

UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA
METROPOLITANA
Casa abierta al tiempo



C. B. I

"EFECTOS DE LA ATMÓSFERA IÓNICA EN LA ESTABILIDAD CINÉTICA DE LA QUIMOPAPAINA"



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
P R E S E N T A
GUADALUPE OLIVIA CAMPOS SALINAS

México, D.F.

SEPTIEMBRE DEL 2001.

Esta tesis se realizó en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química,
División de Ciencias Básicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma
Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de los Doctores Dolores Silvia
Solís Mendiola y Andrés Hernández Arana.

JURADO

Dr. Andrés Hernández Arana	Presidente
Dra. Alberta Jacqueline Padilla Zúñiga	Secretario
Dr. Abel Moreno Cárcamo	Vocal

DEDICATORIAS

*Hoy que por fin he cubierto otra de mis metas
Me doy cuenta de la suerte que he tenido al
Poder tener la fortuna de llegar hasta aquí
Es por eso que agradezco a Dios el que me
Haya brindado la oportunidad de tener libre albedrío
Y me conservó en buena salud física y espiritual
Señor, Gracias por ser mi amigo.*

A MIS PADRES

Jamás podré pagarles con nada lo que han hecho por mí: me dieron la vida, educación, vestido y comida, pero lo que es más importante, me dieron su amor y cuidado, es por ello que esta es una demostración de agradecimiento por los buenos padres que han sido siempre.

A MI ESPOSO

Edu, eres la fuerza que me mantiene en pie, la esperanza que no me deja dudar, la ilusión que me hace soñar, eres mi premio en la vida, sabes que no lo habría logrado sin tí.

A MIS HERMANAS Y HERMANO

Soy afortunada de tener hermanos tan lindos, cariñosos y atentos conmigo, les agradezco todos estos años en los que hemos permanecido juntos.

A MIS CUÑADOS

Gracias por todo el apoyo y afecto que me brindan, espero no defraudarles.

A MIS SUEGROS

Ustedes siempre me han brindado su apoyo incondicional y me han dado infinitas muestras de cariño, Ustedes son parte importante de este triunfo.

A MIS AMIGAS

Es tan importante tener personas en quien confiar y con quien compartir alegrías, triunfos y fracasos. Mggue y Verito, gracias por ser mis amigas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través de la Beca de maestría con número de registro 130445.

Este trabajo pudo ser realizado en parte gracias al apoyo de CONACYT por medio del convenio número 400200-5-29124E.

A la Dra. D. Silvia Solís Mendiola por haberme permitido trabajar bajo su asesoría, le agradezco su dedicación y paciencia.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez le agradezco infinitamente todas las aportaciones teóricas y prácticas que muy amablemente me concedió, y por permitirme trabajar bajo un ambiente de respeto y cordialidad.

Al Dr. Andrés Hernández Arana por el tiempo que dedicó a este Trabajo, por sus asesorías y por la dedicación puesta en ello le agradezco muy calurosamente todas las aportaciones que brindó a esta Tesis.

A mis compañeros del Área de Biofísicoquímica les agradezco las aportaciones directas o indirectas que hayan brindado a este trabajo, así como el compañerismo ofrecido.

A mis amigas Edith, Araceli y Claudia quiero agradecer de manera muy especial el apoyo que me brindaron siempre dentro de las actividades de trabajo y sobre todo les agradezco su amistad, que es uno de los tesoros más importantes y más escasos con los que cuenta el hombre. Gracias por su amistad.

INDICE

225996

CAPITULO 1. GENERALIDADES	1
1.1 INTRODUCCION	2
1.2 QUIMOPAPAINA	4
1.3 ESTABILIDAD EN PROTEINAS	7
1.4 TECNICAS EXPERIMENTALES	11
a) Cromatografía de Intercambio Iónico	12
b) Electroforesis	14
c) Dicroísmo Circular	15
1.5 OBJETIVO	20
 CAPITULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	 21
2.1 MATERIALES	22
2.2 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA	22
2.3 PURIFICACION	23
2.4 PREPARACION DE LA MUESTRA	24
2.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION	24
2.6 COMPROBACION DE PUREZA	25
a) Recromatografía	26
b) Electroforesis	26
2.7 CINETICAS DE DESPLEGAMIENTO	26

CAPITULO 3.	RESULTADOS Y DISCUSION	28
3.1	PURIFICACION	29
3.2	PUREZA	31
a)	Recromatografía	31
b)	Electroforesis	33
3.3	CINETICAS DE DESPLEGAMIENTO	35



COORDINACIÓN DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

CAPITULO 4.	CONCLUSIONES	50
4	CONCLUSIONES	51
CAPITULO 5.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53
5	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	54

CAPÍTULO 1

GENERALIDADES

1.1 INTRODUCCION

Las macromoléculas denominadas proteínas, formadas por una gran variedad de aminoácidos, juegan un papel muy importante en casi todos los procesos biológicos. Su importancia se encuentra en la actividad que las proteínas tienen en prácticamente todas las funciones biológicas como son catálisis enzimática, transporte y almacenamiento, generación y transmisión de impulsos nerviosos, el control y crecimiento, etc.

La enorme gama de diferentes funciones que pueden desarrollar las proteínas se debe a las distintas posibilidades de plegamiento para formar estructuras tridimensionales muy diversas, es por ello que resulta de gran importancia el conocer la manera en que la secuencia de aminoácidos determina la conformación de las proteínas, así como las causas por las que dicha conformación se ve alterada [1].

En la actualidad se sabe que las proteínas se encuentran divididas en cuatro niveles estructurales que les confieren características específicas. El primero de ellos, la estructura primaria, se refiere al ordenamiento que los aminoácidos han tomado al formar la cadena principal, es decir, el establecimiento de la secuencia de aminoácidos; en la estructura secundaria se comienza a percibir la presencia de fuerzas específicas (puentes de hidrógeno, van der Waals, interacciones electrostáticas) debido a las distancias entre átomos o tipos de cargas presentes en los distintos aminoácidos, originando con ello la aparición de hélices α y hojas β principalmente; posteriormente se comienza a establecer una conformación tridimensional denominada estructura terciaria, la cual muestra el aspecto espacial que la proteína ha adquirido; finalmente y sólo en los casos en los que se cuenta con más de una cadena polipeptídica se

observa la presencia de la estructura cuaternaria, que indica la forma en la que dichas subunidades interactúan entre sí.

Las enzimas son aquellas proteínas que actúan como catalizadores en los sistemas biológicos, cuentan con un elevado grado de especificidad respecto a sus sustratos y aceleran reacciones químicas específicas. La actividad catalítica de las enzimas depende de la integridad de su conformación proteica nativa. Si se desnaturaliza o disocia una enzima en subunidades, se pierde normalmente su actividad catalítica [2].

Las enzimas son clasificadas por el tipo de reacción que catalizan, siendo de las más estudiadas las enzimas proteolíticas, quienes se caracterizan por hidrolizar parcial o selectivamente cadenas polipeptídicas las proteasas tiólicas, cisteínicas o sulfhidrílicas vegetales pertenecen a este tipo de enzimas [3]. La actividad catalítica en las proteasas cisteínicas depende del grupo tiol presente en un residuo de cisteína.

Las enzimas proteolíticas son obtenidas a partir de fuentes vegetales y animales demostrándose que existe gran homología entre ambos tipos de enzimas tanto en estructura como en la función de las mismas, sin embargo, las más conocidas y estudiadas son las primeras, ya que se pueden obtener en mayor cantidad.

Los usos de las enzimas cisteínicas vegetales son muy variados, algunos de ellos son en ablandadores de carne o clarificación de la cerveza [4]. Respecto a su función metabólica se sabe que pueden actuar como agentes protectores contra infecciones fúngicas en las plantas [5].

1.2 QUIMOPAPAINA

El látex de papaya (*Carica papaya L*) es rico en el contenido de proteasas sulfhidrúlicas, estando ya caracterizadas las más abundantes: papaína, quimopapaína y caricaína [6]. Se sabe que el contenido de estas enzimas en el látex de papaya es de 5% de papaína, 27% de quimopapaína y 14% de caricaína. Se observó que cada una de estas especies muestran una gran homología en su estructura primaria lo que les confiere masas moleculares similares (papaína 23350 Da [5], quimopapaína 24000 Da [7] y caricaína 26-28000 Da [8]). Las tres enzimas son básicas, mostrando una considerable diferencia en cuanto a sus puntos isoelectricos ($pI_{\text{papaína}}$ 8.75, $pI_{\text{quimopapaína}}$ 10.1-10.6 y $pI_{\text{caricaína}}$ 11). Estas características les hacen presentar propiedades físicas distintas [8].

Al estudiar más a fondo la estructura primaria de las tres proteasas se encontró que la quimopapaína cuenta con 218 residuos de aminoácidos, de los cuales 126 (58%) son idénticos a los que conforman la cadena polipeptídica de la papaína y 141 (65%) residuos iguales a los de caricaína además de una cisteína libre en la posición 25 requerida para la actividad, al considerar la estructura tridimensional de las tres enzimas se observan tres puentes disulfuro. También se lograron separar dos formas distintas de quimopapaína [9].

La quimopapaína es una de las proteasas sulfhidríticas vegetales más ampliamente estudiada, conociéndose de ella además de su estructura primaria (Fig. 1) [9], su masa molecular que tiene un valor de 24 000 Da [7] y un punto isoeléctrico que se encuentra entre 10.1 y 10.6 [10].

1	5	10	15	20	25	29																							
Y	P	Q	S	I	D	W	R	A	K	G	A	V	T	P	V	K	N	Q	G	A	C	G	S	C	W	A	F	S	
30	35	40	45	50	55	59																							
T	I	A	T	V	E	G	I	N	K	I	V	T	G	N	L	L	E	L	S	E	Q	E	L	V	D	C	D	K	H
60	65	70	75	80	85	89																							
S	Y	G	C	K	G	G	Y	Q	T	T	S	L	Q	Y	V	A	N	N	G	V	H	T	S	K	V	Y	P	Y	Q
90	95	100	105	110	115	119																							
A	K	Q	Y	K	C	R	A	T	D	K	P	G	P	K	V	K	I	T	G	Y	K	R	V	P	S	N	C	E	T
120	125	130	135	140	145	149																							
S	F	L	G	A	L	A	N	Q	P	L	S	V	L	V	E	A	G	G	K	P	F	Q	L	Y	K	S	G	V	F
150	155	160	165	170	175	179																							
D	G	P	C	G	T	K	L	D	H	A	V	T	A	V	G	Y	G	T	S	D	G	K	N	Y	I	I	K	N	
180	185	190	195	200	205	209																							
S	W	G	P	N	W	G	E	K	G	Y	M	R	L	K	R	Q	S	G	N	S	Q	G	T	C	G	V	Y	K	S
210	215	218																											
S	Y	Y	P	F	K	G	F	A																					

Figura 1. Estructura primaria de quimopapaína representando cada uno de sus 218 residuos de aminoácidos.

Gracias a estudios de rayos X se determinó la estructura tridimensional de quimopapaína (Fig. 2), encontrándose que la cadena polipeptídica está plegada en dos dominios de aproximadamente el mismo tamaño pero de diferente conformación. El primer dominio está conformado principalmente por hélices α , mientras que el otro dominio consiste esencialmente de hojas β antiparalelas. El sitio activo está localizado en la interfase entre ambos dominios, con su cisteína esencial en la posición 25 [11].

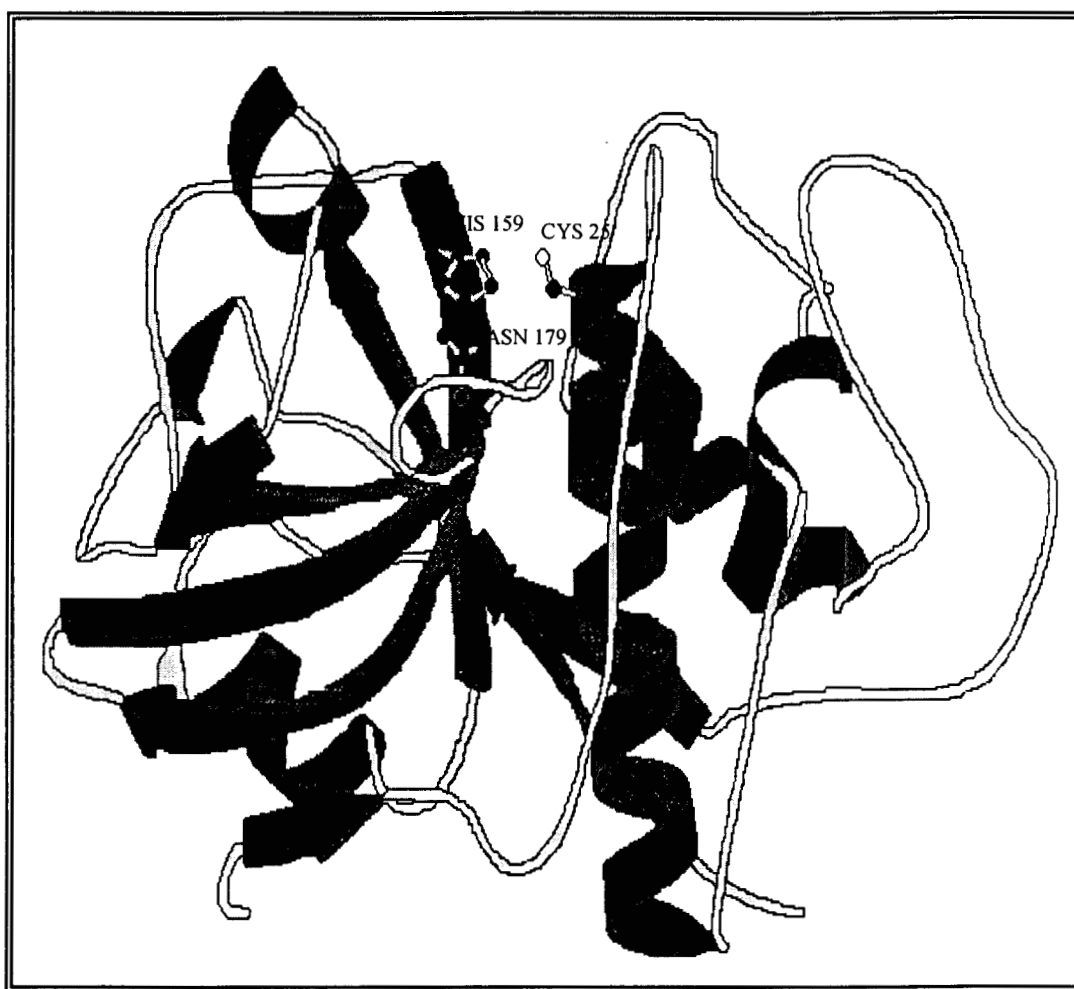
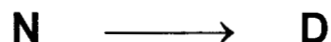


Figura 2. Representación de la estructura tridimensional de quimopapaína, mostrando su sitio activo ubicado entre cisteína 25 – histidina 159 – asparagina 179. Se muestran en rojo las hélices α , en verde las hojas β , en amarillo los giros β así como asas que conectan a los elementos de estructura secundaria, y en negro se muestran los residuos que integran el sitio activo.

225996

Después de haber analizado las condiciones estructurales de la quimopapaína, se analizó la cinética de desplegamiento de la enzima, en donde gracias a estudios calorimétricos se encontró que la proteasa presenta una desnaturalización de tipo irreversible [12]. Así mismo, al realizar estudios de desnaturalización térmica se pudo apreciar que este proceso de desplegamiento se ajusta a una cinética de primer orden [13], es decir, no existe un estado desplegado U reversible en equilibrio con la proteína nativa, tratándose de un proceso de 2 estados, es decir:



1.3 ESTABILIDAD EN PROTEINAS

Se ha mencionado la importancia de conocer la conformación estructural que tienen las proteínas al encontrarse en estado nativo, es decir, bajo condiciones fisiológicas, sin embargo, es aún de mayor importancia conocer los factores por los que estas macromoléculas pierden su estructura original y cómo se ven afectadas en cuanto a su función biológica.

La conformación plegada (nativa) de proteínas es sólo estable dentro de ciertas condiciones que pueden ser interrumpidas por un cambio en el ambiente, tal como un aumento en la temperatura, variación del pH, aumento en la presión o la adición de algún agente desnaturalizante. La

proteína se encuentra entonces desplegada, es decir, ha perdido parcial o totalmente su conformación estructural original (Fig. 3).

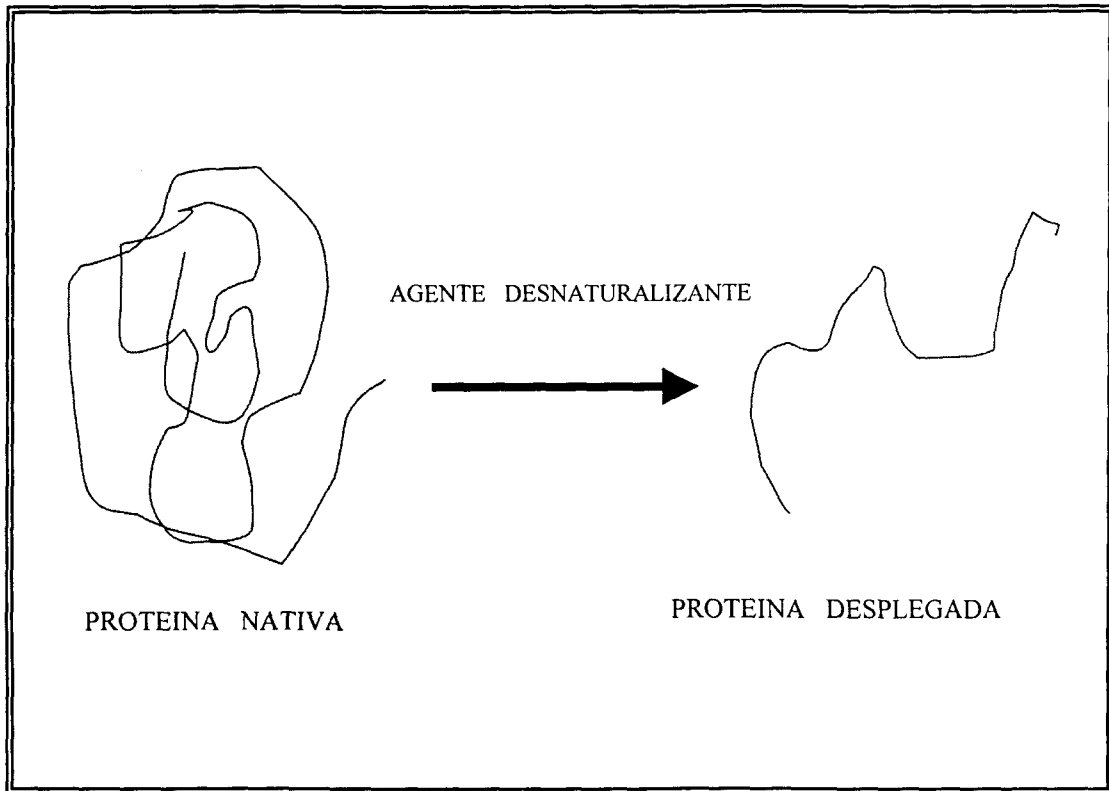


Figura 3. Figura esquemática de un proceso de desnaturalización en donde se aprecia la pérdida de la estructura terciaria de la macromolécula biológica y la conservación de la estructura primaria.

La desnaturalización no implica la pérdida de estructura primaria. En algunos casos la proteína puede ser desplegada por la ruptura de algún enlace disulfuro presente, removiendo algún cofactor esencial, mutando ciertos residuos cruciales o quitando residuos de la estructura primaria [14].

Como consecuencia de la desnaturalización los grupos hidrofóbicos ubicados en el interior de la macromolécula quedan expuestos al solvente acuoso facilitando la interacción entre grupos no polares de diferentes cadenas al azar, lo que puede provocar a su vez la agregación y/o precipitación de la enzima debido a una disminución en la solubilidad de la solución[15].

Se ha observado que en soluciones de proteínas la presencia de sales afecta tanto la estabilidad de estas macromoléculas, sus propiedades fisicoquímicas se ven alteradas [16 y 17], así como el pK_a de algunos de sus grupos. La solubilidad de las proteínas es muy sensible tanto a la presencia de sales así como a cambio en la concentración de iones hidronio [18]. La alteración de estas propiedades por la presencia de sales depende tanto de la naturaleza de la sal como de la proteína. El efecto de las sales sobre las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas se ve reflejado en los fenómenos de disminución de solubilidad y agregación de proteínas (para altas concentraciones de electrolito) [19]. Dicho efecto está definido en términos de 2 fenómenos que se contraponen:

- a) "Salting-in": se da entre iones y moléculas polares (en función de la fuerza iónica) y aumenta la solubilidad de las proteínas en solución salina, y
- b) "Salting-out": presentándose entre grupos no polares (mejor explicado por el modelo de cavidad [20]), tiene lugar a altas concentraciones de sal (fuerza iónica ≥ 1.0 M) y como resultado se presenta la precipitación.

Se ha observado que los agentes que aumentan la solubilidad en las proteínas, son buenos agentes desnaturalizantes de la estructura nativa, mientras que los agentes precipitantes son también buenos estabilizantes de la estructura proteica [21].

La serie de iones Hofmeister puede servir como guía para pronosticar el comportamiento que una proteína tendrá ante una gran variedad de sales manejadas a distintas concentraciones [22]. Hofmeister ordenó aniones y cationes de acuerdo a su habilidad para precipitar proteínas, mostrando que los aniones son más efectivos que los cationes en la precipitación de proteínas [17].

Al hablar de sales es necesario enfocar la atención en la presencia de iones, ya que estos juegan un papel crucial en la solución proteica al darse una competencia de cargas entre iones y agua para con la proteína. En este caso es vital el considerar la fuerza iónica, la cual es un parámetro que ofrece una descripción completa de una solución salina, al considerar los tipos de iones presentes y la cantidad de cada uno de ellos. La fuerza iónica está definida con la siguiente fórmula:

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i Z_i^2$$

En donde:

I = Fuerza iónica

C_i = Concentración molal de la i -ésima sustancia
iónica

Z_i = Carga electrostática de la i -ésima sustancia
iónica

La fuerza iónica es una propiedad de las soluciones que está relacionada tanto con la concentración de los iones en disolución, así como con la carga [23]. La fuerza iónica está basada en la teoría de Debye-Hückel de los electrolitos, la cual supone lo siguiente:

- 1) Los electrolitos se hallan completamente disociados en iones en solución
- 2) Las soluciones son diluidas, su concentración es 0.01M o menor, y
- 3) En promedio, cada ion está rodeado por iones de carga opuesta formando la atmósfera iónica [24].

1.4 TECNICAS EXPERIMENTALES

Para poder estudiar tanto la conformación estructural como el comportamiento de una proteína bajo ciertas circunstancias, es necesario valerse de distintas técnicas experimentales según las necesidades del estudio de interés.

a) CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO

La cromatografía es una de las técnicas más utilizadas para la separación y/o purificación de proteínas. La columna cromatográfica es empacada (fase estacionaria) con algún material que puede absorber selectivamente moléculas con base en diferencias en su estructura química (diferentes masas moleculares), o bien, con base en diferencias respecto a carga eléctrica. La separación se lleva a cabo con la ayuda de algún eluyente (fase móvil) que arrastra a las moléculas a las afueras de la columna (Fig. 4).

Cuando una mezcla de proteínas cuenta con diferencias apreciables en su carga eléctrica, se puede usar cromatografía de intercambio iónico, en donde la fase estacionaria y la mezcla quedan unidas al tener cargas eléctricas opuestas, el eluyente (donde se establece un gradiente salino) arrastrará primero a la proteína que tenga menor interacción con la columna al pH del eluyente, de manera que se puede conseguir la separación óptima de moléculas mediante un cambio gradual de la concentración salina de la solución que se pasa a través de la columna.

Cuando se usan sobre la columna cromatográfica presiones que van de 5000 a 10 000 psi para llevar a cabo la separación, entonces la técnica se vuelve más eficiente, llevando el nombre de High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Resolución, HPLC) [25].

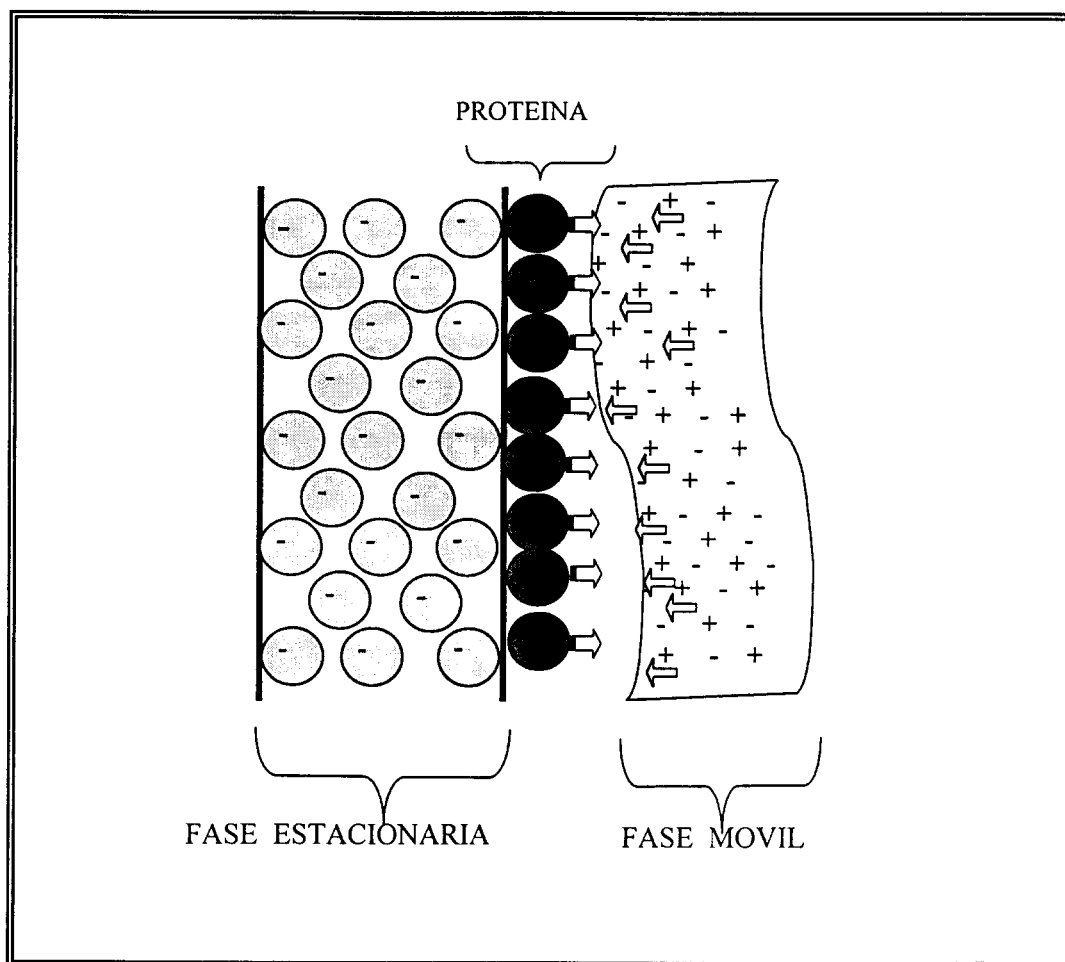


Figura 4. Representación esquemática de una columna cromatográfica de intercambio catiónico.

b) ELECTROFORESIS

Esta técnica es utilizada para la separación de proteínas y está basada en el desplazamiento de las proteínas cargadas dentro de un campo eléctrico; dicho procedimiento es muy útil como método analítico. La electroforesis se lleva a cabo en geles formados por cadenas entrecruzadas de poliacrilamida. Este gel actúa como un tamiz molecular, retrasando el desplazamiento de la proteína (Fig. 5).

Un método electroforético comúnmente utilizado para la estimación de la pureza y la masa molecular, utiliza el detergente dodecilsulfato de sodio (SDS), el cual se une a la mayoría de las proteínas (probablemente mediante interacciones hidrofóbicas) en una cantidad que es proporcional a la masa molecular de la proteína, alrededor de una molécula por cada dos residuos de aminoácidos y en donde la muestra adquiere una carga aparente negativa debido a la presencia del detergente. La electroforesis en presencia de SDS separa a las proteínas casi exclusivamente en función de la masa relativa, de forma que los péptidos pequeños se desplazan más rápidamente; sin embargo, cuando la muestra es aplicada en ausencia de SDS, la carga depende tanto del pI de la enzima, como del pH del amortiguador en el que la enzima se encuentra disuelta.

La electroforesis también permite la determinación de propiedades cruciales de una proteína, tales como su punto isoeléctrico y la masa molecular de forma aproximada [2].

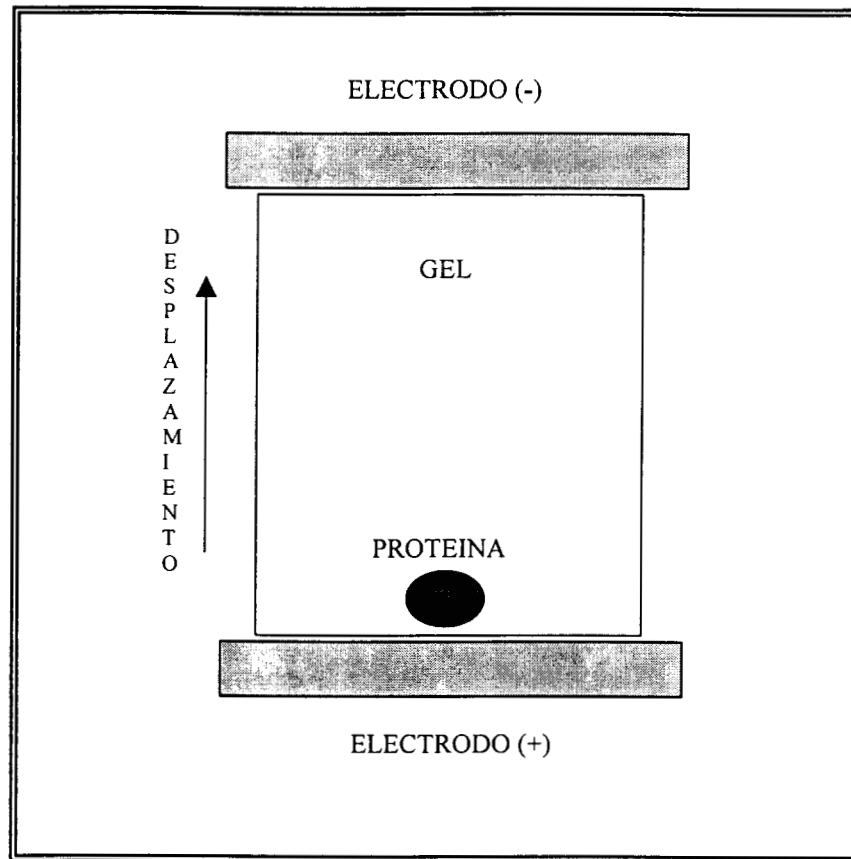


Figura 5. Representación esquemática de la técnica de separación denominada electroforesis en ausencia de SDS.

c) DICROISMO CIRCULAR

El fenómeno de dicroísmo circular es muy sensible a la estructura de polipéptidos y proteínas, este fenómeno es observado cuando la materia ópticamente activa absorbe de forma diferente luz circularmente polarizada

hacia la izquierda y derecha [26]. Un esquema de este fenómeno se muestra en la figura 6.

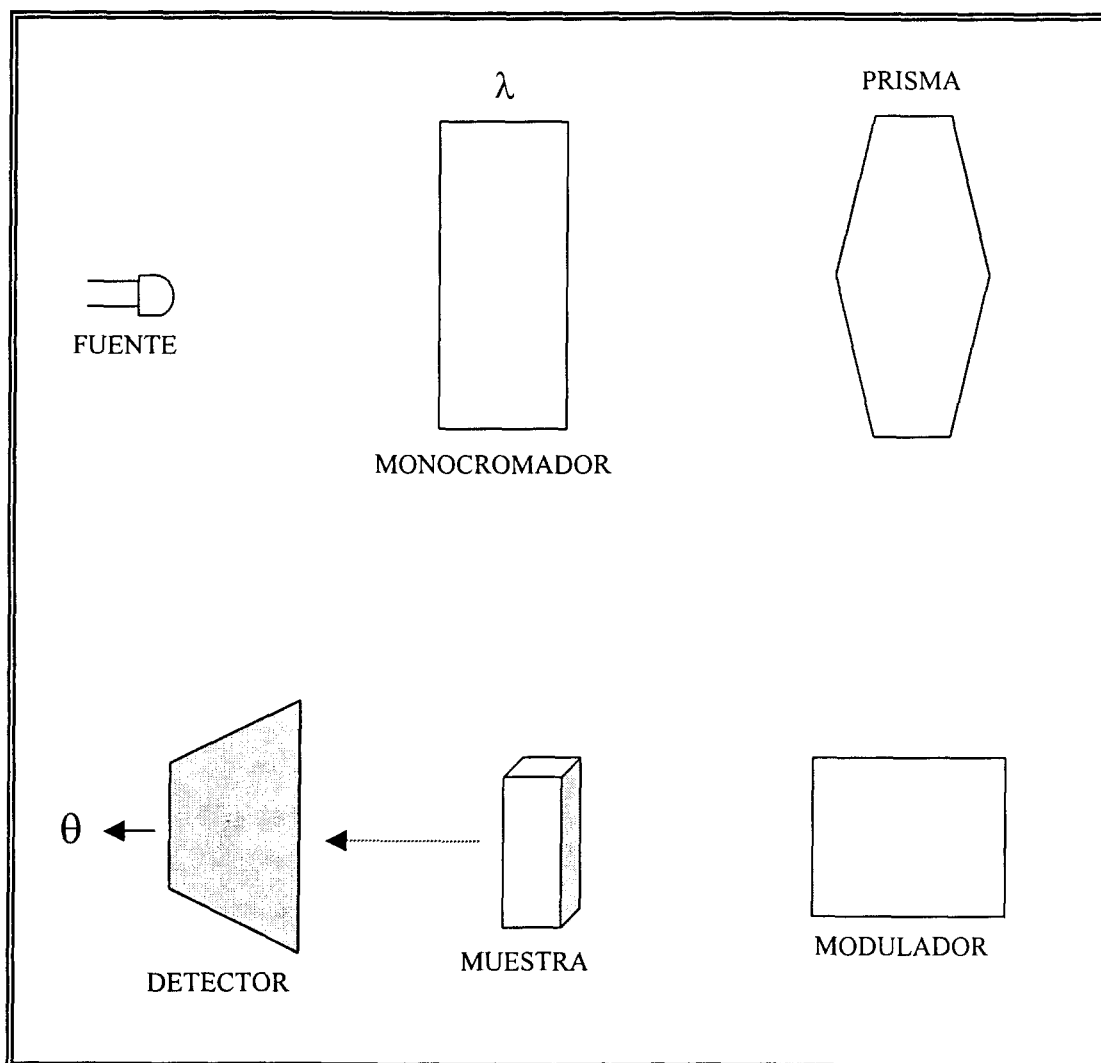


Figura 6. Representación esquemática del fenómeno del dicroísmo circular medido a través de la elipticidad.

Básicamente se tiene una lámpara que emite radiación que llega a un monocromador, el cual permite que el paso de radiación sea de una determinada longitud de onda (λ). Posteriormente, pasa a través de un prisma quien polarizará los rayos en dos planos, al llegar estos al modulador, se retardará la fase de uno de los componentes de la radiación, originando con ello la polarización circular hacia izquierda y derecha de la luz incidente (figura 7) .

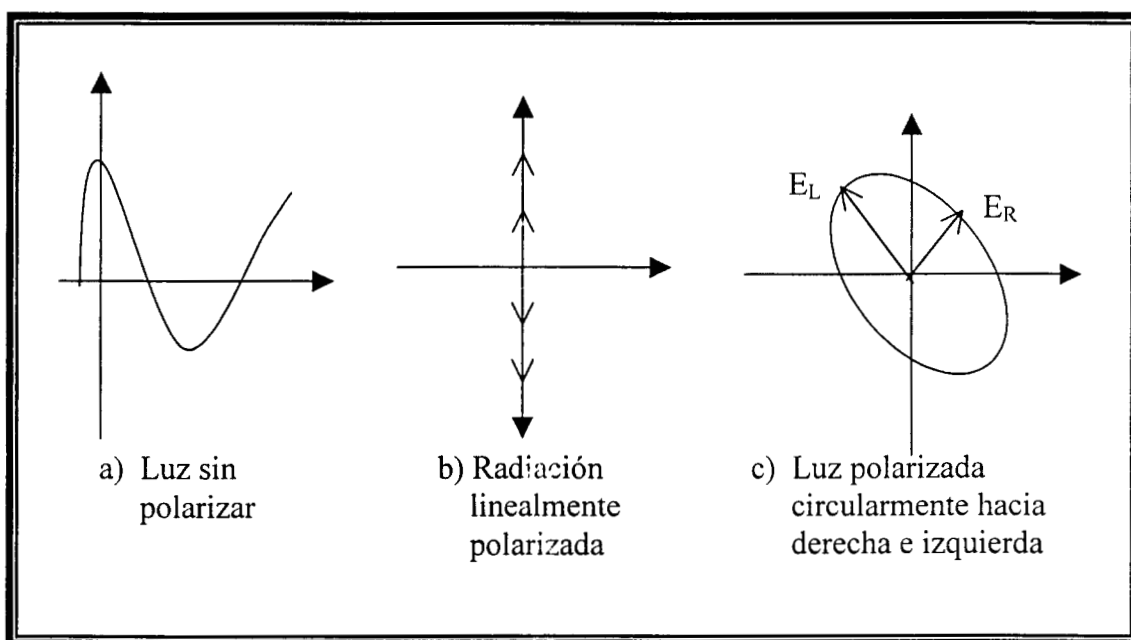


Figura 7. Polarización de la radiación en el fenómeno de dicroísmo circular . a) Luz en una determinada longitud de onda. b) Luz plano polarizada. c) Luz circularmente polarizada mostrando sus componentes eléctricos.

Una vez que se ha logrado tener al haz luminoso en estas condiciones se hace pasar a través de la muestra, la cual debido a sus características ópticas absorberá una determinada cantidad de luz. La luz que no sea

absorbida por la muestra será cuantificada al llegar al detector, quien por medio de una serie de instrumentos electrónicos arrojará un valor numérico: la elipticidad (θ). La elipticidad es el efecto del fenómeno de dicroísmo circular y está definida como la cotangente del cociente del eje menor al eje mayor de la elipse [27]

$$\theta = \text{Arc Tg } [E_R / E_L]$$

Este parámetro mostrará valores específicos dependiendo de las características estructurales que posea la muestra en función de pH, temperatura, grado de desnaturalización, pureza, etc.

Dependiendo del instrumento de dicroísmo circular usado, los datos son registrados como la diferencia en absorbancia de la luz circularmente polarizada hacia derecha e izquierda, y esta diferencia a su vez se relaciona con el coeficiente de extinción (ϵ) por medio de la ley de Lambert y Beer:

$$A = \epsilon b c \quad \Rightarrow \quad \epsilon = \frac{A}{b \times c}$$

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R = \frac{A_L - A_R}{b \times c}$$

Donde:

A_L , A_R = Absorbancia de los vectores izquierdo y derecho (adimensional)

c = Concentración de la muestra ópticamente activa (mol/l)

d = Longitud de recorrido óptico (cm)

$\Delta\epsilon$ = Diferencia del coeficiente de extinción de derecha e izquierda

($[\text{mol.cm}]^{-1}$ o $[\text{mol.residuo.cm}]^{-1}$)

Los datos de dicroísmo circular pueden reportarse como elipticidad molar o como elipticidad por residuo:

$$[\theta] = 3300 \times \Delta\epsilon$$

$$[\theta] = \frac{\theta_{\text{OBS}} \times 100 \text{ Mr}}{c \times d}$$

$$[\theta]_{\text{MRW}} = \frac{\theta_{\text{OBS}} \times 100 \times \text{MRW}}{c \times d} \quad \text{y} \quad \text{MRW} = \frac{\text{Mr}}{\text{Na}}$$

Donde:

θ_{OBS} = Elipticidad observada (mdeg)

c = concentración de la proteína (mg / ml)

d = longitud de recorrido óptico (cm)

Mr = Masa molecular de la proteína

MRW = Peso por residuo medio

Na = Número de aminoácidos por proteína

Las bandas de dicroísmo circular de proteínas ocurren en dos regiones espectrales: la región de UV lejano o región amida (170 – 250 nm) está dominada por contribuciones de los enlaces peptídicos; mientras que en la región del UV cercano (250 – 350 nm) se aprecia la presencia de aminoácidos aromáticos, enlaces disulfuro y grupos prostéticos. Las dos regiones espectrales muestran información distinta acerca de la estructura de la proteína. Las bandas de dicroísmo circular en la región amida contienen información acerca de los enlaces peptídicos y de la estructura secundaria de una proteína, y son frecuentemente empleadas para monitorear cambios en la estructura secundaria en el curso de una transición estructural en la proteína [28].

1.5 OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo de tesis es estudiar la cinética de desplegamiento térmico de la enzima denominada quimopapaína, observando el efecto que sobre su estabilidad estructural tienen algunas sales tales como NaCl, Na₂SO₄ y LiCl, usadas en distintas concentraciones.

225996

CAPÍTULO 2

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 MATERIALES

Se utilizaron dos lotes de quimopapaína parcialmente purificados, el primer lote con número 25T9011 y el segundo con número 124F80751 (EC.3.4.22.6), ambos lotes de la compañía Sigma Chemical Co., St. Louis Missouri, U.S.A.

También se utilizaron algunos otros reactivos como son: Iodoacetamida y azida de sodio de marca Sigma, 2-mercaptoetanol proporcionado por Merck, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, acetato de sodio, ácido acético, cloruro de sodio, sulfato de sodio y cloruro de litio de marca J. T. Baker. Todos los reactivos usados son de grado analítico.

2.2 INHIBICION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA

La quimopapaína, al pertenecer al grupo de enzimas proteolíticas, tiende a autohidrolizarse fácilmente, por lo que es necesario desactivar su sitio activo de manera irreversible antes de proceder a cualquier tipo de experimento. Se disolvió la proteína en un amortiguador de fosfatos 0.05M a un pH 7.0, se le agregó 2-mercaptoetanol 0.1M manteniéndolo en baño de hielo y se dejó en agitación durante media hora. Posteriormente, se adicionó iodoacetamida 0.1M y se dejó reaccionar por 1 hora.

El 2-mercaptoetanol lleva a cabo la reducción de la enzima, la cual ayudó a debilitar los puentes disulfuro presentes en el sitio catalítico (debido a la aparición de puentes de hidrógeno), seguido de una carboximetilación con iodoacetamida, la que bloquea la actividad de los grupos tiol presentes en dicho lugar. Finalmente, la muestra se filtró y mantuvo en refrigeración hasta su uso.

2.3 PURIFICACION

La separación de quimopapaína comercial que contiene la proteína de interés mezclada con caricaína se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos tipo HPLC VARIAN 5000, utilizando una columna de intercambio catiónico Shodex IEC SP 825, de 75 mm de longitud y 8 mm de diámetro interno. Se realizaron inyecciones de 1 ml de muestra comercial a una concentración aproximada de 6.5 mg/ml.

Las condiciones de operación más adecuadas para la separación de la mezcla de proteínas utilizadas fueron:

- 1) Gradiente salino a base de dos amortiguadores de fosfato 0.05 M y pH 7.0 con y sin NaCl 1M

- 2) Flujo de elución de 0.5 ml/min
- 3) La absorbancia de la muestra diluída se determinó a una longitud de onda de 280 nm.

2.4 PREPARACION DE LA MUESTRA

Una vez que se purificó la enzima se preparó antes de iniciar los estudios de desnaturalización. Se recolectó la proteína a la salida del cromatógrafo, se procedió a dializar la muestra contra agua desionizada hasta que se obtuvo un porcentaje mínimo de sales de fosfato presentes en la muestra. Posteriormente se liofilizó la quimopapaína. El tiempo de liofilizado varió dependiendo del volumen de la muestra. Una vez que se obtuvo la enzima sólida, se conservó aislada y en refrigeración.

2.5 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION

Antes de realizar experimentos analíticos, en donde es de suma importancia conocer la concentración de la proteína en solución, la cual se

midió indirectamente por medio de la absorbancia, inmersa en la ley de Lambert y Beer:

$$A = \epsilon bc$$

En donde: A = Absorbancia [adimensional]

ϵ = Coeficiente de extinción [$\text{ml} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$]

b = Longitud del recorrido óptico a través de la muestra [cm]

c = Concentración de la muestra [mg/ml]

Para determinar la concentración de la muestra se utilizó un espectrofotómetro HP 8453, en donde la absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 18.5$ [29].

2.6 COMPROBACION DE PUREZA

Es de suma importancia que antes de llevar a cabo cualquier tipo de estudio se tenga certeza de que la muestra de análisis se encuentre libre de cualquier impureza, con este propósito se aplicaron 2 técnicas distintas:

a) RECROMATOGRAFIA

Se inyectaron muestras de quimopapaína en el mismo equipo y condiciones idénticas a las descritas en sección 2.3, después de haber sido purificadas por medio del método de cromatografía de intercambio iónico y preparadas según se señala en sección 2.4

b) ELECTROFORESIS

Se llevaron a cabo pruebas de electroforesis en un equipo Pharmacia LKB Phast System, sobre una placa de gel homogéneo de poliacrilamida al 20%, en ausencia y presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS). La muestra de enzima ya disuelta en amortiguador de Tris/EDTA 10mM/1mM pH 8.0 se preparó a una concentración de 2.0 mg/ml aproximadamente para el caso de proteína nativa y de 4.0 mg/ml para el análisis en presencia de SDS.

2.7 CINETICAS DE DESPLEGAMIENTO

Para monitorear los cambios estructurales que la enzima presenta como resultado de una desnaturalización térmica, se realizaron mediciones de elipticidad, para lo cual se utilizó un espectropolarímetro JASCO-715,

equipado con un porta celdas tipo Peltier (JASCO PTC-348 WI), y celda con un recorrido óptico de 1cm.

La desnaturalización térmica de la quimopapaína en función del tiempo se obtuvo a una temperatura de 85.0 ± 0.1 °C, siguiendo la señal de elipticidad a una longitud de onda de 221 nm. La cantidad necesaria de solución concentrada de proteína se inyectó en la celda que contenía previamente amortiguador de acetatos 0.01M con o sin sal y a un pH 4.5, habiéndose estabilizado previamente a la temperatura deseada. En todos los casos se conservó aproximadamente constante la concentración de la proteína nativa a 0.02 mg/ml. La enzima se encontraba disuelta en el mismo amortiguador antes mencionado. Las muestras se mantuvieron en agitación permanente a una velocidad de 400 rpm por medio de un agitador magnético para permitir que la proteína en solución y el amortiguador se mezclaran rápidamente y se alcanzara el equilibrio térmico.

Las sales que se usaron en los experimentos de desplegamiento fueron NaCl, Na₂SO₄ y LiCl.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 PURIFICACION

Después de llevar a cabo el proceso de separación de la quimopapaína comercial por cromatografía de intercambio iónico, se pudo observar por medio del cromatograma (Fig. 8) la presencia de 7 picos, en donde se tiene lo siguiente:

Pico 1: se debe a la presencia de impurezas adicionales a proteínas presentes en la muestra comercial. Lo anterior se supone debido a que por el corto tiempo de retención en la columna (aproximadamente 6.5 minutos) debe presentar una diferencia de potencial de hidrógeno muy pequeño, que no corresponde a lo mostrado por alguna de las enzimas presentes en la muestra comercial.

Picos 2-5: éstos corresponden a las 4 isoformas de quimopapaína, según lo reportado en [30]. Los cuatro tipos de quimopapaína son muy parecidos en cuanto a masas moleculares, por lo que no es conveniente realizar la separación por medio de cromatografía en gel, la cual basa el principio de separación en la diferencia de masas moleculares. Los tiempos de retención en la columna son 18.5, 19.5, 21.3 y 22.4 minutos respectivamente.

Picos 6 y 7: muestran la presencia de las dos isoformas de caricaína presentes en la quimopapaína comercial. Se deduce que se trata de esta

enzima debido al mayor tiempo de retención en la columna, lo que implica un punto isoelectrico más alcalino que el de quimopapaína, aproximadamente de 11,0 [10].

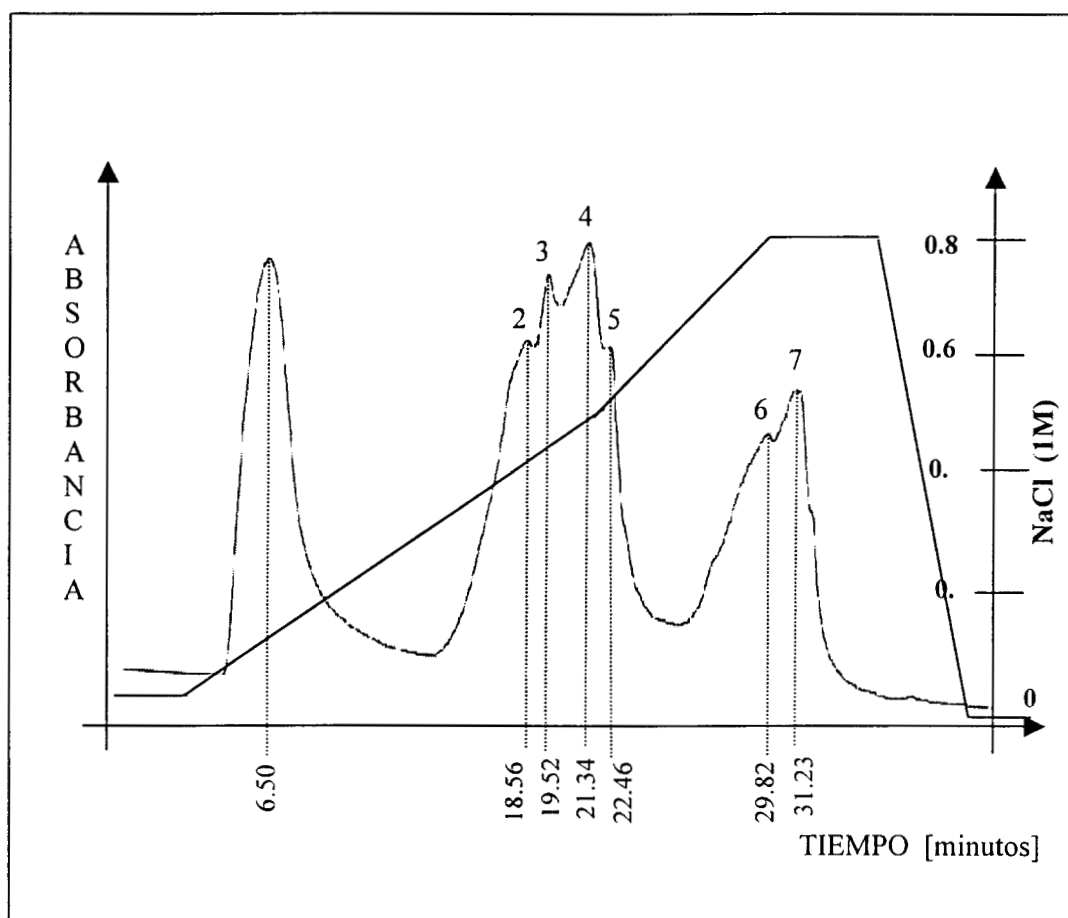


Figura 8. Cromatograma que muestra los diferentes picos mostrados en la purificación de quimopapaína comercial. El pico 1 corresponde a la presencia de impurezas, los picos 2-5 son de las distintas isoformas de quimopapaína, mientras que los picos 6 y 7 pertenecen a caricaína. Las líneas punteadas indican los tiempos de retención para cada una de las muestras separadas y la línea continua indica el gradiente salino usado.

3.2 PUREZA

225996

Se aplicaron dos técnicas distintas para corroborar la pureza de la quimopapaína, una vez que ésta se separó por cromatografía de intercambio catiónico.

a) RECROMATOGRAFIA

Se tomó la isoforma uno de quimopapaína (pico 2 en figura 8) ya que esta es la enzima con la que se trabajó posteriormente y se inyectó (previa concentración vía diálisis seguida de liofilización) en la misma columna utilizada para la separación de las enzimas en el proceso de purificación, empleando el mismo programa de elución que en el caso de la purificación.

Del cromatograma obtenido (fig. 9) se puede observar la presencia de un único pico, cuyo tiempo corresponde al de la enzima inyectada (18.3 minutos aproximadamente), tiempo casi idéntico al mostrado en la separación descrita en la sección 3.1

La ausencia de otros picos indica que la enzima se encuentra libre de impurezas. Sin embargo, se podría pensar que esta prueba no es suficiente para asegurar la pureza de la proteína, por lo que se aplicó una

segunda técnica para comprobar la inexistencia de otras moléculas ajenas a la enzima en cuestión.

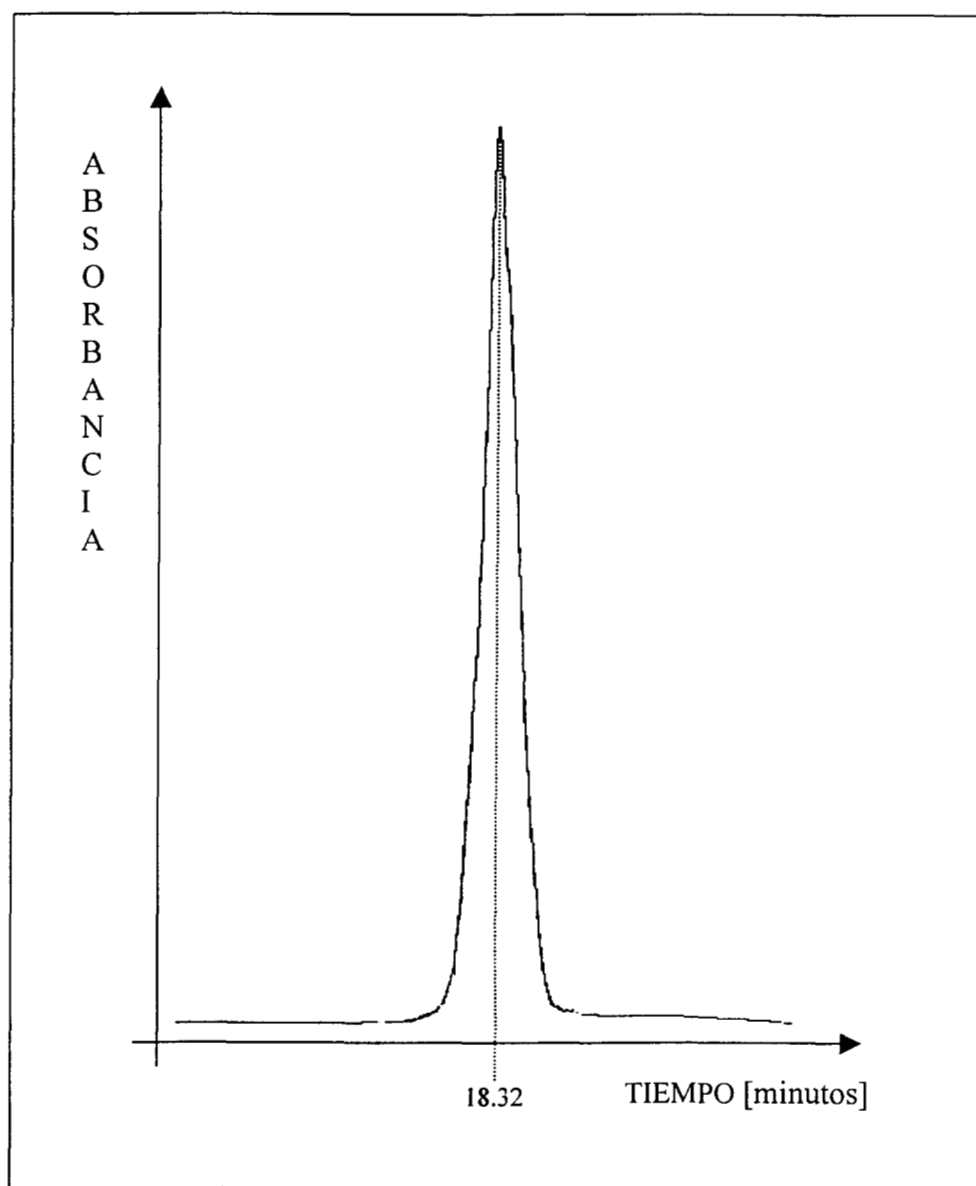


Figura 9. Cromatograma correspondiente a la prueba de pureza (recromatografía) para la isoforma uno de quimopapaína, en donde se aprecia la presencia de un pico único, evidencia de pureza.

b) ELECTROFORESIS

Se realizaron pruebas de electroforesis en geles de poliacrilamida al 20% en presencia y ausencia de SDS (Fig. 10).

Si la separación de la proteína o mezcla de proteínas se lleva a cabo cuando ésta(s) se encuentra(n) en su estado nativo, el éxito de la separación en esta técnica depende solamente de la diferencia tanto en masa molecular como en carga que haya de una con las otras con respecto al punto isoeléctrico de cada una y el pH del medio, dado que la enzima tiene un *pI* entre 10.1 y 10.6 y al encontrarse disuelta en TRIS/EDTA (pH 8.0) la enzima adquiere una carga parcial positiva, por lo que la muestra correrá en dirección al ánodo; sin embargo la situación cambia cuando se aplica SDS a la muestra, ya que aquí la separación está en función de la diferencia en masa molecular, debido a que el detergente confiere a la muestra una carga negativa, dirigiéndose en este caso la muestra hacia el cátodo, por lo que se encontró útil aplicar la técnica en sus dos modalidades.

El resultado obtenido con respecto a la pureza de la muestra en ambos casos fue el mismo. Al inyectar la enzima (por duplicado) disuelta en el amortiguador apropiado y dejar correr el programa indicado por el equipo para cada uno de los casos, se pudo observar la presencia de una banda

en cada carril, ambas correspondientes a quimopapaína en su isoforma uno. Por la buena intensidad que estas manchas presentaron se puede pensar que si existiesen impurezas de al menos un 2% aproximadamente, estas serían visibles en la placa de gel (según información descrita en la técnica proporcionada adjunta al equipo), por tanto, y debido a los resultados obtenidos en esta segunda técnica, se puede asegurar el buen grado de pureza de la enzima.

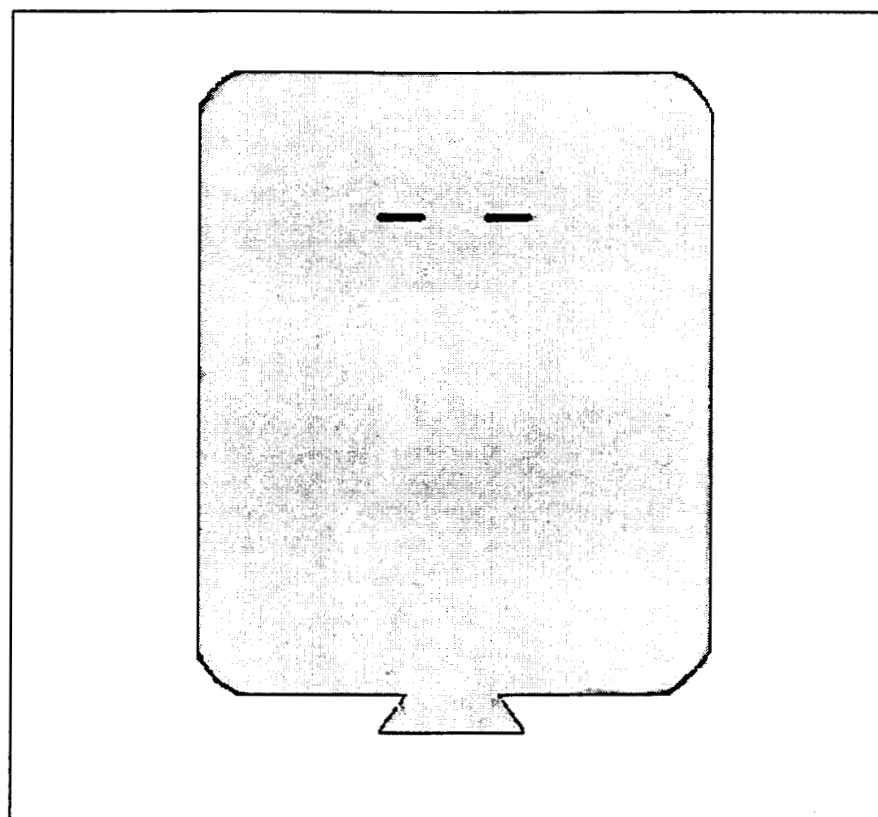


Figura 10. Muestra de la placa de electroforesis usada para comprobar la pureza de la enzima en estado nativo (ausencia de SDS). Cada banda muestra la presencia de quimopapaína (realizada por duplicado). La placa es representativa de ambos experimentos.

3.3 CINETICAS DE DESPLEGAMIENTO

Se realizaron distintos estudios cinéticos del desplegamiento térmico de quimopapaína a una temperatura de 85 ± 0.1 °C, variando la concentración de cada una de las tres sales (NaCl, Na_2SO_4 y LiCl). La tendencia que presentaron dichos estudios se muestra de forma representativa en las figuras 11, 12 y 13.

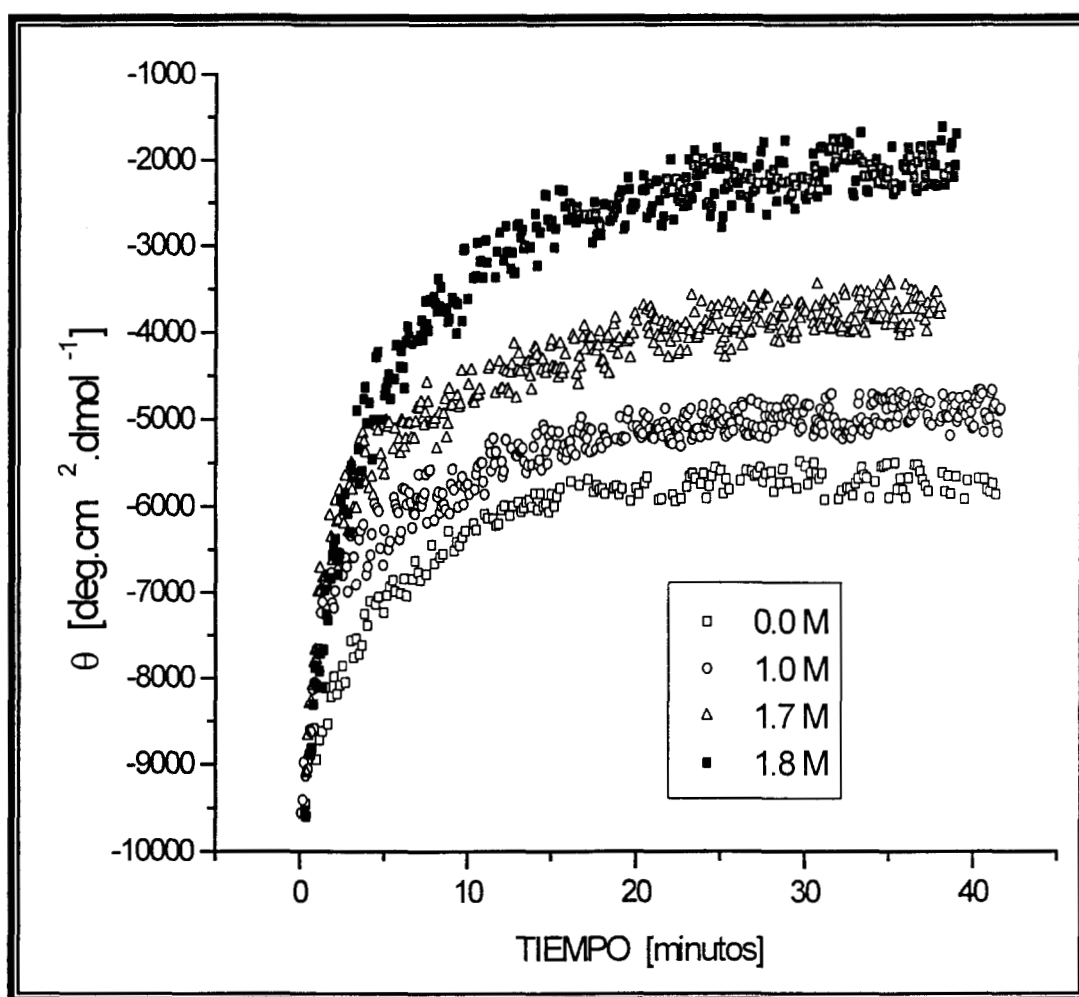


Figura 11. Tendencia de la señal de dicroísmo circular a 221 nm para el desplegamiento de quimopapaína a una $T=85\pm0.1$ °C por las siguientes concentraciones de NaCl: $\square$ 0.0M, $\circ$ 1.0M, $\triangle$ 1.7M y $\blacksquare$ 1.8M. El regulador de acetatos 0.01 M tiene un pH de 4.5.

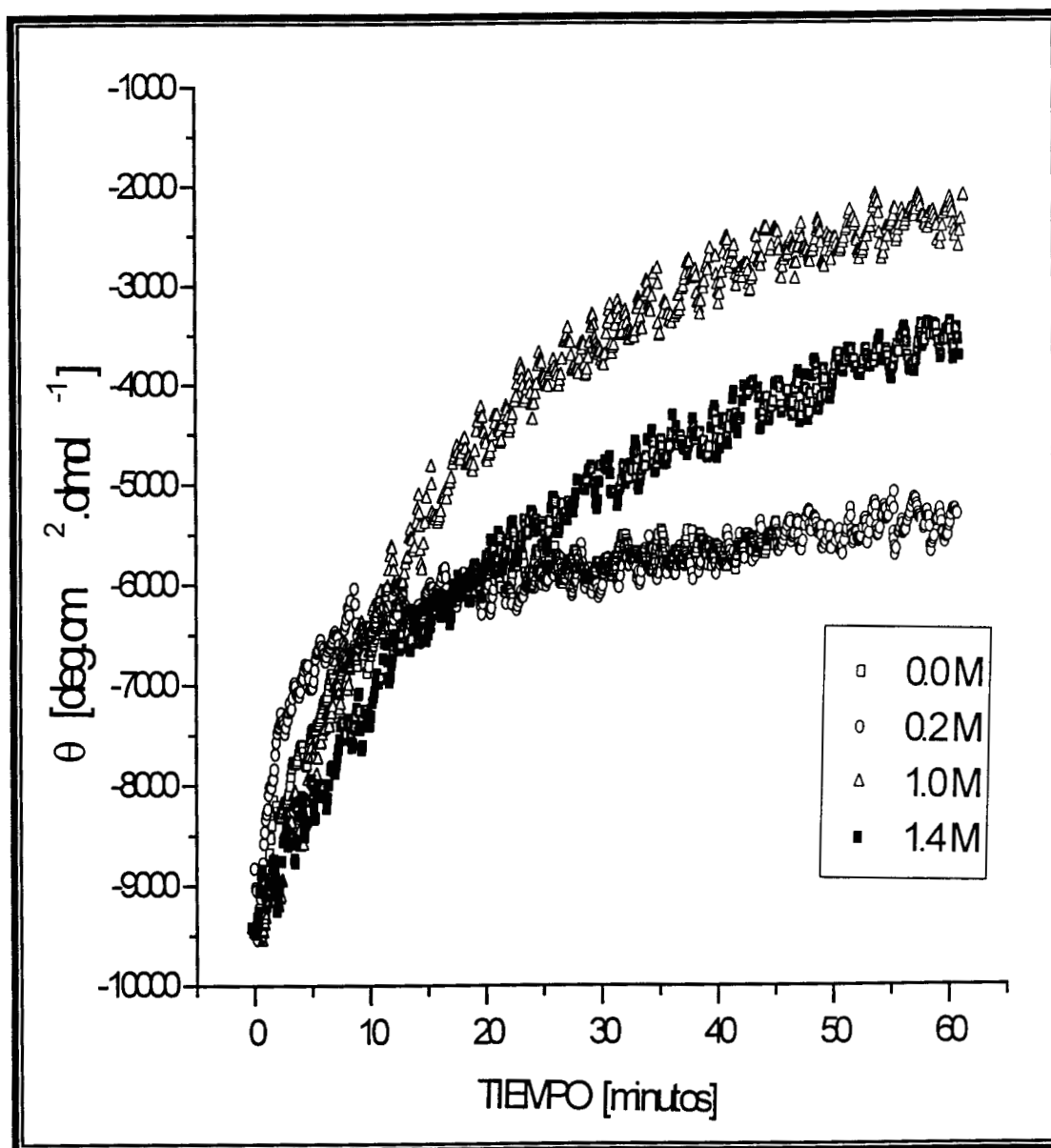


Figura 12. Cinéticas de desnaturalización de quimopapain observadas a través de la técnica de dicroísmo circular medido 221nm y a una $T=85 \pm 0.1$ °C, para las siguientes concentraciones de Na₂SO₄: □ 0.0M, ○ 0.2M, △ 1.0M y ■ 1.4M. El regulador de acetatos 0.01 M tiene un pH de 4.5

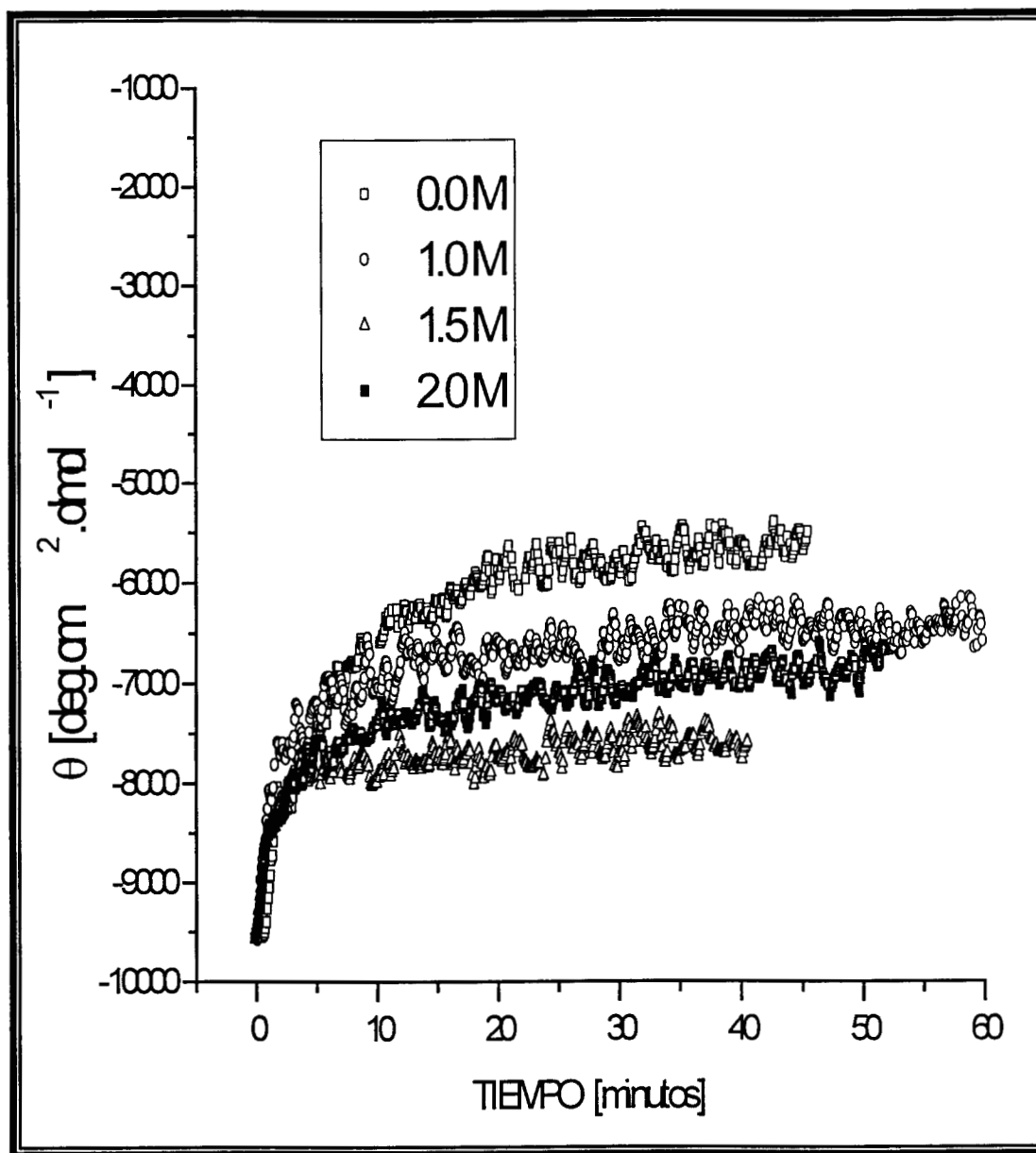
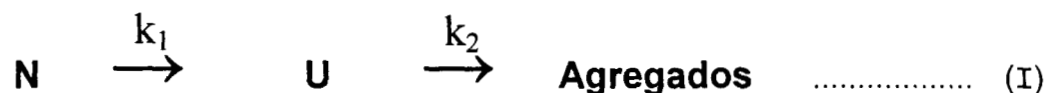


Figura 13. Curvas que muestran las cinéticas de desnaturalización de quimopapaína a una $T=85 \pm 0.1$ °C seguidas por medio de dicroísmo circular a 221 nm para las siguientes concentraciones de LiCl: $\square$ 0.0M, $\circ$ 1.0M, $\triangle$ 1.5M y $\blacksquare$ 2.0 M. El regulador de acetatos 0.01 M tiene un pH de 4.5

Al observar cada una de las 3 figuras anteriores se puede apreciar que todas las cinéticas mostradas presentan una característica similar, es decir, inician en un valor de elipticidad aproximadamente de $-9500 \text{ deg.cm}^2.\text{dmol}^{-1}$ y conforme se van llevando los cambios del estado nativo al desplegado en función del tiempo, esta variable adquiere valores menos negativos. Al iniciar todas las curvas aproximadamente en el mismo valor de elipticidad se puede inferir que la proteína en presencia y ausencia de sal, en el tiempo cero, se encuentra en idéntico estado conformacional. Por otra parte, se puede observar que al incrementar la concentración de NaCl o Na_2SO_4 , las curvas cinéticas aumentan su amplitud de cambio de elipticidad, haciendo que el valor final de dicho parámetro se acerque cada vez más a cero. Además, algunas de las curvas mencionadas muestran un comportamiento claramente bifásico, lo que sugiere que los cambios en elipticidad pueden ser explicados suponiendo un mecanismo secuencial:



Donde la primera etapa involucraría el desplegamiento de la proteína nativa, y la segunda representaría (operacionalmente) una serie de reacciones que llevan a la agregación del estado desplegado de la molécula. Cabe señalar que se observó agregación in situ en los

experimentos con concentraciones altas de NaCl y , especialmente, de Na₂SO₄; como se sabe, esta última sal es un buen agente precipitante de las proteínas [21].

En el mecanismo (I) no se ha considerado la posibilidad de que el estado nativo sufra también agregación debido a la presencia de la sal. Si este fuera el caso, sería de esperarse que en las concentraciones mayores de Na₂SO₄ la pérdida de elipticidad fuera extremadamente rápida debido a que a la vía descrita en (I) se sumaría otra vía cinética:



Lo que se aprecia en la figura 11 es precisamente lo contrario, esto es, la pérdida de la señal de dicroísmo circular es más lenta cuando la concentración de Na₂SO₄ es 1.0 o 1.4 M que en ausencia de sal.

De acuerdo a lo anterior, los datos cinéticos fueron analizados empleando una ecuación de decaimiento exponencial simple (cinética de primer orden simple, ecuación 1) y una de decaimiento doble (cinética bifásica, ecuación 2)

$$\theta = (\theta_N - \theta_D) e^{-k_1 t} + \theta_D \quad \text{..... (Ecuación 1)}$$

$$\theta = (\theta_N - \theta_T) e^{-k_1 t} + (\theta_T - \theta_D) e^{-k_2 t} + \theta_D \quad \text{..... (Ecuación 2)}$$

En donde:

θ = Valor de la elipticidad a un tiempo dado

θ_N = Valor de la elipticidad de la proteína en el estado nativo

θ_T = Valor de la elipticidad de la proteína al término de la primera fase

θ_D = Valor de la elipticidad de la proteína en estado desnaturalizado

k_1 = Constante de velocidad de primer orden correspondiente a la etapa de desplegamiento de la proteína

k_2 = Constante cinética de primer orden que representa las reacciones que llevan a la agregación de la proteína desplegada

t = tiempo

La ecuación 1 dio buen ajuste en los casos en los que $[\text{NaCl}] < 0.50 \text{ M}$, o bien $[\text{Na}_2\text{SO}_4] < 0.20 \text{ M}$. Los datos obtenidos con concentraciones mayores de estos electrolitos requirieron de la ecuación 2 para un ajuste satisfactorio. Los datos correspondientes a LiCl se apegaron, en todos los casos, al comportamiento exponencial simple.

Los valores de k_1 obtenidos, así como las respectivas estimaciones de error experimental, son mostrados en las Tablas 1 a 3.

225996

[NaCl] [M]	k_1 [min^{-1}]
0	0.199 ± 0.005
0.100	0.326 ± 0.008
0.250	0.464 ± 0.014
0.500	0.805 ± 0.030
0.750	1.050 ± 0.074
1.000	1.307 ± 0.129
1.000	1.052 ± 0.058
1.200	1.126 ± 0.079
1.250	1.539 ± 0.083
1.250	1.189 ± 0.163
1.275	1.488 ± 0.123
1.350	1.233 ± 0.069
1.500	1.203 ± 0.114
1.700	1.241 ± 0.089

Tabla 1. Constantes de velocidad (k_1) para la transición en la cinética de desplegamiento térmico de quimopapaína a distintos valores de concentración de NaCl llevadas a cabo a una $T=85.0 \pm 0.1$ °C.

[Na ₂ SO ₄] [M]	k ₁ [min ⁻¹]
0	0.162 ± 0.004
0	0.155 ± 0.004
0.02	0.321 ± 0.011
0.02	0.382 ± 0.008
0.04	0.365 ± 0.012
0.04	0.508 ± 0.012
0.07	0.276 ± 0.009
0.07	0.393 ± 0.010
0.07	0.376 ± 0.008
0.10	0.536 ± 0.014
0.1	0.632 ± 0.031
0.15	0.543 ± 0.027
0.15	0.527 ± 0.034
0.20	0.610 ± 0.030
0.20	0.449 ± 0.0278
0.40	0.299 ± 0.016
0.40	0.379 ± 0.008
0.60	0.219 ± 0.023
0.80	0.194 ± 0.003
1.00	0.082 ± 0.006
1.00	0.074 ± 0.002
1.20	0.083 ± 0.011
1.40	0.067 ± 0.001

Tabla 2. Constantes de velocidad (k₁) para la transición en la cinética de desplegamiento térmico de quimopapaína a distintos valores de concentración de Na₂SO₄ llevadas a cabo a una T=85.0 ± 0.1 °C.

[LiCl] [M]	k_1 [min ⁻¹]
0	0.157 ± 0.003
0.25	0.618 ± 0.037
0.50	0.784 ± 0.096
0.75	1.112 ± 0.215
1.00	1.177 ± 0.128
1.00	1.074 ± 0.097
1.50	1.141 ± 0.117
2.00	1.215 ± 0.175
2.00	1.074 ± 0.147
3.00	1.354 ± 0.102

Tabla 3. Constantes de velocidad (k_1) para la transición en la cinética de desplegamiento térmico de quimopapaína a distintos valores de concentración de LiCl llevadas a cabo a una $T=85.0 \pm 0.1$ °C.

La figura 14 muestra gráficamente la variación del $\ln k_1$ con la fuerza iónica I , para cada uno de los electrolitos empleados.

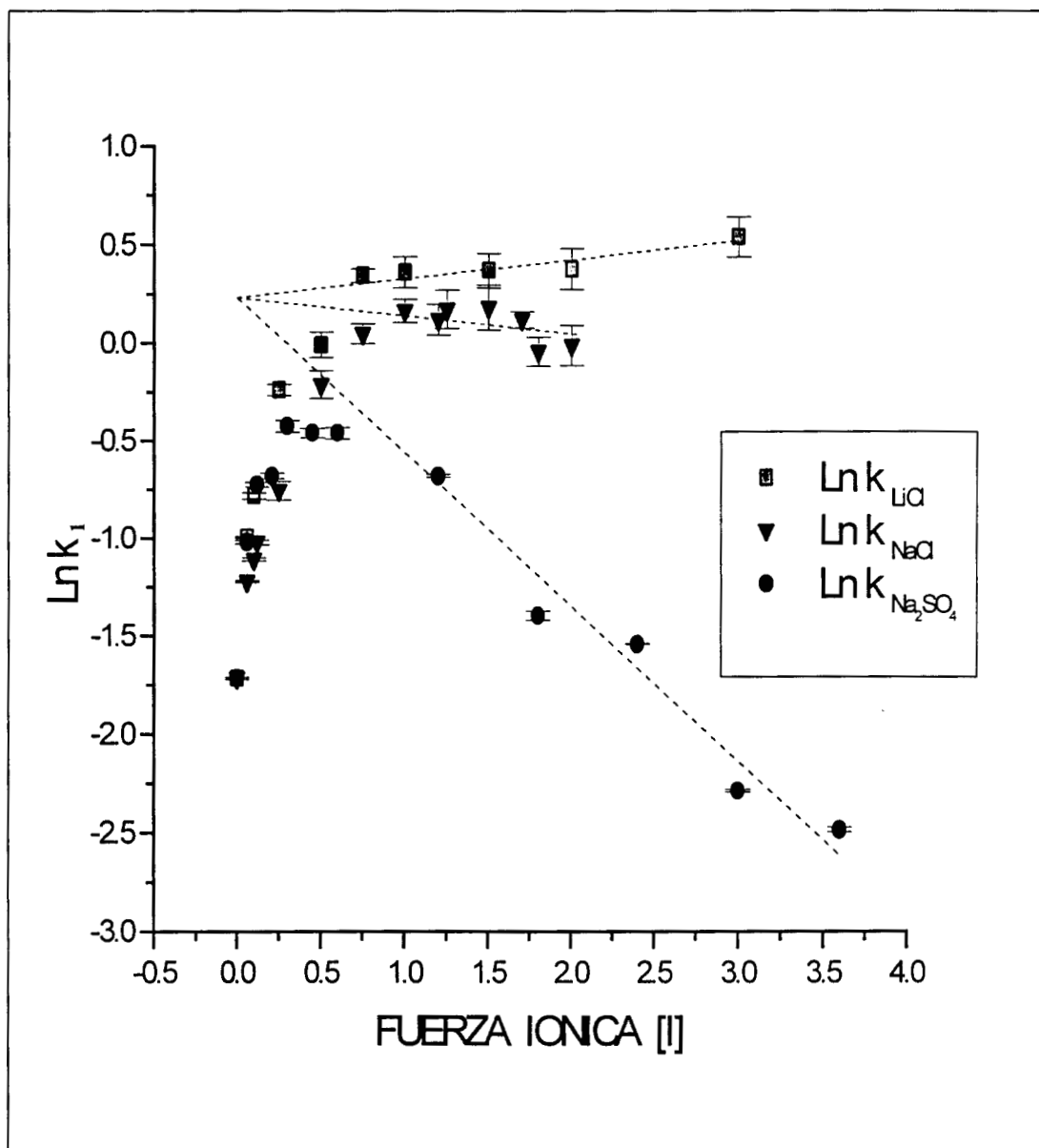


Figura 14. Comportamiento de la desnaturalización térmica d quimopapaína a una $T=85.0 \pm 0.1$ °C en presencia y ausencia d LiCl, NaCl y Na₂SO₄ en distintas concentraciones. Se grafica l concentración de sal (fuerza iónica) contra el Ln de la constante d velocidad para la transición del estado nativo al desplegado para cad una de las cinéticas realizadas.

En la anterior figura pueden apreciarse dos regiones de I , en las que $\ln k_1$ sigue tendencias cualitativamente diferentes. En la primera (concentraciones bajas de electrolito), k_1 aumenta al aumentar I , independientemente de la naturaleza de la sal. En contraste, cuando el valor de I es superior a 0.5 M el $\ln k_1$ muestra una variación diferenciada que depende del tipo de sal presente.

Estas observaciones sugieren que el efecto de I sobre $\ln k_1$ es reflejo de la participación de dos mecanismos fisicoquímicos principales: un efecto general de apantallamiento (screening) electrostático, el cual es aparente a baja fuerza iónica, y un efecto particular de tipo Hofmeister que predomina cuando la fuerza iónica es elevada. De acuerdo con esta interpretación de los resultados, a alta fuerza iónica, el Na_2SO_4 se comporta como un agente que estabiliza la estructura nativa en comparación con el estado de transición (esto es, aumenta $\Delta G^\ddagger$). Si se visualiza el estado de transición como una conformación (o conjunto de conformaciones) “expandida” de la estructura nativa, el efecto del Na_2SO_4 sería consistente con su conocido carácter “precipitante”, ya que tales agentes favorecen termodinámicamente las formas moleculares con menor área superficial. Siguiendo esta línea de razonamiento, podría

decirse que el NaCl y el LiCl se comportan, respectivamente, como un estabilizante marginal y un desestabilizante “suave” del estado nativo. En resumen, los efectos de las sales en la cinética de desplegamiento concuerdan con la serie de Hofmeister [20].

De acuerdo con la interpretación anterior, la dependencia de $\ln k_1$ con la fuerza iónica podría representarse (en una primera aproximación) como sigue:

$$\ln k_1 = \ln k_{1(I=0)} + f_{ae}(I) + (K_{si} \times I) \dots\dots\dots (3)$$

En esta ecuación, $f_{ae}(I)$ representaría el efecto del “apantallamiento electrostático”, y sería una función general de la fuerza iónica I (independientemente del tipo de iones presentes). El término $K_{si} \times I$ representaría el efecto Hofmeister, siendo K_{si} una constante particular para cada tipo de electrolito y que sería análoga a la constante de “precipitación” (“salting out”) descrita en los estudios del efecto Hofmeister en la solubilidad de una gran variedad de moléculas [20].

Si se supone que a alta fuerza iónica el efecto Hofmeister es predominante, entonces la ecuación 3 podría ser expresada aproximadamente como:

$$\ln k_1 \approx \text{constante} + K_{si} \times I \quad \dots\dots\dots (4)$$

Basándose en esta última expresión, los datos de $\ln k_1$ correspondientes a $I \geq 1.0$ fueron usados para ajustar líneas rectas (líneas de puntos en la figura 13) con un intercepto común, obteniéndose así un valor de K_{si} para cada sal (Tabla 4).

SAL	K_{si}
LiCl	0.10 ± 0.05
NaCl	-0.09 ± 0.06
Na_2SO_4	-0.79 ± 0.04

Tabla 4. Constante K_{si} que representa el efecto Hofmeister para cada una de las sales.

Finalmente, los valores de K_{si} se emplearon en la ecuación 3 para calcular los valores de f_{ae} a partir de cada conjunto de datos de $\ln k_1$. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15.

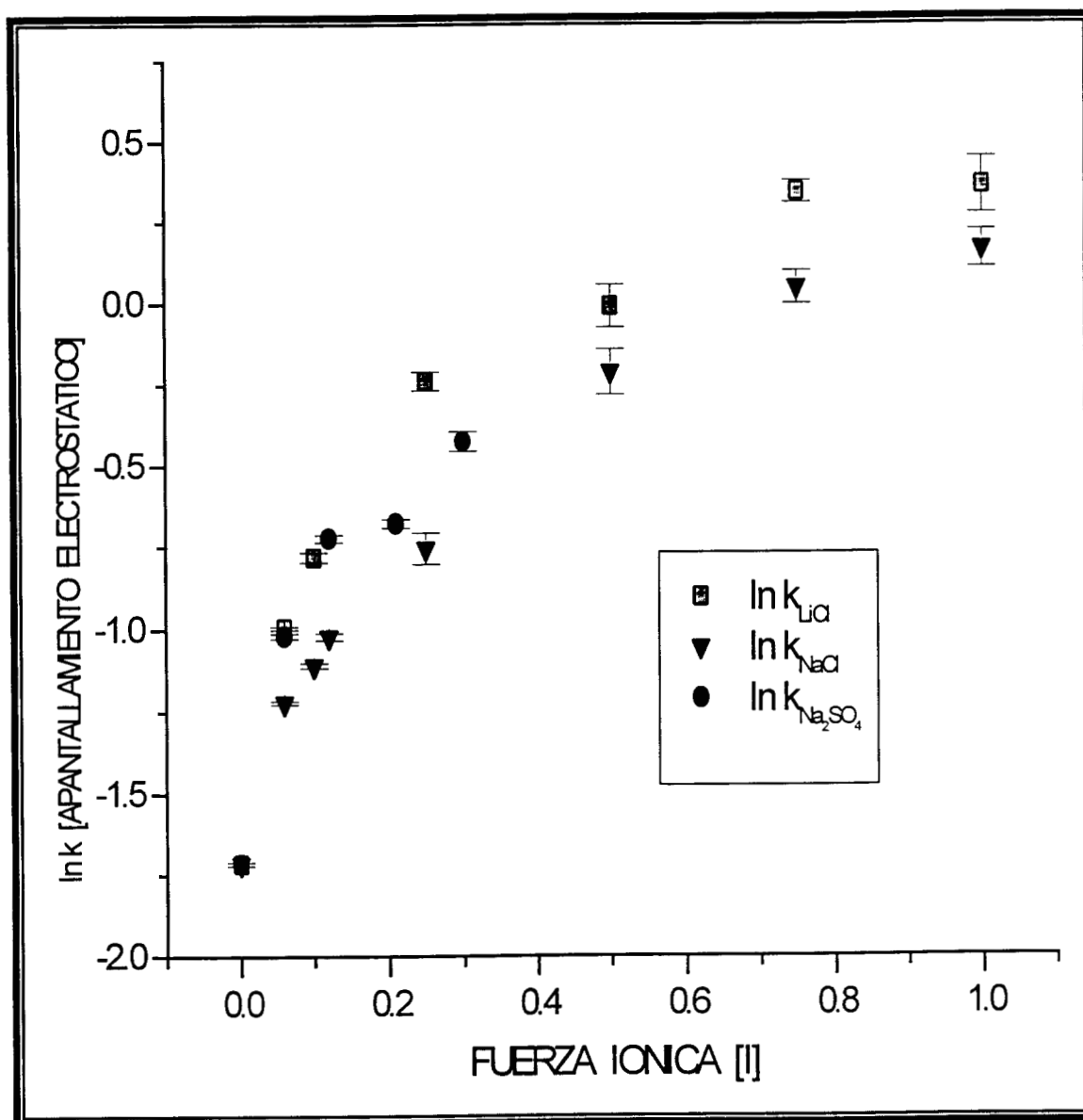


Figura 15. Efecto del apantallamiento electrostático (f_{ac} , en la ecuación 3) en la constante de velocidad para el desplegamiento de la quimopapaína.

Como puede observarse, el efecto de “apantallamiento electrostático” obtenido con cada una de las sales es razonablemente similar, lo cual justifica el haber usado la ecuación 3 para el análisis de los datos.

Los datos en la figura 15 serán usados para intentar inferir algunas propiedades estructurales del conjunto de conformaciones que representarían el estado de transición en la vía de desplegamiento de la proteína. Sin embargo, tal objetivo rebasa las metas planteadas para la presente tesis de maestría.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

4. CONCLUSIONES**225996**

La enzima proteolítica denominada quimopapaína ha sido estudiada por diferentes grupos de investigación, determinándose sus estructuras primaria, secundaria y terciaria, así como su reacción de desplegamiento ante el aumento de temperatura, por medio de agentes desnaturalizantes (guanidina) [31] así como por variaciones de pH.

En este trabajo se observó el proceso de desplegamiento térmico de la enzima a 85 ± 0.1 °C, en presencia de NaCl, Na₂SO₄ y LiCl variando sus concentraciones. A pesar del distinto efecto que cada electrolito tiene sobre el desplegamiento de la proteína, se puede observar que existe una región (a bajas concentraciones de sal) en donde la cinética del proceso sigue un comportamiento cualitativamente similar en presencia de cada una de las sales; esto puede atribuirse a un efecto de apantallamiento electrostático sobre la enzima. Por otro lado, para altas concentraciones de sal el comportamiento cinético depende marcadamente del tipo de iones presente, lo cual conduce a un efecto de tipo Hofmeister.

Bajo la suposición de que los efectos de Hofmeister y de apantallamiento electrostático contribuyen aditivamente en la variación de la constante de velocidad del desplegamiento, fue posible separar (en una primera aproximación) ambas contribuciones. Los datos así obtenidos serán de utilidad para plantear una interpretación molecular del efecto de los electrolitos sobre $\Delta G^\ddagger$.

CAPÍTULO 5

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

5. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Stryer, L.; BIOQUIMICA, Editorial Reverté, S.A.; 4^{ta} edición (1995); **tomo 1**; 15-64.
- [2] Lehninger, A. L., Nelson, D. L. and Cox, M. M.; PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA; Editorial Omega; 2^{da} edición; 198 y 199.
- [3] Walsh, K. A.; METHODS IN PROTEIN SEQUENCE ANALYSIS; Human Press; Clifton, N. Y.
- [4] Baker, E. N. and Drenth, J.; BIOLOGICAL MACROMOLECULES AND ASSEMBLIES; Jornak, F. A. and McPherson, A., eds.; John Wiley and Sons, N. Y.; **vol. 3** (1987), 313-368.
- [5] Glazer, A. N. and Smith, E. L.; THE ENZYMES; Academic Press; 3^{ra} edición; **vol. 3** (1971); 501-546.
- [6] Dubois, T., Jacquet, A., Schneck, A. G. and Looze, Y.; THE THIOL PROTEINASES FROM THE LATEX OF *CARICA PAPAYA L.*, I. Fractionation, purification and preliminary characterization; Biological Chemistry; **vol. 369** (1988); 733-740.
- [7] Solís, M. S., Zubillaga, L. R., Rojo, D. A. and Hernández, A. A.; STRUCTURAL SIMILARITY OF CHYMOPAPAIN FORMS AS INDICATED BY CIRCULAR DICHROISM; Biochemistry Journal; **vol. 257** (1989); 183-186.
- [8] Robinson, G. W.; ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF PAPAYA PEPTIDASE A FROM COMMERCIAL CHYMOPAPAIN; Biochemistry; **vol. 14**, No. 16 (1975); 3695-3700.
- [9] Jacquet, A., Kleinschmidt, T., Schnek, A., Looze, Y. and Braunitzer, G.; THE THIOL PROTEINASES FROM THE LATEX OF *CARICA PAPAYA L.*, III. The primary structure of chymopapain; Biological Chemistry; **vol. 370** (1989); 425-434.

- [10] Brocklehurst, K., Baines, B. S. and Kierstan, M. P.; TOP. ENZYME FERMENT; Biotechnology; **vol. 5** (1981); 262-335.
- [11] Maes, D., Bouckaert, J., Poortmans, F., Lode, W. and Looze, Y.; STRUCTURE OF CHYMOPAPAIN AT 1.7 Å RESOLUTION; Biochemistry; **vol. 35** (1996); 16292-16298.
- [12] Solís, M. S., Rojo, D. A., Hernández, A. A.; COOPERATIVITY IN THE UNFOLDING TRANSITIONS OF CYSTEINE PROTEINASES. CALORIMETRIC STUDY OF THE HEAT DENATURATION OF CHYMOPAPAIN AND PAPAIN; Biochimica et Biophysica Acta; **1203** (1993); 121-125.
- [13] Solís, M. S., Gutiérrez, G. L. H., Arroyo, R. A., Padilla, Z. J., Rojo, D. A. and Hernández, A. A.; pH DEPENDENCE OF THE ACTIVATION PARAMETERS FOR CHYMOPAPAIN UNFOLDING: INFLUENCE OF IONS PAIRS ON THE KINETIC STABILITY OF PROTEINS; Biochimica et Biophysica Acta; **vol. 1388** (1998); 363-372.
- [14] Creighton, T. F.; PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PROPERTIES; Edit. W. H. Freeman and Company; 2^{da} edición (1993); Capítulo 4.
- [15] Van Holde, K. E.; BIOQUIMICA FISICA; Edit. Alhambra, Madrid (1979).
- [16] Green, A. A.; STUDIES IN THE PHYSICAL CHEMISTRY OF THE PROTEINS, X. THE SOLUBILITY OF HEMOGLOBIN IN SOLUTIONS OF CHLORIDES AND SULFATES OF VARYING CONCENTRATION; Journal Biological Chemistry; **95** (1932); 47-66.

- [17] Carbonnaux, C., Ries-Kautt, M., Ducruix, A.; RELATIVE EFFECTIVENESS OF VARIOUS ANIONS ON THE SOLUBILITY OF ACIDIC HYPODERMA LINEATUM COLLAGENASE AT pH 7.2; Protein Science; **4** (1995); 2123-2128.
- [18] Jenkins, W. T.; THREE SOLUTIONS OF THE PROTEIN SOLUBILITY PROBLEM; Protein Science; **7** (1998); 376-382.
- [19] Kaushik, K. J. and Bhat, R.; A MECHANISTIC ANALYSIS OF THE INCREASE IN THE THERMAL STABILITY OF PROTEINS IN AQUEOUS CARBOXYLIC ACID SALT SOLUTIONS; Protein Science; **8** (1999); 222-233.
- [20] Brønsted, J. N.; MOLECULAR MAGNITUDE AND PHASE DISTRIBUTION; I. Z. Phys. Chem. Bodenstein Festband. 257-266.
- [21] Arakawa, T., Bhat, R., Timasheff, S. N.; PREFERENTIAL INTERACTION DETERMINE PROTEIN SOLUBILITY IN THE THREE-COMPONENT SOLUTIONS; THE $MgCl_2$ SYSTEM; Biochemistry; **29** (1990); 1914-1923.
- [22] Baldwin, R. L.; HOW HOFMEISTER ION INTERACTIONS AFFECT PROTEIN STABILITY; Biophysical Journal; **71** (1996); 2056-2063.
- [23] Bohinski, R. T.; BIOQUIMICA; Edit. Addison-Wesley Iberoamericana; 5^{ta} edición; (1991); 59-60.
- [24] Chang, R.; FISICOQUIMICA CON APLICACIONES A SISTEMAS BIOLÓGICOS; CECSA, Edits; 2^{da} impresión; (1987); 258-267.
- [25] Mathews, Ch. K. and Van Holde, K. E.; BIOCHEMISTRY; The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc.; (1990); 157-159.
- [26] CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY;
<http://www.structure.lnl.gov/cd/cdtutorial.htm>
- [27] CIRCULAR DICHROISM SPECTROSCOPY;
http://www.pdb.bnl.gov/PPS2/course/section_8/ss-960531_21.html

- [28] PROTEIN STRUCTURE A PRACTICAL APPROACH; Edited by T. F. Creighton; 276-284.
- [29] Robinson, G. W.; BIOCHEMISTRY; **14** (1975); 3695-3700.
- [30] Solís, M. D. S.; AISLAMIENTO Y ESTUDIO CONFORMACIONAL DE FORMAS MULTIPLES DE QUIMOPAPAINA; Tesis de Maestría; 1989.
- [31] Gutiérrez, G. L. H.; ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD CINÉTICA DE QUIMOPAPAINA. Efecto del pH en los parámetros de activación; Tesis de Maestría; 1996.