



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**✓ ESTUDIO CONFORMACIONAL Y
DESNATURALIZACION TERMICA DE
PROTEINASAS CISTEINICAS DEL
LATEX DE PAPAYA.**

Tesis que presenta

✓ D. SILVIA SOLIS MENDIOLA

Para obtener el grado de

✓ DOCTORA EN CIENCIAS

✓ MAYO 1994

ASESOR: ANDRES HERNANDEZ ARANA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

✓ DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

UNIDAD IZTAPALAPA

Av. Michoacán y La Purísima, Col. Vicentina, Iztapalapa, D.F. C.P. 09340. Tel.: 686-03-22 TELEFAX: (5) 686-89-99 TELEX: UAMME 176496

S I N O D A L E S

DR. BARBARIN ARREGUIN, UNAM

Presidente

DRA. ADELA RODRIGUEZ, UNAM

DR. MANUEL SORIANO-GARCIA, UNAM

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA, UAMI

Asesor

DR. ARTURO ROJO DOMINGUEZ, UAMI

Secretario

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Andrés Hernández Arana por su apoyo y dirección en mi desarrollo profesional.

A todos mis amigos y compañeros.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), convenio núm. 0609-N-9110 y a DGICSA SEP, convenio núm. 91-09-002-39, por el apoyo financiero al Área de Biofísicoquímica.

A mis padres

A mis hermanos

A Max

A Eric

**Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Andrés
Hernández Arana en el Area de Biofisicoquímica,
Departamento de Química, División de Ciencias Básicas e
Ingeniería de la Universidad Autónoma Metropolitana,
Unidad Iztapalapa.**

INDICE

1. INTRODUCCION

1.1 Introducción general	1
1.2 Proteinasa cisteínica	4
1.3 Proteinasa del látex de papaya	7
1.4 Objetivos	13

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Proteinasa cisteínica y otros reactivos	15
2.2 Aislamiento y purificación de las proteinasa cisteínica	15
2.3 Electroforesis y electroenfoque	16
2.4 Actividad proteolítica	17
2.5 Determinación de masas moleculares	17
2.6 Dicroísmo circular	19
2.7 Calorimetría diferencial de barrido	21

3. METODOS DE ANALISIS

3.1 Datos calorimétricos	23
3.2 Curvas de desnaturalización	25

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Purificación de las enzimas	27
4.2 Electroforesis y electroenfoque	30

4.3 Masas moleculares	31
4.4 Dicroísmo circular	32
4.5 Calorimetría diferencial de barrido	38
4.6 Dependencia de pH	38
4.7 Dependencia de la entalpía de desnaturalización con la temperatura	43
4.8 Interacciones dominio-dominio	45
4.9 Desnaturalización térmica por dicroísmo circular	50
4.10 Cambios de elipticidad en función de la velocidad de calentamiento	57
5. CONCLUSIONES	63
6. REFERENCIAS	65

INTRODUCCION.

1.1 Introducción general.

El campo de estudio de este trabajo es de interés médico [1] y biotecnológico [2], debido a la importancia que tiene conocer con detalle la estabilidad y estructura de las proteínas. Un problema fundamental consiste en descifrar el código de doblado de una proteína, es decir, la manera en la cual la conformación tridimensional nativa se encuentra codificada por la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, aunque es de mucha importancia este problema, no es fácil de resolver sin profundizar en el conocimiento de los factores que determinan y estabilizan la estructura de estas macromoléculas.

Existe gran interés en conocer las propiedades estructurales de las proteínas, debido a la estrecha relación que existe entre su conformación y la función biológica que desempeñan. Se sabe que la información necesaria para generar la estructura tridimensional de una proteína se encuentra contenida en la estructura primaria de la molécula. La conformación que adopta una proteína en condiciones fisiológicas, que posee actividad biológica, se denomina nativa, perdiéndose en el proceso conocido como desnaturalización, el cual puede ser inducido por cambios en los valores de pH, temperatura, fuerza iónica, presión, o bien por la presencia de sales inorgánicas, solutos o solventes orgánicos [3].

El objetivo de los estudios de desnaturalización de proteínas es comprender los principios que dictan la formación de la estructura nativa a partir de la información contenida en la secuencia de aminoácidos. Estos principios son denominados código de doblado y una vez establecidos, permitirían el diseño de enzimas sintéticas

y la modificación de macromoléculas naturales, optimizando o modificando sus funciones. La interpretación del código de doblado permite que una proteína adquiera la estructura tridimensional, responsable de su actividad biológica.

El proceso de desnaturalización puede estudiarse en condiciones de equilibrio, bajo las cuales la transición es reversible, asegurando así que estos estudios sean útiles tanto para interpretar el proceso de adquisición de la estructura nativa, como el proceso inverso que es el de mayor interés [4]. El estudio de los cambios conformacionales que ocurren durante la desnaturalización de una proteína es importante porque muestra los factores que estabilizan o desestabilizan la conformación nativa.

La desnaturalización de proteínas globulares pequeñas (masas molares menores a 35,000 daltones) generalmente ocurre en una sola etapa entre dos estados termodinámicos estables, el nativo y el desnaturalizado. Las transiciones son en la mayoría de los casos muy cooperativas [5], es decir, la transición conformacional es difícil de inducirse. Sin embargo, existe la posibilidad de que el mecanismo de desnaturalización se lleve a cabo en varias etapas, a través de uno o más intermediarios. La suposición de que la pérdida de la conformación nativa es cooperativa y reversible se cumple para la mayoría de los sistemas, al menos para ciertas condiciones experimentales. Una evidencia se encuentra en experimentos *in vitro* [5], donde una enzima nativa se desnaturaliza por medio de agentes químicos y posteriormente dicho agente se elimina, observándose que la proteína recupera su estructura nativa. La presencia de enlaces disulfuro limita las conformaciones posibles de la cadena aleatoria y favorece la renaturalización, limitando la formación de intermediarios no relacionados con el proceso. Otras condiciones experimentales que pueden emplearse para prevenir la irreversibilidad son: evitar agregación usando

concentraciones pequeñas de proteína (del orden de 0.1 mg/ml) [6], prevenir autólisis (en el caso de proteinasas) y modificar tanto, la fuerza iónica como la concentración de iones y el valor de pH.

La desnaturalización de una proteína puede ser medida experimentalmente siguiendo el cambio en una propiedad física, causado por el desdoblamiento de la cadena. De acuerdo a la técnica utilizada, puede obtenerse información de cambios globales de la molécula de proteína, o bien de cambios de tipo local [3]. Los métodos comúnmente usados utilizan una amplia gama de diferentes propiedades observables. Dentro de las técnicas aplicadas a estos estudios pueden mencionarse la: espectroscopía diferencial ultravioleta, fluorescencia, medidas de viscosidad, cromatografía de exclusión, proteólisis, pérdida de actividad enzimática, dicroísmo circular, resonancia magnética y microcalorimetría diferencial.

Es conocido que muchas proteínas globulares pequeñas se comportan como unidades cooperativas sencillas en su desnaturalización, mostrando intermediarios no estables durante este proceso [5,7]. En estos casos, una prueba decisiva para la ausencia de intermediarios termodinámicamente estables ha dependido de la comparación de la medida calorimétrica del cambio de entalpía debido a la transición ΔH_{cal} , con la entalpía de van't Hoff, ΔH_{vH} , la cual se deduce de la variación de la constante de equilibrio con la temperatura [8-10]. En una transición de desnaturalización que sigue un mecanismo de dos estados, la relación $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ debe estar cercana a 1.0 [5,9]. En contraste, la desnaturalización térmica de proteínas con más de un dominio está, usualmente, formada por varias transiciones independientes o secuenciales. Aunque en algunos casos las transiciones se traslapan, una desviación en el mecanismo de dos estados se detecta claramente si se observa que el valor de ΔH_{cal} es mayor que ΔH_{vH} . Aparentemente, la conducta de la proteína durante su

desdoblamiento depende del balance entre las interacciones dominio-dominio y la estabilidad intrínseca de los dominios [11,12]. De esa manera, se tienen diversos métodos para seguir el proceso y la transición de la desnaturalización. Sin embargo, la interpretación del mecanismo y el tratamiento de datos no es tarea fácil, debido a que se requieren modelos sencillos y que permitan explicar el comportamiento experimental.

1.2 Proteinasas cisteínicas.

Las proteinasas tiólicas o cisteínicas pertenecen a un grupo de enzimas cuya actividad proteolítica depende del grupo tiol de un residuo de cisteína. Están ampliamente distribuidas a través de los sistemas vivos, encontrándose en animales, plantas y bacterias. Hay evidencia de que pertenecen a una familia de enzimas homólogas, similares en estructura y en función [13].

El papel biológico preciso de muchas de las proteinasas tiólicas es aún desconocido. Este tipo de enzimas, cuando son de origen vegetal tienen tendencia a amplias especificidades, atacando una gran variedad de sustratos. Su función puede ser la protección de la planta en contra de ataques de insectos, hongos, etc., pero la razón de que se produzcan cantidades tan grandes, con formas enzimáticas múltiples y con propiedades muy similares, es algo que aún resulta un misterio.

Casi todas las proteinasas tiólicas tienen masas moleculares estimadas entre 20,000 y 28,000. Sus puntos isoeléctricos son muy variables, lo que refleja, probablemente, el medio ambiente biológico diferente en el que operan estas enzimas. Todas las proteinasas de la papaya son muy básicas, como las calotropinas y la bromelaína del tallo, mientras que la actinidina, las asclepaínas y la bromelaína de fruto son muy ácidas (ver Tabla I).

T A B L A I

PROTEASAS TIPLICAS DE VARIAS FUENTES VEGETALES.

Enzima	Fuente	Masa Molecular (Da)	Punto Isoeléctrico	Referencias
Papaína	<i>Carica papaya</i>	23,350	8.75	[14,15]
Quimopapaína A	<i>Carica papaya</i>	24,000	10.3-10.4	[16-19]
Quimopapaína B	<i>Carica papaya</i>	24,000	10.6-10.7	
Proteinasa Q	<i>Carica papaya</i>	24,000	11.0	[16-18]
Proteinasa β	<i>Carica papaya</i>	28,000	> 11.0	
Actinidina	<i>Actinidia chinensis</i>	23,500	3.1	[20,21]
Ficina	<i>Ficus carica</i>	24-26,000	9.1	[22-24]
		28,000	5.2	
Bromelaína de tallo	<i>Ananas comosus</i>	23,800	9.55	[15,25,26]
		26-28,000		
Bromelaína de fruto	<i>Ananas comosus</i>	25,000	4.6	[27,28]
Asclepaina A	<i>Asclepias syriaca</i>	23,000	3.1	[29]
Asclepaina B	<i>Asclepias syriaca</i>	21,000	3.1	[30]
Asclepaina	<i>Asclepias glaucescens</i>	23,300	> 9.0	[31]
Calotropina DI	<i>Calotropis gigantea</i>	23,400	9.6	[32,33]
Calotropaina FI				

Las proteinasas tiólicas más conocidas son aquellas derivadas de fuentes vegetales, con la papaína (EC 3.4.22.2) como ejemplo típico. Esta enzima se obtiene del látex del fruto de papaya (*Carica papaya*). Otras proteinasas cisteínicas han sido aisladas de una gran variedad de plantas mono y dicotiledóneas. Algunas de estas enzimas y sus fuentes son: quimopapaína (EC 3.4.22.6) y proteinasa Ω (EC 3.4.22.6) del látex de papaya; actinidina (EC 3.4.22.14) del fruto del kiwi, (*Actinidia chinensis*); bromelaína (EC 3.4.22.4) del tallo y del fruto de la piña, (*Ananas comosus*); ficina (EC 2.4.22.3) del látex de higo, (*Ficus carica*); calotropina y calotropina del látex de la planta nadar (*C. gigantea*); asclepaínas A y B (*Asclepias syriaca*) y asclepaína g (*Asclepias glaucenscens*).

Las proteinasas cisteínicas a las que se les ha determinado su estructura tridimensional por cristalografía de rayos X [14,34,35] son la papaína, la actinidina y la proteinasa Ω . Estos estudios han mostrado que las estructuras son comparables en el plegamiento de la cadena de aminoácidos [4]. La papaína, la actinidina, la bromelaína, la ficina y otras tienen gran homología en la secuencia de aminoácidos [3]. Además, éstas tienen gran similitud en sus propiedades físicas y químicas. Entonces, es razonable suponer que estas enzimas de plantas, son proteinasas descendientes de una molécula ancestral común [36].

Existen evidencias que indican que muchas de las proteinasas cisteínicas aisladas hasta la fecha contienen formas múltiples. Estas formas no son simples productos de degradación, puesto que hay diferencia en las secuencias de aminoácidos y las propiedades físicas [37,38]. Se ha observado multiplicidad en las enzimas de *Ficus carica* [39] y *Ficus glabrata* [40], de *Asclepias syriaca* [30], *Calotropis gigantea* [32] (Asclepiadaceae), *Tabernamontana*

grandiflora [41] (Apocynaceae) y asclepaína (*Asclepias glaucescens*) [31].

La desnaturalización térmica de la papaína, una proteinasa cisteínica, cuya estructura muestra dos dominios separados por una hendidura, ha sido estudiada por los métodos de calorimetría y espectroscopía [42,43]. Estos estudios indican que los dominios de la papaína son desdoblados independientemente. Como ya se mencionó, las estructuras cristalinas de otras dos proteinasas cisteínicas vegetales (*actinidina de Actinidia chinensis* y proteinasa Ω de *Carica papaya*) han sido determinadas con detalle [35,44]. En ambos casos se observa claramente la arquitectura de los dos dominios de la papaína. Es probable que el mismo tipo de patrón de doblado se pueda encontrar en otros miembros de esta familia de proteínas, debido a que estas enzimas muestran gran similitud en la secuencia de aminoácidos [13,45].

1.3 Proteinasa del látex de papaya.

El látex de la fruta de la papaya (*Carica papaya*), ha sido usado como fuente de las proteinasas para uso industrial, por ejemplo, en la protección de ablandadores de carne y prevención de la formación de turbidez en bebidas. También, las proteinasas han tenido gran importancia médica, por ejemplo en el tratamiento del prolapso de los discos vertebrales [46].

La presencia de las proteinasas en el látex de papaya ha sido conocida, aproximadamente, desde 1750 [47]. La importancia del látex de papaya como una fuente de enzimas fue reconocida por primera vez por G.C. Roy en 1873 [48] y el nombre papaína fue propuesto por Wurtz y Bochet [49]. Vines [50] sugirió que la papaya podría contener más de una proteinasa y más tarde [51] reportó una separación parcial de dos proteinasas por precipitación

con NaCl. Después de varios tipos de nomenclatura, Balls et al. [52] conservaron el nombre de papaína cuando reportaron la preparación de esta proteinasa (EC 3.4.22.2). Jansen y Balls [53] tomaron el nombre adicional de quimopapaína, siguiendo la idea de Kunitz y Northrop [54], sobre la quimotripsina, para aplicarlo a la enzima con una menor actividad proteolítica sobre hemoglobina, pero a la vez una mayor actividad para la coagulación de leche.

En tiempos recientes, por lo menos tres proteinasas sulfhidrúlicas distintas, papaína, quimopapaína y proteinasa Ω , han sido separados del látex de papaya [16,55] y la fracción conocida como la quimopapaína, contiene varias formas moleculares [55-58] con diferencias en su secuencia de aminoácidos y propiedades físicas [19,37,38]. Esta enzima ha sido separada, en muchos laboratorios, por cromatografía de intercambio catiónico [18,19,59,60-63]. En general, la cromatografía de intercambio iónico de una fracción del látex de papaya lleva a la separación de dos formas de quimopapaína llamadas A y B, respectivamente [18,59,61,62,64]. La quimopapaína B ha mostrado que contiene tres especies moleculares [59].

La única estructura primaria de quimopapaína reportada hasta ahora [45] contiene 218 residuos de aminoácidos, cuenta con ocho residuos de cisteína, seis forman tres enlaces disulfuro (Cys 22-63, 56-95 y 153-204) y dos residuos de cisteína libres (Cys-25 y 117). La quimopapaína no contiene sitios de unión de carbohidratos.

La proteinasa Ω fue aislada por primera vez por Schack [65] y desde entonces ha sido llamada de varias formas: peptidasa A [17,65], peptidasa II [55], proteinasa A [56], proteinasa III [64] y proteinasa Ω [59]. el cual es usado aquí. La obtención de una segunda proteinasa (proteinasa β), con pI de 11.0 y con masa molecular de 28,000 Da, en lugar de 24,000 que corresponde a la

proteínasa Ω , ha sido mencionada [18,66]. El sufijo Ω fue sugerido porque esta enzima fue la mayoría de las veces la última proteínasa tiólica del látex de papaya que es eluida por cromatografía de intercambio iónico [59]. Esta enzima es el tercer constituyente proteolítico del látex de papaya, la cual tiene un punto isoeléctrico > 11.0 [18,67,68]. Tiene 216 residuos de aminoácidos, no contiene ningún carbohidrato unido a su cadena polipeptídica [63] y contiene 7 residuos de cisteína de los cuales se forman, 3 puentes disulfuro, (Cys-22-63, 56-95 y 153-204) y un residuo de cisteína libre (Cys 25) que es esencial para la actividad catalítica [69].

Una comparación de las estructuras primarias de las tres enzimas de la papaya; papaína; proteínasa Ω y quimopapaína, cuyas cadenas polipeptídicas consisten de 212, 216 y 218 residuos de aminoácidos, respectivamente, mostró un alto grado de similitud entre ellas. El total de residuos idénticos (115) corresponde al 53% de las tres proteínasas cisteínicas [70].

La quimopapaína cuenta con 126 residuos de aminoácidos idénticos con papaína (58%) y 141 (65%) con la proteínasa Ω , incluyendo los tres puentes disulfuro y la cisteína libre en posición 25, que se requiere para la actividad; 148 residuos (68.5%) son comunes a la proteínasa Ω y la papaína, mostrando que la quimopapaína posee una homología mayor con la proteínasa Ω que con la papaína (ver Tabla II).

TABLA II

Secuencia de aminoácidos de la proteína quimopapaína (PAP),
 quimopapaína (QUI) y quimopapaína (PPQ)

	5	10	15	20	25
PAP	-Ile-Pro-Glu-Tyr-Val-Asp-Trp-Arg-Gln-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys				
QUI	-Tyr-Pro-Glu-Ser-Ile-Asp-Trp-Arg-Ala-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Lys-Asn-Gln-Gly-Ala-Cys-Gly-Ser-Cys				
PPQ	-Leu-Pro-Glu-Asn-Val-Asp-Trp-Arg-Lys-Lys-Gly-Ala-Val-Thr-Pro-Val-Arg-His-Gln-Gly-Ser-Cys-Gly-Ser-Cys				
	30	35	40	45	50
PAP	-Trp-Ala-Phe-Ser-Ala-Val-Val-Thr-Ile-Glu-Gly-Ile-Ile-Lys-Ile-Arg-Thr-Gly-Asn-Leu-Asn-Glu-Tyr-Ser-Glu				
QUI	-Trp-Ala-Phe-Ser-Thr-Ile-Ala-Thr-Val-Glu-Gly-Ile-Asn-Lys-Ile-Val-Thr-Gly-Asn-Leu-Leu-Glu-Leu-Ser-Glu				
PPQ	-Trp-Ala-Phe-Ser-Ala-Val-Ala-Thr-Val-Glu-Gly-Ile-Asn-Lys-Ile-Arg-Thr-Gly-Lys-Leu-Val-Glu-Leu-Ser-Glu				
	55	60	65	70	75
PAP	-Gln-Glu-Leu-Leu-Asp-Cys-Asp-Arg-Arg-Ser-Tyr-Gly-Cys-Asn-Gly-Gly-Tyr-Pro-Trp-Ser-Ala-Leu-Gln-Leu-Val				
QUI	-Gln-Glu-Leu-Val-Asp-Cys-Asp-Lys-His-Ser-Tyr-Gly-Cys-Lys-Gly-Gly-Tyr-Gln-Thr-Thr-Ser-Leu-Gln-Tyr-Val				
PPQ	-Gln-Glu-Leu-Val-Asp-Cys-Glu-Arg-Arg-Ser-His-Gly-Cys-Lys-Gly-Gly-Tyr-Pro-Pro-Tyr-Ala-Leu-Glu-Tyr-Val				
	80	85	90	95	100
PAP	-Ala-Gln-Tyr-Gly-Ile-His-Tyr-Arg-Asn-Thr-Tyr-Pro-Tyr-Glu-Gly-Val-Gln-Arg-Tyr-Cys-Arg-Ser-Arg-Glu-Lys				
QUI	-Ala-Asn-Asn-Gly-Val-His-Thr-Ser-Lys-Val-Tyr-Pro-Tyr-Gln-Ala-Lys-Gln-Tyr-Lys-Cys-Arg-Ala-Thr-Asp-Lys				
PPQ	-Ala-Lys-Asn-Gly-Ile-His-Leu-Arg-Ser-Lys-Tyr-Pro-Tyr-Lys-Ala-Lys-Gln-Gly-Thr-Cys-Arg-Ala-Lys-Gln-Val				
	105	110	115	120	125
PAP	-Gly-Pro-Tyr-Ala-Ala-Lys-Thr-Asp-Gly-Val-Arg-Gln-Val-Gln-Pro-Tyr-Asn-Glu-Gly-Ala-Leu-Leu-Tyr-Ser-Ile				
QUI	-Pro-Gly-Pro-Lys-Val-Lys-Ile-Thr-Gly-Tyr-Lys-Arg-Val-Pro-Ser-Asn-Cys-Glu-Thr-Ser-Phe-Leu-Gly-Ala-Leu				
PPQ	-Gly-Gly-Pro-Ile-Val-Lys-Thr-Ser-Gly-Val-Gly-Arg-Val-Gln-Pro-Asn-Asn-Glu-Gly-Asn-Leu-Leu-Asn-Ala-Ile				
	130	135	140	145	150
PAP	-Ala-Asn-Gln-Pro-Val-Ser-Val-Val-Leu-Glu-Ala-Ala-Gly-Lys-Asp-Phe-Gln-Leu-Tyr-Arg-Gly-Gly-Ile-Phe-Val				
QUI	-Ala-Asn-Gln-Pro-Leu-Ser-Val-Leu-Val-Glu-Ala-Gly-Gly-Lys-Pro-Phe-Gln-Leu-Tyr-Lys-Ser-Gly-Val-Phe-Asp				
PPQ	-Ala-Lys-Gln-Pro-Val-Ser-Val-Val-Val-Glu-Ser-Lys-Gly-Arg-Pro-Phe-Gln-Leu-Tyr-Lys-Gly-Gly-Ile-Phe-Glu				
	155	160	165	170	175
PAP	-Gly-Pro-Cys-Gly-Asn-Lys-Val-Asp-His-Ala-Val-Ala-Ala-Val-Gly-Tyr-Gly-Pro-.....-Asn-Tyr-Ile				
QUI	-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Lys-Leu-Asp-His-Ala-Val-Thr-Ala-Val-Gly-Tyr-Gly-Thr-Ser-Asp-Gly-Lys-Asn-Tyr-Ile				
PPQ	-Gly-Pro-Cys-Gly-Thr-Lys-Val-Asp-His-Ala-Val-Thr-Ala-Val-Gly-Tyr-Gly-Lys-Ser-Gly-Gly-Lys-Gly-Tyr-Ile				
	180	185	190	195	200
PAP	-Leu-Ile-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-Thr-Gly-Trp-Gly-Glu-Asn-Gly-Tyr-Ile-Arg-Ile-Lys-Arg-Gly-Thr-Gly-Asn-Ser				
QUI	-Ile-Ile-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-Pro-Asn-Trp-Gly-Glu-Lys-Gly-Tyr-Met-Arg-Leu-Lys-Arg-Gln-Ser-Gly-Asn-Ser				
PPQ	-Leu-Ile-Lys-Asn-Ser-Trp-Gly-Thr-Ala-Trp-Gly-Glu-Lys-Gly-Tyr-Ile-Arg-Ile-Lys-Arg-Ala-Pro-Gly-Asn-Ser				
	205	210	215		
PAP	-Tyr-Gly-Val-Cys-Gly-Leu-Tyr-Thr-Ser-Ser-Phe-Tyr-Pro-Val-Lys-Asn				
QUI	-Gln-Gly-Thr-Cys-Gly-Val-Tyr-Lys-Ser-Ser-Tyr-Tyr-Pro-Phe-Lys-Gly-Phe-Ala				
PPQ	-Pro-Gly-Val-Cys-Gly-Leu-Tyr-Lys-Ser-Ser-Tyr-Tyr-Pro-Thr-Lys-Asn				

^a Numeración de quimopapaína.

La quimopapaína, a diferencia de la papaína y la proteinasa Ω , contiene un segundo residuo de cisteína libre, además de Cys 25 [45,62,63,67]. El segundo residuo de cisteína libre se encontró en la posición 117 y sustituye un residuo de asparagina en la papaína [45]. La presencia de los dos residuos de cisteína libre (25 y 117) en el sitio activo de la quimopapaína [62], implicaría una transición conformacional enorme con respecto a la papaína. De acuerdo a estudios sobre la estructura tridimensional de la quimopapaína, por modelado molecular [71], ésta se parece a la de la papaína, lo cual indica que es improbable la hipótesis [45] de la existencia de dos tioles en el sitio activo.

La estructura de la proteinasa Ω ha sido afinada al factor cristalográfico R de 0.1549 en el intervalo 10.0-1.8 Å [35]. La proteinasa Ω tiene una estructura similar a la de la papaína, cuyo afinamiento contra 1.60 Å conduce a un factor R de 16% [72]. Es interesante notar que la proteinasa Ω es una molécula menos flexible que la papaína, a pesar de un número similar de los contactos del cristal, esta observación la podemos relacionar con una mayor estabilidad comparada con la papaína [35].

La papaína es binuclear, es decir, se construye alrededor de 2 centros hidrofóbicos [16,76]. Los 2 lóbulos están separados por una hendidura en la que se encuentra localizado el sitio activo, formado por tres grupos ionizables (Cys 25, Asp 158 y His 159), donde el residuo de cisteína forma parte de una pared de la hendidura y los residuos de ácido aspártico e histidina forman parte del otro muro. El grupo imidazol de la histidina (159) parece estar en un medio hidrofóbico, donde el triptofano (177) forma una parte de éste y está enlazado por puentes de hidrógeno a la cadena lateral de asparagina (175). Todos los residuos mencionados son conservados en la proteinasa Ω , por lo que podemos suponer que posee el mismo mecanismo catalítico.

La quimopapaína tienen como una peculiar característica su alta estabilidad a valores bajos de pH (2.0) [53,74]. En contraste, la papaína y proteinasa Ω se desnaturalizan fácilmente en estas condiciones de pH y además son inactivas en medio ácido [17].

1.4 Objetivos.

Lo expuesto hasta aquí pone de manifiesto que la información existente acerca de la estructura y función de las proteinasas cisteínicas de las plantas es limitada, principalmente la que corresponde a la proteinasa Ω y a las formas múltiples de la quimopapaína, ya que a la fecha aún son pocos los estudios dedicados al conocimiento estructural de estas proteinasas. Faltan por estudiar aspectos relacionados con los mecanismos de desnaturalización, estos estudios permitirían establecer si las formas de estas enzimas están constituidas por dos dominios estructurales cuya desnaturalización es prácticamente independiente, como ocurre con la papaína [73].

El curso que debe tomar la investigación sobre las proteinasas, es hacia el conocimiento total de sus estructuras y la relación de éstas con la estabilidad molecular. Parte de esta información podría obtenerse por medio del estudio del mecanismo de desnaturalización, usando técnicas espectroscópicas o bien de calorimetría diferencial de barrido. Estos métodos nos ayudarían a determinar la existencia de un intermediario estable durante el desdoblamiento de la proteína, y también podrían indicar si tal intermediario correspondería o no al desdoblamiento de un dominio de la cadena polipeptídica. En efecto, la existencia de dominios estructurales permite suponer, con evidencia experimental, la presencia de intermediarios en el proceso de desnaturalización. Dado que los dominios estructurales son relativamente independientes, se ha encontrado en la papaína [42,43] que uno de ellos es menos estable frente al desnaturalizante, sufriendo la pérdida de su estructura antes que el otro dominio y originando así que la desnaturalización se lleve a cabo a través de un intermediario termodinámicamente estable parcialmente desnaturalizado [6,75].

Los objetivos de este trabajo consisten en estudiar las tres proteinasas cisteínicas del látex de papaya (*Carica papaya*), de las que se conocen las secuencias de aminoácidos y la estructura tridimensional de dos de sus miembros. Estos estudios permitirán comparar los resultados obtenidos para las diferentes proteínas con otras moléculas que guardan una estrecha relación en sus funciones y estructura primaria, e incluso la predicción inicial de las características generales de su patrón de plegamiento. En este estudio se propone obtener información por las siguientes líneas:

- 1) El estudio conformacional de proteínas en solución. Se realizarán estudios de dicroísmo circular con las proteinasas del látex de papaya, con el fin de estimar comparativamente el contenido de estructuras secundarias en las moléculas polipeptídicas, así como para obtener mayor información del patrón de plegamiento tridimensional de las mismas.

- 2) Realizar estudios de la estabilidad térmica de estas enzimas, empleando los métodos de dicroísmo circular y calorimetría, para determinar los parámetros termodinámicos de las transiciones conformacionales que caracterizan la estabilidad de dichas macromoléculas y se compararán entre sí.

MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Proteinasas cisteínicas y otros reactivos.

Las proteinasas cisteínicas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de lotes comerciales de Sigma Chemical Co. (St. Louis Mo., U.S.A.): quimopapaína tanto parcialmente purificada como cromatográficamente purificada (EC 3.4.22.6), papaína doblemente cristalizada (EC 3.4.22.2). El clorhidrato de guanidina (GuHCl) grado I y la caseína grado reactivo, también fueron obtenidos de la misma casa comercial. El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

2.2 Aislamiento y purificación de las proteinasas cisteínicas.

La purificación de las proteínas es de gran importancia ya que para realizar cualquier estudio sobre ellas, lo primero que hay que considerar es su homogeneidad, con lo cual aseguramos que los resultados obtenidos correspondan exclusivamente a las proteínas estudiadas. Las proteinasas del látex de papaya son enzimas proteolíticas que se autohidrolizan fácilmente, siendo necesario mantenerlas a bajas temperaturas para evitar este fenómeno. Debido a lo anterior, las muestras se conservaron a baja temperatura, durante todas las etapas de experimentación.

Se ha observado que la proteinasa Ω se encuentra en cantidad considerable en algunas quimopapaínas comerciales (parcialmente purificadas) [17,66]. En este caso, la presencia de la proteinasa Ω fue fácilmente detectada por cromatografía de intercambio catiónico donde, siendo esta enzima la más básica de las proteinasas del látex de papaya, se eluyó como el último componente con un aumento de

fuerza iónica [17,64]. En este trabajo se usó quimopapaína parcialmente purificada como material inicial para el aislamiento de la proteínasa Ω y de la quimopapaína. Se disolvieron aproximadamente 7 mg de quimopapaína parcialmente purificada en 1 ml de regulador de fosfatos (0.031 M NaH_2PO_4 /0.019 M Na_2HPO_4 , pH 7.0), la muestra se filtró en membranas Millipore con diámetro de poro de 1.2 μm , las cuales se inyectaron en una columna de intercambio catiónico TSK-SP5PW (0.75 X 7.5 cm) en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) Varian 5020B. Los componentes de la proteína fueron eluidos de la columna a un flujo de 0.5 ml/min, empleando un programa con gradiente bifásico de NaCl: de 0.0 a 0.40 M NaCl (pendiente de 0.015 M/ml) y de 0.40 a 0.80 M NaCl (pendiente de 0.04 M/ml) en el mismo regulador de fosfatos. La elución de los componentes protéicos fue determinada por absorción de luz de 280 nm. La papaína fue purificada por el mismo procedimiento descrito anteriormente, excepto que únicamente se inyectaron 0.3 mg a la columna, debido a la poca solubilidad de esta enzima a pH neutro.

2.3 Electroforesis y Electroenfoque.

La electroforesis se llevó a cabo en un aparato Multiphor LKB 2117, sobre una placa horizontal de gel de poliacrilamida preparada al 5% (2 mm X 250 mm X 115 mm) en regulador imidazol/ H_3PO_4 (0.09 M imidazol/0.01 M H_3PO_4 , pH 7.0). La concentración de las muestras analizadas fue entre 0.2 y 2.0 mg/ml; se colocaron 10 μl de muestra en cada una de las ranuras de la placa y se aplicó al gel un voltaje de 12 V/cm, durante 1.2 h a 10 °C. El tratamiento posterior para la placa se llevó a cabo según el método de Weber y Osborn [76]. Para el electroenfoque se usó el mismo tipo de placa, excepto que ésta contenía 4% de solución de anfolina, pH 9-11 (LKB). Estos geles se sometieron a una potencia constante de

25 W, durante 1.45 h, a 10 °C. Las bandas de la proteína fueron detectadas por el método de teñido mencionado anteriormente [76].

2.4 Actividad Proteolítica.

La actividad proteolítica se determinó utilizando caseína como sustrato, a pH 7.0 y 35 °C. En este método se activaron 0.25 ml de solución enzimática, con una concentración entre 0.05 y 0.2 mg/ml, de la siguiente forma: se adicionó 0.75 ml de una solución 0.1 M en cisteína y 0.01 M en EDTA, disueltos en el mismo regulador de fosfatos (utilizado en HPLC), dejando en incubación las muestras durante 5 min a 35 °C. La reacción se inició agregando 1 ml de caseína (1% p/v), disuelta en el mismo regulador de fosfatos, manteniendo la misma temperatura anterior y dejando transcurrir 10 min exactamente; después se añadieron 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, a fin de detener la reacción. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min; posteriormente se centrifugó y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm [19]. La unidad de actividad está definida como el cambio de 1.0 unidad de absorbancia a 280 nm por minuto de hidrólisis.

2.5 Determinación de Masas Moleculares.

Para determinar masas moleculares de biomoléculas se han utilizado varias técnicas. Una de ellas es la cromatografía de filtración en gel en presencia de guanidina (GuHCl). Esta se basa en un efecto de tamiz molecular en el que el material de la columna cromatográfica logra retener mayor tiempo a las moléculas con menor radio efectivo [77]. En el caso de proteínas globulares, se ha observado una correlación lineal entre el tiempo de retención y el logaritmo de la masa molecular [77]. Sin embargo, es necesario considerar la diferencia en la forma de las moléculas, ya que dos proteínas globulares con la misma masa pero con radios efectivos

distintos presentan diferentes tiempos de retención. A fin de evitar este problema, se ha sugerido el empleo de un agente desnaturizante para que se lleve a cabo la reducción de los disulfuros para inducir la conformación de la cadena aleatoria en las proteínas [78]. El cloruro de guanidina (GuHCl) 6 M ha demostrado su efectividad en este sentido, disminuyendo además las interacciones de las proteínas con el material de empaque de la columna, que en algunos casos afectan significativamente los resultados [79].

Para la determinación de masas moleculares se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 5020B, con una columna TSK-2000SW de 7.5 mm de diámetro interno x 30 cm de longitud, con guarda columna TSK-GSWP de 7.5 cm de longitud. Se utilizaron preparaciones con una concentración de 0.20 mg/ml de proteína. Estas muestras se incubaron previamente durante 8 horas en GuHCl 6 M y 2-mercaptoetanol 0.1 M, regulando el pH a 8.6 con tris-hidroximetil amino-metano (Tris); posteriormente, los grupos tiol formados fueron bloqueados con iodoacetamida 0.12 M durante 1 hora, a temperatura ambiente. Se inyectaron 10 μ l de cada una de las soluciones de proteína desnaturizada en la columna de filtración en gel y se eluyeron con GuHCl 6 M, a un flujo de 0.5 ml/min. En la calibración de la columna se utilizaron los siguientes estándares: aprotinina (Mr 6500), citocromo c (12384), lisozima (14300), mioglobina (16950), papaína (23350) y anhidrasa carbónica (29000).

Para evitar la autodigestión durante las etapas iniciales de la desnaturización se bloquearon los sitios activos de la papaína, quimopapaína y proteinasa Ω antes del tratamiento con guanidina. Para ésto, se activaron con mercaptoetanol 0.1 M durante 30 min y posteriormente se les adicionó iodoacetamida 0.12 M, dejándolas

reaccionar durante 60 min. Una vez bloqueados los sitios activos de las muestras, se aplicó el tratamiento descrito anteriormente.

2.6 Dicroísmo Circular.

El espectro de dicroísmo circular (DC) de una proteína es un reflejo de las estructuras secundaria y terciaria de la macromolécula, por lo que este método espectroscópico resulta muy apropiado para estudiar los cambios conformacionales que ocurren durante la desnaturalización de una proteína. Generalmente se obtiene un experimento por cada condición de temperatura, pH o concentración del agente desnaturalizante. El parámetro observable que se maneja es el valor de la elipticidad a una longitud de onda fija. En general se usan longitudes de onda cercanas a los 190 y 220 nm, pues es la región aproximada en que la mayoría de las proteínas en estado nativo presentan las señales más intensas. A medida que la desnaturalización transcurre, disminuye la magnitud de la elipticidad, siendo esto reflejo de la pérdida de estructuras secundarias.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un espectropolarímetro JASCO modelo J-500A, calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico [80]. Las medidas en la región del ultravioleta lejano (182-250 nm) fueron hechas con soluciones de proteína de aproximadamente 0.1 mg/ml en una celda de 0.1 cm. En la región donde absorben los residuos aromáticos (250-320 nm), se utilizó una celda de 1.0 cm y una concentración de proteína en el intervalo de 0.3 a 0.5 mg/ml. Antes de registrar los espectros, las muestras fueron dializadas por 48 h a 4 °C, contra regulador de fosfatos 0.01 M (0.0062 M NaH_2PO_4 /0.0038 M Na_2HPO_4 , pH 7.0). La concentración de las proteínas fue determinada espectrofotométricamente, empleando el coeficiente de extinción ($A^{1\%}_{1\text{cm}, 280\text{nm}}$) de 25.0 para la papaína [15], 18.5 para la

quimopapaína y 18.3 para la proteinasa Ω [17,66]. La elipticidad por residuo medio, $[\theta]$, se calculó utilizando una masa molecular por residuo medio, determinada por la secuencia de aminoácidos de acuerdo a la relación:

$$[\theta] = 100 \cdot \theta / c \cdot l \text{ (grados cm}^2 \text{ decimol}^{-1}\text{)}$$

donde

$[\theta]$ = elipticidad molar por residuo

θ = elipticidad en grados

c = concentración molar de residuos

l = longitud de recorrido óptico, en cm.

El contenido de estructuras secundarias se estimó mediante un ajuste de mínimos cuadrados a los espectros de base de Hennessey y Johnson [81].

Los estudios de desnaturalización se llevaron a cabo de dos formas. En la primera se obtuvieron los espectros en la región del UV lejano (190-260 nm), con soluciones de proteína de aprox. 0.2 mg/ml; se utilizó una celda de 0.05 cm de recorrido óptico, en un portaceldas con chaqueta de circulación de agua y un baño de agua HAAKE NK-22, el cual controló el valor de la temperatura deseada con una precisión de ± 0.2 °C. El tiempo de incubación a cada temperatura fue de 10 min. Se utilizaron velocidades de calentamiento de aprox. 1.0 °C por minuto. Los valores de pH estudiados fueron 2.55, 2.7 y 2.9, para lo cual se usaron reguladores de glicina 0.02 M.

Por otro lado, se hicieron experimentos con un calentamiento continuo de la muestra, registrando el cambio de elipticidad a 220 nm y la temperatura de la celda como funciones del tiempo. Las velocidades de calentamiento empleadas fueron 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 1.5 °C/min; este parámetro se controló, con una variación de $\pm 10\%$, con el ajuste de potencia del baño HAAKE NK-22. La temperatura de la celda se midió con una sonda inmersible conectada a un termómetro digital 08402-20, Cole-Parmer. La celda empleada fue de 1 mm de recorrido óptico, y la concentración de proteína de 0.2 mg/ml. El pH fue regulado con soluciones de glicina 0.02 M.

2.7 Calorimetría Diferencial de Barrido.

Este método es el único que mide de manera directa el calor absorbido por la muestra durante la desnaturalización. Sin embargo, los estudios calorimétricos en proteínas presentan una serie de problemas experimentales; la magnitud medida es muy pequeña lo cual hace necesaria una gran cantidad de muestra y una gran sensibilidad del equipo. En soluciones concentradas, sin embargo, la desnaturalización térmica puede provocar la agregación, complicando así el análisis termodinámico del proceso.

En un calorímetro diferencial de barrido se mide el cambio en la capacidad calorífica de una solución de proteína al aumentar la temperatura. En intervalos de temperatura relativamente amplios (20 - 100 °C), la curva calorimétrica muestra la transición endotérmica que ocurre cuando la proteína se desnaturaliza; entonces, el área bajo dicha curva es igual a la diferencia de entalpía existente entre el estado desnaturalizado y el estado nativo de la molécula.

El manejo de datos obtenidos a partir de un microcalorímetro, permite determinar directamente los valores de entalpía de transición y los valores de ΔC_p (cambio de la capacidad calorífica), debido a la desnaturalización, a la temperatura en que ocurre la transición, de acuerdo a la velocidad de calentamiento programado. En los casos en que se presentan transiciones donde no se obtienen picos bien definidos, debido a que se encuentran traslapados, es posible hacer una desconvolución, obteniendo curvas independientes para cada una de las transiciones involucradas en la curva experimental inicial; de esta forma se pueden evaluar los parámetros termodinámicos correspondientes.

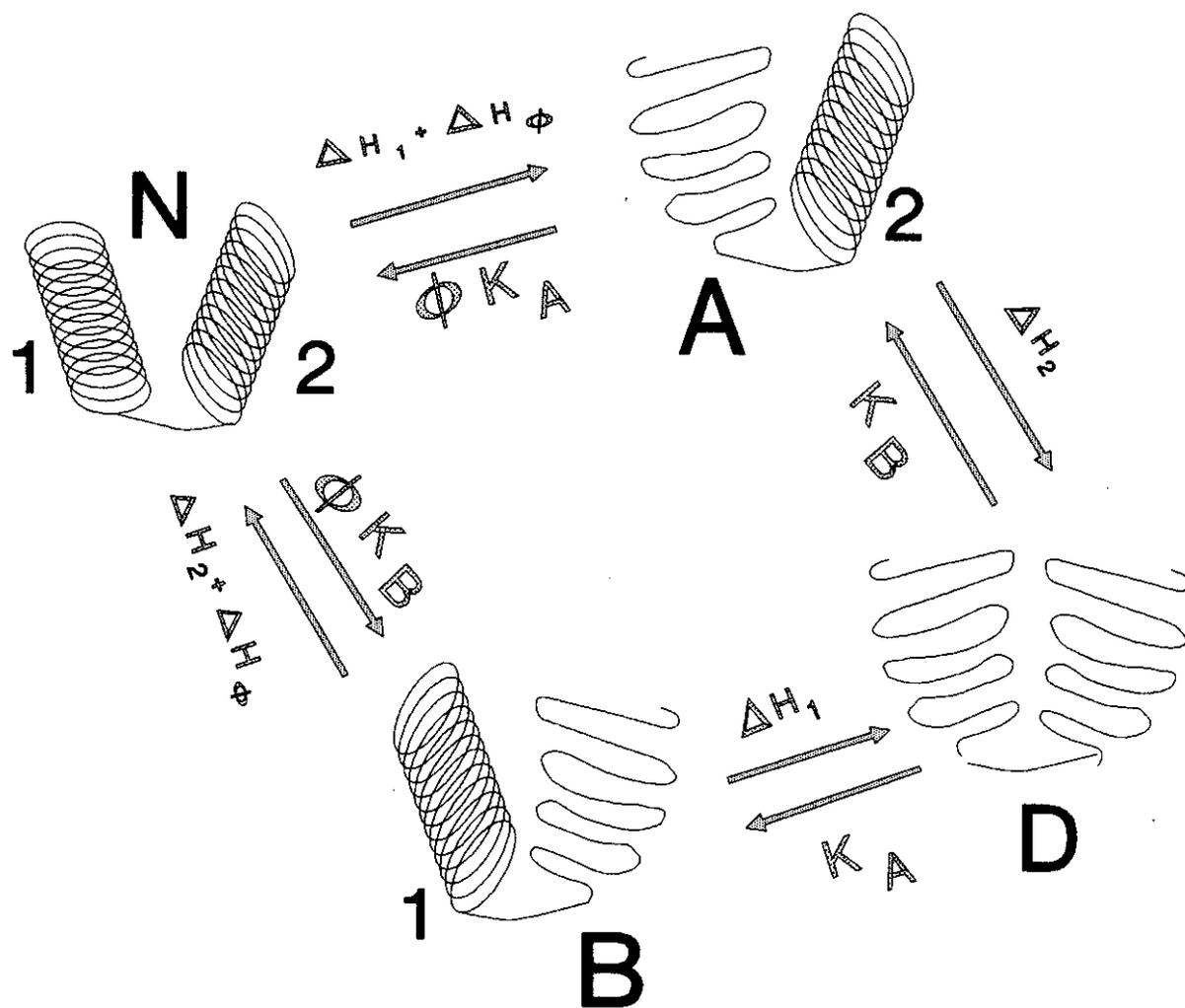
Los barridos calorimétricos se llevaron a cabo con un microcalorímetro diferencial de barrido MicroCal MC-2 (Microcal Inc., Northampton MA, U.S.A.), en un intervalo de pH 2.55 - 4.10 y 1.20 - 3.45 para la papaína y quimopapaína, respectivamente. Las soluciones de proteína se utilizaron en concentraciones de 2.0 a 5.0 mg/ml, las cuales fueron dializadas contra regulador de glicina 0.05 M al valor de pH deseado. Después de la diálisis, fue determinada la concentración de la proteína y el pH de las muestras. Todas las soluciones fueron desgasificadas antes de ser colocadas dentro de las celdas del calorímetro. La mayoría de los experimentos fueron realizados a una velocidad de calentamiento de 60 °C/hr. Las líneas base regulador-regulador fueron obtenidas bajo las mismas condiciones y restadas a las curvas de la muestra.

El paquete de software DA-2 (Microcal, Inc.) fue empleado para la colección y el análisis de los datos, que incluyeron la resta de la línea base y la estimación de los cambios en entalpía calorimétrica y van't Hoff (ΔH_{cal} y ΔH_{vH}).

METODOS DE ANALISIS.

3.1 Datos calorimétricos.

Para describir cuantitativamente las diferencias de cooperatividad, analizamos los datos calorimétricos en términos del modelo propuesto por Brandts et al. [11], el cual es un caso particular de un modelo general de Ramsay y Freire [82]. Para la desnaturalización de una proteína de dos dominios, este modelo toma en cuenta cuatro estados:



En el esquema anterior se consideran el estado nativo (N) y el estado totalmente desdoblado (D), y dos estados parcialmente desnaturalizados (A y B), asociados con las formas de la molécula en la cual un dominio está doblado y el otro desdoblado. Relacionando las concentraciones de las especies con las constantes de equilibrio individuales y el término ϕ que incluye todas las interacciones interdominio;

$$\phi K_A = [A]/[N]$$

$$\phi K_B = [B]/[N]$$

$$K_A = [D]/[B]$$

$$K_B = [D]/[A]$$

se determinó la población fraccionaria, P, de cada estado a través de las ecuaciones [82]:

$$P_N = 1/Q \tag{1}$$

$$P_A = K_A \phi / Q \tag{2}$$

$$P_B = K_B \phi / Q \tag{3}$$

$$P_D = K_A K_B \phi / Q \tag{4}$$

donde Q es la función de partición en el equilibrio y está dada por

$$Q = 1 + K_A \phi + K_B \phi + K_A K_B \phi \tag{5}$$

En estas ecuaciones, K_A y K_B representan constantes intrínsecas de desdoblamiento de los dominios (considerando que cada dominio se comporta como una unidad cooperativa sencilla). Cada término K_i puede ser expresado como una función de la temperatura por la relación

$$K_i = \exp(-\Delta G_i/RT) \quad (6)$$

$$\Delta G_i = \Delta H_i - T\Delta S_i = \Delta H_i - T\Delta H_i/T_{m,i} \quad (7)$$

en la cual la entalpía de transición de la desnaturalización de los dominios aislados, ΔH_i , se introdujo junto con la temperatura de transición, $T_{m,i}$. El término ϕ se relacionó con la energía libre de interacción dominio-dominio, ΔG_ϕ , a través de la ecuación 6. En cada temperatura, la entalpía de desnaturalización, $\langle \Delta H \rangle$, se obtuvo de acuerdo a la ecuación 8, que incluye la entalpía asociada con la ruptura de contactos interdominio (ΔH_ϕ).

$$\langle \Delta H \rangle = (\Delta H_A + \Delta H_\phi)P_A + (\Delta H_B + \Delta H_\phi)P_B + (\Delta H_A + \Delta H_B + \Delta H_\phi)P_D \quad (8)$$

Finalmente, la capacidad calorífica en exceso, C_{ex} , es evaluada como la derivada de $\langle \Delta H \rangle$ con respecto a la temperatura.

3.2 Curvas de desnaturalización.

Los cambios de elipticidad observados a diferentes temperaturas se usaron para expresar la fracción de proteína desnaturalizada, f_D , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$f_D = \frac{\theta - \theta_N}{\theta_D - \theta_N}$$

donde,

θ Parámetro experimental observable que varía con la conformación de la molécula de la proteína.

θ_D Valor del parámetro observable para la proteína desnaturalizada.

θ_N Valor del parámetro observable para la proteína nativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Purificación de las enzimas.

La cromatografía de quimopapaína comercial parcialmente purificada, sobre la columna TSK-SP5PW, reveló dos regiones principales con actividad proteolítica (Fig. 1.a). En contraste, el patrón de elución de quimopapaína comercial cromatográficamente purificada, bajo las mismas condiciones, mostró sólo una región de actividad (Fig. 1.b). De este modo, suponemos que la última zona eluida en la Fig. 1.a comprendía al menos dos formas de proteinasa Ω [17,64]. Un trabajo previo de Robinson [17] ha mostrado que la proteinasa Ω es el componente más básico en la quimopapaína comercial. Similarmente, Buttle y Barrett [64] han reportado que esta proteinasa Ω , presente en el látex de papaya en polvo, fue eluida de una columna de intercambio catiónico como un pico complejo, con una fuerza iónica mayor que la necesaria para la elución de la papaína y quimopapaína.

Se colectaron y se recromatografiaron las tres fracciones indicadas en la Fig. 1.a, bajo las mismas condiciones. La Fig. 2 muestra éstas, en cada caso, como picos sencillos razonablemente simétricos. El material colectado en esta etapa fue usado en estudios subsecuentes. Por otro lado, la purificación de la papaína en la misma columna dio como resultado un pico principal y dos pequeños picos contaminantes (Fig. 1.c). El material colectado como se indica en la Fig. 1.c se empleó en estudios posteriores.

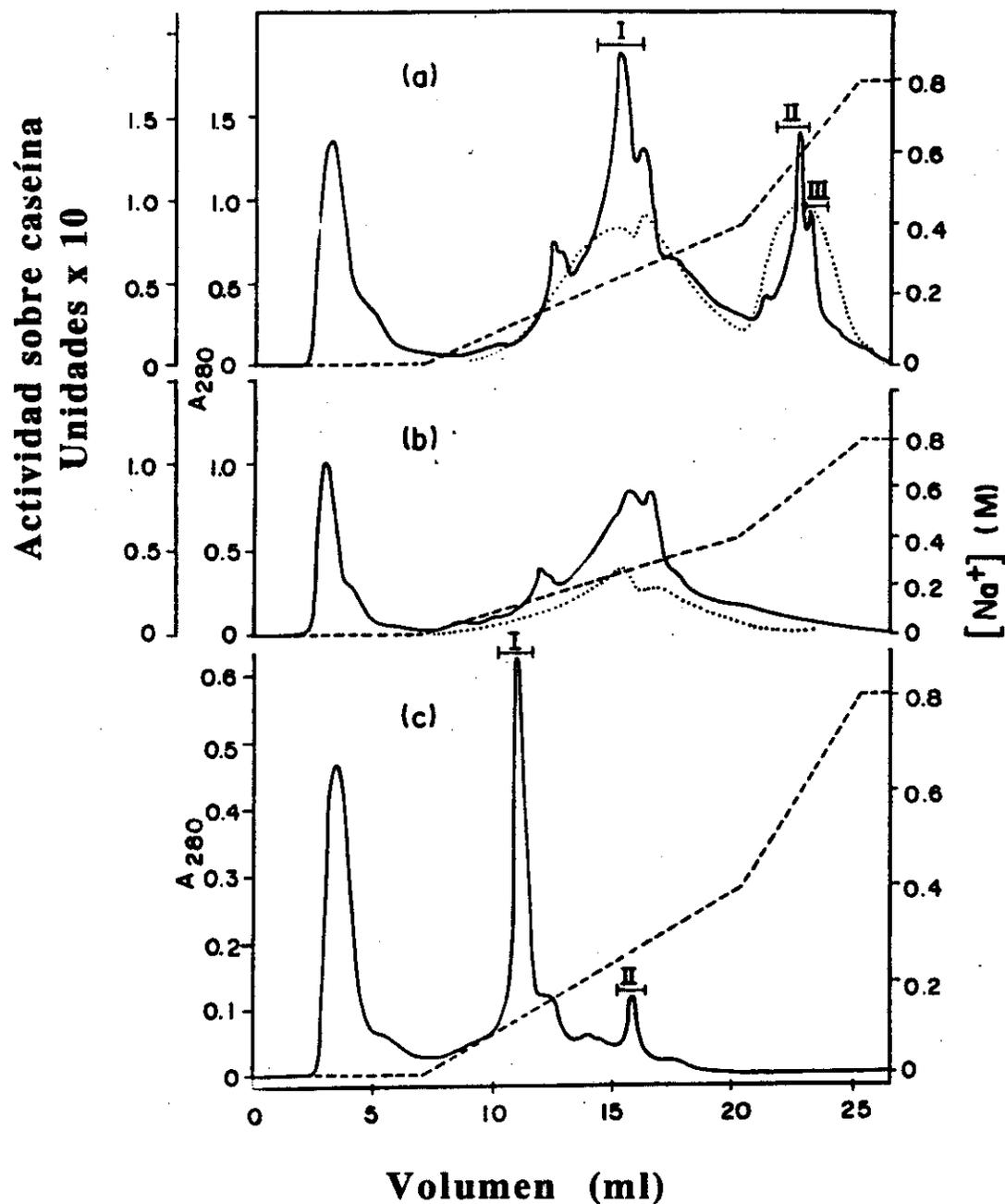


Fig. 1. Cromatografía de las proteinasas cisteínicas del látex de papaya en una columna TSK-SP5PW a pH 7.0. Se inyectaron aprox. 7 mg de quimopapaína parcialmente purificada (a), 3 mg de quimopapaína cromatográficamente purificada (b), y 0.3 mg de papaína (c), las cuales se eluyeron con un gradiente bifásico de NaCl. Las fracciones marcadas con barras fueron usadas en estudios posteriores; —, absorbancia de la proteína a 280 nm; ·····, actividad sobre caseína (se midió con alícuotas de 0.3 ml); - - - - - , concentración de NaCl.

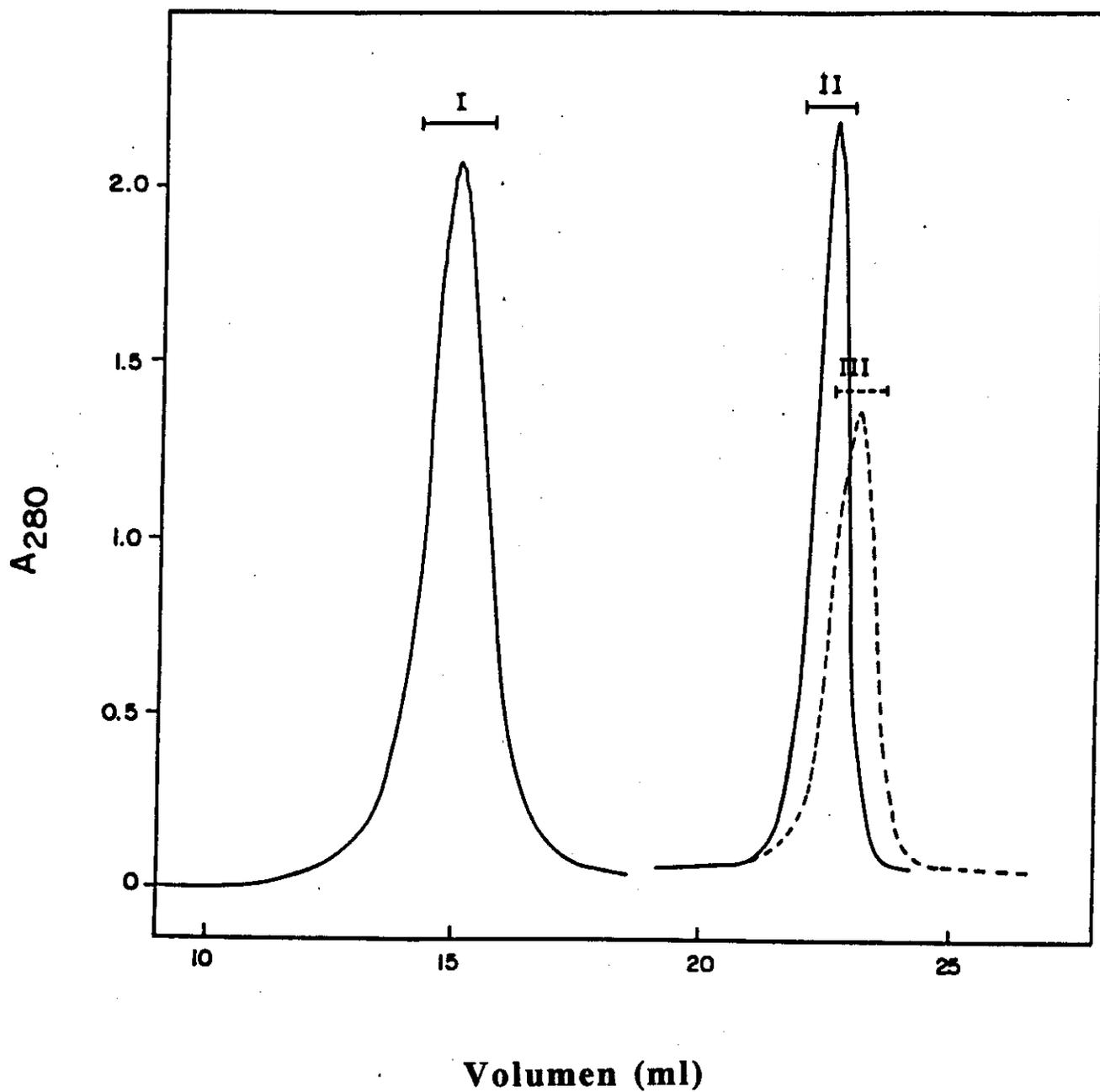


Fig. 2. Recromatografía de las formas aisladas de quimopapaína y proteinasa Ω . Las 3 fracciones marcadas con las barras en la fig. 1.a, fueron colectadas por separado y recromatografiadas bajo las mismas condiciones.

4.2 Electroforesis y Electroenfoque.

La quimopapaína (Pico I en la Fig. 2), proteinasa Ω (Picos II y III en la Fig. 2) y papaína (Pico I en la Fig. 1.c) se sometieron a electroforesis y electroenfoque en gel de poliacrilamida a pH 7.0. En tales condiciones, las movilidades relativas de estas enzimas (Fig. 3) fueron consistentes con los puntos isoeléctricos esperados; papaína, 8.75 [15]; quimopapaína, 10.1-10.6 [16]; proteinasa Ω , 11.0 [16,17]. Los resultados de electroenfoque (no se muestran) indicaron un punto isoeléctrico de 10.2 para la quimopapaína, aislada en este trabajo; las dos formas de la proteinasa Ω enfocaron exactamente en la franja del cátodo, indicando que sus puntos isoeléctricos fueron ≥ 11.0 . Estos resultados apoyan nuestra identificación de los picos II y III en la Fig. 1.a, como dos formas de proteinasa Ω .

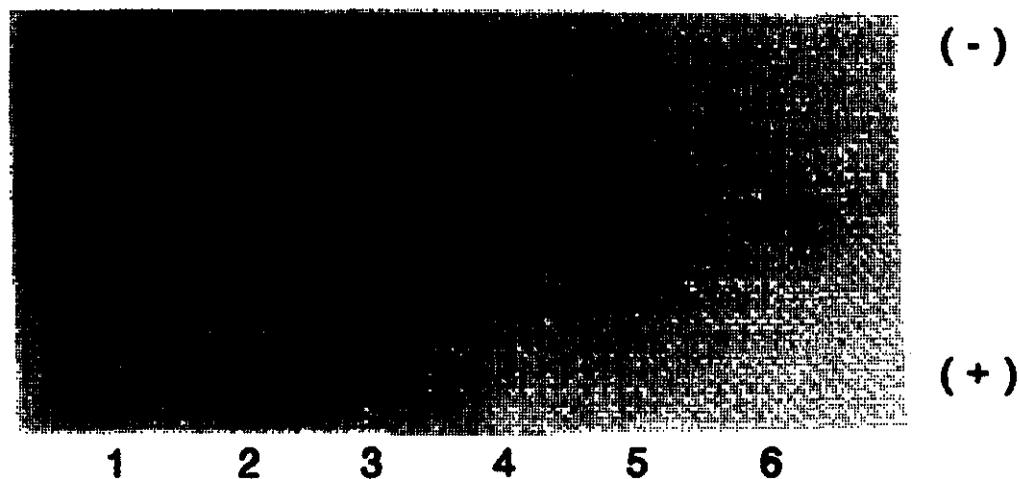


Fig. 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida de las proteinasas cisténicas del látex de papaya a pH 7.0. Ranuras 1 y 2, papaína (pico I en la fig. 1.c); ranura 3, proteinasa Ω (pico III en la Fig. 2); ranura 4, proteinasa Ω (pico II en la Fig. 2); ranuras 5 y 6, quimopapaína (pico I en la Fig. 2).

4.3 Masas Moleculares.

Las masas moleculares se determinaron por medio de filtración en gel en clorhidrato de guanidina 6M. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla III.

T A B L A I I I

ENZIMA	MASA MOLECULAR * (Da)
Papaina	23,500
Quimopapaina	23,600
Proteinasa Ω (Pico II)	24,600
Proteinasa Ω (Pico III)	24,990

* \pm 1,000

Dentro del error experimental, estos valores concuerdan bien con aquellos derivados de la secuencia de aminoácidos [14,45,84].

4.4 Dicroísmo Circular.

La Fig. 4 muestra los espectros de DC de las proteinasas estudiadas a pH 7.0 y 25 °C. La papaína expone una curva (Fig. 4.a) muy similar a aquellas reportadas anteriormente [81,83]. Por otro lado, el espectro de la quimopapaína (Fig. 4.c) fue similar en forma, pero aprox. 20-30% menos intenso que aquellos reportados en un artículo previo de nuestro laboratorio [19]. La diferencia en magnitud, probablemente se derivó de un error en la determinación de la concentración de la proteína en nuestro trabajo anterior. Las curvas de las dos formas de la proteinasa Ω , las cuales son reportadas por primera vez, fueron casi idénticas (Fig. 4.b). Es interesante mencionar que la papaína comercial doblemente cristalizada presenta un contaminante principal (pico II en la Fig. 1.c), que da un espectro de DC cualitativamente similar al de la quimopapaína (Fig. 5).

Los espectros de papaína y proteinasa Ω tienen características comunes en la región del UV lejano, según se enlista a continuación:

- La banda positiva centrada en 185 - 186 nm.
- La señal negativa alrededor de 200 nm la muestran como un hombro o como un pico pequeño.
- El extremo negativo a 208 nm es mayor en magnitud que la banda a 220 - 222 nm.

En contraste, en el espectro de quimopapaína se observa:

- La señal a 222 nm es más intensa que la señal a 208 nm.
- No hay señal negativa a 200 nm.
- La banda positiva está centrada en 188 nm.

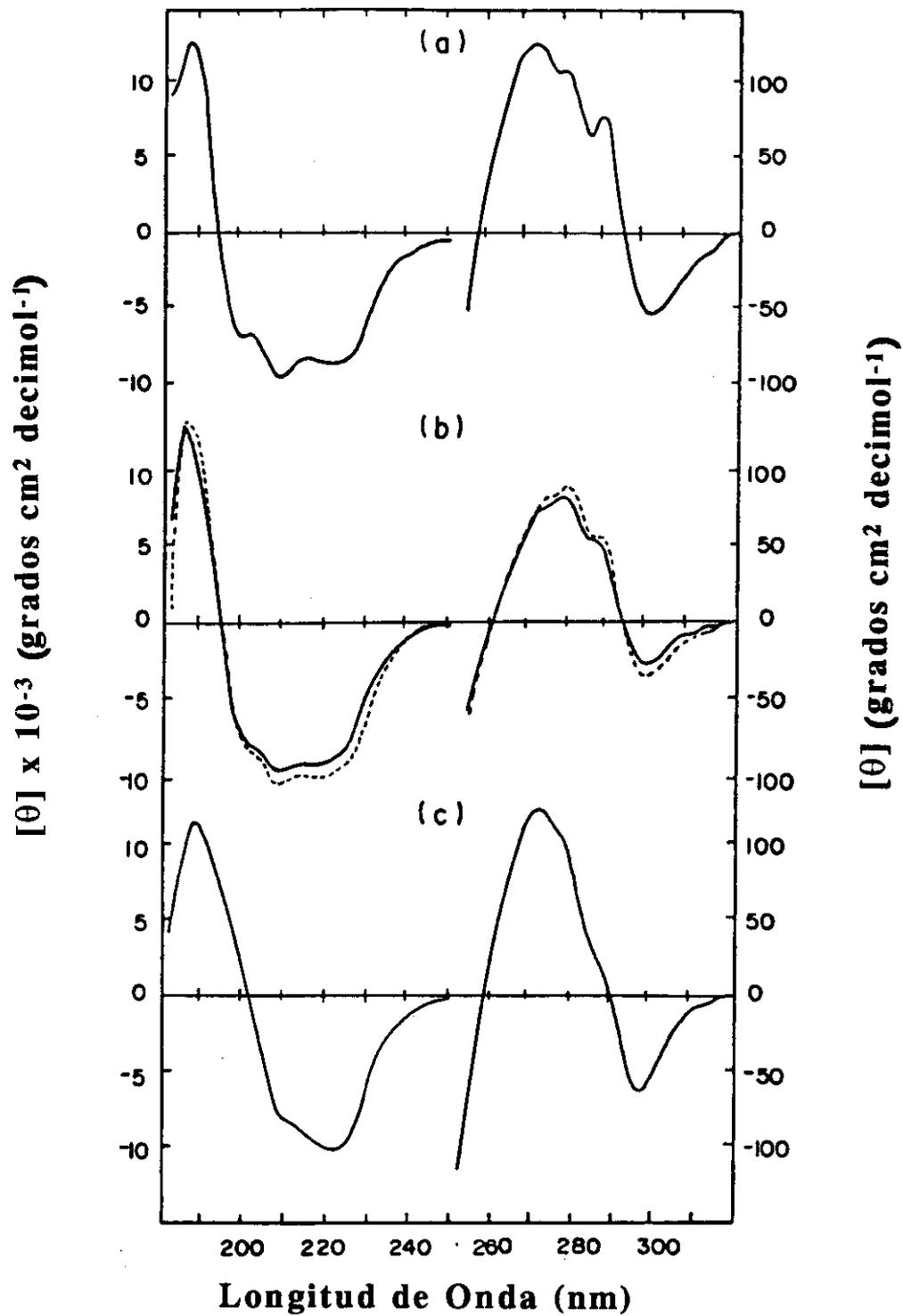


Fig. 4. Espectros de DC de las proteinasas cisteínicas del látex de papaya en regulador de fosfatos 0.01M (pH 7.0) a 25 °C. (a) Papaína. (b) Formas de proteinasa Ω : ----- pico II, ————— pico III (ver fig. 1.a). (c) Quimopapaína.

De acuerdo a Manavalan y Johnson [85], las características espectrales de la papaína y la proteinasa Ω indican que éstas pertenecen a la clase de proteínas $\alpha+\beta$, cuyos miembros presentan regiones separadas ricas en α -hélice y hoja- β [86]. Efectivamente, esto es cierto en ambos casos ya que las estructuras moleculares muestran un dominio α y un dominio de hoja β antiparalela [14]. Según la curva de DC, la quimopapaína sería clasificada como una proteína α/β , estructura que se caracteriza por segmentos alternados de α -hélice y segmentos de hoja β ; éstos últimos principalmente en un sentido paralelo [86].

El análisis de los espectros DC por medio del procedimiento simplificado de Compton y Johnson [87], dió los resultados mostrados en la Tabla IV. Los contenidos estimados de estructuras secundarias fueron muy similares en los casos de la proteinasa Ω y la papaína. Los cálculos de estructuras, en base a DC, para estas proteinasas están de acuerdo con aquellos derivados de estudios de rayos X, con la excepción de la cantidad pequeña de hojas β paralela, un tipo estructural que se sabe está ausente en estas macromoléculas [13,14]. Para la quimopapaína, los resultados obtenidos fueron ligeros, pero significativamente diferentes de aquellos correspondientes a la papaína y proteinasa Ω . Especialmente, los montos de hélices y hoja β paralela son mayores para la enzima anterior.

T A B L A I V

CONTENIDO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LAS PROTEINASAS DEL LATEX DE PAPAYA			
	PAPAINA	PROTEINASA Ω	QUIMOPAPAINA
HELICES	0.27 (.006)	0.27 (.006)	0.31 (.006)
HOJA β ANTIPARALELA	0.12 (.015)	0.14 (.015)	0.07 (.014)
HOJA β PARALELA	0.05 (.012)	0.02 (.012)	0.09 (.013)
GIROS	0.15 (.012)	0.17 (.012)	0.13 (.012)
OTROS	0.53 (.028)	0.50 (.029)	0.48 (.027)
TOTAL	1.12	1.10	1.08

La desviación estándar de los valores calculados está entre paréntesis.

Por lo tanto, los resultados de DC sugieren que el patrón de plegamiento de la molécula de quimopapaína, o al menos una parte de ella, difiere de las otras dos proteinasas. Si esta conclusión es comprobada por futuros estudios de rayos X, sería muy interesante ver que regiones de la quimopapaína están plegadas de una manera diferente en comparación con la papaína, y si estas regiones están localizadas en un solo o en los dos dominios de la molécula. Por otro lado, si resultase que los patrones de doblado de la quimopapaína y la papaína son muy similares, esto indicaría que la señal de DC en la región de UV lejano es influenciada por otros factores ajenos a las estructuras secundarias.

Los espectros de DC de las proteinasas en la región aromática (250 - 320 nm) son similares, aunque la curva de la quimopapaína muestra una estructura menos fina (Fig. 4). Una característica común de los espectros es la presencia de una banda negativa ancha centrada de 297 a 298 nm. Ya que en esta longitud de onda los residuos de tirosina y fenilalanina no contribuyen a los espectros de DC en las proteínas [88,89], esta banda negativa probablemente se origina de residuos de triptofano localizados en ambientes asimétricos que son similares en cada una de las proteinasas. En la papaína, los triptofanos 26 y 177 contribuyen al campo electrostático que origina la formación del sitio catalítico, que es un par iónico tiolato - imidazolio, mientras que el residuo 177 también está involucrado en las interacciones enzima - sustrato [13]. Es posible que funciones semejantes puedan ser llevadas a cabo por residuos de triptofano localizados en posiciones equivalentes en la secuencia de aminoácidos de la quimopapaína y proteinasa Ω .

4.5 Calorimetría Diferencial de Barrido.

Las curvas calorimétricas de papaína y quimopapaína, corregidas con la línea base regulador-regulador, obtenidas a pH 3.18 y 60 °C/hr, son mostradas en la Fig. 6. En el intervalo de pH estudiado, la desnaturalización térmica de ambas proteínas fue aparentemente irreversible como se observó en el termograma de un segundo barrido de la muestra, después de que se enfrió ésta de la primera corrida. Además, se probó el efecto de la velocidad de calentamiento midiendo el valor de la temperatura en el máximo de la curva de capacidad calorífica, T_m , al llevar a cabo algunos experimentos a diferente velocidad de calentamiento (30 °C/hr). Para las dos enzimas se observó que el valor de T_m varió aproximadamente 1.0 °C cuando la velocidad de barrido se duplicó. Esta pequeña variación sugiere que la fuente de irreversibilidad puede ser atribuida a un proceso que toma lugar a más altas temperaturas que aquellas en la cual ocurre la transición de desdoblado [90]. Para determinar la entalpía de desnaturalización de las curvas calorimétricas, tal como se muestran en la Figura 6, las curvas originales fueron corregidas por la diferencia de la capacidad calorífica permanente, ΔC_p , por substracción de una línea base que unía las temperaturas de transición inicial y final; esto es, se calculó la función de la capacidad calorífica en exceso, C_{ex} , y a partir de ella fueron determinadas ΔH_{cal} y ΔH_{vH} . Resultados esencialmente iguales fueron obtenidos cuando una línea base sigmoideal fue usada en este procedimiento.

4.6 Dependencia del pH.

En resumen, los parámetros termodinámicos de la desnaturalización térmica de la papaína y de la quimopapaína se presentan en la Tabla V. En el caso de la papaína, podemos ver que la relación $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ se acerca a un valor de 2.0, de acuerdo

con resultados previos de Tiktopulo y Privalov [42]. Este cociente de entalpías puede ser considerado como un indicio de que los dominios de la papaína sufren una transición de desdoblamiento cuasi-independiente. En contraste, en la quimopapaína se observa un comportamiento cooperativo marcadamente diferente; en este caso $\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$ es 1.3 - 1.4 en el intervalo de pH estudiado.

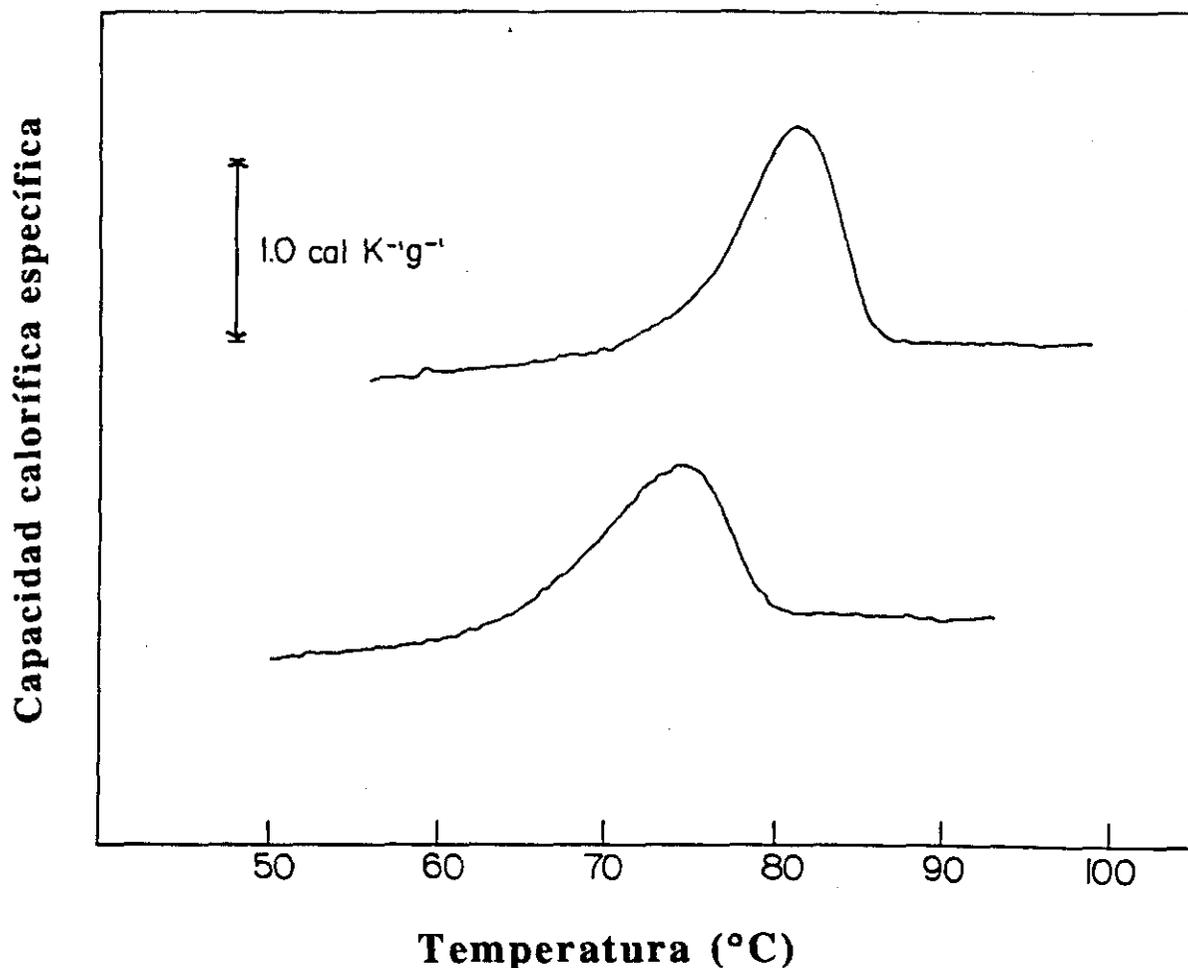


Fig. 6. Los termogramas de la quimopapaína (arriba) y la papaína (abajo) después de restar la línea base regulador-regulador. Estos experimentos fueron hechos a pH 3.18 y 1.0 °C/min. La concentración de las proteínas fue de 3.28 y 2.90 mg/ml para la quimopapaína y la papaína, respectivamente.

T A B L A V

Parámetros termodinámicos que caracterizan la desnaturalización térmica de la papaína y la quimopapaína					
(1) Datos referidos T=T _m	pH	T _m (°C)	ΔH_{cal} (1) (kcal mol ⁻¹)	ΔH_{vH} (1) (kcal mol ⁻¹)	$\Delta H_{cal}/\Delta H_{vH}$
Papaína	4.10	81.8	210.8	115.8	1.82
	3.80	78.5	197.5	108.5	1.82
	3.18	74.6	186.0	96.0	1.94
	2.90	60.3	133.0	78.0	1.71
	2.55	51.0	107.9	65.4	1.65
Quimopapaína	3.45	83.7	198.7	144.8	1.37
	3.18	81.1	193.4	142.7	1.36
	2.90	78.2	186.2	138.3	1.35
	2.56	75.2	174.0	135.8	1.28
	2.35	67.9	161.2	123.1	1.31
	2.20	62.0	143.8	108.3	1.33
	1.91	56.9	138.2	99.2	1.39
	1.20	43.0	104.6	73.5	1.42

La desnaturalización térmica de las proteinasas del látex de papaya fue estudiada a diferentes valores de pH. Las Figuras 7 y 8 muestran, a manera de ejemplo, las curvas de capacidad calorífica específica, C_p , a diferentes valores de pH (2.0 y 3.8 para la papaína, y 2.20 y 3.18 para la quimopapaína). Es evidente la mayor estabilidad de la quimopapaína, ya que el proceso de desnaturalización ocurre a temperaturas mayores al mismo pH.

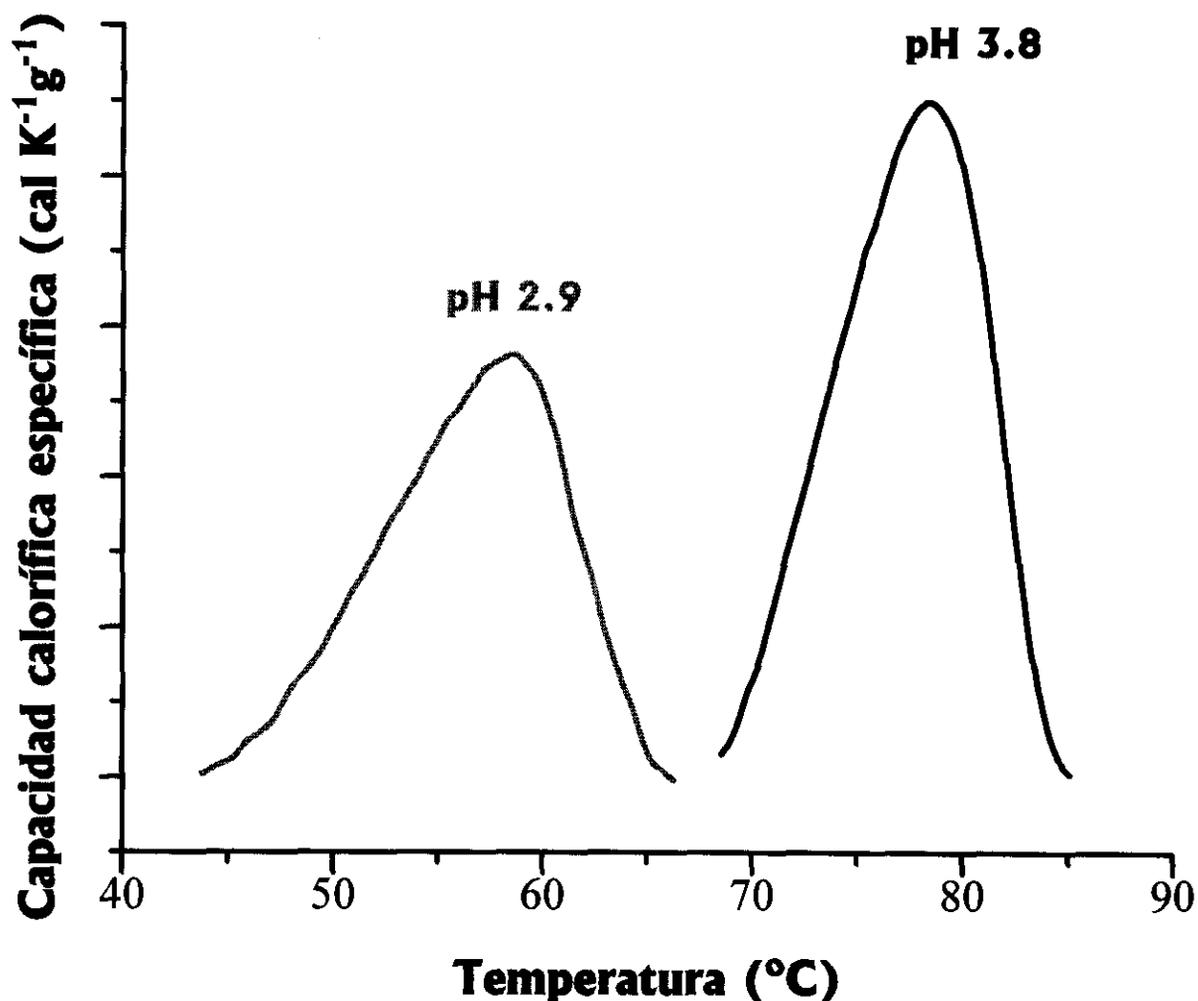


Fig. 7. Termogramas de la papaína después de restar la línea base regulador-regulador. Estos experimentos fueron hechos a $1.0^{\circ}C/min$ y a diferentes valores de pH. La concentración de la proteína utilizada fue de 2.0 a 5.0 mg/ml.

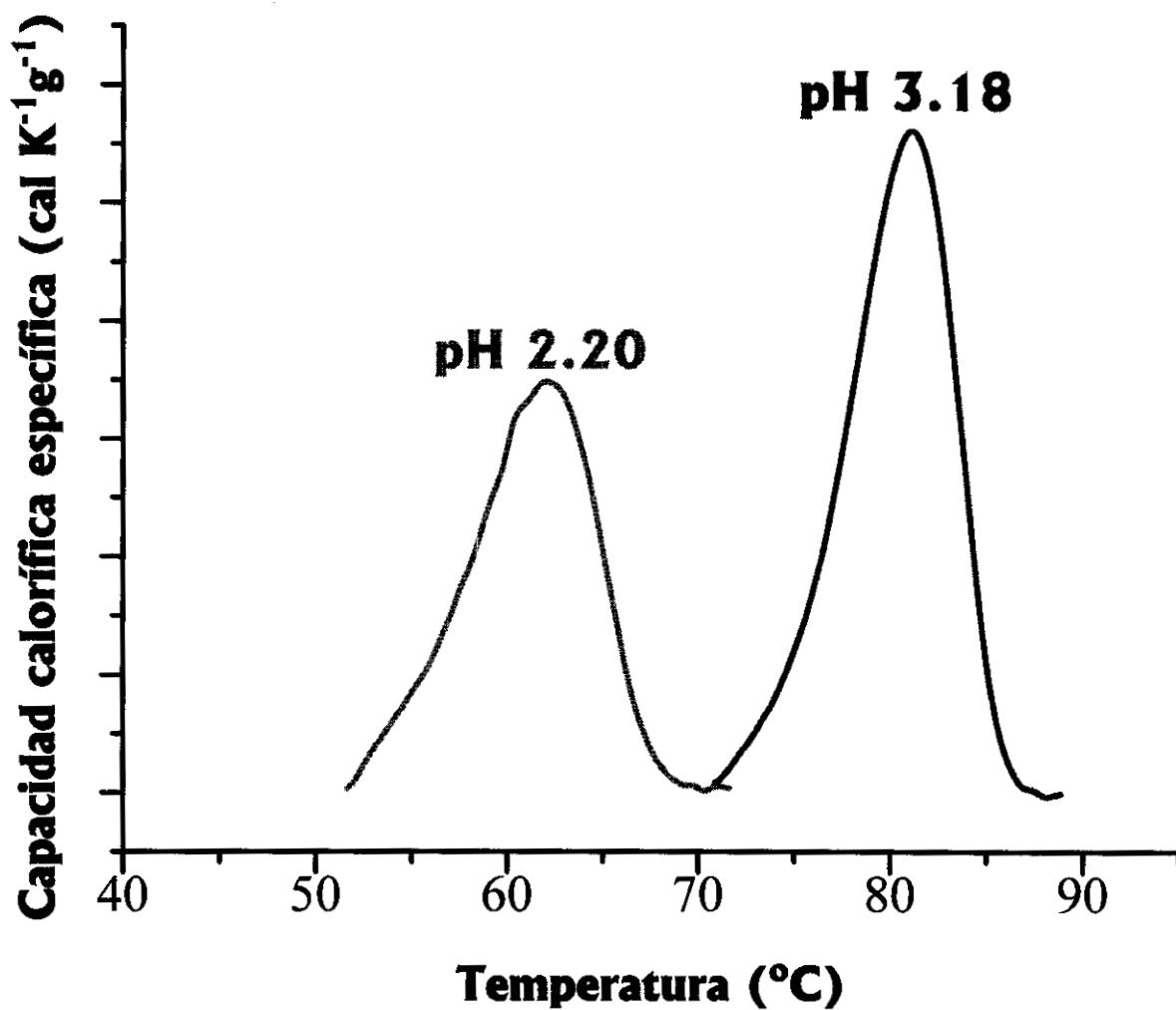


Fig. 8. Termogramas de la quimopapaína después de restar la línea base regulador-regulador. Estos experimentos fueron hechos a 1.0 °C/min y a diferentes valores de pH. La concentración de proteína utilizada fue de 2.0 a 5.0 mg/ml.

4.7 Dependencia de la entalpía de desnaturalización con la temperatura.

La Figura 9 ilustra la influencia de la temperatura sobre la entalpía específica de desnaturalización, ΔH_{cal} , de las dos proteínas estudiadas. Con fines de comparación, los datos reportados por Tiktopulo y Privalov [42] también se muestran en esta figura. Como podemos observar, existe una buena relación lineal entre ΔH_{cal} y la temperatura, en concordancia con resultados para algunas otras proteínas pequeñas [5,8]. En realidad, es generalmente aceptado que en un intervalo amplio de temperatura la entalpía de desnaturalización es una función lineal de la temperatura, con una pendiente igual a la diferencia de la capacidad calorífica entre los estados desnaturalizado y nativo [5,91]. De la Figura 9, las diferencias de la capacidad calorífica obtenidas son $0.096 \text{ cal K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($2.3 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) y $0.142 \text{ cal K}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ($3.3 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) para quimopapaína y papaína, respectivamente. Estos valores concuerdan bien con los determinados directamente de las curvas calorimétricas (Fig. 6) los cuales son $2.1 \pm 0.5 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (quimopapaína) y $3.0 \pm 0.4 \text{ kcal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ (papaína). Estas últimas determinaciones fueron hechas extrapolando linealmente las partes pre y post-desnaturalización de cada curva calorimétrica y evaluando las diferencias entre ellas a T_m [5,8].

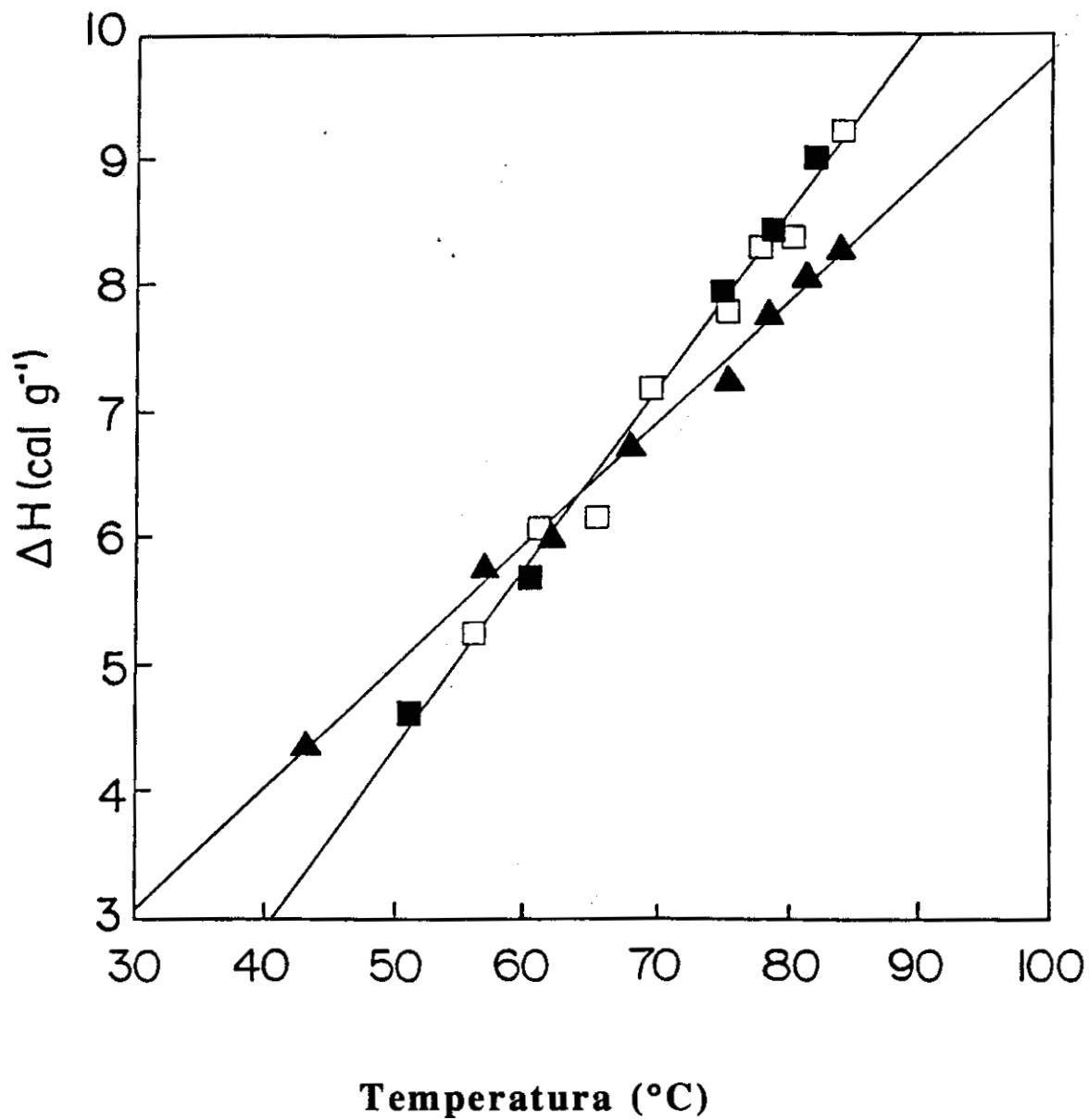


Fig. 9. Dependencia del cambio de entalpía (por gramo de proteína) con la temperatura, para quimopapaína (▲) y papaína (■). Para la papaína, los datos reportados por Tiktopulo y Privalov [42] también se muestran con fines comparativos (□).

4.8 Interacciones Dominio-Dominio.

En el análisis de una curva experimental de C_{ex} , los parámetros que se ajustaron fueron ΔH_A , ΔH_B , $T_{m,A}$, $T_{m,B}$, ΔG_ϕ , y ΔH_ϕ (ver sección 3.1). Para conservar un modelo lo más simple posible, consideramos ΔG_ϕ como una constante igual a ΔH_ϕ ; de este modo todos los cambios de entropía son asignados exclusivamente a la desnaturalización de los dominios. Los datos calorimétricos para la papaína (pH 3.80) y quimopapaína (pH 2.90) fueron analizados de acuerdo al procedimiento explicado antes, por medio de una regresión no lineal en la que se usó una versión modificada del programa GRIDLS [92]. Los valores calculados de C_{ex} coincidieron razonablemente con los datos experimentales (Fig. 10), a juzgar por los valores de la desviación estándar, la cual corresponde a menos del 5% del valor máximo de C_{ex} en ambos casos. Los parámetros obtenidos de las curvas correspondientes son resumidos en la Tabla VI. Para la papaína el valor de ΔG_ϕ es insignificante, indicando que la desnaturalización de los dominios de esta proteína ocurre de manera prácticamente independiente. Por otro lado, los valores de ΔH_A y ΔH_B no difieren mucho ($\Delta H_A/\Delta H_B = 1.29$), como sería de esperarse para dominios de tamaño similar [93]. En el caso de la quimopapaína la diferencia entre ΔH_A y ΔH_B fue considerablemente mayor ($\Delta H_A/\Delta H_B = 1.98$) y el término de interacciones adquirió un valor significativo de $0.97 \text{ kcal mol}^{-1}$.

Sin embargo, dada la alta homología en su secuencia y la semejanza en la masa molecular de las dos enzimas, es razonable suponer que la estructura molecular de la quimopapaína esté formada por dominios de un tamaño semejante a aquellos de la papaína. Por lo tanto, realizamos un ajuste adicional a la curva de la quimopapaína, introduciendo una restricción que limitó el cociente de entalpías de transición a 1.29 (como en el caso de la

papaína). Los resultados que se obtuvieron con esta restricción se muestran en el tercer renglón de la Tabla VI. La desviación estándar fue otra vez menor al 5% del valor máximo de la curva, indicando concordancia satisfactoria entre los datos calculados y los obtenidos experimentalmente. Con esta aproximación, ΔG_{ϕ} resultó un poco más grande que en el análisis previo.

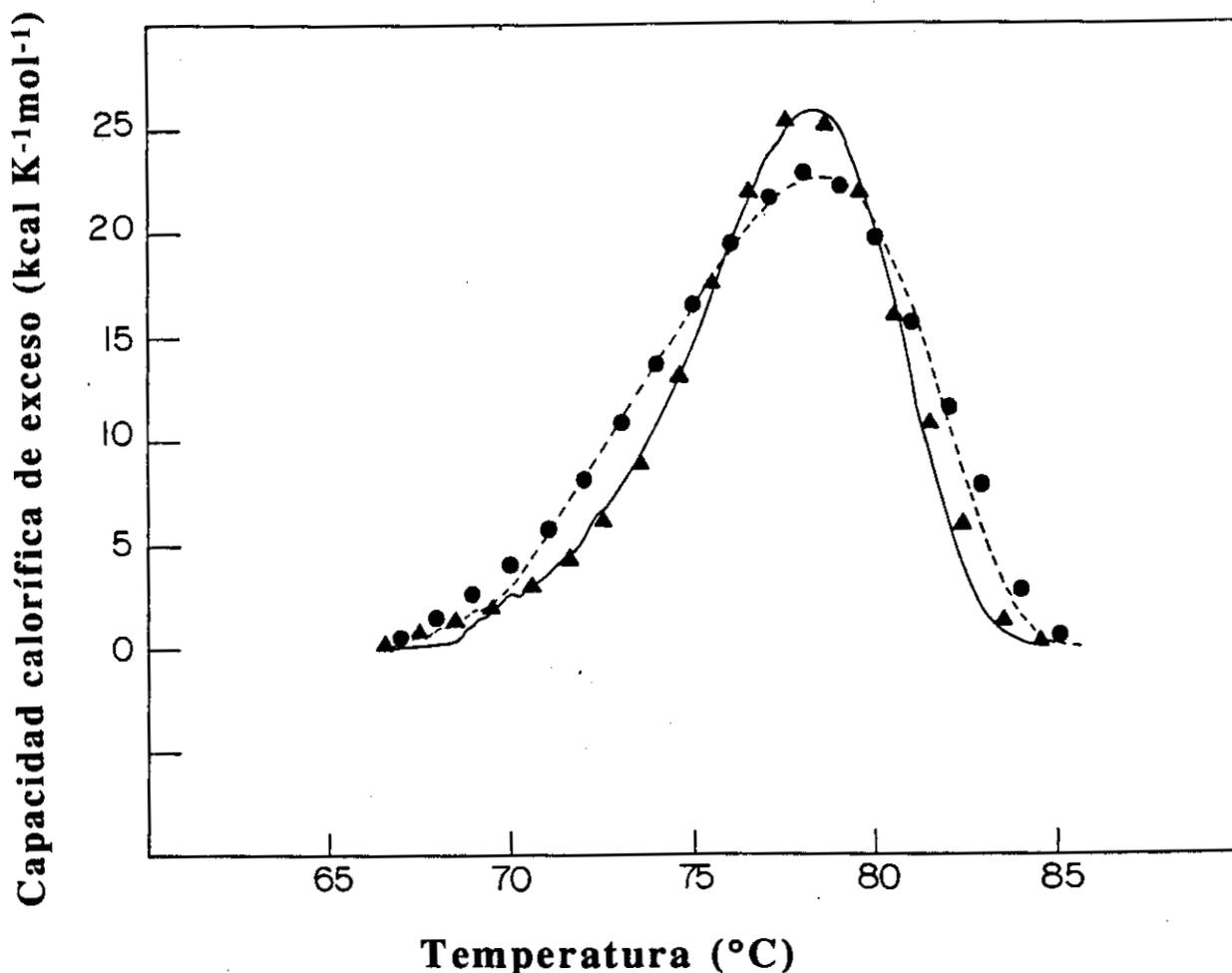


Fig. 10. Las funciones de la capacidad calorífica de exceso para la quimopapaína a pH 2.90 (————) y papaína a pH 3.8 (-----). La curva de la quimopapaína tiene un valor más grande en el máximo. Ajustando los datos a un mecanismo de desnaturalización en el cual se consideraron dos dominios con posibilidad de interacción, se obtuvieron los valores de C_{ex} , indicados con triángulos (quimopapaína) y círculos (papaína).

TABLA VI

Transición 1		Transición 2		Interacciones		
$T_{m,A}$ (°C)	ΔH_A (kcal mol ⁻¹)	$T_{m,B}$ (°C)	ΔH_B (kcal mol ⁻¹)	ΔG_{ψ} (kcal mol ⁻¹)	DE(0) (cal mol ⁻¹ K ⁻¹)	
Papaína	75.5 ± 0.3	97 ± 7	78.9 ± 0.2	126 ± 9	0.005 ± 0.04	923
Quimopapaína	71.1 ± 0.3	67 ± 6	77.8 ± 0.1	134 ± 8	0.97 ± 0.04	1053
Quimopapaína ⁽²⁾	73.1 ± 0.2	88 ± 8	77.8 ± 0.2	112 ± 7	1.15 ± 0.05	1228

⁽¹⁾Desviación estándar del ajuste de la curva experimental (Cex).

⁽²⁾En este caso, se impuso una restricción en la relación de las entalpías, de acuerdo al cociente obtenido para la papaína.

Los resultados calorimétricos antes expuestos muestran que la transición de desnaturalización de la quimopapaína no es un proceso de dos estados, como lo indica la relación de entalpías calorimétrica y de van't Hoff. A este respecto, el comportamiento de desdoblado de la quimopapaína se parece al de la papaína, aunque difiere en la cooperatividad (Tabla V). Aparentemente, los dominios de la molécula de la papaína siguen un camino de desnaturalización independiente, lo cual conduce a un valor de $\Delta H_{\text{cal}}/\Delta H_{\text{vH}}$ próximo a 2.0, como fue previamente reportado por Tiktopulo y Privalov [42].

Los análisis de los datos calorimétricos, basados sobre un mecanismo que incluye interacciones dominio-dominio [11,82], generó resultados en concordancia con esta propuesta, ya que la energía libre de interacción, ΔG_{ϕ} , es despreciable ($0.005 \text{ kcal mol}^{-1}$). Para la quimopapaína, en contraste, el valor obtenido de ΔG_{ϕ} en ambos tipos de análisis fue significativamente mayor (aprox. $1.0 \text{ kcal mol}^{-1}$). Debe notarse que ΔG_{ϕ} tuvo una pequeña variación al restringir al cociente $\Delta H_A/\Delta H_B$ a tomar un valor similar al observado para la desnaturalización de la papaína (Tabla VI). Un método de análisis más complejo (es decir, uno que incluye términos diferentes de ϕ , para el desdoblamiento de diferentes dominios) probablemente proporcione más información del comportamiento cooperativo de estas macromoléculas durante la desnaturalización. Sin embargo, antes de intentar un análisis de este tipo, sería conveniente tener una mejor comprensión de la naturaleza irreversible de este fenómeno. En cualquier caso, los datos calorimétricos de la quimopapaína son consistentes con una estructura molecular bilobal, parecida a la de la papaína, pero con interacciones dominio-dominio más fuertes. Además, es posible que los diferentes contactos interdominio puedan ser la causa de sutiles diferencias en el doblado de la cadena polipeptídica,

explicando así las diferencias en los espectros de dicroísmo circular que estas proteínas muestran. Futuros estudios calorimétricos con otras proteinasas cisteínicas de estructura tridimensional conocida probablemente ayuden a aclarar este punto. Posteriormente, se intentará establecer una correlación detallada entre la estructura molecular y el comportamiento de desdoblado, lo cual se ha hecho recientemente con algunas otras proteínas [12,94].

Otro punto digno de comentar es la diferencia del cambio de la capacidad calorífica asociada con la desnaturalización de la papaína y de la quimopapaína. Esto sugiere que estas macromoléculas poseen distintos centros hidrofóbicos, ya que el valor de ΔC_p , en una primera aproximación, es proporcional al área no polar en la estructura nativa de una proteína [5,91]. Además de esta importante conexión con el efecto hidrofóbico, ΔC_p es un parámetro termodinámico fundamental que determina la dependencia con la temperatura de los cambios de entropía y entalpía. Dentro de un intervalo de temperatura relativamente grande, ΔC_p puede ser considerado como una constante [97] y, en consecuencia, la entalpía de desdoblado sigue una dependencia lineal con la temperatura, la cual puede ser escrita como:

$$\Delta H = \Delta H^* + \Delta C_p (T - T_H^*) \quad (1)$$

donde T_H^* es una temperatura de referencia en la cual $\Delta H = \Delta H^*$. La constante T_H^* tiene un especial significado porque los cambios de entalpía (expresados por gramo o por residuo) para un número grande de proteínas extrapolan a un valor común a esta temperatura, como primero lo notaron Privalov y Khechinashvili [8]. Ha sido propuesto que a la temperatura de referencia, la contribución del efecto hidrofóbico en ΔH es cero, es decir, a esta temperatura la entalpía de desdoblado corresponde solamente a las

interacciones polares (enlaces de hidrógeno y contactos polares de van der Waals) [5,12]. Por lo tanto, las proteínas que tienen igual número de interacciones polares por gramo deberían mostrar el mismo valor de entalpía (ΔH^*) cuando $T = T_H^*$, como indica la ecuación 1. Sin embargo, el valor preciso de T_H^* ha sido motivo de gran controversia. A partir de los análisis de las propiedades termodinámicas de las proteínas, diferentes autores han asignado valores de 112 [95], 100 [12] u 84 °C [96] a la T_H^* . No obstante, en este trabajo encontramos que las entalpías específicas de desnaturalización de la quimopapaína y la papaína coinciden aproximadamente a 64 °C (Fig. 9), temperatura más baja que los valores de T_H^* indicados arriba. Este resultado sugiere que los miembros de una familia de proteínas pueden tener propiedades termodinámicas que se distinguen de las de otras proteínas. En otras palabras, es posible que los valores de T_H^* y ΔH^* puedan variar de familia a familia, en respuesta a la red particular de los enlaces de hidrógeno que caracteriza cada tipo de patrón estructural de doblado.

4.9 Desnaturalización Térmica por Dicroísmo Circular.

Las figuras 11 y 12 muestran los espectros de DC de las proteínas estudiadas (quimopapaína y papaína) en regulador de glicina, pH 2.55, a 20 y 66 °C. A baja temperatura, los espectros tienen la forma y magnitud característica de la conformación nativa de cada una de estas enzimas, por lo que puede decirse que, aun en pH de 2.55, el estado nativo de estas macromoléculas es estable. Por otra parte, en la temperatura elevada la forma de las curvas de elipticidad es semejante a la observada con otras proteínas desnaturalizadas térmicamente [43], esto es, se observa un mínimo alrededor de los 200 nm que es indicativo de la aparición de estructuras desordenadas en la cadena polipeptídica.

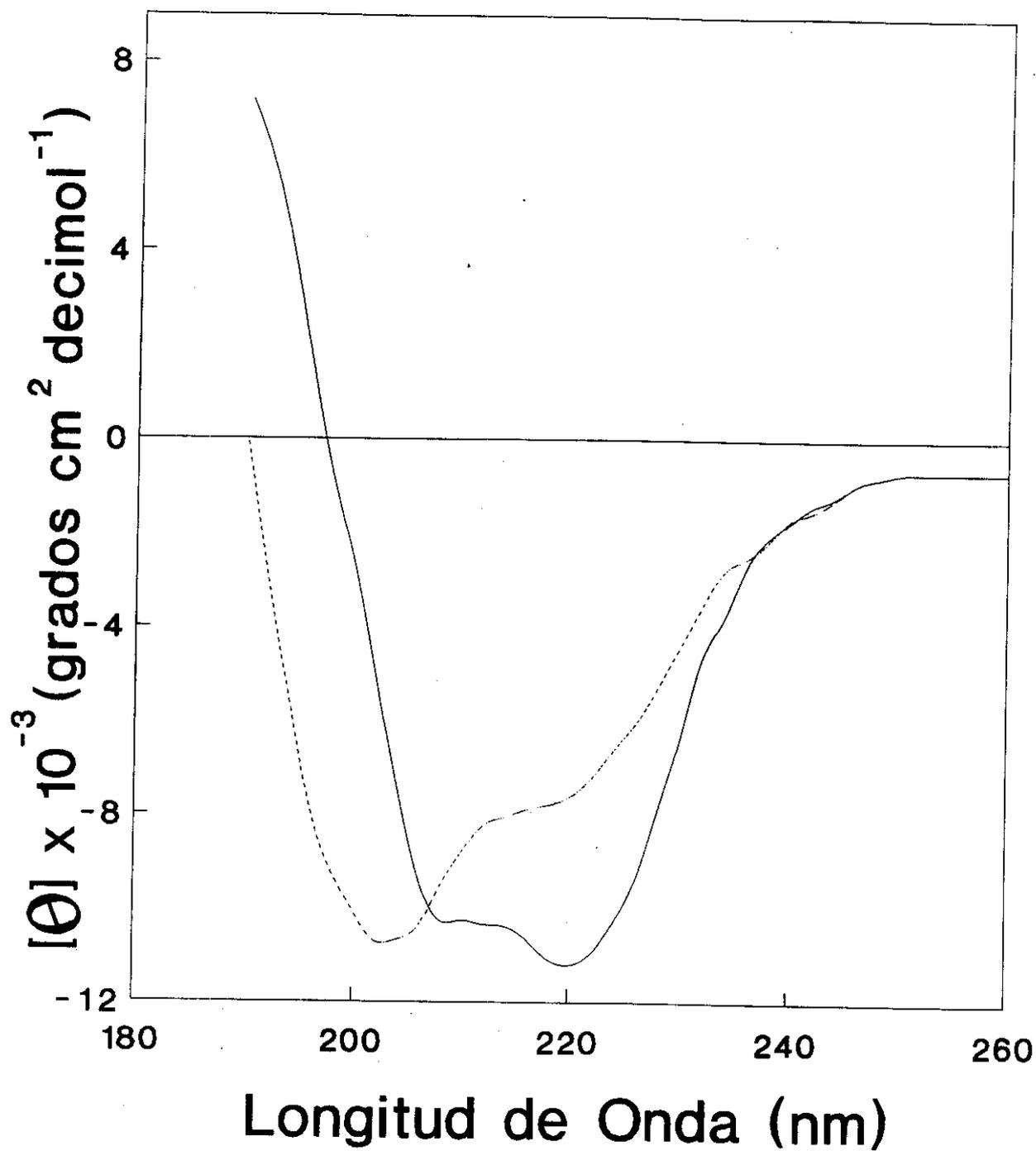


Fig. 11. Espectros de DC de quimopapaína en regulador de glicina 0.02M a pH 2.9, a diferentes temperaturas: 21 °C (—) y 66 °C (-----).

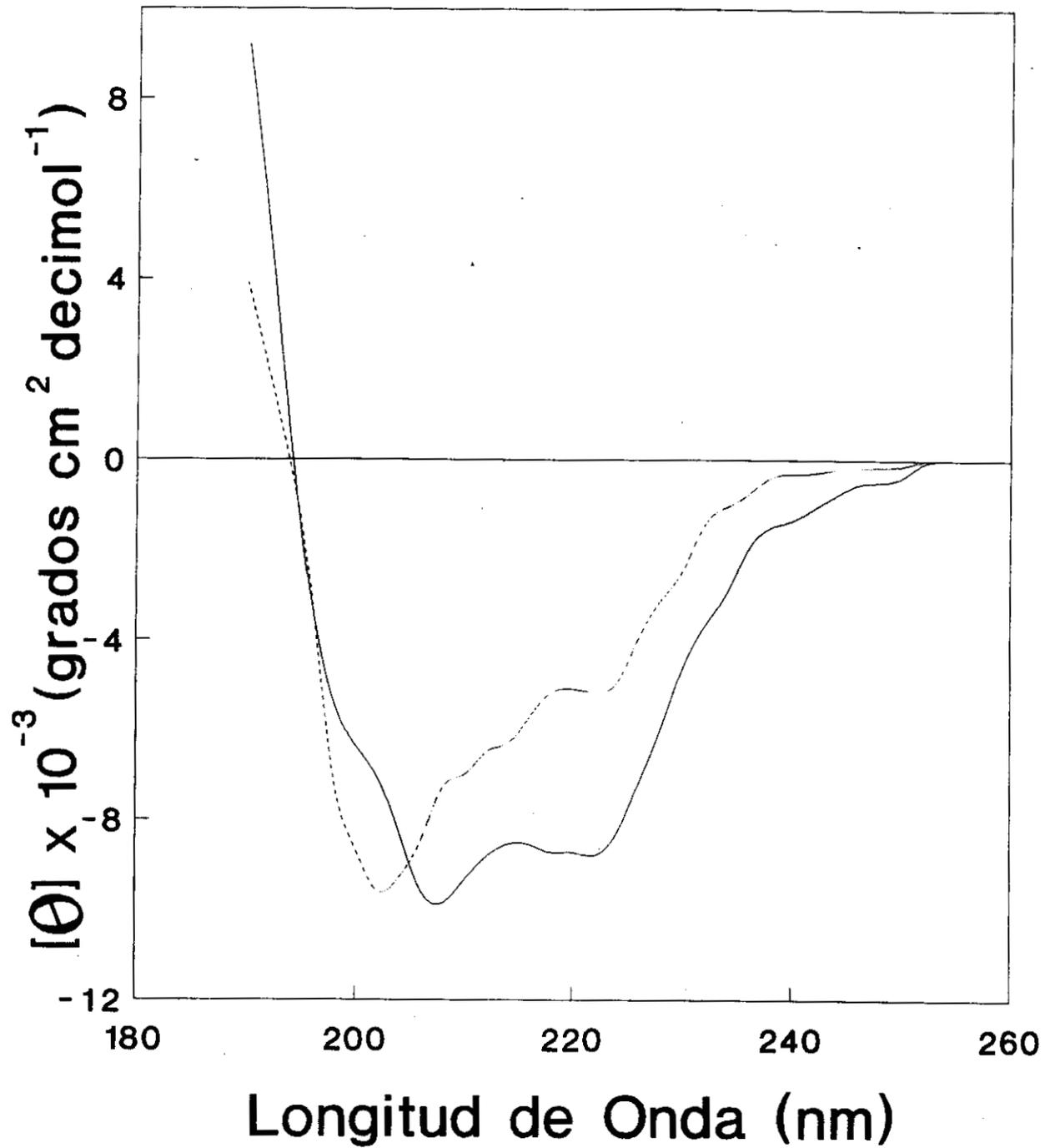


Fig. 12. Espectros de DC de papaína en regulador de glicina 0.02 M a pH 2.9, a diferentes temperaturas: 20 °C (————) y 66 °C (-----).

La pérdida de estructura secundaria en función de la temperatura fue seguida mediante el cambio de elipticidad a 220 nm. Las Figuras 13 y 14 representan las curvas de desdoblamiento de las dos proteinasas en solución, a pH 2.55 y 2.9. Es evidente que la transición entre los estados nativo y desnaturalizado de la quimopapaína ocurre a temperaturas mayores que en el caso de la papaína. Además, con esta última la zona de cambio se presenta en un intervalo más amplio de temperatura.

Cuando se disminuyó el pH a un valor de 2.55, el comportamiento del fenómeno de desnaturalización cambió radicalmente en el caso de la quimopapaína (Fig. 14). En estas condiciones se observó una curva bifásica que indica la presencia de un intermediario estable entre 36 y 59 °C. Aunque con menos claridad, un comportamiento similar fue observado también con la proteinasa Ω (Fig. 15).

En resumen, los resultados del presente trabajo indican que la estabilidad térmica de la quimopapaína depende estrechamente del valor de pH de la solución en la que se encuentre. Cuando el pH es cercano a 3.0, el comportamiento de esta proteína haría pensar que se trata de una entidad única, sin dominios, al menos en el sentido termodinámico. Sin embargo, al disminuir unas décimas el valor de pH, la presencia de al menos dos dominios se hace evidente. En el caso de la papaína, la existencia de los dos dominios se manifiesta independientemente del pH, como lo demuestran los resultados aquí mencionados y los reportados previamente por Tiktopulo y Privalov [42]. Este diferente comportamiento entre ambas enzimas indica que, probablemente, las estructuras de las mismas difieran en la interfase de contacto de los dominios.

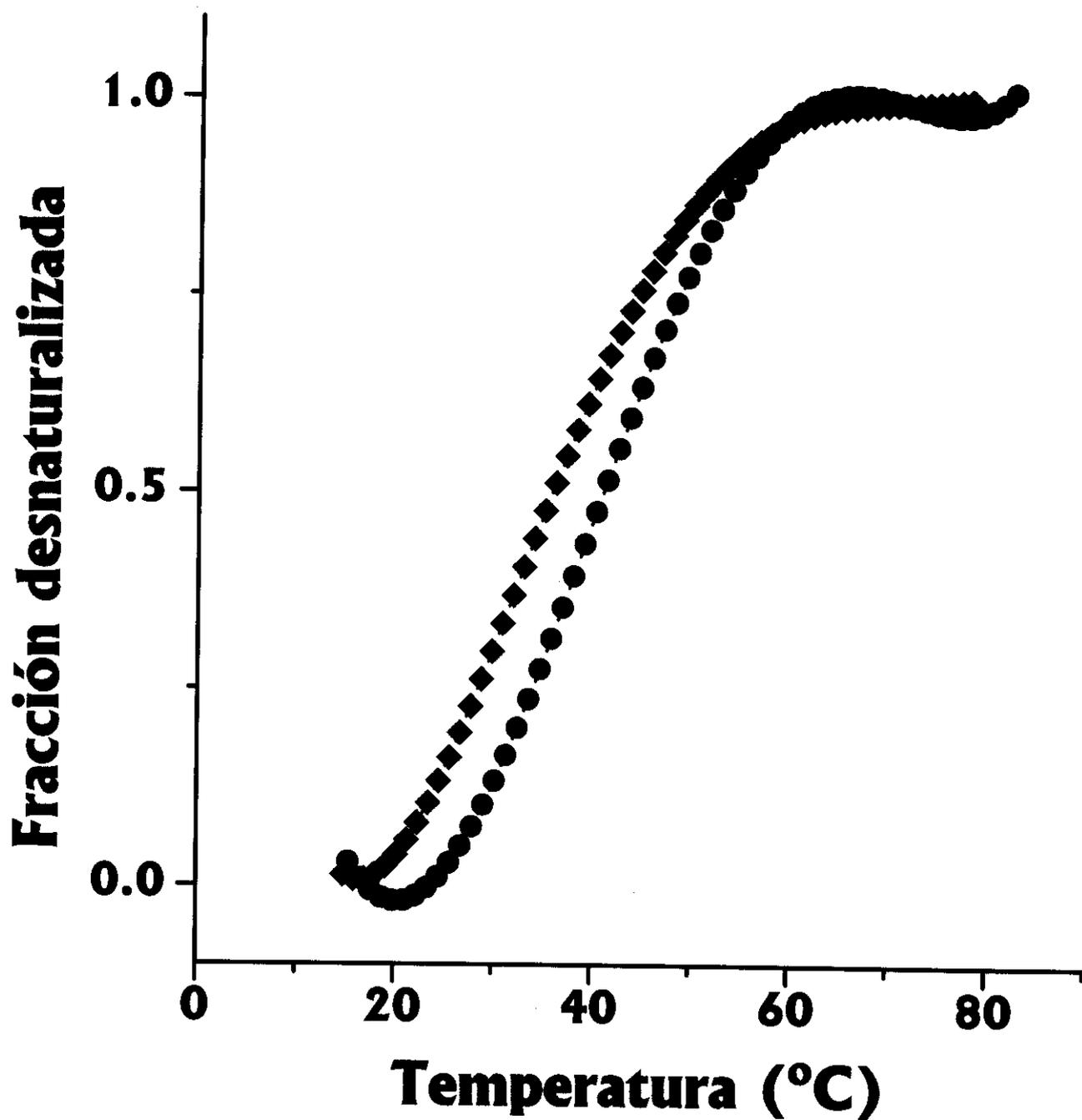


Fig. 13. Fracción de la proteína desnaturalizada en función de la temperatura, medida por la variación de la elipticidad a 220 nm. Papaína en regulador de glicina 0.02M a pH 2.55 (◆-◆-◆-◆-◆) y pH 2.9 (●-●-●-●-●).

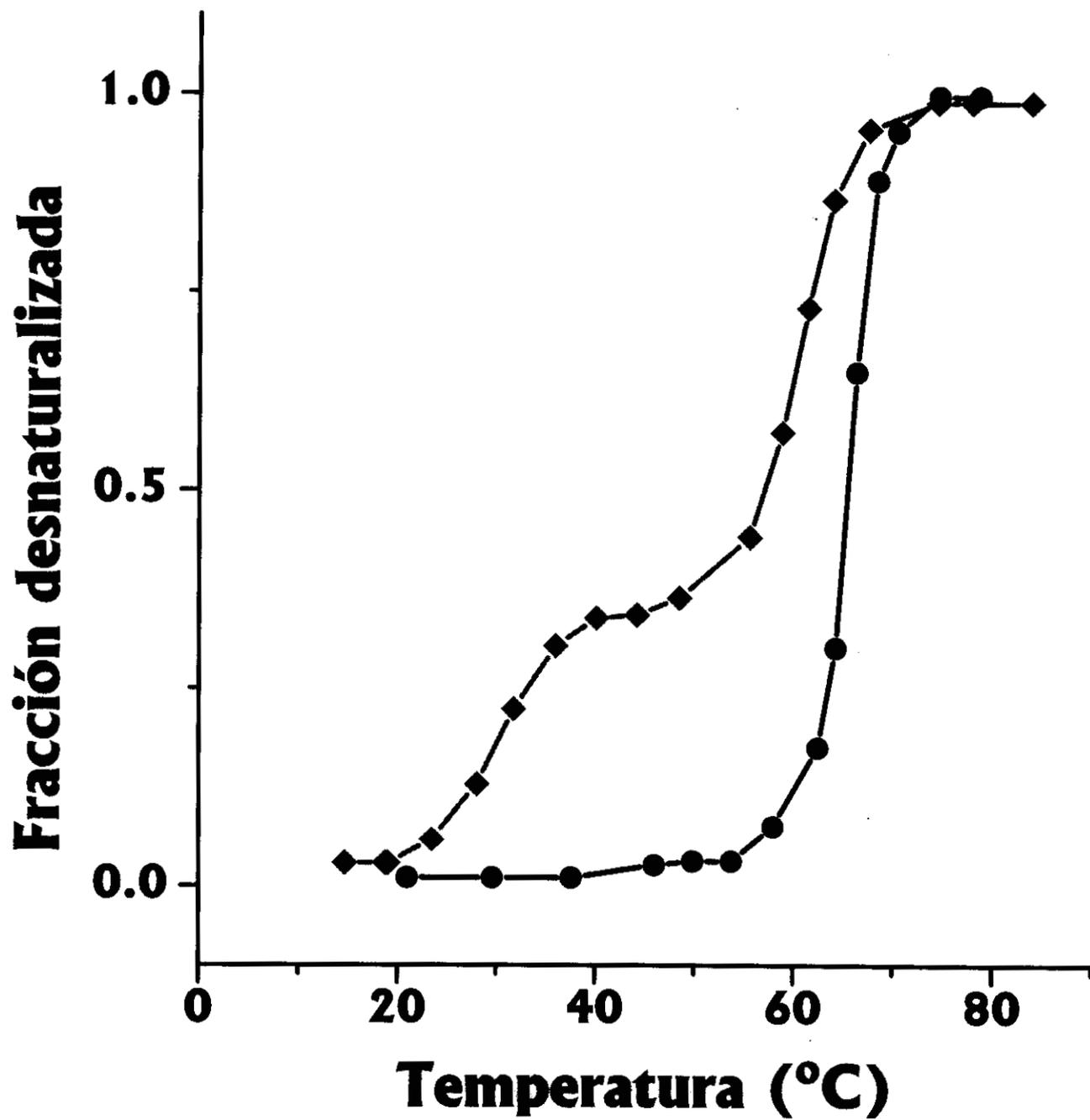


Fig. 14. Fracción de la proteína desnaturalizada en función de la temperatura, medida por la variación de la elipticidad a 220 nm. Quimopapaína en regulador de glicina 0.02M a pH 2.55 (◆-◆-◆-◆-◆) y pH 2.9 (●-●-●-●-●).

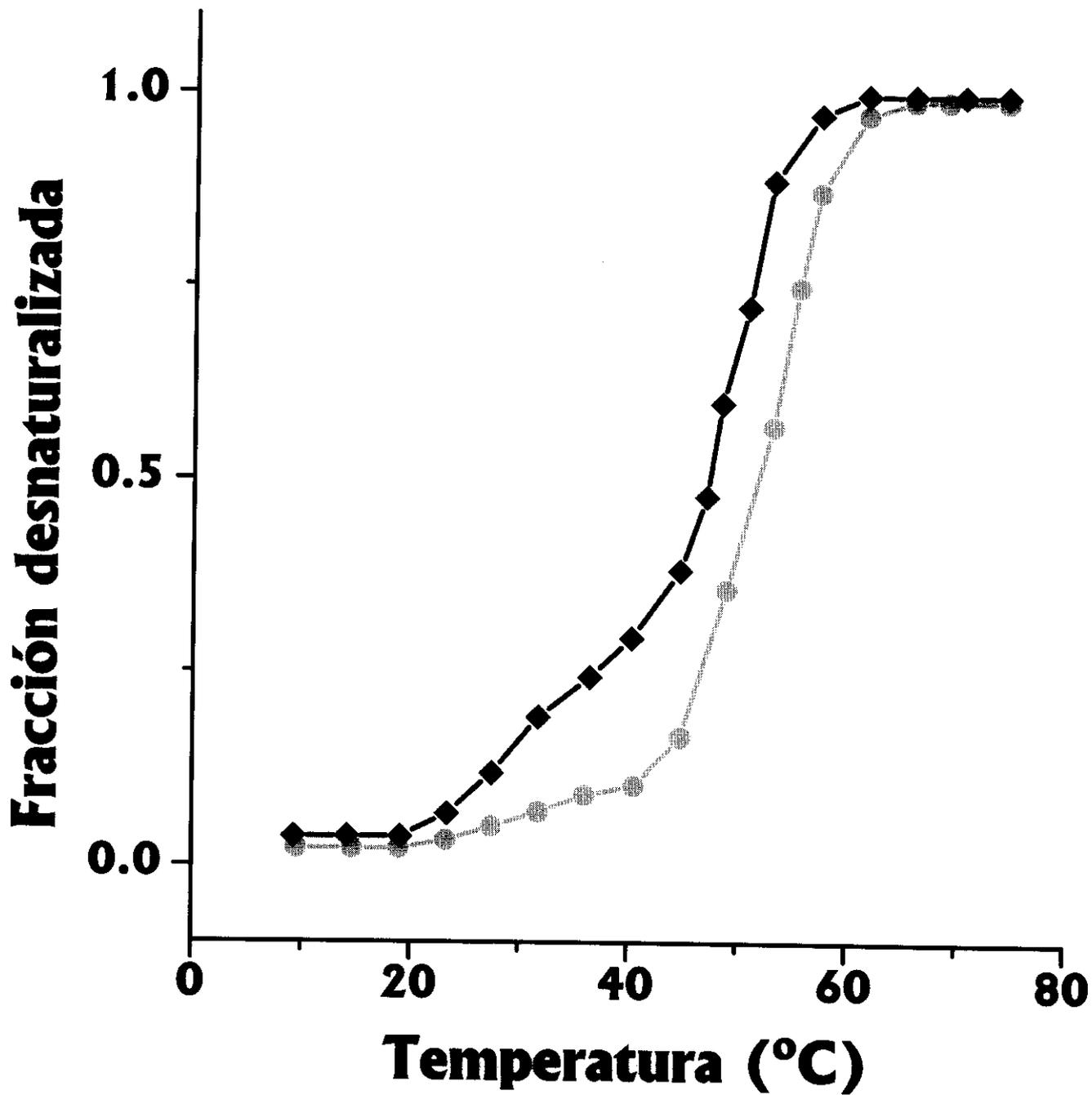


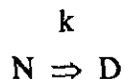
Fig. 15. Fracción de la proteína desnaturalizada en función de la temperatura, medida por la variación de la elipticidad a 220 nm. Proteinasa Ω en regulador de glicina 0.02 M a pH 2.55 (\blacklozenge - \blacklozenge - \blacklozenge - \blacklozenge - \blacklozenge) y pH 2.9 (\bullet - \bullet - \bullet - \bullet - \bullet).

Los valores de T_m obtenidos por calorimetría y los valores de $T_{0.5}$ (temperatura a la cual la fracción de proteína desnaturalizada corresponde al 50%) obtenidos por dicroísmo circular, presentan una diferencia significativa que se atribuyó a la desnaturalización irreversible de las proteasas papaína y quimopapaína. Lo anterior, nos condujo a la realización de nuevos experimentos por DC, en los cuales se varió la velocidad de calentamiento.

4.10 Cambios de elipticidad en función de la velocidad de calentamiento.

Hay varios mecanismos responsables de la desnaturalización irreversible de las proteínas. Han estado clasificados dentro de a) procesos covalentes, tal como: Hidrólisis de enlace peptídico adyacente a un residuo de ácido aspártico, destrucción de puentes disulfuro y desaminación de residuos de asparagina y glutamina y b) procesos conformacionales como: agregación de proteína y doblado incorrecto de estructuras [90].

En algunos casos, el proceso de desnaturalización irreversible se apega a un modelo de una sola etapa en el cual la proteína nativa, N, se convierte directamente en la especie irreversiblemente desnaturalizada, D.



Cuando se observa este comportamiento, la única información accesible experimentalmente es la entalpía de desnaturalización y el cambio en capacidad calorífica [90]. Sin embargo, se ha demostrado que varias proteínas pueden seguir un mecanismo más complejo que involucra la existencia de estados intermediarios en equilibrio, previamente a que ocurra la etapa irreversible [90]:



De acuerdo a este modelo, si los equilibrios se establecen rápidamente, la población de moléculas en el estado D dependerá de la etapa limitante controlada por la constante de velocidad k y, por lo tanto, del tiempo transcurrido en llevar la muestra a una cierta temperatura. Esto es, las curvas de desnaturalización serán función de la velocidad de calentamiento empleada. Teóricamente, a una velocidad de calentamiento infinita las curvas de desnaturalización deberían representar la situación de equilibrio termodinámico, sin contribución alguna de la etapa irreversible. En estas condiciones sería posible obtener los parámetros termodinámicos (ΔH y T_m) correspondientes al desdoblamiento reversible de la proteína [90]. Por lo tanto, sería de esperarse que los valores de los parámetros que caracterizan a una transición irreversible tendieran a un valor límite a medida que aumenta la velocidad de calentamiento.

En esta parte del trabajo, presentamos los resultados de estudios de desnaturalización de papaína y quimopapaína a diferentes velocidades de calentamiento. Estos estudios se hicieron a un pH de 2.5, midiendo de manera continua el cambio de elipticidad a 220 nm. Los datos experimentales se transformaron para obtener curvas de f_D contra temperatura, según se ilustra en las figuras 16 y 17. Como puede observarse, existe una marcada dependencia de las curvas con la velocidad de calentamiento. En particular, $T_{0.5}$ aumenta con la velocidad de calentamiento, tendiendo asintóticamente a un valor límite (Figs. 18 y 19). Estos resultados sugieren que existe una o más especies en equilibrio con la proteína nativa, y que la irreversibilidad puede ser atribuida a un proceso que ocurre después de la transición de desdoblamiento de estas macromoléculas.

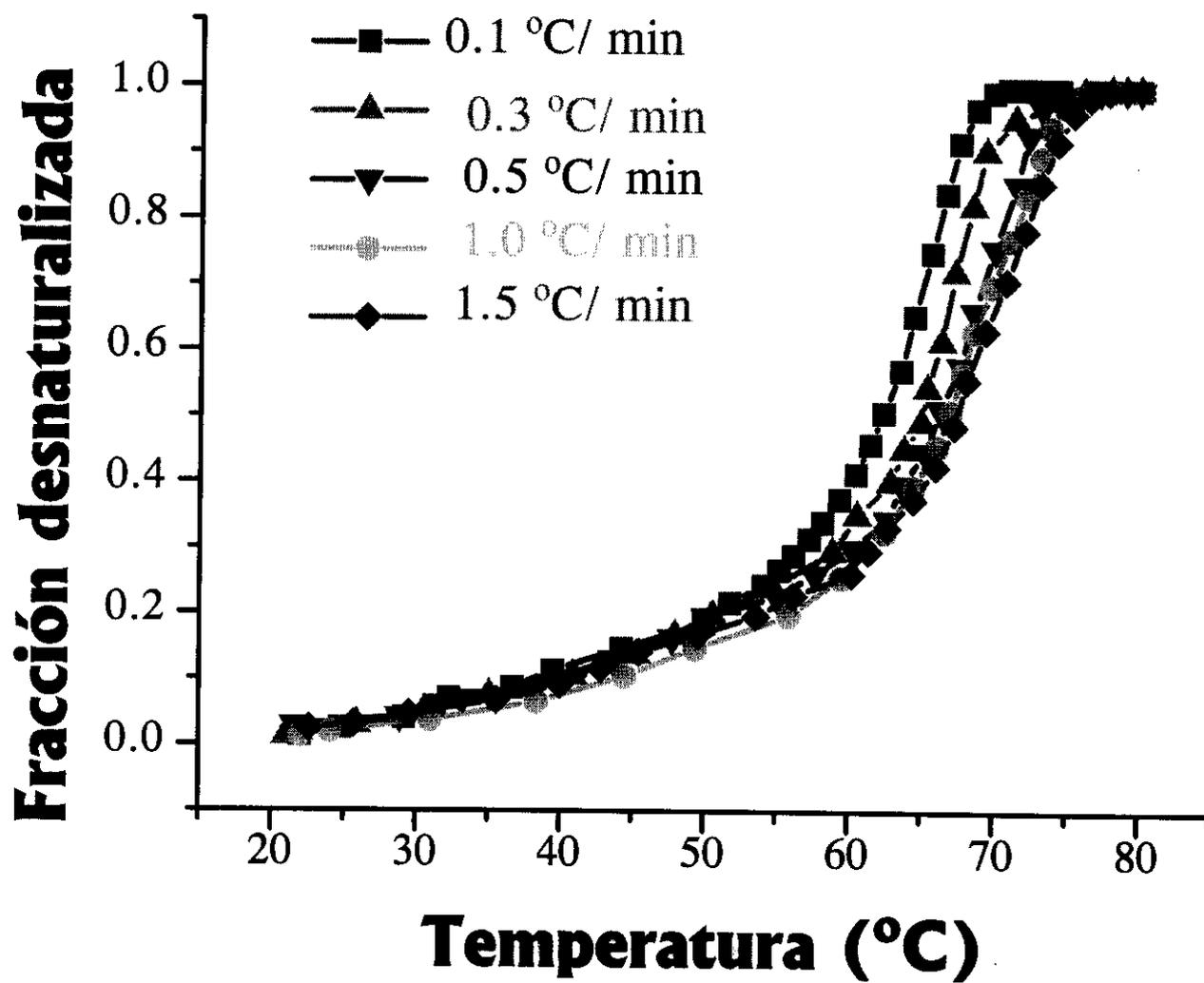


Fig. 16. Fracción de la proteína desnaturalizada en función de la temperatura, con una dependencia de la elipticidad a 220 nm. Quimopapaína en regulador de glicina 0.02 M y pH 2.5, a diferentes velocidades de calentamiento.

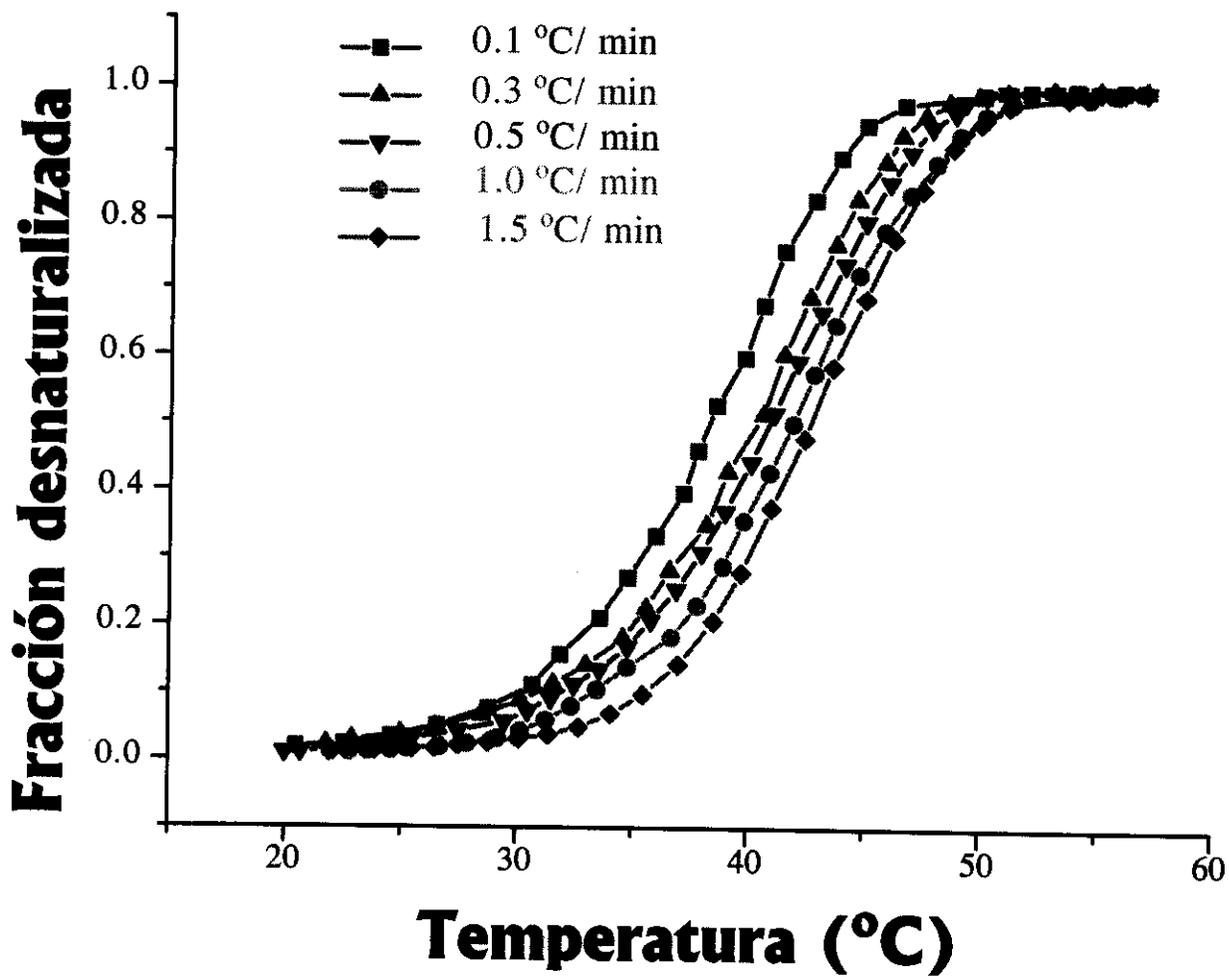


Fig. 17. Fracción de la proteína desnaturalizada en función de la temperatura, con una dependencia de la elipticidad a 220 nm. Papaína en regulador de glicina 0.02 M y pH 2.5, a diferentes velocidades de calentamiento.

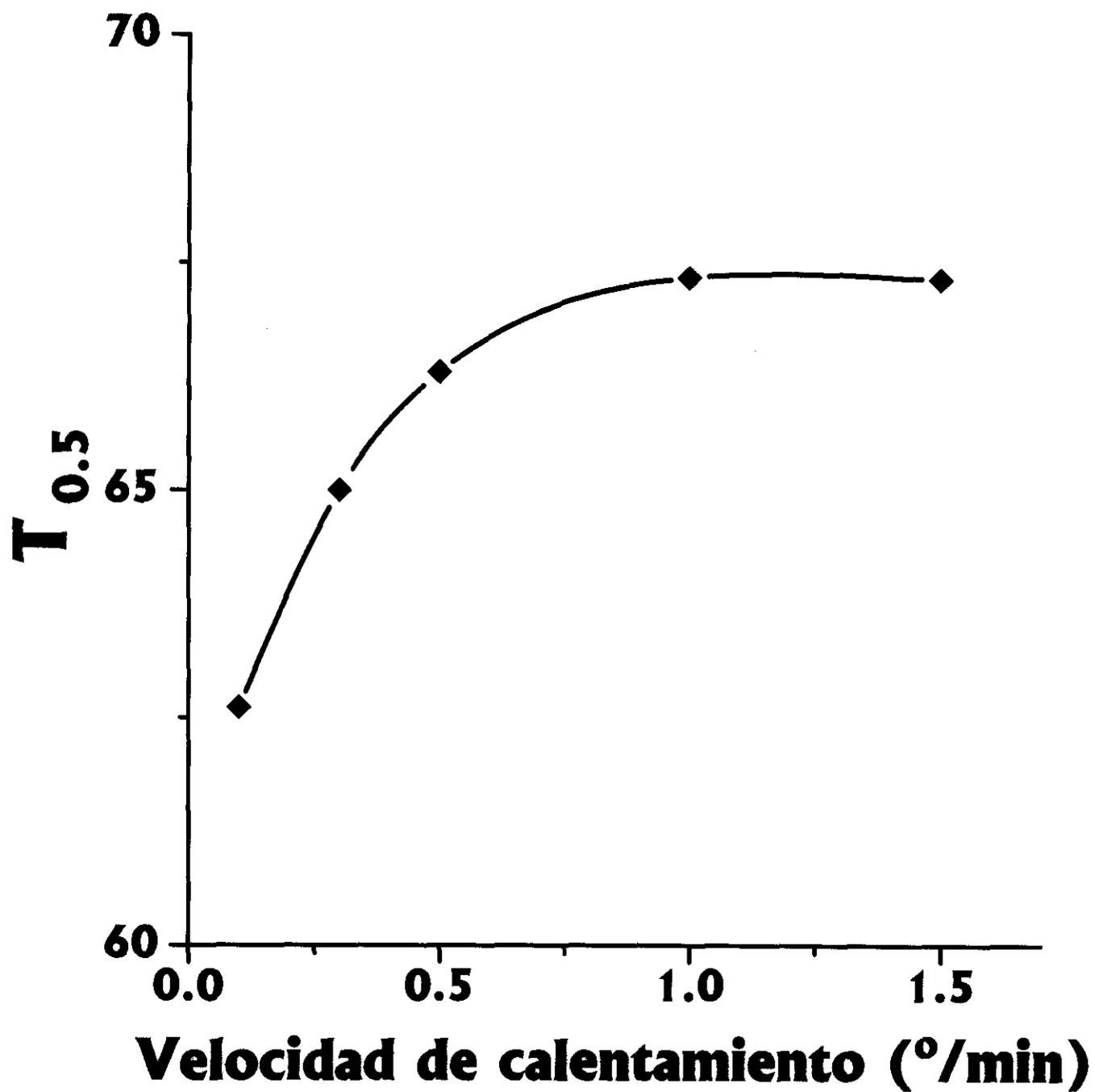


Fig. 18. Gráfica de $T_{0.5}$ en función de la velocidad de calentamiento, de muestras de quimopapaína a pH 2.5.

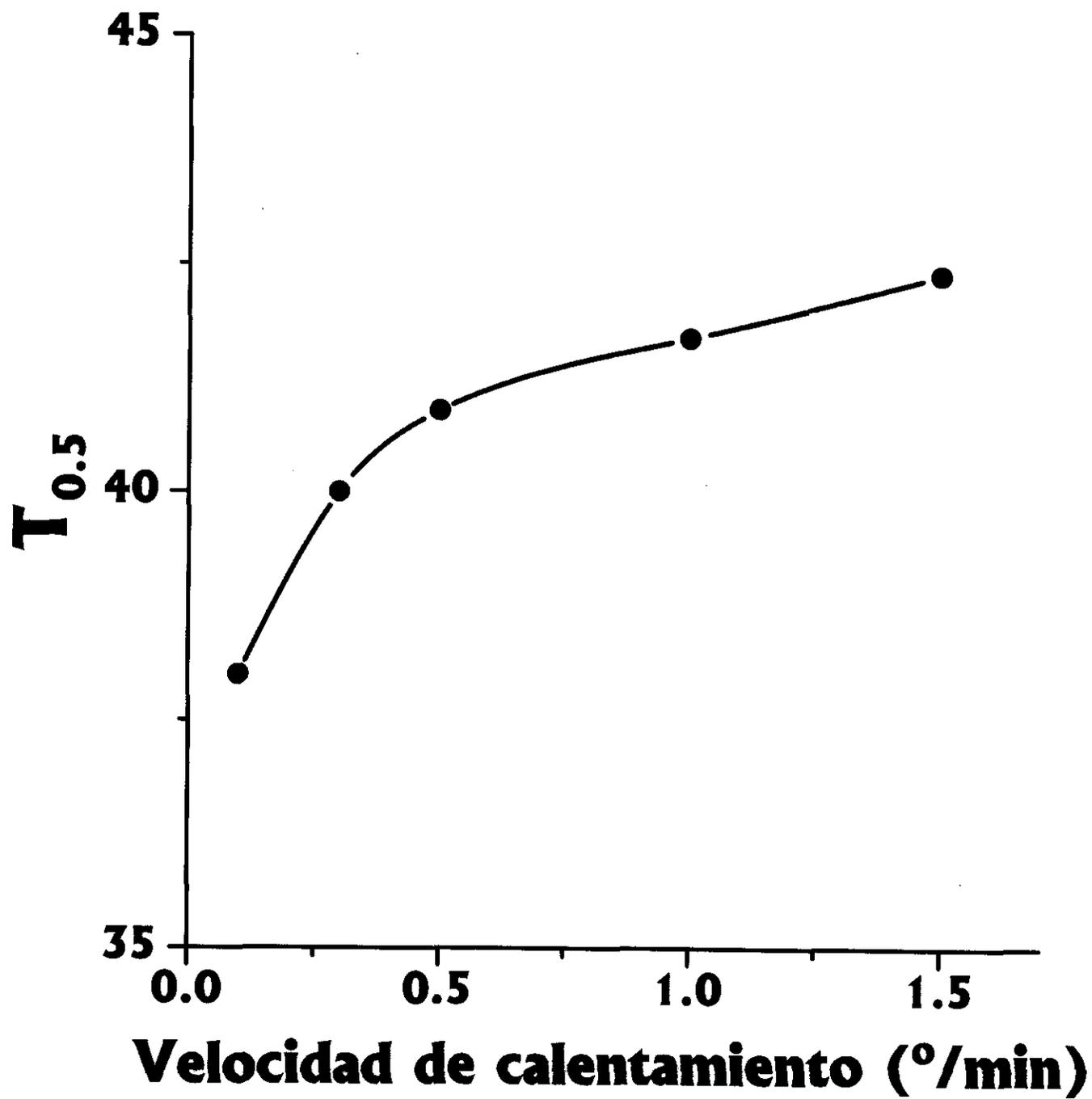


Fig. 19. Gráfica de $T_{0.5}$ en función de la velocidad de calentamiento, de muestras de papáina a pH 2.5.

CONCLUSIONES.

La confirmación de la similitud estructural entre las proteinasas de papaya, deberá esperar a la determinación de la estructura tridimensional de la quimopapaína por medio de difracción de rayos X. Mientras tanto, en este trabajo se comparan las características estructurales de estas enzimas en solución por medio de Dicroísmo circular (DC). Aunque los espectros de DC han sido reportados previamente [19,81,83], decidimos determinarlas otra vez, para asegurar que las tres proteinasas fueran estudiadas bajo las mismas condiciones. Los resultados de los análisis de las curvas de DC sugieren, inesperadamente, que la estructura molecular de la quimopapaína difiere de las otras dos proteinasas estudiadas en este trabajo, a pesar de la gran homología que existe en las secuencias de aminoácidos (58%).

Además, en este trabajo estudiamos la desnaturalización térmica de la quimopapaína y la papaína por calorimetría diferencial de barrido (DSC). Las curvas calorimétricas muestran que la desnaturalización de la quimopapaína es más cooperativa que la papaína, sugiriendo que las interacciones presentes en la zona interdominio son mas fuertes en aquella proteína. Se analizaron las curvas calorimétricas de ambas enzimas, considerando un modelo que incluye explícitamente las interacciones entre dos dominios. Estas proteinasas presentan diferentes cambios de capacidad calorífica en su desnaturalización, indicando que las interacciones hidrofóbicas varían de una molécula a otra. Entonces, es posible que las distintas propiedades termodinámicas reportadas aquí puedan ser la razón de algunas diferencias en el patrón de doblado de las dos proteinasas.

También, se estudió la desnaturalización térmica de las proteinasas cisteínicas quimopapaína y papaína, por medio de la técnica de dicroísmo circular, a diferentes velocidades de calentamiento, con el objeto de profundizar en el conocimiento de la irreversibilidad que caracteriza su desnaturalización térmica. Al parecer, el comportamiento de la T_m con la velocidad de calentamiento parece indicar que la etapa irreversible del proceso de desnaturalización ocurre a temperaturas mayores que las correspondientes a la transición de desdoblamiento. Lo anterior justifica de cierta manera, el análisis de las curvas calorimétricas bajo el formalismo de la termodinámica para sistemas en equilibrio.

Sin embargo, es evidente que se necesitan más estudios al respecto, que nos permitan conocer la causa de la irreversibilidad en este fenómeno.

REFERENCIAS.

1. Ransberger, K. y Solorzano, H. (1991) Enzimoterapia, Asociación Médica Int. de Inv. enzimáticas.
2. Badui, S. (1984) Química de los alimentos, Ed. Alhambra, S.A., España.
3. Ghélis, C. y Yon, J. (1982) "Protein Folding". Academic Press, N.Y. USA.
4. Tanford, C. (1968) Adv. Protein Chem. **23**, 121-282.
5. Privalov, P.L. (1979) Protein Chemistry, **33**, 167-241.
6. Epstein, C.J. y Coldberger, R.F. (1963) J. Biol. Chem. **238**, 1380.
7. Kim, P.S. y Baldwin, R.L. (1982) Annu. Rev. Biochem. **51**, 459-489.
8. Privalov, P.L. y Kechinashvili, N.N. (1974) J. Mol. Biol. **86**, 665-684.
9. Sturtevant, J.M. (1987) Annu. Rev. Phys. Chem. **38**, 463-488.
10. Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry, part III, pp. 1075-1088, W.H. Freeman, New York.
11. Brandts, J.F., Hu, C.Q., Lin, L.N. y Más, M.T. (1989) Biochemistry **28**, 8588-8596.
12. Murphy, K.P. y Freire, E. (1992) Adv. Protein Chem. **43**, 313-361.

13. Baker E.N. y Drenth, J. (1987) in *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. y MacPherson, A., eds.), vol. 3, pp. 313-368, John Wiley and Sons, N. Y.
14. Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B.A. y Drenth, J. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 233-257.
15. Glazer, A.N. y Smith, E.L. (1971) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) Vol. 3, pp. 502-545, Academic Press, New York.
16. Brocklehurst, K., Baines, B.S. y Kierstan, M.P.J. (1981) *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **5**, 262-335.
17. Robinson, G.W. (1975) *Biochemistry* **14**, 3695-3700.
18. Goodenough, P.W. y Owen, J. (1987) *Phytochemistry* **26**, 75-79.
19. Solís-Mendiola, S., Zubillaga-Luna, R., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (1989) *Biochem. J.* **257**, 183-186.
20. McDowall, M.A. (1970). *Eur. J. Biochem.* **14**, 214-221.
21. Carne, A. y Moore, C.H. (1978). *Biochem. J.* **173**, 73-83.
22. Kortt, A.A., Hinds, J.A. y Zerner, B. (1974). *Biochemistry* **13**, 2023-2028.
23. Sugiura, M. y Sasaki, M. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **350**, 38-47.
24. López, I., Enríquez, P., Rojo, A., García, E. y Hernández, A. (1993) *XXIX Congreso Mexicano de Química Pura y Aplicada Vol. 37 No. 6, 4.*

25. Takahashi, N., Yasuda, Y., Goto, K., Miyake, T. y Murachi, T. (1973). *J. Biochem.* **74**, 355-373.
26. Ritonja, A., Rowan, A.D., Buttle, D., Rawlings, N.D., Turk, V. y Barrett, A.J. (1989) Feb. vol. 247, núm. 2, 419-424.
27. Yamada, F., Takahashi, N. y Murachi, T. (1976). *J. Biochem.* **79**, 1223-1234.
28. Rowan, A.D., Buttle, D.J. y Barrett, A.J. (1990) *Biochem. J.* **266**, 869-875.
29. Brockbank, W.J. y Lynn, K.R. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **578**, 13-22.
30. Lynn, K.R., Brockbank, W.J. y Clevette, N.A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **612**, 119-125.
31. Tablero, M., Arreguín, R., Arreguín, B., Soriano, M., Sánchez, R.I., Rodríguez-Romero, A. y Hernández-Arana, A. (1991) *Plant Science*, **74**, 7-15.
32. Abraham, K.I. y Joshi, P.N. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **568**, 120-126.
33. Pal, G.P. y Sinha, N.K. (1980). *Arch. Biochem. Biophys.* **202**, 321-329.
34. Baker, E.N. (1980) *J. Mol. Biol.* **141**, 441-484.
35. Pickersgill, R.W., Rizkallah, P., Harris, G.W. y Goodenough, P.W. (1991) *Acta Cryst.* **B47**, 766-771.
36. Lynn, K.R. y Yaguchi, M. (1983) *Phytochemistry* **22**, 2485-2487.

37. Dalling, M.J. (1986) CRC Press, Vol. 1, 475-530.
38. Lynn, K.R., Yaguchi, M. y Roy, C. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **624**, 579-580.
39. Kramer, D.E. y Whitaker, J.R. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2178-2183.
40. Jones, K. y Glazer, A.N. (1979) *J. Biol. Chem.*, **245**, 2765-2772.
41. Jaffé, W.C. (1943) *Rev. Bras. Biol.*, **3**, 149-153.
42. Tiktopulo, E.I. y Privalov, P.L. (1978) *Febs Letters* **91**, núm. 1, 57-58.
43. Hernández-Arana, A. y Soriano-García, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 170-175.
44. Baker, E.N. y Dodson, E.J. (1980) *Acta Cryst.* **A36**, 559-572.
45. Jacquet, A., Kleinschmidt, T., Schnek, A.G., Looze, I. y Braunitzer, G. (1989) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 425-434.
46. Javid, M.J., Nordby, E.J., Ford, L.T., Hejna, W.J., Whisler, W.W., Burton, C., Millett, D.K., Wiltse, L.L., Widell, E.H., Boyd, R.J., Newton, St. E. y Thisted, R. (1983) *Am. Med. Assoc.* **249**, 2489.
47. Mendel, L.B. y Blood, A.F. (1910) *J. Biol. Chem.* **8**, 177-213.
48. Cayle, T., Saletan, L.T. y Lopez Ramos, B. (1964) *Wallerstein Lab. Commun.* **27**, 87-96.

49. Wurtz, A. y Bochet, E. (1879) C.R. Hebd Seances Acad. Sci. Paris **89**, 425-430.
50. Vines, S.H. (1905) Ann. Bot. **19**, 149-162.
51. Vines, S.H. (1909) Ann. Bot. **23**, 1-18.
52. Balls, A.K., Lineweaver, H. y Thompson, R.R. (1937) Science **86**, 379.
53. Jansen, E.F. y Balls, A.K. (1941) J. Biol. Chem. **127**, 459-460.
54. Kunitz, M. y Northrop, J.H. (1934-1935) J. Gen. Physiol. **18**, 433-458.
55. Brocklehurst, K. y Salih, E. (1983) Biochem. J. **213**, 559-560.
56. Polgár, L. (1984) Biochem. J. **221**, 555-556.
57. Khan, I.U. y Polgár, L. (1983) Biochim. Biophys. Acta **760**, 350-356.
58. Brocklehurst, K., Baines, B.S., Salih, E. y Hatzoulis, C. (1984). Biochem. J. **221**, 553-554.
59. Brocklehurst, K., Salih, E., McKee, R. y Smith, H. (1985) Biochem. J. **228**, 525-527.
60. Barrett, A.J. y Buttle, D.J. (1985) Biochem. J. **228**, 527.
61. Calam, D.H., Davidson, J. y Harris, R. (1985) J. Chromatogr. **336**, 103-111.
62. Korodi, I., Asboth, B. y Polgár, L. (1986) Biochemistry **25**, 6895-6900.

63. Dubois, T., Jacquet, A., Schnek, A.G. y Looze, Y. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 733-740.
64. Buttle, D.J. y Barrett, A.J. (1984) *Biochem. J.* **223**, 81-88.
65. Schack, P. (1967) *C.R. Trav. Lab. Carlsberg* **36**, 67-83.
66. Polgár, L. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 262-269.
67. Baines, B.S. y Brocklehurst, K. (1982) *J. Prot. Chem.* **1**, 119-139.
68. Kaarsholm, N.C. y Schack, P. (1983) *Acta Chem. Scand.* **B37**, 607-611.
69. Baines, B.S. y Brocklehurst, K. (1982). *Biochem. J.* **205**, 205-211.
70. Kamphuis, I.G., Drenth, J. y Baker, E.N. (1985) *J. Mol. Biol.* **182**, 317-329.
71. Padilla, J. (1993) Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. de Química.
72. Pickersgill, R.W., Harris, G.W. y Garman, E. (1992) *Acta Cryst.* **B48**, 59-67.
73. Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R. y Wolthers, B. (1971) *Adv. Protein Chem.* **25**, 79-115.
74. Kunimitsu, D.K. y Yasunobu, K.T. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* **139**, 405.
75. Lumry, R., Biltonen, R. y Brandts, J.F. (1966) *Biopolymers* **4**, 917.

76. Weber, K. y Osborn, M. (1975) in *The Proteins* (Neurath, H. y Hill, R.L., eds.), Vol. 1, pp. 200-201, Academic Press, New York.
77. Andrew, P. (1964) *Biochem. J.* **91**, 222-233.
78. Fish, W.W., Mann, K.G. y Tanford, C. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4989-4994.
79. Rojo-Domínguez, A., Solís-Mendiola, S., Zubillaga-Luna, R. y Hernández-Arana, A. (1990) *Rev. Latinoamer. Quím.* **21/2**, 48-51.
80. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C. (1982) *Anal. Biochem.* **125**, 177-188.
81. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C. (1981) *Biochemistry* **20**, 1085-1094.
82. Ramsay, G. y Freire, E. (1990) *Biochemistry* **29**, 8677-8683.
83. Su, Y.Y.T. y Jirgenson, B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 137-146.
84. Dubois, T., Kleinschmidt, T., Schnek, A.G., Looze, Y. y Braunitzer, G. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **369**, 741-754.
85. Manavalan, P. y Johnson, W.C. (1983) *Nature* **305**, 831-832.
86. Levitt, M. y Chothia, C. (1976) *Nature* **261**, 552-558.
87. Compton, L.A. y Johnson, W.C. (1986) *Anal. Biochem.* **155**, 155-167.
88. Strickland, E.H. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem.* **2**, 113-175.

89. Strickland, E.H., Horwitz, J. y Billups, C. (1969) *Biochemistry* **8**, 3205-3213.
90. Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L. y Sanchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **19**, 159-188.
91. Privalov, P.L. y Gill, S.J. (1988) *Adv. Protein Chem.* **39**, 191-234.
92. Bevington, P.R. (1969) *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, pp. 204-246, McGraw-Hill, New York.
93. Privalov, P.L. (1982) *Adv. Protein Chem.* **35**, 1-104.
94. Murphy, K.P., Bhakuni, V., Xie, D. y Freire, E. (1992) *J. Mol. Biol.* **227**, 293-306.
95. Murphy, K.P., Privalov, P.L. y Gill, S.J. (1990) *Science* **247**, 559-561.
96. Spolar, R.S., Livingstone, J.R. y Record, M.T., Jr. (1992) *Biochemistry* **31**, 3947-395.