

ARTÍCULO DE REVISIÓN

Inhibidores de proteasas multifuncionales de naturaleza proteica

Multifunctional proteases inhibitors of proteic nature

Maday Alonso del Rivero,^{1*} Yamilé González,¹ Isel Pascual,¹ Rossana García,¹ Julieta Delfín,¹ Joaquín Díaz¹ y María A. Chávez¹

¹ Centro de Estudio de Proteínas, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba.

* Autor para correspondencia: maday@fbio.uh.cu

Los inhibidores de proteasas (IP) de naturaleza proteica constituyen importantes herramientas de la naturaleza para el control de la actividad proteolítica de sus proteasas blanco, así como su bloqueo en casos de emergencia (Bode y Huber, 1992). Se presentan en múltiples formas, en numerosos tejidos de animales y plantas; de igual forma se encuentran en microorganismos, donde se producen inhibidores de proteasas no proteicos que afectan la actividad proteolítica de proteasas hospederas (Bode y Huber, 1992; Valueva y Mosolov, 2004).

La principal función fisiológica de los IP endógenos es la prevención de la proteólisis no deseada y, por tanto, están involucrados en la mayoría de los procesos fisiológicos normales, al igual que en los procesos patológicos, debido a su implicación en la regulación de la actividad proteolítica, la activación de coenzimas y la liberación de polipéptidos biológicamente activos (Laskowski y Kato, 1980; Laskowski, 1986). La presencia de inhibidores de proteasas en el plasma de mamíferos sugiere que pueden intervenir en la regulación de la coagulación sanguínea y en otras cascadas proteolíticas, como la activación del complemento. Su función en las plantas también ha sido estudiada y se encuentra generalmente asociada a mecanismos de defensa contra la infección por patógenos, mediante la inhibición de sus proteasas (Lawrence y Koundal, 2002; Valueva y Mosolov, 2004).

El estudio de estas biomoléculas ha permitido profundizar en los estudios de estructura y función de las proteasas, y en el estudio de los mecanismos de interacción proteína-proteína (Laskowski *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta que muchas proteasas constituyen importantes blancos terapéuticos, los inhibidores de proteasas constituyen un principio farmacológico válido en el tratamiento de diversas enfermedades (Turk, 2006). En la biotecnología se han utilizado para obtener variedades de plantas más resistentes a las plagas y enfermedades (Jongsma y Bolter, 1997; Schuler *et al.*, 1998),

RECIBIDO: 10/2008
ACEPTADO: 12/2008

y para incrementar los rendimientos y la estabilidad operacional en los procesos de producción y aplicación de las proteínas (Macaulay-Patrick *et al.*, 2005).

Para nombrar los inhibidores se han utilizado diferentes nomenclaturas que incluyeron, en un inicio, el origen del inhibidor y la proteasa que inhibe; sin embargo, tal tipo de nomenclaturas no permitía establecer una relación funcional y estructural entre los inhibidores. En 2004, Rawling y Barrett agruparon la unidad inhibitoria de una molécula de inhibidor en 48 familias, basados en la similitud de secuencia de aminoácidos de cada una de estas unidades. Con base en su estructura tridimensional, 31 familias de inhibidores se asignaron a 26 clanes. A diferencia de las peptidasas –donde muchos clanes contienen varias familias–, en los inhibidores de proteasas la gran mayoría pertenece a una familia y a un único clan. Esta clasificación también se introdujo en la base de datos de peptidasas MEROPS (<<http://www.merops.sanger.ac.uk>>), conformada actualmente por 52 familias y 33 clanes de IP (Rawlings *et al.*, 2006).

A diferencia de las proteasas, donde los residuos del sitio catalítico se conservan dentro de los miembros de la familia, en los IP se presenta una gran variedad de aminoácidos en el sitio reactivo (Laskowski y Kato, 1980; Forsyth *et al.*, 2003). Estos residuos son generalmente los más variables entre los miembros de las familias, lo que impide distinguir IP que no presentan actividad inhibitoria, de supuestos IP.

La inhibición del sitio activo de las proteasas se logra usualmente mediante el acoplamiento del inhibidor a la enzima que inhibe, a través de un elemento estructural que se encuentra expuesto, ya sea un simple lazo o un extremo terminal del inhibidor, solo o en combinación con dos o más de estas estructuras (Otlewski *et al.*, 2005). Para los IP se han descrito diferentes mecanismos de inhibición, que se presentan en la figura 1 y se describen a continuación:

- IP que incluyen el bloqueo del sitio activo de la enzima igual que lo hace el sustrato: el enlace peptídico escindible P1-P1' puede ser hidrolizado y posteriormente re-sintetizado,

se produce la formación de un complejo proteasa-inhibidor no covalente y estable, y no ocurren cambios conformacionales en la molécula del inhibidor (inhibidores canónicos, de serino proteasas, tipo tripsina).

- La inhibición a través de la formación de un complejo estable enzima-producto: se presenta cierta analogía con los inhibidores canónicos de serino proteasas pues puede ocurrir un corte lento del enlace peptídico P1-P1' y el producto de esta reacción es activo como inhibidor (PCI y LCI en las metalo carboxipeptidasas).
- IP que bloquean estéricamente el sitio activo: la cadena polipeptídica del inhibidor bloquea el sitio activo de la proteasa. En algunos casos, por ejemplo, en los inhibidores no canónicos, el extremo amino del inhibidor se inserta en el sitio activo de la enzima, y pueden presentarse interacciones secundarias que incrementan el área de contacto. Esto genera una inhibición fuerte y específica (inhibición de las cistatinas en las cisteino proteasas, tipo papaina, e inhibidores no canónicos como la ornitodorina).
- IP que se unen a un sitio adyacente o exosito: inhibidores de trombina.
- IP irreversibles que forman intermediarios acil-enzima: se produce una deformación del sitio activo de la enzima y ocurren cambios conformacionales en el inhibidor (inhibidores de serino proteasas, serpinas) e intermediarios tioacil enzima (inhibidores de cisteino proteasas).
- La inhibición alostérica: los pro-peptidos de las serino proteasas (Bode y Huber, 2000; Otlewski *et al.*, 2005).

Existen inhibidores formados por una sola unidad inhibitoria (inhibidores homotípicos) capaces de actuar frente a una o más proteasas, pertenecientes a una o más clases mecanísticas. Por ejemplo, la hirudina es un polipéptido de 7 kDa aislado de la sanguijuela *Hirudo medicinalis*, capaz de inhibir específicamente trombina con un valor de $K_i = 8,3 \times 10^{-13}$ mol/L (Stone *et al.*, 1987; Ascenzi *et al.*, 1992; Stubbs y Bode, 1995; Ascenzi *et al.*, 1995); mientras que el BPTI

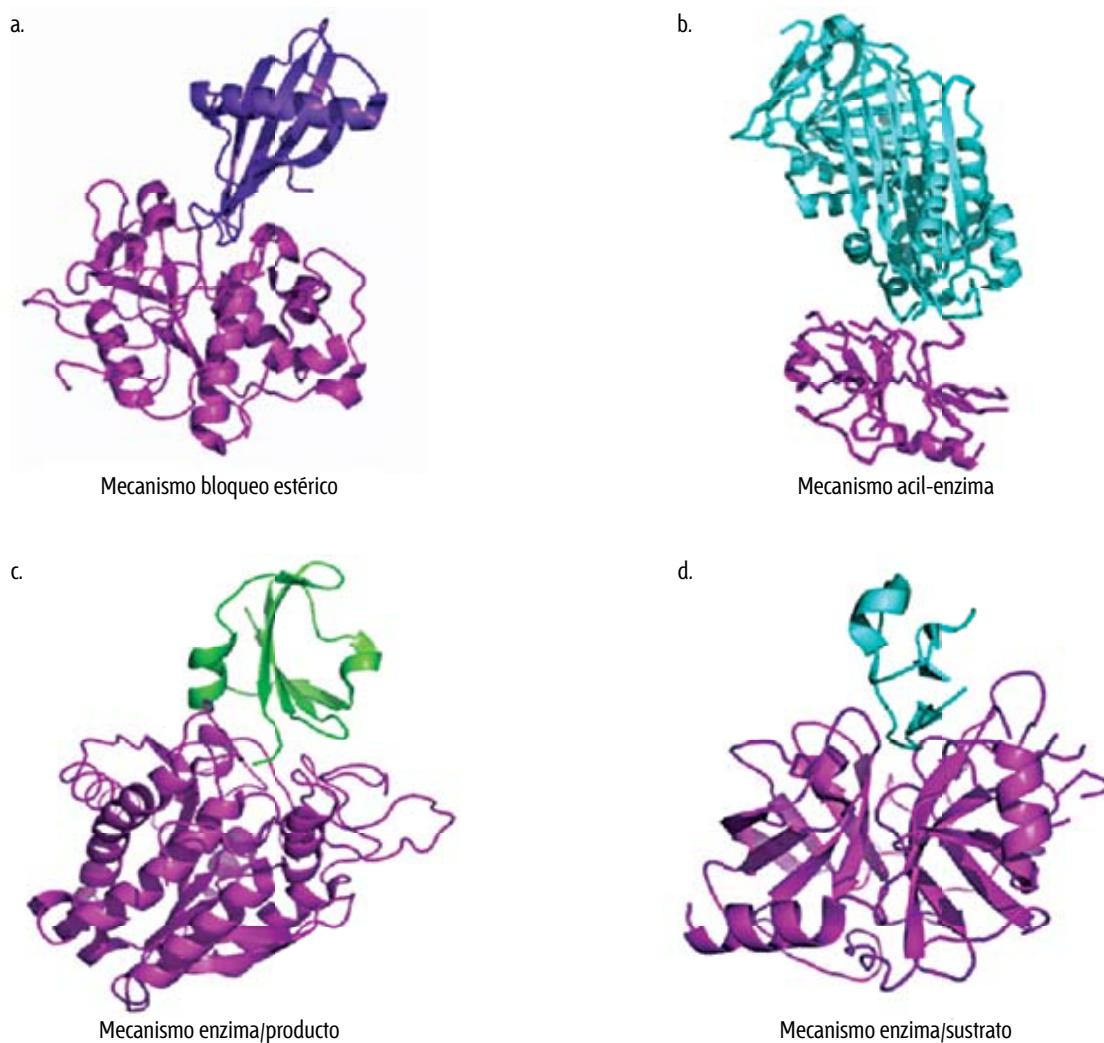


Figura 1. Ejemplos de complejos proteasas-inhibidor: a) complejo entre proteasa tipo cisteíno-inhibidor; Catepsina H: Estefina (1NB5); b) complejo proteasa tipo serino: serpina; tripsina; α 1-antitripsina (1EZK); c) complejo metaloproteasa-inhibidor; Carboxipeptidasa A2: LCI (1DTD); d) complejo proteasa tipo serino-inhibidor; Tripsina: CMTI (1PPE). En la figura se representa la estructura tridimensional de los complejos enzima: inhibidor. En la parte superior de cada complejo se encuentra el inhibidor, mientras que en la parte inferior se presenta la enzima. Se señala además el mecanismo de inhibición que se manifiesta en cada caso.

(*bovine pancreatic trypsin inhibitor*) es un potente inhibidor de tripsina ($K_i = 6,0 \times 10^{-14}$ mol/L), que también es capaz de inhibir otras enzimas que pertenecen a la misma clase mecanística, como quimotripsina, calicreina y elastasa de neutrófilos (Fritz y Wunderer, 1983). Igualmente, la eglina C y la eglina B (inhibidores de la familia de papa I) inhiben catorce serino proteasas de la familia S1 (quimotripsina) y S8 (subtilisina), a través de un mismo sitio reactivo, con valores de $K_i < 10^{-8}$ mol/L (Ascenzi *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 2000).

La actividad inhibidora frente a más de una enzima que pertenece a una misma clase mecanística se ha observado no solo en proteínas formadas por una sola unidad inhibitoria, sino también en aquellas que presentan más de un dominio en su estructura (fig. 2), que pueden inhibir simultánea e independientemente, o no, una misma enzima o distintas enzimas, a través de diferentes sitios reactivos (Laskowski y Kato, 1980; Bode y Huber, 1992). Este modo de inhibición de varias enzimas fue reconocido por Rhodes *et al.* (1960), quienes lo asociaron al conocido término de «inhibido-

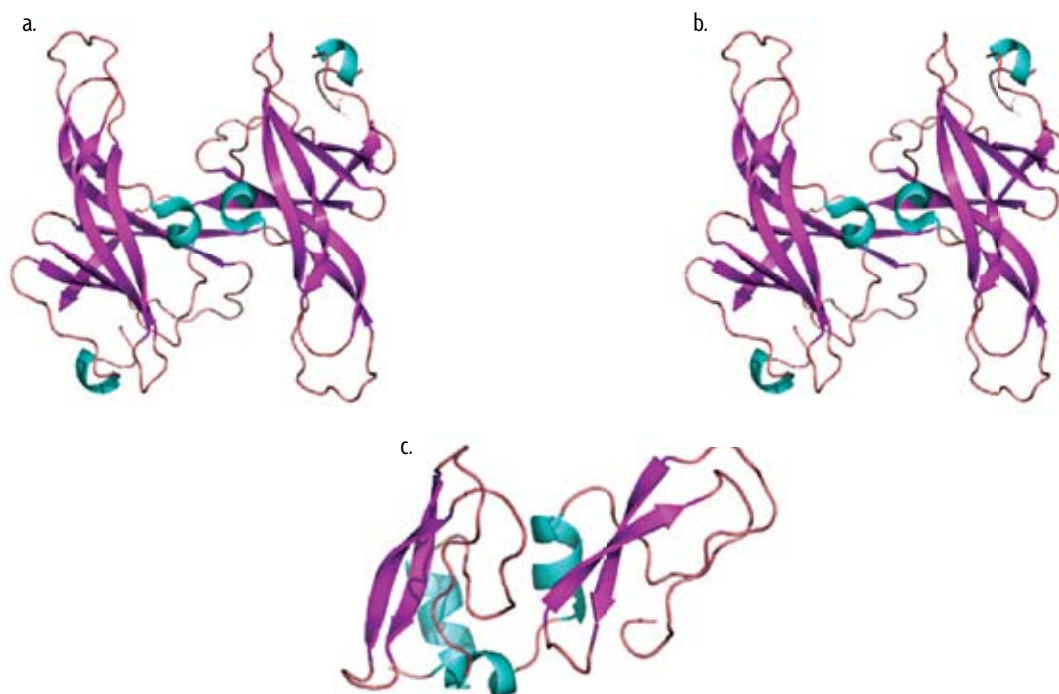


Figura 2. Ejemplos de inhibidores multidominios: a) BBI, inhibidor de la familia Bowman Birk (1BB1); b) Ecotina, inhibidor de la familia Ecotin; 1ECZ; c) Bikunin, inhibidor de la familia BPTI/Kuntiz (1BIK).

res multicabezas» (*multiheaded inhibitor*). Los inhibidores multicabezas, generalmente multidominios, pueden ser el resultado de asociaciones no covalentes de varias cadenas polipeptídicas, cada una con un sitio reactivo capaz de inhibir la misma enzima o enzimas diferentes de una misma clase mecanística. Tal es el caso del inhibidor de papa I, que es un tetrámero no covalente capaz de inhibir cuatro moléculas de quimotripsina simultáneamente, sin disociarse (Ryan y Shumway, 1971); de igual forma ocurre con el inhibidor de doble cabeza de subtilisina (SSI), formado por un dímero no covalente que inhibe dos moléculas de subtilisina sin que ocurra la disociación (Laskowski y Kato, 1980). Otro ejemplo resulta el de los inhibidores pertenecientes a la familia Bowman-Birk (fig. 2a), aislados de las semillas de plantas leguminosas, que consisten en dos secuencias homólogas unidas por puentes disulfuro, cada una con un sitio reactivo (Krahn y Stevens, 1970; Song *et al.*, 1999).

Por su parte, la inhibición de enzimas que pertenecen a una misma clase mecanística puede darse en proteínas multidominios formadas por una sola cadena polipeptídica que se pliega en dos

o más dominios funcionales y estructurales homólogos (Laskowski y Kato, 1980; Christeller, 2005). Generalmente, cada dominio inhibe una enzima diferente, como sucede, por ejemplo, en el caso de los ovomucoides, formados por tres dominios Kazal homólogos, donde cada dominio es capaz de inhibir una enzima diferente (de la misma clase mecanística) de forma independiente. El primer dominio del ovomucoide de pavo inhibe la proteasa específica para ácido glutámico de *Streptomyces griseus* (Komiyama *et al.*, 1991), el segundo dominio inhibe tripsina, mientras que el tercer dominio inhibe quimotripsina, elastasa y subtilisina (Ardelt y Laskowski, 1985; Bigler *et al.*, 1993).

Si bien los inhibidores multicabezas, que han sido generalmente descritos, son capaces de inhibir proteasas pertenecientes a una misma clase mecanística, también existen informes de inhibidores que actúan sobre proteasas de diferentes clases mecanísticas (Bode y Huber, 1992, 2000). Este tipo de actividad, menos frecuente en proteínas formadas por un dominio inhibitorio, ha sido igualmente informado para proteínas multidominio, en las que cada dominio es responsable de un tipo de actividad. Estos dominios pueden ser

homólogos entre sí (inhibidor multidominio homotípico), como en la equistatina, inhibidor aislado de la anémona *Actinia equina*, formado por tres dominios tipos tiroglobulinas-1 capaces de inhibir aspártico y cisteíno proteasas (Lenarcic *et al.*, 1997). Se conoce que el primer dominio es capaz de inhibir papaína con valores de K_i en el orden nanomolar, comparables con la proteína natural; mientras, el segundo dominio es capaz de inhibir catepsina D, por lo que pudiera ser el responsable de la actividad inhibidora de aspártico proteasas (Lenarcic y Turk, 1999). Hasta el momento se desconoce la función del tercer dominio de la equistatina (Strukelj *et al.*, 2000).

Se han descrito inhibidores multidominios de la familia BPTI/ Kunitz, como el bikunin (Zhuo *et al.*, 2004) y el inhibidor BMTIA aislado de la garrapata *Boophilus microplus* (Daishi *et al.*, 2004), proteínas que están formadas por dos dominios BPTI/Kunitz; así como los inhibidores de los factores titulares 1 y 2 (TFPI1 y TFPI2) y SmCI (inhibidor aislado a partir del anélido marino *Sabellastarte magnifica*), que poseen tres dominios Kunitz en serie (Wun *et al.*, 1988; Sprecher *et al.*, 1994; Du *et al.*, 2003; Alonso del Rivero *et al.*, 2007). Se ha observado que en inhibidores multidominios de esta familia no todos los dominios presentan actividad inhibidora. Por ejemplo, el primer dominio del TFPI1 humano inhibe el complejo factor VIIa/factor tisular (VIIa/TF) (Wun *et al.*, 1988; Sprecher *et al.*, 1994; Petersen *et al.*, 1996; Burgering *et al.*, 1997; Du *et al.*, 2003); mientras que el segundo dominio inhibe el factor Xa. Sin embargo, el tercer dominio no presenta función inhibidora y solo se ha descrito que posee sitios de unión a la heparina (Mine *et al.*, 2002). Todos son capaces de inhibir enzimas que pertenecen a una misma clase mecanística.

Recientemente se aisló y purificó, a partir de la corona de tentáculos del anélido marino *S. magnifica*, un nuevo inhibidor multidominio (tres dominios) perteneciente a la familia BPTI/Kunitz, capaz de inhibir proteasas de dos clases mecanísticas. SmCI (*S. magnifica* carboxypeptidase inhibitor) es un inhibidor fuerte de serino y metalocarboxipeptidasa A. Es capaz de inhibir serino proteasas de la familia S1 como tripsina, elastasa pancreática y quimotripsina, con valores de K_i en el orden nanomolar para las dos primeras y menos fuertes

(10^{-7} M) para quimotripsina; así como carboxipeptidasa A con un valor de $K_i = 23$ nM. A diferencia del resto de los inhibidores de CPs que se han descrito, SmCI no es capaz de inhibir carboxipeptidasa B. SmCI constituye el primer inhibidor BPTI/Kunitz capaz de inhibir carboxipeptidasa. La obtención recombinante de los dos bidominios de SmCI (SmCI D1-D2 y SmCI D2-D3) mostró que solo el bidominio D1-D2 es capaz de inhibir carboxipeptidasa A, lo que sugiere el papel fundamental del primer dominio en la inhibición de esta enzima (Alonso del Rivero *et al.*, 2012). La presencia de residuos diferentes en el lazo canónico P3-P3' de cada uno de los dominios sugiere una participación diferencial de los dominios en la inhibición de las serino proteasas. Aunque se desconoce actualmente el mecanismo de inhibición de SmCI frente a CPA, estudios preliminares han demostrado que este mecanismo no involucra el extremo carboxilo de la molécula (Alonso del Rivero *et al.*, 2007), como ocurre para la mayoría de los inhibidores de esta enzima (Arolas *et al.*, 2007; Sanglas *et al.*, 2009).

También se presenta este tipo de actividad en proteínas multidominios, formadas por dominios que pertenecen a diferentes familias de inhibidores –inhibidores multidominios heterotípicos– (Christeller, 2005), como en la proteína WFIKKN, formada por múltiples dominios que incluyen un dominio WAP –*Whey Acid Protein*, «inhibidor de metalo proteinasa»–, un dominio follistatin/Kazal, dos dominios Kunitz, un dominio inmunoglobulina y un dominio NTR –*netrin C terminal domain*, que interactúa con proteoglicanos– (Trexler *et al.*, 2001). Se conoce que el segundo dominio Kunitz de esta proteína es un potente inhibidor de tripsina con un valor de $K_i = 9,6$ nmol/L (Nagy *et al.*, 2003).

Inhibidores formados por un solo dominio inhibitorio son capaces de inhibir proteasas de diferentes clases mecanísticas. Por ejemplo, Delfín *et al.* (1994, 1996) informaron sobre la presencia de actividad inhibidora de proteasas que pertenecen a diferentes clases mecanísticas, en un inhibidor aislado a partir de la anémona *Stichodactyla helianthus* (ISH1_STOHE). Este inhibidor, formado por un dominio Kunitz, es capaz de inhibir proteasas serino como tripsina, quimotripsina, plasmina y calicreína bovina; cisteíno proteasas como bromelina y papaína; y aspártico proteasas como la

pepsina. A partir del sobrenadante de un cultivo de *Streptomyces caespitosus* se aisló un nuevo inhibidor bifuncional de la familia SSI, denominado ScNPI, capaz de inhibir enzimas pertenecientes a dos clases mecanísticas. Este inhibidor es capaz de inhibir subtilisina BPN y otras serino proteasas como tripsina y quimotripsina, además de metalo proteasas aisladas de dicho organismo. Estudios de mutagénesis dirigida apuntan a que la inhibición frente a los dos tipos de enzima se realiza, probablemente, por sitios reactivos diferentes, que se localizan en zonas opuestas en la molécula del inhibidor (Hiraga *et al.*, 2000). Otro ejemplo es un inhibidor de un solo dominio aislado de la hemolinfa de *Apis mellifera* que pertenece a la familia de inhibidores Ascaris, capaz de inhibir quimotripsina y catepsina G (Cierpicki *et al.*, 2000).

Otros autores han informado sobre el aislamiento y caracterización de inhibidores de proteasas de plantas, capaces de inhibir enzimas de diferentes clases mecanísticas, e incluso enzimas que no son proteasas. A partir de la semilla de *Eleusine coracana* se aisló un inhibidor de tripsina y α amilasa que pertenece a la familia de inhibidores α amilasa/tripsina. La estructura del complejo α amilasa/inhibidor demostró que la inhibición frente a la α amilasa se realiza por el extremo amino del inhibidor y no coincide con el sitio de unión a la tripsina, que es diferente a otros sitios reactivos típicos informados para inhibidores de serino proteasas (Guorinath *et al.*, 2000). Otros dos inhibidores bifuncionales de esta familia, capaces de inhibir simultáneamente las enzimas α amilasa/subtilisina y α amilasa/proteinasa K, se aislaron, respectivamente, a partir de cebada y trigo (Mundy *et al.*, 1983; Pal *et al.*, 1986). Por su parte, Ritonja *et al.* (1990) informaron sobre la secuencia de un inhibidor aislado de papa capaz de inhibir tripsina y catepsina D, para el que demostraron la existencia de dos sitios de unión diferentes para estas enzimas. Recientemente, un inhibidor bifuncional, activo frente a tripsina y papaína, se aisló de la leguminosa *Prosopis juliflora* (PTPKI). La inhibición frente a las dos enzimas se realiza a través de un mismo lazo de unión, lo que impide la inhibición simultánea de las enzimas (Franco *et al.*, 2002).

La elongación de genes por multiplicación es probablemente la mayor causa de inhibidores de

proteasas multicabezas, pero no es la única. La elongación por fusión de genes es otro posible mecanismo, principalmente en aquellos inhibidores que inhiben enzimas de diferentes clases mecanísticas (Laskowski *et al.*, 1974).

LITERATURA CITADA

- AROLAS, J.L.; J. VENDRELL, F.X. AVILES y L.D. FRICKER (2007): «Metallocooxypeptidasas: emerging drug targets in biomedicina», *Current Pharmaceutical Design*, vol. 13, n.º 3, pp. 347-364.
- ALONSO DEL RIVERO, M.; M. RODRÍGUEZ DE LA VEGA; S.A. TREJO; J. DELFÍN *et al.* (2007): «Isolation, characterization and cDNA cloning of a novel bifunctional inhibitor of metallo cooxypeptidase and serine proteases isolated from the annelid *Sabellastarte magnifica*», *Revista Cubana de Química*, vol. XIX, n.º 1, p. 227.
- ALONSO DEL RIVERO, M.; S.A. TREJO, M.L. REYTOR, M. RODRÍGUEZ DE LA VEGA *et al.* (2012): «Tri-domain bifunctional inhibitor of metallocooxypeptidasas A and serine proteases isolated from marine annelid *Sabellastarte magnifica*», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, n.º 19, pp. 15427-15438.
- ARDET, M. y M. JR. LASKOWSKY (1985): «Turkey ovomucoid third domain inhibits eight different serine proteinases of varied specificity on the same Leu18-Glu19 reactive site», *Biochemistry*, vol. 24, n.º 20, pp. 5313-5320.
- ASCENZI, P.; G. AMICONI, W. BODE, M. BOLOGNES *et al.* (1995): «Proteinase inhibitors from the European Medical Leech *Hirudo medicinalis*: structural, functional and biomedical aspects», *Molecular Aspects in Medicine*, vol. 16, pp. 215-313.
- ASCENZI, P.; G. AMICONI, M. COLETTA, G. LIUPIDI *et al.* (1992): «Binding of hirurin to human α , β , γ -thrombin: a comparative kinetic and thermodynamic study», *Journal of Molecular Biology*, vol. 225, pp. 177-184.
- BIGLER, T.L.; W. LU, S.J. PARK, M. TASHIRO *et al.* (1993): «Binding of amino acid side chains to preformed cavities interaction of serine proteinases with turkey ovomucoid third domains with coded and noncoded P1 residues», *Protein Science*, vol. 2, pp. 786-799.
- BODE, W. y R. HUBER (1992): «Natural protein proteinase inhibitors and theirs interaction with proteinases», *European Journal of Biochemistry*, vol. 204, pp. 433-451.

- BODE, W. y R. HUBER (2000): «Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction», *Biochemical Biophysics Acta*, vol. 1477, pp. 241-252.
- BURGERING, M.J.M.; L.P.M. ORBONS, A. VAN DER DOELEN, J. MULDER *et al.* (1997): «The second Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor: cloning, structure determination and interaction with factor Xa», *Journal of Molecular Biology*, vol. 269, pp. 395-407.
- CHRISTELLER, J.T. (2005): «Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability», *FEBS Journal*, vol. 272, pp. 5710-5722.
- CIERPICKI, T.; J. BANIA y J. OTLEWSKI (2000): «NMR solution structure of *Apis mellifera* chymotrypsin/cathepsin G inhibitor-1 (AMCI-1). Structural similarity with *Ascaris* protease inhibitors», *Protein Science*, vol. 9, pp. 976-984.
- DAISHI, S.; S. SANT'ANNA, H. YOSHICO, R. ANDREOTTI *et al.* (2004): «*Boophilus microplus* tick larvae, a rich source of Kunitz type serine proteinase inhibitors», *Biochimie*, vol. 86, pp. 643-649.
- DELFIN, J.; Y. GONZÁLEZ, J. DÍAZ y M. CHÁVEZ (1994): «Proteinase inhibitor from *Stichodactyla helianthus*: Purification, characterization and immobilization», *Archives of Medical Research*, vol. 25, pp. 199-204.
- DELFIN, J. *et al.* (1996): «Purification, characterization and immobilization of proteinase inhibitors from *Stichodactyla helianthus*», *Toxicon*, vol. 34, n.ºs 11-12, pp. 1367-1376.
- DU, X.; F.M. DENG, H.S. CHAND y W. KISIEL (2003): «Molecular cloning, expression, and characterization of bovine tissue factor pathway inhibitor-2», *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 417, pp. 96-104.
- FORSYTH, S.; A. HORVATH y P. COUGHLIN (2003): «A review and comparison of the murine $\alpha 1$ -antitrypsin and $\alpha 1$ -antichymotrypsin multigene clusters with the human clade A serpins», *Genomics*, vol. 81, pp. 336-345.
- FRANCO, O.L.; M.F. GROSSI DE SA, M.P. SALES, L.V. MELLO *et al.* (2002): «Overlapping binding sites for trypsin and papain o a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora* proteins», *Structure, Function and Genetics*, vol. 49, pp. 335-341.
- FRIEZE, H. y G. WUNDERER (1983): «Biochemistry and application of aprotinin the kallikrein inhibitor from bovine organs», *Arzneimittelforschung*, vol. 33, pp. 479-479.
- GUORINATH, S.; N. ALAM, A. SRINIVASAN, CH. BETZEL *et al.* (2000): «Structure of the bifunctional of trypsin α -amylase from *Ragi* at 2,2 Å resolution», *Acta Cryst*, vol. D56, pp. 287-293.
- HIRAGA, K.; T. SUZUKI y K. ODA (2000): «A novel double-headed proteinaceous inhibitor for metalloproteinase and serine protease», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n.º 33, pp. 251773-251779.
- JONGSMA, M.A. y C. BOLTER (1997): «The adaptation of insects to plant protease inhibitors», *Journal of Insect Physiology*, vol. 43, pp. 885-895.
- KOMIYAMA, T.; T.L. BIGLER, N. YOSHIDA, K. NODA *et al.* (1991): «Replacement of P1 Leu18 by Glu18 in the reactive site of turkey ovomucoid third domain converts it into a strong inhibitor of Glu-specific *Streptomyces griseus* proteinase (GluSGP)», *Journal of Biology and Chemistry*, vol. 266, pp. 10727-10730.
- KRAHN, J. y F.C. STEVENS (1970): «Lima bean trypsin inhibitor. Limited proteolysis by trypsin and chymotrypsin», *Biochemistry*, vol. 9, n.º 13, pp. 2646-2652.
- LASKOWSKI, M.JR. (1986): «Protein inhibitors of serine proteinases –mechanism and classification», *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 199, pp. 1-17.
- LASKOWSKI, M.JR. e I. KATO (1980): «Protein inhibitors of proteinases», *Annual Review of Biochemistry*, vol. 49, pp. 593-626.
- LASKOWSKI, M.JR.; M.A. QASIM y S.M. LU (2000): «Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases», en C. Kleantous (ed.), *Protein-Protein Recognition*, Oxford University Press, pp. 228-279.
- LASKOWSKI, M.JR.; I. KATO, T.R. LEARLY, J. SCHRODE *et al.* (1974): «Evolution of specificity of protein proteinase inhibitors», en *Bayer Symposium V Proteinase Inhibitors*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 597-611.
- LAWRENCE, P.K. y K.R. KOUNDAL (2002): «Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects», *Journal of Biotechnology*, vol. 5, n.º 1, pp. 93-109.
- LENARCIC, B.; A. RITONJA, B. STRUKELJ, B. TURK *et al.* (1997): «Equisatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, pp. 13899-13903.
- LENARCIC, B. y V. TURK (1999): «Thyroglobulin type-1 domains in equisatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, pp. 563-566.
- MACAULEY-PATRICK, S.; L. FAZENDA, B. McNEIL y L.M. HARVEY (2005): «Heterologous protein production

- using the *Pichia pastoris* expresión system», *Yeast*, vol. 22, pp. 249-270.
- MINE, S.; T. YAMAZAKI, T. MIYATA, S. HARA *et al.* (2002): «Structural mechanism for heparin-binding of the third Kunitz domain of human tissue factor pathway inhibitor», *Biochemistry*, vol. 41, pp. 78-85.
- MUNDY, J.; I. SVENDSEN y J. HEJGAARD (1983): «Barley α -amylase/subtilisin inhibitor. I. Isolation and characterization», *Carlsberg Research Communication*, vol. 48, pp. 81-91.
- NAGY, A.; M. TREXLER y L. PATTHY (2003): «Expression, purification and characterization of the second Kunitz type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein», *European Journal of Biochemistry*, vol. 270, pp. 2101-2107.
- OTLEWSKI, J.; F. JELEN, M. ZAKRZEWSKA y A. OLEKSY (2005): «The many faces of protease-protein inhibitor interaction», *EMBO Journal*, vol. 24, pp. 1303-1310.
- PAL, G.P.; C. BETZEL, K.D. JANY y W. SAENGER (1986): «Crystallization of the bifunctional proteinase/ amylase inhibitor PKI-3 and its complex with proteinase K», *FEBS Letter*, vol. 197, pp. 111-114.
- PETERSEN, L.C.; S.E. BJORN, OH. OLSEN *et al.* (1996): «Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type inhibitor domains from tissue factor pathway inhibitor», *European Journal of Biochemistry*, vol. 235, pp. 310-316.
- RAWLINGS, N.D.; F.R. MORTON y A.J. BARRETT (2006): «MEROPS: the peptidase database», *Nucleic Acids Research*, vol. 34, pp. D270-D272.
- RITONJA, A.; I. KRIZAJ, P. MESKO, M. KOPITAR *et al.* (1990): «The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato», *FEBS Letters*, vol. 267, pp. 13-15.
- RYAN, C.A. y L.K. SHUMWAY (1971): «Differential synthesis of chymotrypsin inhibitor I in variegated leaves of a cytoplasmic mutant of tobacco (Dp1)», en H. Fritz y H. Tschesche (eds.), *Conference of Proteinase inhibitors*, Walter de Gruyter, Berlin, pp. 175-188.
- SANGLAS, L.; F.X. AVILÉS, R. HUBER, F.X. GOMIS-RUTH *et al.* (2009): «Mammalian metalloproteinase inhibition at the defense barrier of *Ascaris* parasite», *PNAS*, vol. 106, n.º 6, pp. 1743-1747.
- SCHULER, T.H.; G.M. POPPY, B.R. KERRY e I. DENHOLM (1998): «Insect-resistant transgenic plants», *TIBTECH*, vol. 16, pp. 168-175.
- SONG, H.K.; Y.S. KIM, J.K. YANG, J. MOON *et al.* (1999): «Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 Å resolution», *Journal of Molecular Biology*, vol. 293, n.º 5, pp. 1133-1144.
- SPRECHER, C.A.; W. KISIEL, S. MATHEWES y D.S. FOSTER (1994): «Molecular cloning, expression, and partial characterization of a second human tissue-factor-pathway inhibitor», *PNAS*, vol. 91, pp. 3353-3357.
- STONE, S.R.; P.J. BRAUN y J. HOFSTEENGE (1987): «Identification of regions of thrombin involved in its interaction with hirudin», *Biochemistry*, vol. 26, pp. 4617-4624.
- STRUKELJ, B.; B. LENARIC, K. GRUDEN, J. PUNGERCAR *et al.* (2000): «Equistatin, a protease inhibitor from the sea anemone *Actinia equina*, is composed of three structural and functional domains», *Biochemistry and Biophysics Research Communications*, vol. 269, pp. 732-736.
- STUBBS, M.T. y W. BODE (1995): «Crystal structures of thrombin and thrombin complexes as a framework for antithrombotic drug design», *Perspectives in Drug Discovery Design*, vol. 1, pp. 432-452.
- TREXLER, M.; L. BANYAI y L. PATTHY (2001): «A human protein containing multiple types of protease-inhibitory modules», *PNAS*, vol. 98, pp. 3705-3709.
- TURK, B. (2006): «Targeting proteases: successes failures and future prospects», *Natures Review: Drug Discovery*, vol. 5, pp. 785-799.
- VALUEVA, T.A. y N. MOSOLOV (2004): «Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganism», *Biochemistry*, vol. 69, n.º 1, pp. 1305-1309.
- WUN, T.C.; K.K. KRETZMER, T.J. GIRARD, J.P. MILETICH *et al.* (1988): «Cloning and characterization of a cDNA coding for the lipoprotein-associated coagulation inhibitor shows that it consists of three tandem Kunitz-type inhibitory domains», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 263, pp. 6001-6004.
- ZHUO, L.; V. HASCALLY y K. KIMATA (2004): «Inter- α -trypsin inhibitor, a covalent protein glycosaminoglycan-protein complex», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270, n.º 37, pp. 38079-38082.

