} using a Bio-Rad Model 550 microplate reader (Bio-Rad). Cell viability data, expressed as a percentage of the values determined for control cells grown in the absence of either form of rT11B, were obtained from at least three independent experiments ($n \geq 4$ per experiment). The concentration of rT11B that reduced cell viability by 50% (IC_{50}), as compared with untreated controls, was calculated by non-linear regression fit using the GraFit software. The data were analysed statistically by the Bonferroni's test to compare means and statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Heterologous expression of T11B and an engineered mutant

A cDNA clone (pT112-36) was chosen for heterologous expression of T11B, a major isoform from pea seeds, in *P. pastoris*. The *in silico* translation of the cDNA showed two inhibitory domains and fourteen cysteine residues in conserved positions, as described previously^(19,24). Following the nomenclature of Schechter & Berger⁽²⁵⁾, the residues Lys and Tyr at position P₁ in the first (CTKSNPPTC) and second inhibitory domain (CAYSNPPKC), respectively, confer specificity for inhibition of trypsin and chymotrypsin-like proteases. To obtain an inactive T11B-like protein, pT112-36 cDNA was used as a template and mutations to its active sites achieved

by site-directed mutagenesis. Overlapping PCR was used to substitute the P₁ amino acid within the trypsin (Lys¹⁶) and chymotrypsin (Tyr⁴²) inhibitory domains with a Gly at both positions.

Pichia pastoris was selected for the expression of rTI1B and its mutant derivative since this host had been shown previously to be capable of folding and secreting a BBI from lentil⁽¹⁷⁾. Sequences corresponding to the pea cDNA, pTI12-36, encoding either a mature form of TI1B lacking any of the forty-two amino acid prepropeptide sequence, or the mutant derivative of TI1B predicted to be inactive, were cloned into the vector pPIC9 downstream of the α -factor secretion signal sequence to direct the recombinant proteins into the secretory pathway of *P. pastoris*. Expression of both recombinant forms of TI1B was induced by methanol, and the recombinant proteins were subsequently secreted into the culture supernatants. TIA and CIA assays were used for rapid screening of a large number of putative TI1B transformants after induction with methanol; spent media from transformants expressing the mutant form of rTI1B lacked inhibitory activity in these assays (not shown). In the culture supernatants of putative transformants of rTI1B and its mutant derivative, polypeptides in the range 7–9 kDa were detected by SDS-PAGE; in the case of yeast transformed with the empty vector, these polypeptides were absent from culture supernatants (not shown). Yeast transformants expressing the highest levels of rTI1B were selected by TIA and CIA for subsequent large-scale protein expression, whereas transformants secreting the rTI1B mutant were selected by SDS-PAGE followed by protein concentration determination, as previously described⁽²²⁾. Zymography of culture supernatants of rTI1B under non-denaturing conditions allowed the detection of two bands with specific inhibitory activities against the digestive enzymes trypsin and chymotrypsin (Fig. 1). These bands showed an increased mobility on non-denaturing gels when compared with the primary mature product of the *TI1* gene observed *in vivo*. In zymograms, the overall charges of the rTI1B forms were observed to be -3 and -4, whereas that deduced from the sequence of the mature TI1B variant *in vivo* is -2⁽¹⁸⁾. Culture supernatants from the rTI1B mutant derivative failed to inhibit in-gel activity of either digestive enzyme (Fig. 1).

Purification, molecular and functional characterisation of the recombinant proteins

To purify the recombinant proteins, secreted proteins were fractionated by MonoS cation exchange chromatography. The elution patterns of rTI1B and its inactive mutant are shown in Fig. 2(A) and (B), respectively. The recombinant proteins were retained by the Mono S column at pH 4.4. In good agreement with results obtained from non-denaturing gels, rTI1B was resolved as two chromatographic peaks, which eluted in the range 0.07–0.10 M-NaCl (peak 1) and 0.13–0.16 M-NaCl (peak 2), and the two chromatographic peaks showed both TIA and CIA. The rTI1B mutant derivative (see later for positive identification) was eluted as a single broad chromatographic peak in the range 0.04–0.09 M-NaCl,

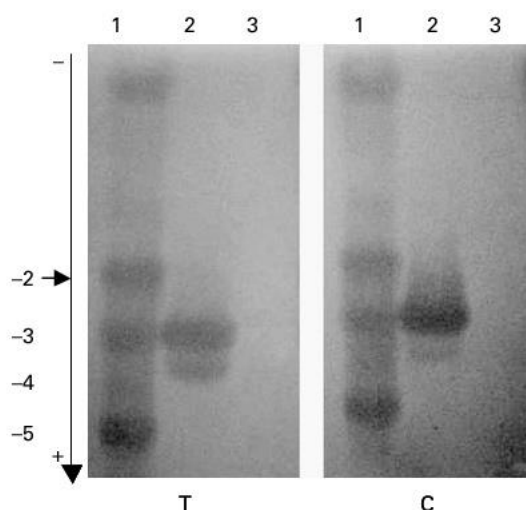


Fig. 1. In-gel protease inhibitory activity analyses of recombinant TI1B (rTI1B) and its inactive mutant. Zymogram blue casein gels were treated with the digestive enzymes, trypsin (T) or chymotrypsin (C); dark areas indicate where the enzyme has been inhibited. Lane 1: pea seed albumin fraction from cv. Birte; lane 2: culture supernatant from secreted expression of rTI1B; lane 3: culture supernatant from secreted expression of the mutant rTI1B predicted to be inactive. Lane 1 contained 1.5 mg of pea albumin fraction, whereas lanes 2 and 3 contained 20 μ g of recombinant protein. The direction of electrophoresis on non-denaturing gels is indicated (vertical arrow), alongside the overall charge of the major isoforms found in pea seeds of cv. Birte. Among the isoforms present in seeds, the -2 variant represents the primary mature product of the *TI1B* gene (horizontal arrow).

having neither TIA nor CIA (Fig. 2(B)). Differences in the elution pattern of the two recombinant proteins can be predicted to be due to the substitution of Lys¹⁶ at the P₁ position of the trypsin inhibitory domain with Gly in the rTI1B mutant. The chromatographic fractions containing the recombinant proteins were pooled and analysed by SDS-PAGE; in all cases, purified fractions showed proteins in the range 7–9 kDa. The peak 2 from rTI1B showed a reduced gel migration when compared to peak 1, with the latter possibly representing a processed variant (Fig. 2(C)). Further studies by MALDI-time of flight (TOF) MS and mass peptide fingerprinting were carried out in order to determine the authenticity of the recombinant proteins. The experimentally determined *m/z* values of peaks 1 and 2 derived from rTI1B were 7694 and 8146 Da, respectively, clearly differing from the value predicted for mature TI1B, allowing for disulphide formation (7946 Da) (Fig. 3). In the case of the inactive mutant, a mixture of three differentially processed isoforms was deduced, based on molecular masses of 7386, 7515 and 7968 Da, compared with an expected mass of 7768 Da for the mutant construct with correct disulphide bond formation. The presence of these three forms was not revealed by SDS-PAGE; this may be due to differences in their relative proportions. Given their lack of inhibitory activity, further chromatographic separation of inactive forms was not carried out before cell assays. In addition, the amino acid sequences of the two recombinant proteins were matched by mass peptide fingerprinting (Fig. 3). In-gel tryptic digestion of excised electrophoretic bands was performed followed by separation

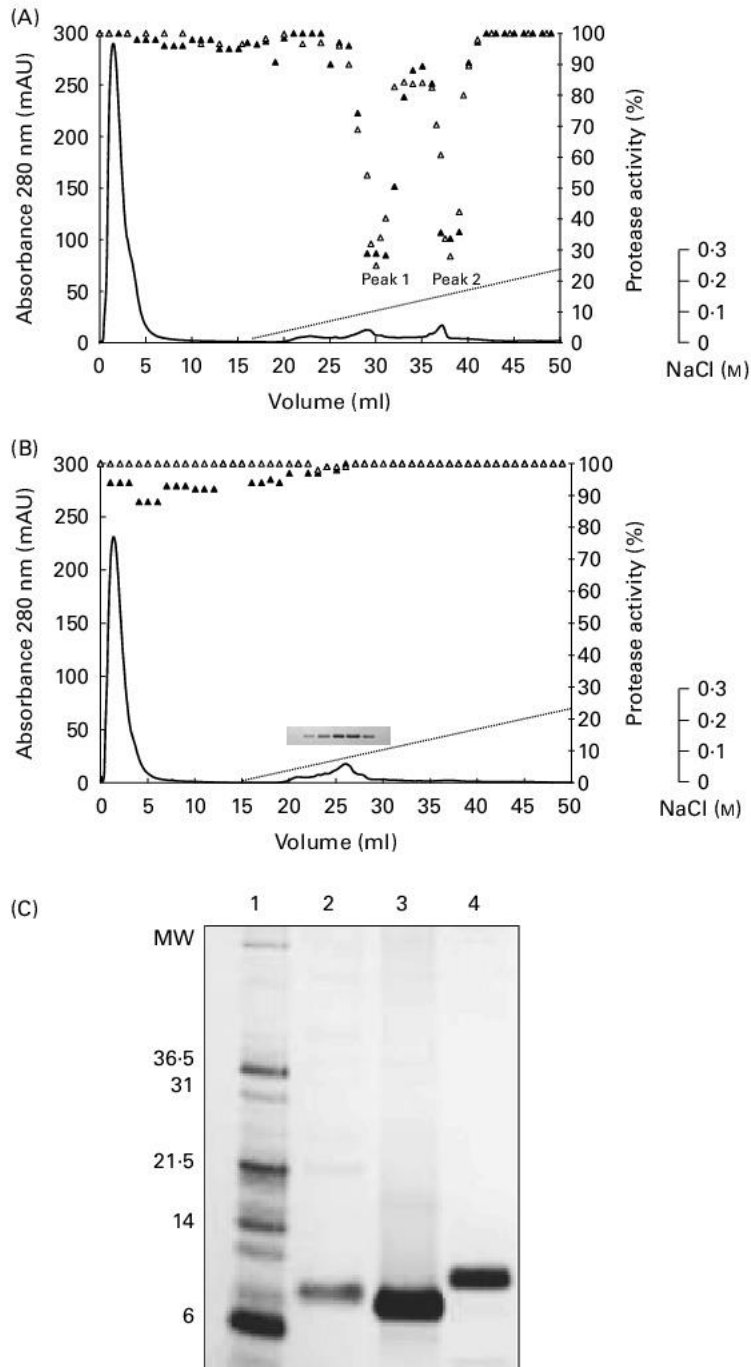


Fig. 2. Elution profile of (A) recombinant T11B (rT11B) and (B) its mutant derivative on a MonoS 5/50 GL cation exchange column. Absorbance (mAU) at 280 nm of the chromatographic elution and the linear gradient of NaCl (0–0.22 M) are shown (solid and dotted lines, respectively). Using *N*- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide and *N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester as specific substrates, the trypsin (▲) and chymotrypsin (Δ) inhibitory activities, measured on every fraction are shown. Where there was little or no inhibition (B), then monitoring of the elution profile was carried out by SDS-PAGE (gel inset in B); (C) SDS-PAGE under denaturing and reducing conditions of the inactive mutant protein (lane 2) and peaks 1 and 2 from rT11B (lanes 3 and 4, respectively), following the chromatography steps. Molecular weight (MW) markers are shown in lane 1.

of the peptides generated and MS-based analysis. A search of peptide mass data against the MS protein sequence database enabled the unambiguous identification of T11B (Swiss-Prot entry: IBBA_PEA). The sequence coverage of peaks 1 and 2 from rT11B was 86 and 75%, respectively. An attempt to identify the peptide mass data against the theoretical mass peptides

derived from trypsin digestion of the rT11B mutant, not included in databases, was also carried out. Sequence coverage of the inactive mutant was 82% and included both inhibitory domains having their corresponding Gly substitution. Although endoproteolytic removal of the signal sequence by the *P. pastoris* Kex2 protease clearly occurred, differences

		Molecular mass	
		Predicted	Observed
IBBA_PEA (Q41065)		GDDVKSACCDTCLCTKSNPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAYSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEEVIKN	7946
rT11B	Peak 1	EAGDDVKSAC CDTCLCTKSN PPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAYSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEE	7694
	Peak 2	EAGDDVKSAC CDTCLCTKS NPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAYSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEE VIKN	8146
rT11B mutant		GDDVKSACCDTCLCTGNSNPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAGSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEE VIKN	7768
		<i>EAGDDVKSAC CDTCLCTGNSNPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAGSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEE VIKN</i>	7968
		<i>EAGDDVKSAC CDTCLCTGNSNPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAGSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVEE</i>	7515
		<i>EAGDDVKSAC CDTCLCTGNSNPPTC RCVDVRETC HSACDSC ICAGSNPPKC QCFDTHKFCY KACHNSEVE</i>	7386

Fig. 3. Molecular mass determination and amino acid sequences deduced by peptide mass fingerprinting of recombinant T11B (rT11B) and its mutant derivative, compared with the primary mature pea protein encoded by the *T11B* gene (Q41065, Swiss-Prot database, Swiss Institute of Bioinformatics). Amino acid sequences of inhibitory domains are underlined. P₁-P₁' are the reactive peptide bond sites, in bold text. Lys (K) and Tyr (Y) at position P₁ determine specificity for trypsin and chymotrypsin, respectively. Amino acid sequences of recombinant proteins were deduced from mass peptide fingerprinting analyses; the peptide sequences determined for recombinant proteins are italicised. The molecular masses of the recombinant variants, determined by MALDI-TOF, are shown compared with their predicted values. The sequence Glu Ala Glu Ala was engineered just before the N-terminus of recombinant proteins for efficient cleavage by *Pichia* Kex2. The deduced sequences of the recombinant proteins indicate an inefficient cleavage of the dipeptide Glu Ala by the endogenous STE13 dipeptidyl aminopeptidase.

in mobility on non-denaturing gels (Fig. 1), molecular mass determination and mass peptide fingerprinting data (Fig. 3) supported the existence of a Glu-Ala extension (200 Da) at the N-terminus of the recombinant proteins (Fig. 3); this indicates an inefficiency in cleavage by the endogenous STE13 dipeptidyl aminopeptidase^(26,27). Recombinant forms having the complete Glu-Ala-Glu-Ala extension or those fully processed by STE13 were not observed. In the case of peak 1 from rT11B, a loss of four amino acids (Val Ile Lys Asn) at the C-terminus was deduced whereas, in the case of the inactive mutant, a loss of an additional amino acid (Glu Val Ile Lys Asn) was deduced for one isoform, compared with those predicted from the DNA sequences (Fig. 3). Both an N-terminal extension (Glu Ala) and deduced processing at the C-terminus, involving loss of charged amino acid(s), are in good agreement with the observed mobility on non-denaturing gels of rT11B (peaks 1 and 2) when compared *in vivo* (Fig. 1). The mass and peptide data obtained for the mutant protein are consistent with correct protein folding,

based on disulphide bond formation, and the *m/z* variants are consistent with differential processing of C-terminal sequences, as indicated in Fig. 3. All further experiments, including kinetic and cells assays, were performed with unprocessed rT11B (peak 2) and the mixture of isoinhibitors derived from the inactive mutant (Fig. 3).

The ability of rT11B to inhibit the digestive enzymes trypsin and chymotrypsin was evaluated (Table 2). The specific TIA and CIA of this recombinant protein were 2476 (SD 238) and 2956 (SD 196) units per mg of protein, respectively. The rT11B mutant was unable to inhibit either enzyme. Based on IC₅₀ and K_i calculations, rT11B was demonstrated to be a potent inhibitor of trypsin (K_i of 21 (SD 2) nM) and chymotrypsin (K_i of 8 (SD 1) nM) (Table 2). Such values fall within the nanomolar range reported previously for various members of the BBI family, including those from soyabean⁽¹⁵⁾, lentil⁽¹⁷⁾ and lupin (*Lupinus albus*)⁽²⁸⁾, and suggested that T11B was expressed as a correctly folded active recombinant protein from *P. pastoris*.

Table 2. Inhibition constant (K_i) and specific inhibitory activity (IU) for trypsin (T) and chymotrypsin (C) of recombinant T11B (rT11B) and its mutant derivative*

(Mean values and standard deviations from at least five independent determinations)

Recombinant protein	Amino acid sequence of inhibitory domains		K _i (nM)				Specific inhibitory activity (IU/mg protein)			
			T		C		T		C	
			Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
rT11B	CTKSNPPTC	CAYSNPPKC	21	2	8	1	2476	238	2956	196
rT11B mutant	CTGNSNPPTC	CAAGSNPPKC	ND		ND		ND		ND	

ND, not detected.

*The reactive peptide bond sites are marked in bold text. K determines specificity for trypsin, whereas Y determines specificity against chymotrypsin. Amino acid substitutions in the rT11B mutant are highlighted in grey.

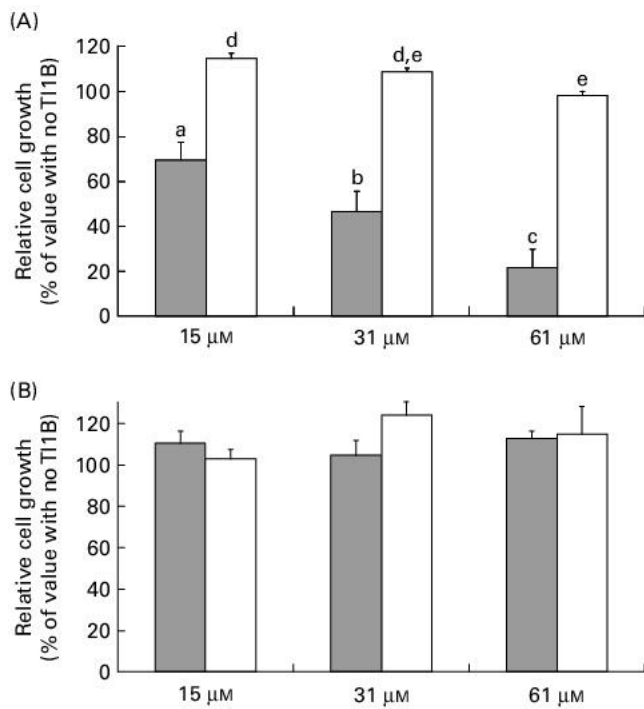


Fig. 4. Effects of recombinant T11B (rT11B, closed bars) and the corresponding mutant protein (open bars) on the *in vitro* growth of (A) HT29 human colorectal adenocarcinoma cells and (B) normal colon fibroblastic CCD-18Co cells. Growth media were supplemented with protein in the concentration range 0–61 μM and cells harvested after a period of 96 h. Values are means, with standard deviations represented by vertical bars of at least three independent experiments, each having four technical replicates. ^{a,b,c,d,e} Mean values with different letters were significantly different ($P < 0.05$; Bonferroni's test).

Effect of rT11B and the corresponding inactive mutant on the proliferation of human colon cells

The effects of the recombinant proteins on the growth of human colon adenocarcinoma HT29 cells were determined by comparing the cell viability of cultured cells in the absence or presence of rT11B or the corresponding mutant protein (0–61 μM), monitored by the cytotoxic NR cell assay. At concentrations greater than 15 μM , rT11B inhibited the *in vitro* growth of HT29 cells in a concentration-dependent manner (Fig. 4(A)); the IC_{50} value for rT11B was 31 (SD 7) μM , in agreement with those obtained for BBI from plant sources, including lentil⁽¹⁷⁾ and soyabean⁽¹⁵⁾. In contrast, the growth of HT29 cells was not reduced when treated with the rT11B related mutant, even at the highest concentration tested (61 μM). In addition, the growth of non-malignant CCD-18Co colon cells was unaffected by either rT11B or its inactive variant in the range of concentrations tested (0–61 μM , Fig. 4(B)).

Discussion

Among other dietary constituents, soyabean BBI and homologous proteins appear to be promising chemopreventive agents within the gastrointestinal tract⁽⁵⁾. These dietary constituents, present at high concentrations in legume seeds, have been shown to be effective at preventing or suppressing radiation- and chemical carcinogen-induced transformation, in

a wide variety of *in vitro* assays, and carcinogenesis in *in vivo* model systems, as reviewed elsewhere^(6–8,29,30). In previous studies, we have demonstrated a significant concentration- and time-dependent decrease in the growth of an array of colon cancer cells (HT29, LoVo, Caco2) when treated with BBI proteins from different sources, including soyabean⁽¹⁵⁾, lentil⁽¹⁷⁾ and pea⁽¹⁶⁾; after soyabean BBI treatment, HT29 colon cancer cells showed a dose-dependent increase in the proportion of cells that were arrested in the G0-G1 phase⁽¹⁵⁾. It was shown furthermore that treatment of soyabean BBI with reducing and alkylating agents, which substantially reduces inhibitory activity against serine proteases, renders these dietary proteins unable to inhibit cell proliferation of colon cancer cells⁽¹⁵⁾. Treatments like autoclaving⁽⁵⁾ or chemical modification via alkylation of sulphhydryl groups⁽¹⁵⁾ have been used as tools for probing the association between protease inhibition and anti-cancer properties of BBI. Related studies have indicated the importance of disulphide bonds in maintaining the three-dimensional structure and inhibitory activity of BBI⁽³¹⁾. Where severe disruptive treatments are used, the native conformation of BBI is lost, alongside losses of tryptic and chymotrypsin inhibitory activities, making the relationship between protease inhibition, protein structure and health-beneficial effects unclear. In the present study, we have provided new evidence to support a relationship between the anti-proliferative properties of BBI and their specific inhibition of serine proteases. Here, a loss of native conformation and/or correct protein folding is avoided by comparing the anti-proliferative cellular properties of a major pea iso-inhibitor, T11B, capable of inhibiting both trypsin- and chymotrypsin-like proteases, with a related mutant predicted to lack both TIA and CIA. Both proteins were expressed in recombinant form by heterologous expression in the methylotrophic *P. pastoris* system, capable of efficiently folding extensively disulphide-bonded proteins, as reported for lentil BBI⁽¹⁷⁾ and other unrelated protease inhibitors⁽³²⁾. In this study, the masses of the secreted recombinant proteins were consistent with correct disulphide bond formation. When treated with rT11B, a significant concentration-dependent decrease in the growth of HT29 human colon adenocarcinoma cells was observed, whereas non-malignant colonic fibroblast CCD-18Co cells were unaffected; in contrast, the rT11B mutant lacking TIA and CIA did not exert any significant effect on the growth of HT29 cells (Fig. 4). These findings suggest that serine proteases should be considered as molecular targets in investigating the potential chemopreventive role of BBI and related proteins during the early stages of carcinogenesis.

Yavelov *et al.*⁽³³⁾ reported that an enzymatically modified BBI having only CIA was still fully effective as an inhibitor of radiation-induced transformation *in vitro*, whereas the modified inhibitor with TIA only was ineffective. Although the modified BBI may have been impaired in the inhibition of several molecular targets compared with the native protein, these early observations led to the hypothesis that chymotrypsin-like proteases are potential targets of BBI in anti-cancer effects. In contrast, it has been demonstrated recently that a major soyabean BBI iso-inhibitor which inhibits

trypsin-like proteases only exerts anti-proliferative properties against colon cancer cells⁽¹⁵⁾. These data suggest that both trypsin- and chymotrypsin-like proteases involved in the early stages of carcinogenesis should be considered as potential targets of BBI-like proteins. So far, the therapeutic targets and the action mechanisms of BBI remain unknown. However, the present study shows that the successful expression of individual isoforms, both naturally occurring and engineered BBI, can assist in understanding the mechanism by which these dietary proteins can inhibit cancer cell proliferation, and in identifying and validating their precise therapeutic targets^(6,8). In parallel, direct comparative serine protease profiling studies of malignant and non-malignant cells will explain the differential effects on cell proliferation observed for the variant rT11B tested here, contributing to the assessment of BBI for preventive and/or therapeutic medicine.

Acknowledgements

A. C. acknowledges support by ERDF-co-financed grants from the Spanish CICYT (AGL 2007-60007 and AGL2010-15877) and from CSIC (PIE-200970I054). C. D. acknowledges support from the European Union (Grain Legumes Integrated Project, a Framework Programme 6 project, grant no. FOOD-CT-2004-506223) and from Defra (grants nos AR0105 and AR0711). The authors are very grateful to Dr S. Ogueta and A. Lario from the Proteomics Facility of University of Cordoba (Spain) and the Institute of Parasitology and Biomedicine Lopez Neyra (Granada, Spain), respectively, for carrying out peptide mass fingerprinting and molecular mass determination. This study is not subject to any conflicts of interest. A. C. and C. D. were responsible for the experimental design, data analysis, interpretation and writing of the manuscript. M. C. M.-M. was responsible for gene cloning, site-directed mutagenesis and heterologous expression of recombinant proteins. E. J. and M. C. A. carried out protein purification and enzymatic kinetic experiments.

References

- Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* (2009) Cancer statistics, 2009. *Cancer J Clin* **59**, 225–249.
- Cummings JH & Bingham SA (1998) Fortnightly review – diet and the prevention of cancer. *Br Med J* **317**, 1636–1640.
- Reddy BS (2000) Novel approaches to the prevention of colon cancer by nutritional manipulation and chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* **9**, 239–247.
- MacFarlane AJ & Stover PJ (2007) Factors in gastrointestinal cancers: convergence of genetic, nutritional and inflammatory. *Nutr Rev* **65**, S157–S166.
- Kennedy AR, Billings PC, Wan XS, *et al.* (2002) Effects of Bowman–Birk inhibitor on rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer* **43**, 174–186.
- Clemente A & Domoney C (2006) Biological significance of polymorphism in plant protease inhibitors from the Bowman–Birk class. *Curr Prot Pept Sci* **7**, 201–216.
- Clemente A & Domoney C (2007) Therapeutic properties of legume protease inhibitors from the Bowman–Birk class. In *Recent Progress in Medicinal Plants*, pp. 397–417 [JN Govil, VK Singh and RK Sharma, editors]. vol. 20, Houston, TX: Studium Press.
- Clemente A, Sonnante G & Domoney C (2011) Bowman–Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health: current status and perspectives. *Curr Prot Pept Sci* **12**, 358–373.
- Chen P, Rose J, Love R, *et al.* (1992) Reactive sites of an anti-carcinogenic Bowman–Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *J Biol Chem* **267**, 1990–1994.
- Ramasarma PR, Appu Rao AG & Rao DR (1995) Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochim Biophys Acta* **1248**, 35–42.
- Trivedi MV, Laurence JS & Siahann TJ (2009) The role of thiols and disulfides on protein stability. *Curr Prot Pept Sci* **10**, 614–625.
- Clemente A, Jimenez E, Marín-Manzano MC, *et al.* (2008) Active Bowman–Birk inhibitors survive gastrointestinal digestion at the terminal ileum of pigs fed chickpea-based diets. *J Sci Food Agric* **88**, 523–531.
- Marín-Manzano MC, Ruiz R, Jimenez E, *et al.* (2009) Anti-carcinogenic soyabean Bowman–Birk inhibitors survive faecal fermentation in their active form and do not affect the microbiota composition *in vitro*. *Br J Nutr* **101**, 967–971.
- Kennedy AR, Szuhaj BF, Newberne PM, *et al.* (1993) Preparation and production of a cancer chemopreventive agent, Bowman–Birk inhibitor concentrate. *Nutr Cancer* **19**, 281–302.
- Clemente A, Moreno J, Marín-Manzano MC, *et al.* (2010) The cytotoxic effect of Bowman–Birk isoforms from soybean on HT29 human colorectal cancer cells is related to their intrinsic ability to inhibit serine proteases. *Mol Nutr Food Res* **54**, 396–405.
- Clemente A, Gee JM, Johnson IT, *et al.* (2005) Pea (*Pisum sativum* L.) protease inhibitors from the Bowman–Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells *in vitro*. *J Agric Food Chem* **53**, 8979–8986.
- Caccialupi P, Ceci LR, Siciliano RA, *et al.* (2010) Bowman–Birk inhibitors in lentil: heterologous expression, functional characterisation and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. *Food Chem* **120**, 1058–1066.
- Domoney C. (1999) Inhibitors of legume seeds. In *Seed Proteins*, pp. 635–655 [PR Shewry and R Casey, editors]. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Domoney C, Welham T, Ellis N, *et al.* (2002) Three classes of proteinase inhibitor gene have distinct but overlapping patterns of expression in *Pisum sativum* plants. *Plant Mol Biol* **48**, 319–329.
- Ho S, Hunt H, Horton R, *et al.* (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51–59.
- Domoney C & Welham T (1992) Trypsin inhibitors in *Pisum*: variation in amount and pattern of accumulation in developing seed. *Seed Sci Res* **2**, 147–154.
- Clemente A, MacKenzie DA, Jeenes DJ, *et al.* (2004) The effect of variation within inhibitory domains on the activity of pea protease inhibitors from the Bowman–Birk class. *Protein Express Purif* **36**, 106–114.
- Copeland RA, Lombardo D, Giannaras J, *et al.* (1995) Estimating K_i values for tight-binding inhibitors from dose-response plots. *Bioorg Med Chem Lett* **5**, 1947–1952.
- Domoney C, Welham T, Sidebottom C, *et al.* (1995) Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. *FEBS Lett* **360**, 15–20.

25. Schechter I & Berger A (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157–162.
26. Damaso MC, Almeida MS, Kurtenbach E, *et al.* (2003) Optimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. *Appl Environ Microbiol* **69**, 6064–6072.
27. Chen Z, Wang D, Cong Y, *et al.* (2011) Recombinant antimicrobial peptide hPAB- β expressed in *Pichia pastoris*, a potential agent active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**, 281–291.
28. Scarafoni A, Consonni A, Galbusera V, *et al.* (2008) Identification and characterization of a Bowman–Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. *Phytochem* **69**, 1820–1825.
29. Kennedy AR (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* **78**, 167–209.
30. Kennedy AR (1998) The Bowman–Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr* **68**, 1406s–1412s.
31. Singh RR & Appu Rao AG (2002) Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman–Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for “hyper-reactive” disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerisation in folding. *Biochim Biophys Acta* **1597**, 280–291.
32. Volpicella M, Ceci LR, Cordewener J, *et al.* (2003) Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to protease inhibitors. *Eur J Biochem* **270**, 10–19.
33. Yavelow J, Collins M, Birk Y, *et al.* (1985) Nanomolar concentrations of Bowman–Birk soybean protease inhibitor suppress X-ray induced transformation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5395–5399.

