



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA**

***DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA***

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ÁREA DE BIOFISICOQUÍMICA**

# **Mecanismo molecular de la desnaturalización ácida de papaína**

TESIS QUE PRESENTA LA

**Q. ROSA ERÉNDIRA FOSADO QUIROZ**

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS

**ASESOR  
DR. ARTURO ROJO DOMÍNGUEZ**

Mayo 2011

---

## CONTENIDO

Agradecimientos	I
Resumen	II
Índice general	III
Abreviaturas	V
Índice de figuras	VI
Índice de tablas	VIII

---

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Metropolitana, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (123806), a ambas instituciones el reconocimiento.

A los profesores del Departamento de Química y en especial a los que integran el Área de Biofísicoquímica, les agradezco por cada enseñanza y espacio brindado.

Al Dr. Arturo Rojo Domínguez, asesor de tesis y amigo. Gracias por tu comprensión, por las largas charlas, caminatas y risas compartidas, en las coincidencias tan extrañas de la vida.

Un sincero agradecimiento a mis amigos y compañeros de laboratorio, por los gratos momentos compartidos, por las palabras de aliento y su apoyo.

A mi querida madre, con todo el amor, admiración y respeto. Mujer admirable por su fortaleza y Valentía para enfrentar las grandes adversidades. Mil gracias.

A mi padre, hermanos y sobrinos, con todo cariño.

A ti Adolfo por estar siempre mi lado.

*Señor, gracias por cada momento.*

---

## RESUMEN

Los cambios estructurales en la papaína provocados por un medio ácido fueron estudiados, al igual que en sus variantes S-carboximetil papaína y S-carbamoil papaína, especies con modificaciones sobre el residuo de Cys<sup>25</sup>. Espectros y curvas de desnaturalización ácida en función del tiempo obtenidas por dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca y fluorescencia de ANS de las tres especies muestran disimilitud en el proceso de desplegamiento ácido, al parecer la modificación sobre uno de los residuos del sitio activo afecta su estabilidad de manera diferente. La causa de este comportamiento podría radicar en la carga del derivatizante y su interacción con el momento dipolar de la hélice- $\alpha$  que contiene a la Cys<sup>25</sup> (residuo de aminoácido encargado de la actividad). En las tres especies, la fluorescencia de ANS a 484 nm ha indicado la existencia de un estado intermediario ácido: A, (N $\rightarrow$ A $\rightarrow$ D). Por otra parte, la naturaleza bifásica de las cinéticas seguidas por dicroísmo circular y fluorescencia sugieren la existencia de otro estado intermediario: I, este estado intermediario es cinético y se localiza en el proceso de desplegamiento N $\rightarrow$ A. Lo cual nos indica, que la desnaturalización ácida de la papaína seguiría un proceso de desplegamiento de más de dos estados al pasar de su estado nativo al estado desnaturalizado (N $\rightarrow$ I $\rightarrow$ A $\rightarrow$ D).

## ÍNDICE GENERAL

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Proteasas .....	1
1.2. Estructura y función de las proteasas sulfhidríticas .....	2
1.3. Papaína.....	5
1.4. Efecto del pH sobre la estabilidad estructural en las proteasas sulfhidríticas .....	8
1.5. Irreversibilidad del proceso de desplegamiento .....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>12</b>
2.1. Objetivo general .....	12
2.2. Objetivos particulares.....	12
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
3.1. Materiales.....	13
3.2. Modificación de la papaína.....	13
3.3. Ensayos de actividad enzimática .....	15
3.3.1. $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA).....	15
3.3.2. Reactivo de Ellman: ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) .....	16
3.3.3. Hidrocloruro de N-CBZ-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (HAMC).....	17
3.4. Electroforesis .....	17
3.5. Técnicas espectroscópicas.....	18
3.5.1. Preparación de la muestra.....	18
3.5.2. Dicroísmo circular.....	19
3.5.3. Fluorescencia .....	20
3.6. Modelado molecular.....	22

<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1. Obtención de las especies modificadas químicamente:</b>	
<b>S-carbamoilmetil papaína y S-carboximetil papaína .....</b>	<b>23</b>
<b>4.2. Estructura nativa .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3. Efecto del pH sobre la estabilidad estructural de la papaína .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4. Evidencia, permanencia y localización del estado A.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5. Irreversibilidad del estado A .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6. Curvas de desnaturalización térmica en función del tiempo a pH 2 .....</b>	<b>42</b>
<b>4.7. Simulación de poblaciones .....</b>	<b>49</b>
<b>4.8. Irreversibilidad del estado I.....</b>	<b>52</b>
<b>4.9. Estudios para dilucidar las diferencias conformacionales entre N, A e I.....</b>	<b>54</b>
<b>4.10. Estudios para eliminar fenómenos causados por</b>	
<b>factores externos a la inhibición. ....</b>	<b>55</b>
<b>Fotooxidación.....</b>	<b>55</b>
<b>Agregación.....</b>	<b>57</b>
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>62</b>
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>67</b>
<b>7. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>69</b>
<b>9. ARTÍCULO .....</b>	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

A	Estado A
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalensulfónico
BAPNA	$\alpha$ -N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilina (BAPNA)
BNA <sup>-</sup>	2-nitro-5-tiobenzoato
Fans	Fluorescencias de ANS
Fi	Fluorescencia intrínseca
CBP	S-carbamoilmetil papaína
CXP	S-carboximetil papaína
D	Estado desnaturalizado
DC	Dicroísmo circular
DM	Dinámica molecular
DTNB	Ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
HAMC	Hidrocloreuro de N-CBZ-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina
I	Estado I
k <sub>1</sub>	Constante de velocidad del proceso N → I
k <sub>2</sub>	Constante de velocidad del proceso I → A
MD	Modelado molecular
MOE	Molecular Operating Environment
N	Estructura nativa
PAP	Papaína sin modificar
SDS	Dodecilsulfato de sodio

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Estructura cristalográfica de la papaína.	4
2	Espectros de dicroísmo circular del UV lejano de las diferentes conformaciones de papaína sin modificar obtenidos en forma experimental y utilizando programas de predicción de estructura.	26
3	Espectros de fluorescencia intrínseca de la CXP a diferentes valores de pH ácido.	30
4	Fluorescencia intrínseca de las diferentes especies de papaína (CXP, CBP y PAP) a diferentes valores de pH.	31
5	Espectros de fluorescencia de ANS de la CXP a diferentes valores de pH ácido.	32
6	Fluorescencia de ANS de las diferentes especies de papaína (CXP, CBP y PAP) a diferentes valores de pH ácido.	33
7	Espectros de dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca y de ANS de los estados N y A.	34
8	Evolución en el tiempo de la intensidad de fluorescencia de la CXP a 484 nm, preparadas a diferentes valores de pH ácido.	37



<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
9	Espectros de fluorescencia de ANS de la CXP a diferentes valores de pH y después de la adición de NaOH.	40
10	Espectros de fluorescencia intrínseca de la CXP a diferentes valores de pH y después de la adición de NaOH.	41
11	Curvas de desplegamiento por pH ácido de la CXP en función del tiempo en un ajuste simultáneo de las señales de dicroísmo circular, fluorescencia de ANS e intrínseca.	46
12	Gráfico de Eyring para los datos experimentales obtenidos del ajuste simultáneo a través de los cuales se obtienen los parámetros cinéticos de CXP, CBP y PAP.	47
13	Gráfica de la simulación de poblaciones siguiendo un modelo $N \rightarrow I \rightarrow A$ .	51
14	Curva de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo de la CXP seguida por fluorescencia de ANS.	58
15	Curva de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo de la CXP en fluorescencia de ANS para exponer el fenómeno de fotooxidación y el ajuste.	59
16	Espectros de UV de la papaína sin modificar en estado desnaturalizado a diferentes concentraciones.	60
17	Modelo de papaína desnaturalizada con una molécula de ANS insertada.	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pág.</b>
1	Estructura primaria de la papaína.	7
2	Estimación de la estructura secundaria del estado nativo (N) e intermediarios (A e I) con el analizador k2d.	27
3	Constantes de velocidad para la CXP, CBP y PAP obtenidas por ajuste simultáneo a una doble exponencial.	45
4	Cambios de entalpía y entropía de activación a pH 2 para la CXP, CBP y PAP.	48
5	Actividad de la PAP medida en diferentes estados conformacionales.	53
6	Constantes de velocidad para la papaína sin modificar obtenidas a partir del ajuste individual a un modelo de doble exponencial.	61

---

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Proteasas

En las proteínas, la estructura nativa (N) es la responsable de la función y la estabilidad; su estructura está soportada por un complejo equilibrio entre las contribuciones entálpica y entrópica que producen el relieve energético de la energía libre. En el caso particular de las proteasas, su síntesis se realiza generalmente como zimógenos inactivos, para evitar una actividad proteolítica descontrolada durante su producción y almacenamiento [1]. Los zimógenos se convierten después en la enzima activa a través de la hidrólisis de una parte específica de su cadena polipeptídica [2-3].

Esta hidrólisis deja una molécula con capacidad proteolítica, a menudo en un estado metaestable, es decir, con una conformación termodinámicamente inestable mantenida por una barrera cinética cuya altura se conoce como la energía de activación de desplegamiento. El conocimiento sobre las bases moleculares de esta barrera permite, en principio, la ingeniería de la estructura con el fin de modificar su estabilidad cinética [4]; por un lado, para aumentar la vida útil de un producto que contenga este tipo de enzimas o aumentar su resistencia a las condiciones en procesos industriales; y por el otro, para encontrar las regiones sensibles a inhibidores específicos capaces de desnaturalizar o interferir con la estructura en un proyecto de diseño de fármacos [5]. Por éstas y otras razones, el conocimiento molecular de la cinética de plegamiento de las proteínas ha sido declarado como un gran desafío clásico en biofísica molecular [6].

La aplicación de técnicas espectroscópicas, como la fluorescencia y el dicroísmo circular, ha sido ampliamente utilizada para el estudio de de la metaestabilidad en proteínas de interés médico, nanotecnológico o biotecnológico en publicaciones recientes [7-9]. En estos estudios se han empleado cambios en el pH del medio

como agente desnaturalizante [10-12], así como el uso de simulaciones por computadora, o la combinación de resultados experimentales y computacionales para entender el proceso molecular a detalle [13-15]. En este trabajo hemos estudiado la papaína, el arquetipo [16-17] de la familia de las proteasas que se considera la más abundante de las proteasas cisteínicas [18], también llamada familia C1 del clan CA [19]. Este tipo de proteasa ha sido implicado en una amplia variedad de enfermedades humanas [3] y por lo tanto, como posibles blancos en el diseño de inhibidores específicos [20]. Durante el desarrollo de este trabajo, se utilizaron herramientas espectroscópicas, bioquímicas y computacionales para el estudio de la papaína con el propósito de entender su mecanismo molecular de desplegamiento ácido, así como para la caracterización de las propiedades moleculares de las especies intermediarias que participan en ese mecanismo.

## **1.2. Estructura y función de las proteasas sulfhidrúlicas**

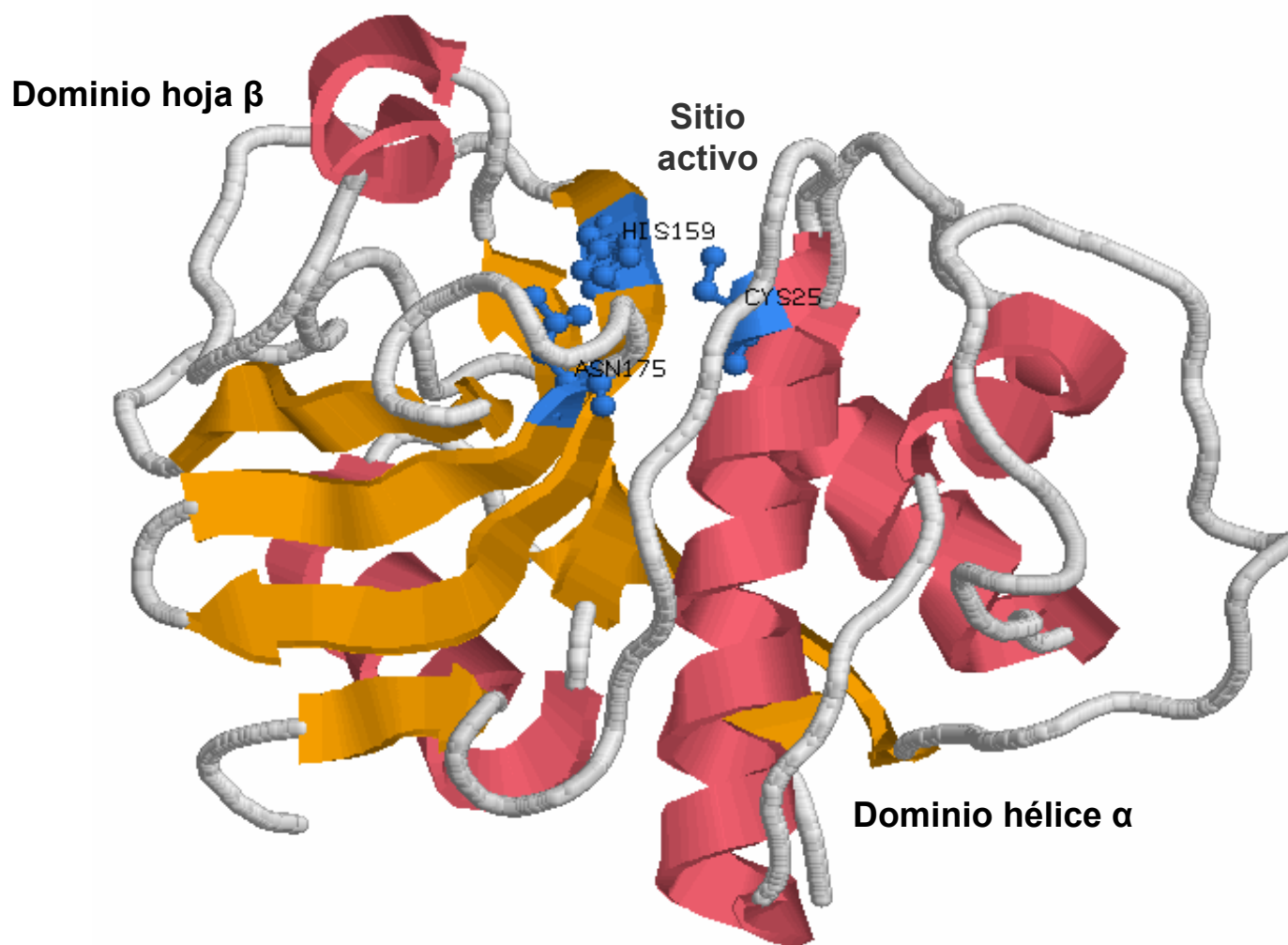
Las proteasas sulfhidrúlicas, también conocidas como proteasas cisteínicas o tiólicas, son enzimas cuya actividad proteolítica depende del grupo tiol de un residuo de cisteína en su sitio activo [21]. Estas enzimas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos vivos (animales, plantas y bacterias), y a pesar de provenir de sistemas biológicos tan diferentes, se ha observado que existe una gran similitud en su masa molar, secuencia de aminoácidos, estructura y función [21-24]. Sin embargo, una de las diferencias más notorias en estas enzimas es su punto isoelectrico, el cual puede ser básico o ácido [23-24].

Los estudios cristalográficos realizados sobre las proteasas sulfhidrúlicas muestran que estas enzimas poseen una estructura de tipo  $\alpha+\beta$ , organizada en dos dominios estructurales de tamaño semejante entre sí, en donde cada uno de ellos cuenta con un núcleo hidrofóbico propio. La interfase entre los dominios es

predominantemente polar, en ésta se localizan los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo: cisteína, histidina y asparagina [21, 25] (Figura 1).

Una de las características que hacen muy interesante al residuo de cisteína del sitio activo en el estado nativo (Cys<sup>25</sup> de acuerdo a la numeración en papaína), es el efecto que provoca el entorno sobre el valor de su pKa, pues se ha observado en varias proteasas cisteínicas una disminución drástica de este valor (de 4 a 6 unidades) en comparación con el valor de 8.2 cuando este residuo de aminoácido se encuentra libre. Esta diferencia en el pKa puede ser originada por dos factores de tipo electrostático: 1) por una interacción ocasionada por la presencia de un grupo imidazol adyacente al residuo de cisteína (lo cual permitiría la formación de un par iónico disminuye el valor de pKa de la cisteína e incrementa el de la histidina) y 2) por una interacción entre la cisteína y el dipolo de la hélice  $\alpha$  que la contiene [21]. Tal vez la segunda sea la razón de mayor peso para el cambio del pKa, pues esta hélice posee un enorme momento dipolar debido a su gran longitud ( $\approx 20$  residuos de aminoácido) y la cisteína se localiza justo en su extremo amino [21].

La gran magnitud del cambio de pKa de la cisteína hace pensar que existe una fuerte interacción entre este residuo y diferentes grupos de la proteína, y que es posible que su importancia trascienda la acción catalítica para cumplir además con un papel en la estabilidad intrínseca de la proteína, ya que se encuentra en la hendidura formada por los dos dominios estructurales, en contacto con aminoácidos de ambos. Una manifestación de este comportamiento es el hecho de que en el estado nativo de la papaína se ha reportado un valor de pKa de 4 para la Cys<sup>25</sup>, además de que se sabe que este residuo de aminoácido contiene el único grupo tiol en la molécula (todas las demás cisteínas se encuentran formando enlaces sulfuro) lo cual permite modificar de manera específica a este aminoácido.



**Figura 1.** Estructura cristalográfica de la papaína. Se observa a la derecha el dominio I predominantemente hélice  $\alpha$  y a la izquierda el dominio II hoja  $\beta$ , así como residuos de aminoácidos responsables de la actividad.

Diferentes miembros de la familia de las proteasas sulfhidrúlicas han sido utilizados en aplicaciones industriales y terapéuticas [21, 23]. De entre estas enzimas, una de las más utilizadas es la papaína, por su gran abundancia y por la amplia gama de enlaces peptídicos que puede hidrolizar. Por lo tanto, los estudios realizados sobre esta proteína podrían ser importantes para sentar las bases del desarrollo de inhibidores específicos con alta afinidad en el campo de las aplicaciones farmacéuticas. En consecuencia, se podría regular la actividad enzimática de las proteasas sulfhidrúlicas involucradas en la metástasis tumoral y en el desarrollo de enfermedades degenerativas como artritis, resorción de hueso, osteoporosis y Alzheimer [26]. En la manufactura de biofármacos los estudios sobre estas proteasas podrían apoyar el desarrollo de enzimas capaces de replegarse sin la necesidad de un zimógeno, sólo con una modificación específica a la estructura del sitio activo, para crear nuevamente la forma activa de la enzima [27]. Un reporte reciente sobre una proteasa homóloga llamada criptopapaína demuestra esta posibilidad [28]. Por otra parte en el campo industrial resultaría de gran importancia incidir sobre el diseño de proteasas cisteínicas con estabilidad y especificidad alteradas, que toleraran tiempos prolongados de almacenamiento a través del control de su autólisis.

### 1.3. Papaína

La papaína es una enzima sulfhidrúlica que se extrae del látex de la papaya (*Carica papaya*). Uno de los primeros científicos en caracterizar a la papaína fue Balls [29] quien en 1937 la logró aislar y cristalizar, sin embargo el método más conocido y con mejores resultados es el de Kimmel y Smith [30]. Actualmente, esta enzima se encuentra disponible de manera comercial y usualmente se purifica mediante columnas de afinidad. Algunas de sus propiedades fisicoquímicas son: masa molecular de 23,350 Da, punto isoeléctrico de 8.75 y coeficiente de extinción molar de  $2.5 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  a 278 nm [31]. La actividad óptima de la papaína se encuentra en un intervalo amplio de pH, entre 5 y 7.5 [30].

Los trabajos pioneros de secuenciación de la papaína fueron realizados por Smith y colaboradores [30-34]. Sin embargo, no fue sino hasta 1968 cuando Drenth y cols. publicaron el primer estudio cristalográfico sobre esta proteína, en el que se dio a conocer la secuencia correcta de la cadena polipeptídica (estructura primaria) la cual consiste de 212 residuos de aminoácido (Tabla 1) [35]. Los aminoácidos N y C-terminal son isoleucina y asparagina, respectivamente.

La estructura tridimensional de la papaína ha sido determinada por cristalografía de rayos X a diferentes resoluciones [21, 25, 35-37]. Uno de sus dominios se caracteriza por tener estructura secundaria de tipo hélice  $\alpha$  (residuos 10 a 111 y 208 a 212), mientras que el otro dominio está formado por giros y hojas  $\beta$  (residuos 1 a 9 y 112 a 207) [37]. En su estado nativo, el interior de cada uno de sus dominios contiene cadenas de aminoácido predominantemente no polares, no obstante que en la interfase existen aminoácidos polares [21]. La conformación en dos dominios estructurales es una característica común en las proteasas cisteínicas; sin embargo, el número de aminoácidos no polares presentes en la interfase varía de manera considerable en cada uno de los miembros de esta familia [21]. También, cerca de la interfase se localizan los residuos de aminoácidos que conforman el sitio activo de esta macromolécula  $\text{Cis}^{25}$ ,  $\text{His}^{159}$  y  $\text{Asn}^{175}$  (Figura 1).



I P E Y V D W **R** Q **K** G A V T P V **K** N Q G S C G S C W <sup>13</sup> \* 26  
 A F S A V V T I E G I I **K** I **R** T G N L N Q Y S E Q E <sup>39</sup> 52  
 L L D C D **R** **R** S Y G C N G G Y P W S A L Q L V A Q Y <sup>65</sup> 78  
 G I **H** Y **R** N T P Y Y E G V Q **R** Y C R S **R** E **K** G P Y A <sup>91</sup> 104  
 A **K** T D G V **R** Q V Q P Y N Q G A L L Y S I A N Q P V <sup>117</sup> 130  
 S V V L Q A A G **K** D F Q L Y **R** G G I F V G P C G N **K** <sup>143</sup> 156  
 \* <sup>169</sup> \* 182  
 V D **H** A V A A V G Y N P G Y I L I **K** N S W G T G W G  
E N G Y I **R** I **K** **R** G T G N S Y G V C G L Y T S S F Y <sup>195</sup> 208  
 P V K N <sup>212</sup>

**Tabla 1.** Estructura primaria de papaína. En esta secuencia se muestran los residuos de aminoácido responsables de la actividad catalítica (\*), cargados positivamente (letra negra) y negativamente (letra roja subrayada) a pH 7. El contenido en papaína es de 23 cargas positivas que corresponden a 2 residuos de H, 10 de K y 11 de R, así como 13 cargas negativas que corresponden a 7 residuos de E y 6 de D, además de sus extremos N y C terminales.

#### **1.4. Efecto del pH sobre la estabilidad estructural en las proteasas sulfhidríticas**

Se conoce que a valores extremos de pH la estabilidad de las proteínas disminuye al establecerse interacciones electrostáticas desfavorables entre los grupos iónicos, las cuales causan la desnaturalización de la macromolécula [38]. La disminución de la estabilidad ha sido bien documentada experimentalmente para varias proteínas [39-42]. En particular este comportamiento se ha observado en la desnaturalización térmica de la caricaína y quimopapaína, encontrándose en ambas proteínas un fuerte efecto del pH sobre los parámetros termodinámicos de activación, ocasionado por el gran número de pares iónicos ocultos en sus estructuras [43-45].

#### **1.5. Irreversibilidad del proceso de desplegamiento**

El proceso de replegamiento no se ha observado de forma común en los miembros de esta familia, pues hasta este momento los estudios realizados indican un comportamiento irreversible en todas estas proteasas, salvo un único caso de desnaturalización ácida reportado por Edwin y Jagannadham [46]. Este comportamiento irreversible podría ser causado por un carácter metaestable del estado nativo de las proteasas cisteínicas [47]; se debe recordar que el estado nativo de la enzima es la forma madura, derivada del correspondiente zimógeno por el corte de una proregión de la molécula de aproximadamente 100 residuos. Existen indicios de que esta proregión podría ser parte esencial para el correcto plegamiento de la molécula [3, 47-48].

En algunas proteasas como la actinidina, caricaína y quimopapaína se ha demostrado esta irreversibilidad. En actinidina con curvas de transición térmica a pH 7 [49], caricaína y quimopapaína con estudios cinéticos en un amplio intervalo de valores de pH y temperaturas, ajustándose todas a un modelo irreversible de

---

dos estados (N  $\rightarrow$  D) [43-44]. Adicionalmente, las técnicas de calorimetría y dicroísmo circular (DC) han reportado que la desnaturalización térmica de la papaína no sigue un proceso de dos estados [50-51]. En estos estudios se demuestra la presencia de un estado intermediario estable alrededor de pH 2.6. Los espectros de DC y las curvas de desnaturalización térmica sugieren la formación de este estado intermediario como consecuencia del desplegamiento independiente de cada dominio, siendo el helicoidal el primero en desplegarse, lo cual implica que el segundo de la molécula dominio (formado por hojas  $\beta$ ) es más estable que el primero (Figura 1). La razón para esta alta estabilidad podría estar relacionada con la diferencia en el número de contactos hidrofóbicos de cada dominio [50-51].

Otros estudios de DC y fluorescencia realizados recientemente para la desnaturalización de la papaína en un intervalo de pH de 0.5 a 9.0, sugieren la necesidad de utilizar un modelo de tres estados para interpretar los resultados a pH 2 [52]. El estado intermediario localizado a este pH (llamado estado A) es capaz de replegarse adquiriendo nuevamente la conformación del estado nativo (N) cuando se restablece la neutralidad (pH 7). Este intermediario también se presenta al realizarse estudios de desnaturalización térmica, en donde se observó una curva bifásica a pH 2.6 [51]. En ambos casos, los espectros de DC en la región del UV lejano, mostraron una señal a 215 nm que sugiere la retención de la estructura secundaria de tipo hoja  $\beta$  en un intervalo de pH 2.6. Por otra parte, en los espectros de DC en la región del UV cercano se observa la pérdida casi total de las interacciones de la estructura terciaria, y en la fluorescencia del ácido 8-anilino-naftalen sulfónico (Fans) se presenta un máximo a pH 2 el cual decrece tanto con el aumento como con la disminución del pH. Todo lo anterior sugiere la existencia de A como una molécula compacta parecida a un glóbulo fundido. Al igual que Hernández y Soriano [51], Edwin y Jagannadham [46] sugieren un desplegamiento secuencial e independiente de cada dominio. Sin embargo, en este último artículo se debe considerar que los espectros reportados corresponden

a muestras incubadas por 30 minutos, por lo tanto no se puede decidir si la proteína ha llegado realmente a un equilibrio termodinámico y si el estado intermediario es un glóbulo fundido. Por lo tanto, antes de iniciar este proyecto es necesario caracterizar la estructura y estabilidad de A.

Con este objetivo y con la finalidad de confirmar la existencia y localización del intermediario ácido, iniciamos nuestros primeros estudios. Los resultados (capítulo 4) son parcialmente compatibles a los de Edwin-Jagannadham en Fans, pues aunque se demostró la existencia de un estado intermediario a pH 2, éste no se mantiene estable en el tiempo como para ser considerado un intermediario termodinámico. Además, observamos que el proceso de desplegamiento del estado N a la especie A no es reversible, como se había reportado [46]. A pesar de estos últimos resultados, el estudio de la especie A es muy importante, puesto que representa una posibilidad para entender mejor el proceso de desplegamiento desde una perspectiva estructural, así como la oportunidad para explicar las razones de la irreversibilidad presente en el proceso de plegamiento de esta cadena, información indispensable para modificar racionalmente la estructura para aplicaciones de todo tipo. Hasta este momento sólo se ha estudiado el proceso  $A \rightarrow D$  [52] y no se cuenta con información del proceso  $N \rightarrow A$ , pero con estudios cinéticos es posible caracterizar este proceso de desplegamiento, al determinar los parámetros de activación e interpretar energética y estructuralmente el desarrollo de los eventos que se presentan en este proceso. Así, sería finalmente posible describir de manera total el modelo de desplegamiento que sigue la papaína.

Los trabajos mencionados en el párrafo anterior [46, 51], en donde se describe la presencia de un intermediario en la molécula de papaína a pH ácido, van a ser de particular relevancia para el presente proyecto. Dado que los dominios que constituyen la estructura presentan notables diferencias en el número de residuos cargados o en el número de aminoácidos hidrofóbicos que los integran [21, 25],

sería de esperar que la estabilidad de estos dos dominios varíe con el pH de manera diferente o que se vea afectada por una modificación en el residuo de Cys<sup>25</sup>, pues debemos recordar que este residuo se localiza en una zona interdominio y que el valor de su pKa en el estado nativo está fuertemente afectado. Además, sabemos que la Cys<sup>25</sup> presenta el único sulfhidrilo libre en la papaína, en consecuencia es el único susceptible de ser modificado con reactivos específicos e irreversibles que se conocen y se usan ampliamente en el manejo de proteasas sulfhídricas y de grupos tiol en general. De este modo si se modificara de forma específica a la Cys<sup>25</sup>, podría alterarse la estabilidad de la proteína y ello se vería reflejado en los parámetros cinéticos del proceso de desplegamiento  $N \rightarrow A$ . La validez de esta hipótesis se determinará a través de estudios experimentales de los cambios de conformación de las especies modificadas de papaína.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Estudiar el mecanismo de desplegamiento de la papaína en medio ácido caracterizando las especies intermediarias que se presentan.

### **2.2. Objetivos particulares**

1. Demostrar la existencia del estado A para la papaína sin modificación y con modificación irreversible.
2. Verificar la reversibilidad del proceso  $N \leftrightarrow A$  en todos los casos anteriores.
3. Proponer un mecanismo cinético para el proceso N a A.
4. Obtener y comparar los parámetros cinéticos de activación de las diferentes especies.
6. Obtener información estructural sobre el estado A.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

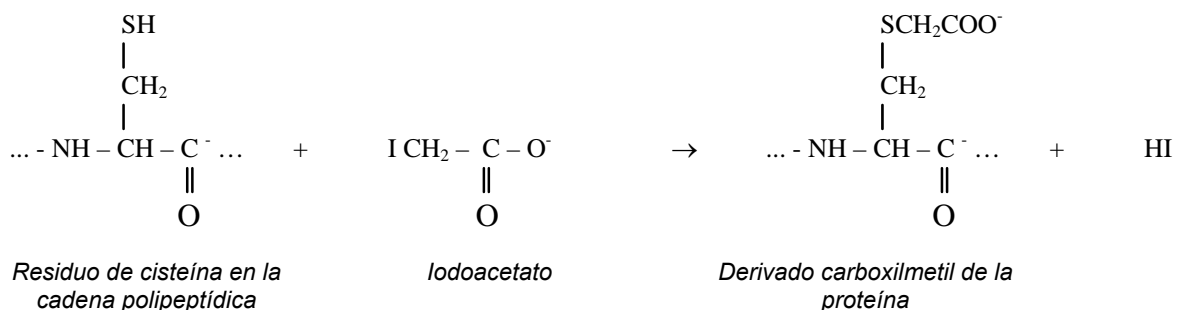
#### 3.1. Materiales

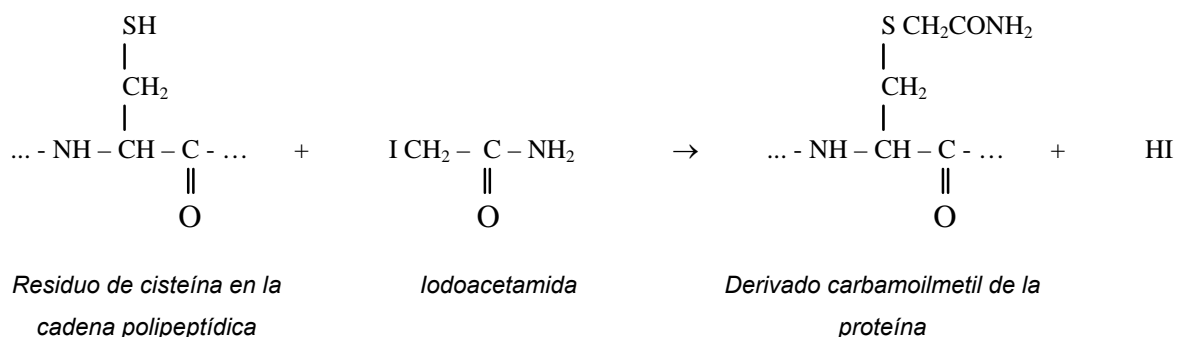
Se utilizó papaína dos veces cristalizada distribuida comercialmente por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 101H7090, 67H7020 y 17H70116. Los reactivos necesarios para la inhibición y manejo de la enzima fueron de grado analítico. Todos los materiales y equipos necesarios para este proyecto se localizan en el Área de Biofísicoquímica del Departamento de Química de la UAM-Iztapalapa.

#### 3.2. Modificación de la papaína

La modificación del residuo 25 de la papaína consistió de dos etapas: la reducción de la cisteína y su transformación mediante una carboximetilación con ácido iodoacético o iodoacetamida. Esta modificación altera un residuo catalítico por lo que el grado de transformación puede ser seguido por la pérdida de actividad de la enzima.

Los haloacetatos y sus derivados han sido extremadamente útiles para modificar de manera específica los residuos de cisteína. Estos reactivos reaccionan con el grupo  $-SH$  de la cisteína, mediante un mecanismo sustitución nucleofílica de orden dos ( $SN_2$ ) para producir los correspondientes derivados carboximetil y carbamoilmetil:





Las reacciones pueden ocurrir muy rápido cuando el halógeno involucrado es el yodo. Por ejemplo, la reacción de cisteína con iodoacetato es 2 veces más rápida que la reacción con bromoacetato y de 20 a 100 veces más rápida que con cloroacetato. En este trabajo es necesario que la modificación no altere significativamente la conformación de papaína, ya que es muy importante observar el efecto que puede tener el derivatizante ( $\alpha$ -haloácido o una  $\alpha$ -haloamida) sobre la estabilidad de las estructuras idénticas [53-54].

El protocolo de modificación propuesto es una combinación de los métodos de inhibición utilizados por Mitchel-Chaiken-Smith y Shapira-Arnon [55-56]. La papaína fue activada con un exceso molar de EDTA y L-cisteína de 500 y 100 veces, respectivamente. La solución resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la posible oxidación de la proteína. Una vez reducido el grupo tiol del sitio activo se inició el proceso de derivatización al adicionar un exceso molar de ácido iodoacético o iodoacetamida (dependiendo de la especie que se quiera formar) de 1000 veces, la mezcla resultante se agitó durante 30 minutos para permitir la carboximetilación o carbamoilmetilación. Una vez modificada la papaína se dializó con regulador de acetatos 30 mM pH 5. A continuación, se filtró la solución de proteína inhibida y se midió la concentración. En este protocolo los reactivos se prepararon con regulador de acetatos 30 mM y se ajustaron a pH 5 antes de utilizarse.



Durante las diferentes etapas se determinó la concentración de la papaína mediante la ley de Lambert-Beer:

$$Abs = \varepsilon \times C \times l \quad (1)$$

en donde *Abs* la lectura de la absorbencia (278 nm),  $\varepsilon$  el coeficiente absortividad en una celda de 1 cm ( $\varepsilon = 2.5 \text{ mg}^{-1} \text{ mL cm}^{-1}$ ) [31], *C* la concentración ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) y *l* la longitud de la celda (cm).

### 3.3. Ensayos de actividad enzimática

#### 3.3.1. $\alpha$ -N-benzoil-DL-arginil-p-nitroanilida (BAPNA)

Para corroborar el proceso de derivatización, se realizaron pruebas de actividad específica utilizando como sustrato BAPNA, el proceso mide la velocidad de transformación del reactivo en p-nitroanilina [57].

El BAPNA es un sustrato cromogénico que en sus inicios fue sintetizado para ser hidrolizado por la tripsina (1960), pero más tarde se encontró que la papaína lo hidrolizaba así como algunas esterasas. La hidrólisis de este sustrato produce un producto de color amarillo, por lo que el progreso de esta reacción puede ser seguido en un espectrofotómetro para medir la velocidad de formación de la p-nitroanilina como una función del incremento de la absorbencia con el tiempo, a una longitud de onda de 400 nm, donde el producto de la hidrólisis tiene su máximo de absorbencia [58].

Así, el procedimiento para medir la actividad consistió en colocar a la papaína inhibida en concentración 0.06 mg/mL más la solución activadora (0.08 mM L-cisteína y 1.6 mM de EDTA en regulador de acetatos 30 mM pH 5) en una celda de 1 cm de recorrido óptico y completar un volumen de 900  $\mu\text{L}$ . Para iniciar la

reacción se le adicionó 100  $\mu\text{L}$  de sustrato 3 mM, completando así un volumen de 1 mL, agitando y siguiendo el cambio de absorbencia con el tiempo en muestras de papaína sin inhibir (PAP) e inhibidas, S-carboximetil papaína (CXP) y S-carbamoilmetil papaína (CBP).

Para calcular la velocidad ( $v$ ) debido al cambio de absorbencia con respecto al tiempo se utilizó la absortividad molar de la 3-nitroanilina ( $10,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) en la siguiente ecuación:

$$v = \frac{\mu \text{ mol p-nitroanilina producidos}}{\text{min}} = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{1}{10,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times \frac{1}{1 \text{ cm}} \times \frac{10^{+6} \mu\text{M}}{1 \text{ M}} \times 0.001 \text{ L}$$
$$v = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times 0.0952 \mu \text{ moles min}^{-1} \quad (2)$$

### 3.3.2. Reactivo de Ellman: ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB)

La técnica de Ellman [59-60] describe la reacción de los grupos sulfhidrilos libres con el DTNB, la sustancia provoca el rompimiento de los enlaces disulfuro para dar una sustancia de color amarillo, 2-nitro-5-tiobenzoato ( $\text{BNA}^-$ ), la cual produce una señal cuantificable en el espectrofotómetro a 412 nm utilizando su coeficiente de extinción de  $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [61].

A las PAP, CBP y CXP, se les cuantificó el contenido de grupos sulfhidrilo libres, a fin de corroborar la eficacia en el procedimiento de inhibición. Las muestras de proteína fueron reducidas como se indicó para el BAPNA, se dializaron extensivamente en regulador de acetato de sodio para remover el exceso de cisteínas libres, se filtró la solución de proteína y se adicionaron 75  $\mu\text{L}$  ( $1.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ) a una solución 8 mM de DTNB, preparado en regulador de TRIS 0.30 M, pH 8.

### 3.3.3. Hidrocloruro de N-CBZ-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina (HAMC)

El reactivo de HAMC al reaccionar con cisteínas libres produce 7-amino-4-metilcumarina, desplegando una señal de fluorescencia a una longitud de excitación y emisión de 380 y 480 nm, respectivamente [62].

Muestras de proteína de  $0.020 \text{ mg mL}^{-1}$ , de PAP, CBP y CXP se activaron durante 10 minutos como se describió para el proceso de derivatización. La actividad de la enzima sin inhibir se determinó a  $25^\circ\text{C}$  ( $5.2 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$ ) antes de agregar HAMC  $0.15 \text{ mM}$  preparado en regulador de acetato de sodio  $30 \text{ mM}$  pH 5, midiendo la señal en un espectrofluorómetro ISS K2 con anchos de rejilla de 10 y 5 nm para excitación y emisión, respectivamente.

A partir de la curva de avance de la reacción y utilizando los datos iniciales del cambio en la señal de fluorescencia con respecto al tiempo se calculó la pendiente en unidades de fluorescencia por minuto ( $\text{U min}^{-1}$ ) que al multiplicarse por la concentración de proteína ( $2 \text{ mg mL}^{-1}$  ó  $0.85 \mu\text{M}$ ) permitió comparar los resultados de los cambios conformacionales en función de la actividad.

### 3.4. Electroforesis

La electroforesis nativa se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia LKB) utilizando una placa homogénea de gel de poliacrilamida ( $0.45 \times 43 \times 50 \text{ mm}$ ) el cual contiene un sistema regulador  $0.112 \text{ M}$  de acetato y  $0.112 \text{ M}$  de Tris, pH 6.4 (Phast Gel homogeneous 20) y dos tiras reguladoras (3% agarosa) de  $0.88 \text{ M}$  L-alanina y  $0.25 \text{ M}$  Tris, pH 8.8. Las muestras de papaína se prepararon a concentraciones de 7, 70 y  $700 \mu\text{g mL}^{-1}$  y se les aplicó un voltaje constante de  $2.5 \text{ W}$  por 45 minutos a  $15^\circ\text{C}$  [63].

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) se realizó en el mismo equipo pero utilizando una placa homogénea de gel de poliacrilamida Phast Gel Homogeneous 20 (0.45 x 43 x 50 mm) la cual contiene un sistema regulador 0.112 M de acetato y 0.112 M de Tris, pH 6.4 (Phast Gel homogeneous 20) y dos tiras reguladoras (3% agarosa) de 0.20 M tricina, 0.20 M Tris y 0.55 M SDS, pH 8.1. Las muestras de papaína se prepararon con una concentración de 7, 70 y 700  $\mu\text{g mL}^{-1}$  y se les aplicó un voltaje constante de 3 W por 45 minutos a 15°C [64]. En la separación, fijación, teñido y desteñido se utilizaron las disoluciones y los métodos NATIVO-PAGE y SDS-PAGE sugeridos por el proveedor [65].

También se realizó electroforesis con teñido de plata en geles similares para revisar la forma nativa y con SDS, a fin de comprobar la ausencia de eventos de autoproteólisis después de los ensayos a pH 2.

En los dos tipos de electroforesis se analizaron PAP, CBP y CMP con el propósito comparar y observar si ocurrió algún cambio apreciable de tipo conformacional provocado por la presencia del derivatizante o una posible ruptura de los puentes disulfuro cuando la muestra fue transformada.

### **3.5. Técnicas espectroscópicas**

#### **3.5.1. Preparación de la muestra**

Las muestras se prepararon de forma idéntica para cada una de las diferentes técnicas espectroscópicas, tanto para obtener sus espectros como sus curvas de desnaturalización. La desnaturalización ácida se ocasionó por un cambio abrupto de pH, las señales fueron seguidas después de mezclar 80  $\mu\text{L}$  de solución de papaína preparada en regulador de acetatos 30 mM, pH 5, con 2920  $\mu\text{L}$  de regulador de Gly-HCl 50 mM a diferentes valores de pH (2.3, 2 y 1.5) previamente

incubado a la temperatura del experimento. La concentración final de la solución de proteína fue de  $0.85 \mu\text{M}$  ( $0.020 \text{ mg mL}^{-1}$ ). En todos los equipos se utilizaron celdas de 1.0 cm de recorrido óptico con un agitador magnético para promover un rápido mezclado. La temperatura en la celda se controló a través de un sistema tipo Peltier que rodea a la celda y un termómetro inmersible dentro de la misma. El pH se midió nuevamente al finalizar cada uno de los experimentos y el cambio fue de  $\pm 0.03$ , respecto a cada uno de los reguladores de Gly-HCl utilizados.

La reversibilidad fue explorada utilizando el mismo procedimiento indicado para preparar la muestra y provocar el cambio conformacional. A la solución resultante de proteína se le adicionaron de 55 a 80  $\mu\text{L}$  de NaOH 1.0 M con una agitación vigorosa, lo cual indujo a un regreso abrupto del pH a valores de 5 y 9, respectivamente. La recuperación de la señal se examinó tanto con estudios cinéticos, como con espectros realizados en ese instante y hasta doce horas después del suceso.

Para descartar la presencia de agregación, se realizaron por medio de fluorescencia intrínseca tres cinéticas a concentraciones de 0.85, 2.4 y 3.5 mM, utilizando el mismo procedimiento para preparar la muestra. La nula dispersión de luz se corroboró obteniendo los espectros de las muestras mencionadas anteriormente. Se establecieron las mismas condiciones de longitud de excitación y emisión, así como el ancho de rendija para seguir la señal en la obtención de espectros y en experimentos cinéticos.

### **3.5.2. Dicroísmo circular**

Un espectropolarímetro Jasco J715 equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier PTC-348WI se utilizó para obtener los espectros de DC. El equipo fue calibrado con ácido (+)-10-camforsulfónico [66] y en la región del UV lejano se utilizó regularmente lisozima  $1.4 \mu\text{M}$  ( $0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ ) como estándar de calibración.

Para la estimación de estructura secundaria los espectros se determinaron en la región del ultravioleta lejano (190-250 nm). Los datos espectrales se expresaron en función de la elipticidad por residuo medio  $[\Theta]_{MRW}$ :

$$[\Theta]_{MRW} = \frac{100 \theta M_R}{c d N_A} \quad (3)$$

En donde:  $\theta$  es la elipticidad (grados),  $c$  es la concentración de la proteína ( $\text{mg mL}^{-1}$ ),  $d$  es la longitud de la celda (cm),  $M_R$  es la masa molecular relativa de la proteína (23,350) y  $N_A$  el número de aminoácidos presentes en la cadena (212), por lo que  $[\Theta]_{MRW}$  tiene unidades de *grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$* . El factor de 100 en la ecuación tiene su origen en la conversión de la concentración molar a unidades de concentración de  *$\text{dmol cm}^{-3}$* . El contenido de estructura secundaria fue estimado utilizando los espectros y métodos implementados en el DicroWeb [67-70].

Las curvas cinéticas se siguieron también por el cambio en la elipticidad a una longitud fija de 224 nm pero en esta ocasión en función del tiempo.

### 3.5.3. Fluorescencia

En las determinaciones por fluorescencia se utilizó un espectrofluorómetro ISS K2 con sistema equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier, el cual está acoplado a un baño recirculador de agua Fisher Scientific (Modelo 90). Para controlar los cambios ocasionados por la intensidad de la lámpara, espectros de N-acetil-L-triptofenil-etil éster 0.13 mM fueron realizados al inicio y final del día para corregir las pequeñas variaciones en la señal del fluorómetro.

Los espectros de fluorescencia intrínseca (Fi) se obtuvieron a una longitud de onda fija de 292 nm para la excitación de residuos de triptófano y la emisión se colectó en la región de 300 a 400 nm. Para Fans la longitud de onda de excitación y el intervalo de colección del espectro de emisión se fijaron en 380 nm y de 400 a

600 nm, respectivamente. El ANS se preparó en regulador de Gly-HCl 30 mM pH 2, se utilizó a razón de un exceso molar de 1:100 respecto a la proteína [46] y se adicionó antes de la proteína para permitir su homogenización e incubación. En todos los casos el ancho de rejillas para la excitación y emisión fue de 10 y 5 nm, respectivamente.

Las curvas cinéticas para  $F_i$  y  $F_{ans}$  se realizaron a las mismas longitudes de excitación y se siguieron a una longitud de onda fija de 334 y 484 nm, respectivamente.

### 3.6. Modelado molecular

Los análisis estructurales y experimentos computacionales se realizaron utilizando el programa Molecular Operating Environment (MOE) [71] con el campo de fuerza CHARMM22. La estructura cristalográfica de la papaína se obtuvo del PDB (archivo 9PAP) y se arregló removiendo todos los átomos que no son de la proteína con excepción de la molécula de agua 195. Se le adicionaron todos los átomos de hidrógeno y se optimizó la posición de cada uno, manteniendo fijo el resto de los átomos. Para los estudios se construyeron dos archivos, uno representativo del pH neutro con los aminoácidos parcialmente cargados y la Cys<sup>25</sup> en forma de tiolato, y el otro que representa un medio ácido al tener todos los carboxilatos y grupos tiol protonados, por lo tanto eléctricamente neutros. En las dos estructuras se minimizó la energía y realizó una simulación de dinámica molecular (DM) independiente de 6 ns a 300 K. Con la intención de acelerar el proceso de desnaturalización, a las conformaciones de cada una de las simulaciones se les aplicó una segunda simulación de DM pero ahora durante 10 ns a una temperatura de 500 K.

Para estimar el comportamiento del ANS al interactuar con papaína durante sus cambios de conformación, se construyó esta molécula reportera asignándole cargas parciales a sus átomos con el campo de fuerza MMFF94x. Se determinaron nueve conformaciones de ANS de baja energía y cada una de ellas se ligó independientemente a sitios potenciales de unión (docking) a las conformaciones parcialmente desplegadas de papaína extraídas de sus trayectorias de DM. En la superficie de la enzima se encontraron muchos sitios favorables de interacción, pero la finalidad de este trabajo fue localizar cavidades en el interior de la estructura de la proteína donde el ANS se pudiera ocultar para formar complejos estables proteína-ANS en donde la señal de la molécula reportera se multiplica y así relacionarlos con los resultados experimentales de fluorescencia.



---

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Obtención de las especies modificadas químicamente:

#### **S-carbamoilmetil papaína y S-carboximetil papaína**

Las condiciones para la obtención de las especies modificadas químicamente fueron resultado de cambiar las concentraciones de los reactivos involucrados en un intervalo de 8 a 40 mM para L-cisteína, 1.6 a 8 mM para EDTA y 50 a 80 mM para el derivatizante (ácido iodoacético), los tiempos de activación de 20 minutos a 1 hora y de transformación de 30 minutos a 24 horas, la temperatura de 4 a 37°C, y se ensayaron diferentes pH en las soluciones de los reactivos involucrados en estos procesos. También fueron probados como agentes reductores  $\beta$ -mercaptoetanol y ditioeritritol en lugar de L-cisteína. Estos diferentes procesos de transformación fueron verificados realizando pruebas de actividad residual utilizando como sustrato inicialmente BAPNA, y posteriormente se verificó la actividad residual con cumarina y DTNB.

Las mejores condiciones para medir la actividad se localizaron realizando ensayos a las concentraciones de la papaína modificada en un intervalo de 0.06 a 0.17 mg mL<sup>-1</sup>, el BAPNA 0.06 a 1.04 mg mL<sup>-1</sup> y la solución activadora, así como el orden de mezclado de éstos en la celda. Como el BAPNA es poco soluble en agua se realizaron varias pruebas para medir la actividad en papaína utilizando al sustrato disuelto en agua, en solución activadora, en metanol, en etanol y en propanol. Así, papaína modificada químicamente se adicionó a la solución activadora (40 mM L-cisteína y 8 mM de EDTA en regulador de acetatos 30 mM pH 5) en concentración 0.06 mg mL<sup>-1</sup> hasta completar un volumen de 900  $\mu$ L, se agitó esta mezcla y se dejó incubar durante 4 min. Para medir la actividad de esta solución se agregaron 100  $\mu$ L de BAPNA 3 mM (disuelto en solución activadora) para completar un volumen de 1 mL en una celda de 1 cm de recorrido óptico, se volvió a agitar y se siguió el cambio de absorbencia con el tiempo.

Para controlar todos estos parámetros se siguió la actividad residual (ecuación 1) en las muestras tanto de papaína activada como las dos formar químicamente modificadas (CXP y CBP), lográndose así encontrar las constantes óptimas para anular la actividad. El protocolo final de modificación química se realizó de la siguiente forma, la papaína se activó con un exceso molar de L-cisteína de 500 veces y de EDTA 100 veces. La solución resultante se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la posible oxidación en la proteína. Una vez reducido el grupo tiol del sitio activo se inició el proceso de transformación al adicionar un exceso molar de ácido iodoacético de 1000 veces, la mezcla resultante se agitó durante 6 h a 4°C para permitir la carboximetilación, la primera media hora se agitó bajo atmósfera de nitrógeno y temperatura ambiente; una vez modificada se dializó contra regulador de acetatos 30 mM pH 5. A continuación, la solución de proteína (CXP) se filtró en una membrana con diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , para posteriormente medir su concentración. En este protocolo los reactivos se prepararon en regulador de acetatos 30 mM pH 5 y se ajustaron a este pH antes de utilizarse. Con este proceso se obtuvo papaína 100% modificada y con una concentración final de 1.6  $\text{mg mL}^{-1}$  (69  $\mu\text{M}$ ). Este mismo protocolo se utilizó para la obtención de la CBP, sustituyendo el ácido iodoacético por iodoacetamida.

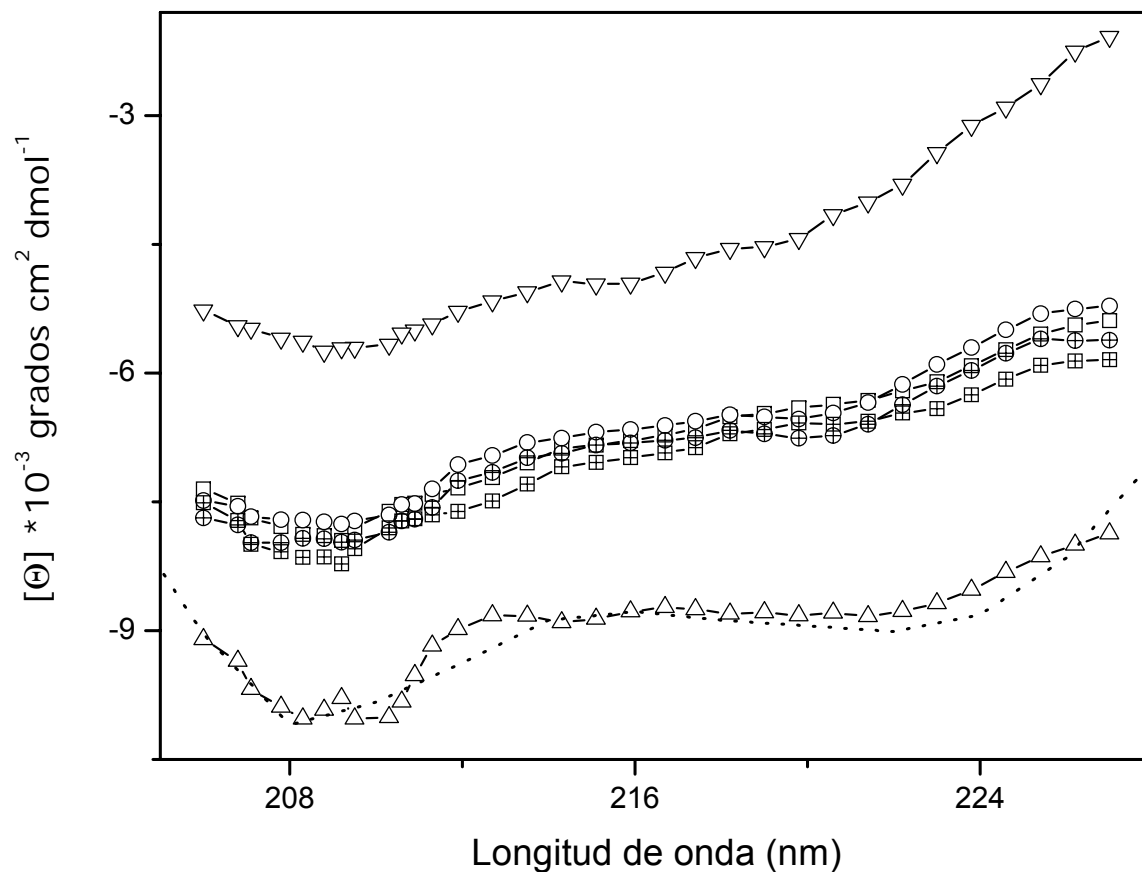
La inactividad de las dos especies inhibidas, CXP y CBP, así como la actividad de PAP se verificaron utilizando DTNB y HAMC, conocidos como ensayos de Elman y Menard, respectivamente [59, 63]. Los resultados comparativos de los dos tipos de ensayo mostraron la existencia de grupos tiol libres en las dos especies de papaína modificadas y la presencia de un grupo de este tipo en PAP, mientras que demostró la ausencia de actividad detectable en las especies inhibidas y la actividad específica completa para PAP.

## 4.2. Estructura nativa

La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida en presencia y ausencia de SDS. En los dos tipos de electroforesis se analizó papaína inhibida y sin inhibir, con el propósito de comparar y observar si ocurrió algún cambio conformacional provocado por la presencia del inhibidor o por un posible rompimiento de puentes disulfuro causado por la inhibición. No se observó evidencia de este cambio en ninguna de las placas de electroforesis, ni la presencia de algún contaminante.

El procedimiento anterior se repitió para cada lote de preparación con la finalidad de comprobar si nuestros experimentos iniciarían siempre con la misma especie y si ésta correspondía a la conformación N. Con el mismo objetivo se determinaron los espectros de DC de PAP, CMP y CBP en la región del UV lejano y fueron comparados con los espectros de papaína reportados por Manavalan y Johnson [69] y Compton y Johnson [70]. El ajuste mostró que los espectros obtenidos con la predicción de estructura secundaria son prácticamente superponibles a los experimentales y reportados (Figura 2).

Posteriormente, estimamos la cantidad de estructura secundaria de nuestros espectros utilizando los programas SELCON, CONTIN [68] y k2d (Tabla 2), los resultados fueron satisfactorios (sólo se muestran los obtenidos por el programa k2d) pues existe una alta similitud entre éstos y lo reportado por Sreerama y Woody [68] y Soriano y Hernández [51].



**Figura 2.** Espectros de dicroísmo circular de PAP 0.85  $\mu\text{M}$  a 18.7°C: N - $\Delta$ -, A - $\nabla$ - e I a diferentes tiempos: 1250 s, la - $\square$ - y 1600 s, lb - $\circ$ -. Espectros determinados con los programas SELCON y CONTIN, la' - $\boxplus$ - y lb' - $\oplus$ -, respectivamente.

---

Estado	Alfa	Beta	Otros	Diferencia al cuadrado	Error Máx
N	0.27	0.14	0.59	55.27	0.122
I	0.08	0.40	0.52	nd	nd
A	0.09	0.37	0.54	70.96	0.182

nd, no determinado

**Tabla 2.** Estimación de la estructura secundaria del estado nativo (N) e intermediarios (A e I) con el analizador k2d. Los espectros analizados para I corresponden a la serie de espectros rápidos obtenidos a 18.7°C. En todos los casos la concentración de la proteína fue de 0.85  $\mu$ M.

### 4.3. Efecto del pH sobre la estabilidad estructural de la papaína

En este trabajo es muy importante observar el efecto que puede tener la modificación química realizada en el residuo de Cys<sup>25</sup> sobre la estabilidad de la proteína al utilizar un  $\alpha$ -haloácido (ácido iodoacético) o una  $\alpha$ -haloamida (iodoacetamida), pues estas modificaciones y el pH pueden ocasionar una diferencia notoria tanto sobre la estructura como sobre el proceso de desplegamiento [34-35].

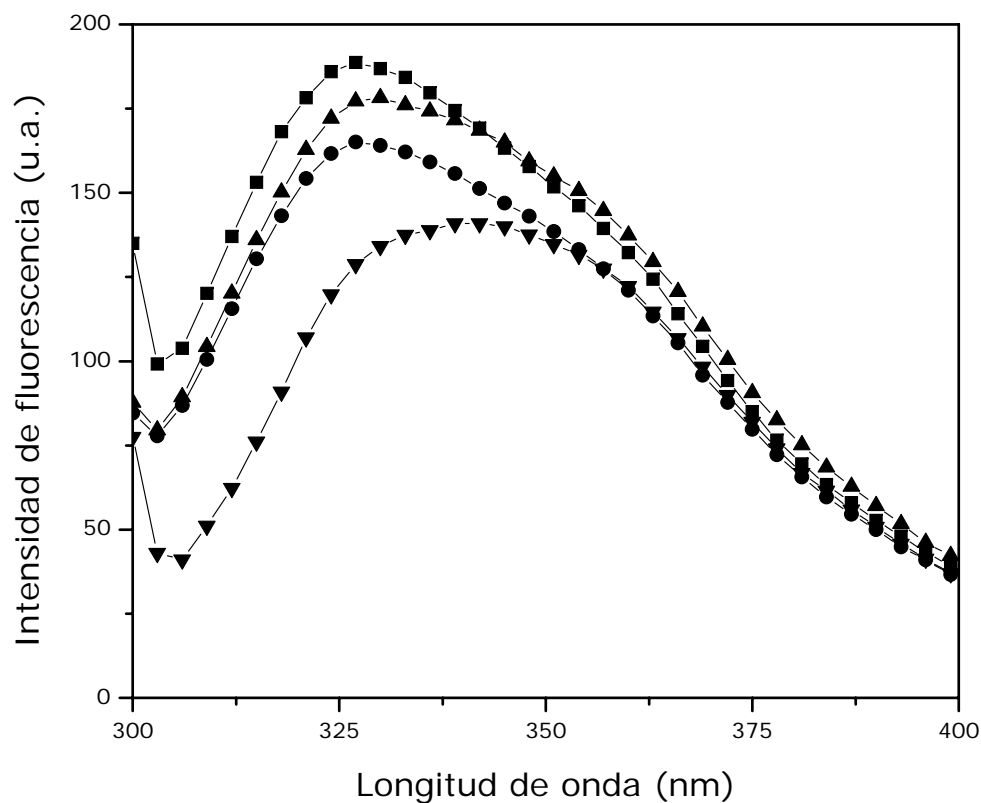
Con la finalidad de comparar la estabilidad estructural y seguir la pérdida de estructura secundaria y terciaria en función del pH de las especies en estudio, se presentan los resultados obtenidos para la CXP y CBP, así como para la PAP en las tres técnicas espectroscópicas utilizadas.

Las figuras 3 y 4 muestran los primeros espectros iniciales de Fi de CXP, CBP y PAP a diferentes valores de pH ácido. La fluorescencia de estas mismas muestras fue estudiada durante 500 horas (Figura 3A), en este período se conservaron a 4.0 °C. En la figura 4 se puede observar que la disminución del pH indujo un corrimiento hacia el rojo en la señal máxima de emisión (330 nm a 340 nm) indicativo una mayor exposición de los triptofanos, comportamiento cualitativamente idéntico para todas las especies pero que muestra las diferencias en función del tiempo, pues la estabilidad de CBP es mayor que CXP y PAP al mostrarse una mayor resistencia al cambio en función del pH.

Al igual que las figuras anteriores pero estudiando la Fans, las figuras 5 y 6 muestran los espectros iniciales de la CXP, CBP y PAP a diferentes valores de pH ácido. En estos espectros se observó que las muestras a pH 5 y 3.3 no muestran Fans, este mismo comportamiento se repitió en las otras dos especies (no se muestran datos para pH 3.3). Ya se había reportado la ausencia de esta señal para la CXP a estos valores ácidos de pH [46].

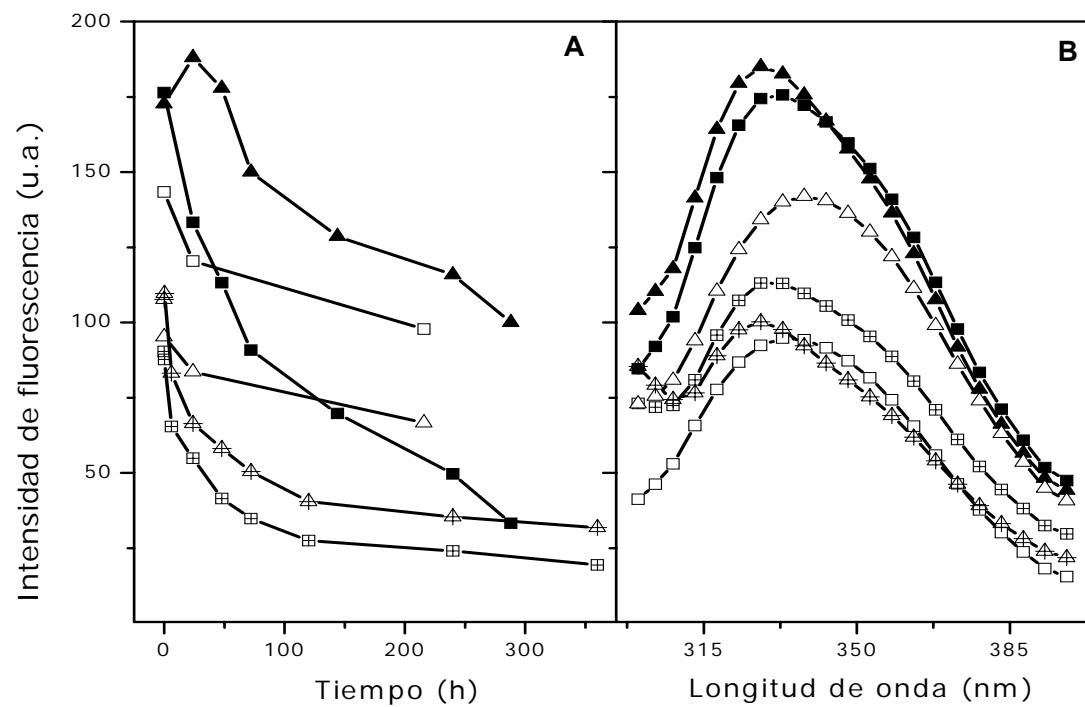
En la figura 6 estas mismas muestras fueron estudiadas con el tiempo durante un período de más de 300 horas. En esta figura pueden observarse diferencias iniciales ( $t < 24h$ ) en la resistencia de la estructura nativa al cambio del pH. Sin embargo, la diferencia más notable se observa en la permanencia de una conformación parecida a un glóbulo fundido, estado A, pues en las especies modificadas se mantiene más de 10 días, mientras que en la papaína sin inhibir el intermediario empieza a decaer antes de las 50 horas, apareciendo la forma desplegada (D).

En DC en la región del UV lejano los espectros a pH 2 mostraron una considerable retención de estructura secundaria nativa si bien los elementos de estructura regular se perdieron como lo muestra la reducción de la señal de elipticidad a 208 y 222 nm, figura 7-C. Aunque las estructuras de la PAP y CXP adquirieron una estructura similar, semejante a un glóbulo fundido, sus formas ácidas muestran diferencias significativas en las cinéticas de formación y desplegamiento.

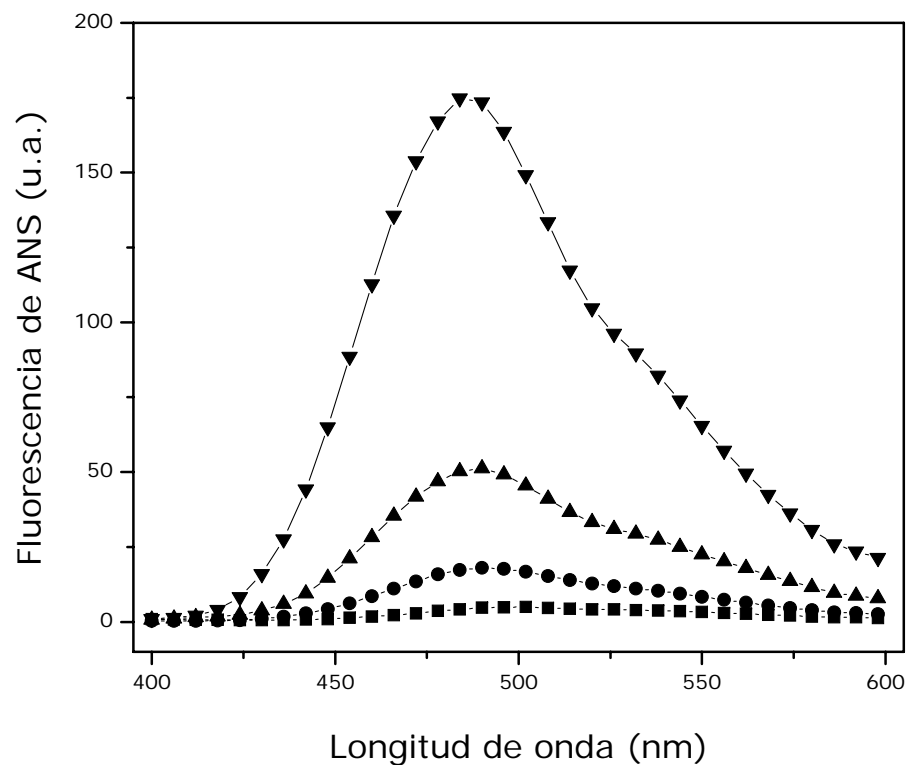


**Figura 3.** Espectros de FI de la CXP obtenidos a diferentes valores de pH ácido (pH 5 -■-, pH 2.3 -●-, pH 2 -▲- y pH 1.5 -▼-) a una longitud de onda de excitación de 292 nm y 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M. Estos espectros representan el primer punto de las curvas de intensidad de fluorescencia contra el tiempo de la figura 3.

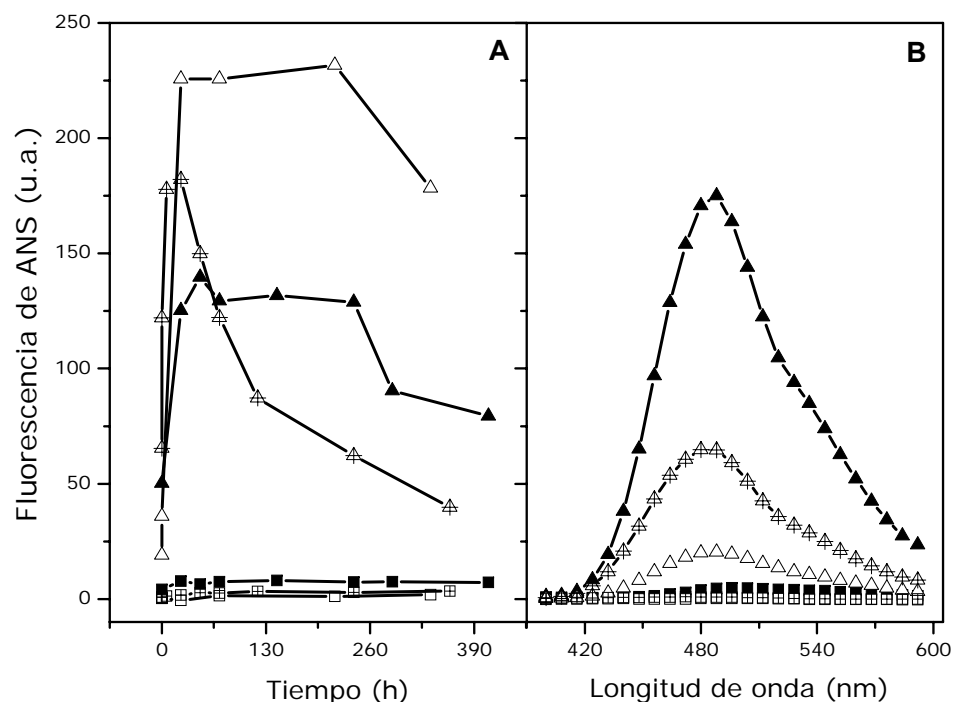




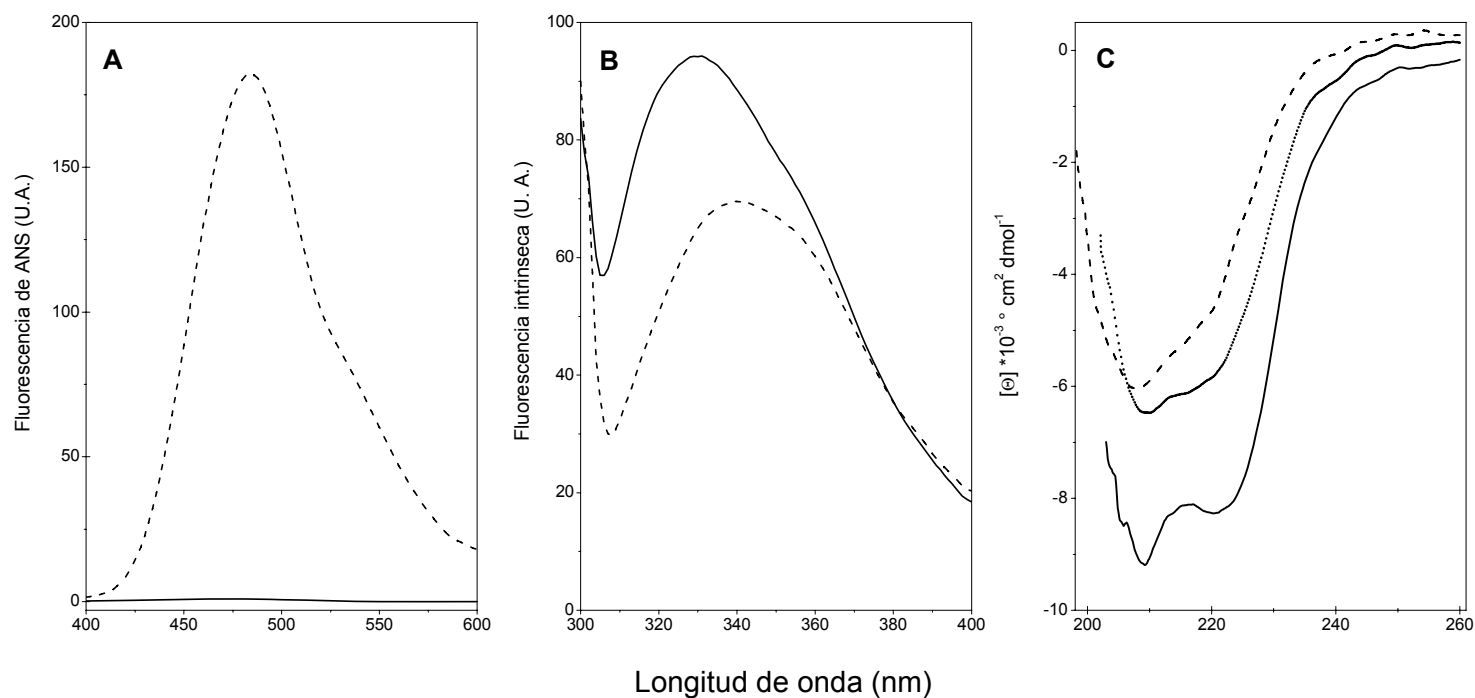
**Figura 4. A)** FI de las diferentes especies estudiadas: Símbolos cerrados, símbolos abiertos y símbolos cruzados: CXP, CBP y PAP, respectivamente. Triángulos: pH 2, cuadrados: pH 5. Las curvas de la figura principal corresponden a la evolución en el tiempo de la intensidad de fluorescencia a 338 nm de muestras preparadas a diferentes valores de pH. Cada punto de las curvas equivale a un espectro de FI de emisión como los que se muestran en la figura 2 y 3B. **B)** Espectros de fluorescencia intrínseca obtenidos a diferentes valores de pH (5 y 2), a una longitud de onda de excitación de 292 nm y 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M. Estos espectros representan el primer punto de las curvas de intensidad de fluorescencia contra el tiempo.



**Figura 5.** Espectros de Fans de la CXP obtenidos a diferentes valores de pH ácido (pH 5 -■-, pH 2.3 -●-, pH 2 -▲- y pH 1.5 -▼-) a una longitud de onda de excitación de 380 nm y 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS. Estos espectros representan el primer punto de las curvas de intensidad de fluorescencia contra el tiempo (figuras 5 y 6).



**Figura 6. A)** Fans de las diferentes especies estudiadas: Símbolos cerrados, símbolos abiertos y símbolos cruzados: CXP, CBP y PAP, respectivamente. Triángulos: pH 2, cuadrados: pH 5. Las curvas de la figura principal corresponden a la evolución en el tiempo de la intensidad de fluorescencia a 484 nm de muestras preparadas a diferentes valores de pH. Cada punto de las curvas equivale a un espectro de emisión de Fans como los que se muestran en el panel B. **B)** Espectros de Fans de emisión obtenidos a diferentes valores de pH (5 y 2), a partir de una longitud de onda de excitación de 380 nm y a 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu\text{M}$  y con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS. Estos espectros representan el primer punto de las curvas de intensidad de fluorescencia contra el tiempo.



**Figura 7.** Espectros de papaína a 20°C obtenidos por DC en la región del UV lejano (A), Fi (B) y Fans (C). Los espectros corresponden a la enzima nativa (pH 5, —) y al estado A (pH 2, - - -). El tercer espectro de DC corresponde a una muestra incubada a pH 2.0 durante 10 min y regresada a pH 5 (· ····).

---

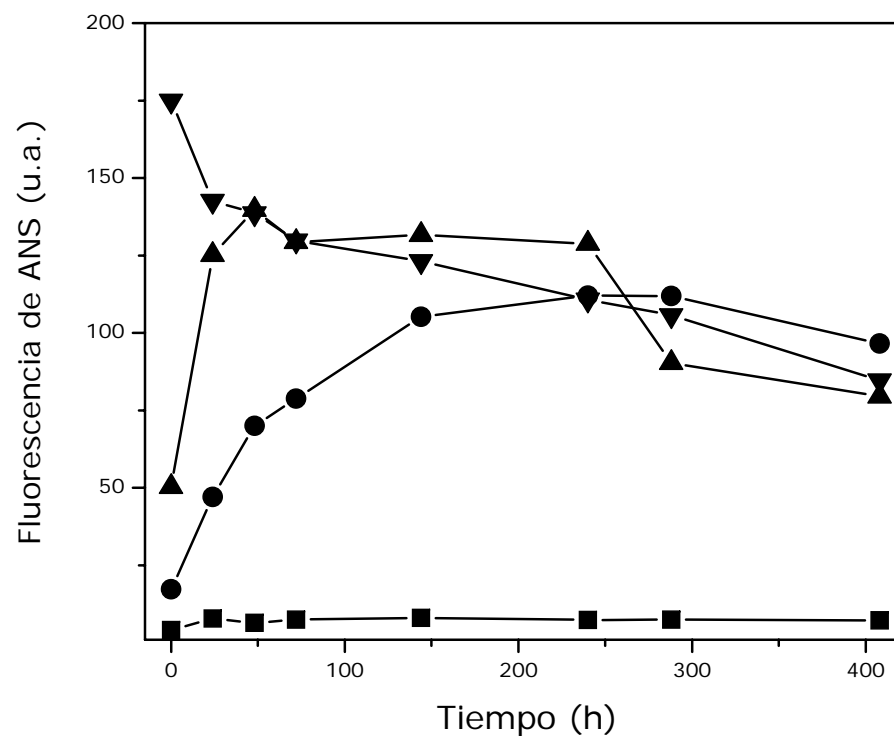
#### 4.4. Evidencia, permanencia y localización del estado A

El estado intermediario ocasionado por un cambio estructural en la papaína a valores ácidos de pH y detectado por Fans, se localizó y observó en CBP y PAP a pH 2, (Figura 6A). Este estado sólo se había reportado para CXP [46], sin embargo al estudiarlo por periodos largos de tiempo se observó que no permanece indefinidamente como se reportó previamente [46], es decir no es una especie termodinámicamente estable.

Debido a estas diferencias se decidió comprobar el valor de pH al cual se localizó el estado intermediario para ver si éste era el idóneo para su formación en las tres especies. Se incubaron muestras a diferentes valores ácidos de pH las cuales fueron estudiadas durante un período de 500 horas (sólo se muestran datos para la CXP, Figura 8). Finalmente se observó que un entorno ácido a pH 2 es el más útil para la formación del estado intermediario (estado A) en las tres especies, pues este ambiente permite la permanencia de esa conformación durante un periodo de tiempo largo durante el desplegamiento de la papaína, para posteriormente desaparecer, hasta llegar al desplegamiento total de la proteína, es decir al estado desplegado (D) (Figura 6). Este comportamiento es diferente para las tres especies y la única causal es la desigualdad en el residuo de Cys<sup>25</sup>. Este resultado es consistente con otros trabajos donde la mutación sobre el residuo de cisteína del sitio activo (Cys<sup>29</sup>) por alanina o serina de la catepsina B modifica la estabilidad [72].

A pesar de las diferencias en la estabilidad de A, el desplegamiento de los tres sistemas estudiados se podría explicar hasta este momento mediante un mecanismo  $N \leftrightarrow A \rightarrow D$ , aunque queda aún por confirmar la reversibilidad del primer proceso. Por el momento, las especies moleculares N y A no difieren significativamente, hecho comprobado mediante electroforesis nativa donde la movilidad fue similar sugiriendo que el radio hidrodinámico no cambió

sustantivamente. Evidencia que sumada a las anteriores, sugirió para las tres especies a pH 2 la formación de una estructura molecular parecida a una conformación de glóbulo fundido, similar a las encontradas en otras proteasas en las cuales el sitio activo de cisteína fue bloqueado para formar derivados de S-carboximetil [73], S-carboxiamidometil [74] o S-tiometil [75].



**Figura 8.** Las curvas de esta figura corresponden a la evolución en el tiempo de la intensidad de fluorescencia a 484 nm de muestras de CXP preparadas a diferentes valores de pH ácido (pH 5 -■-, pH 2.3 -●-, pH 2 -▲- y pH 1.5 -▼-). Cada punto de las curvas equivale a un espectro de emisión de Fans como los que se muestran en la figura 4, obtenidos a partir de una longitud de onda de excitación de 380 nm y a 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M y con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS.

---

#### 4.5. Irreversibilidad del estado A

A las muestras de las tres especies incubadas a pH 2 se les midió la actividad en diferentes periodos, antes y después de regresarlas a la neutralidad. Las muestras no mostraron una actividad significativa. En electroforesis nativa el resultado fue similar, no se detectó ningún cambio en la estructura indicativo de reversibilidad.

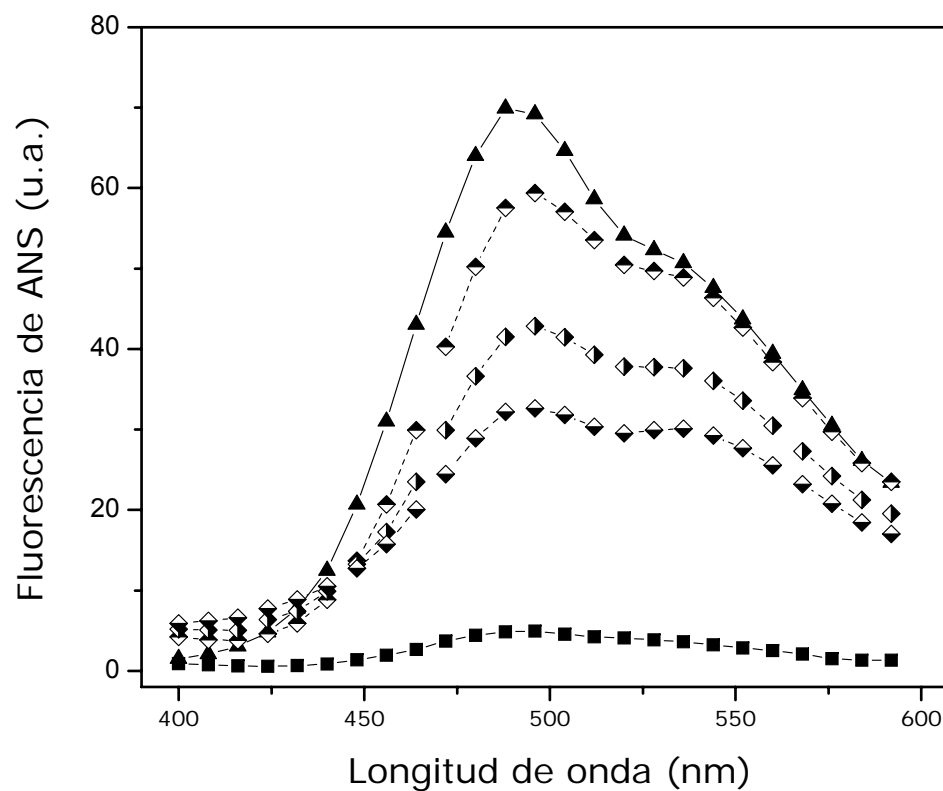
Los primeros estudios de reversibilidad por métodos espectroscópicos se realizaron siguiendo la Fans, después de regresar a pH 5 con la adición NaOH, aún sabiendo que N y D no se distinguen entre sí (no fluorescen), pues sólo el estado A es detectado mediante esta técnica. Por eso al analizar los resultados para la CXP (Figura 9) en donde se observa una reversibilidad parcial a las 408 horas y no inmediatamente, por lo cual no se puede distinguir y mucho menos asegurar que el proceso que está ocurriendo en la figura 9, sea un replegamiento de  $A \rightarrow N$  o bien el desplegamiento de  $A \rightarrow D$ . Se decidió entonces verificar la reversibilidad utilizando DC y Fi,

Los resultados de Fi (Figura 10) y DC en CXP no pudieron demostrar la reversibilidad del proceso  $N \rightarrow A$ , pues en ambas técnicas se observó que al desnaturalizar la proteína y posteriormente restablecer el pH 5, la señal se pierde de manera constante en un periodo de 400 h. Esta pérdida indica el desplegamiento de la estructura y la ausencia de reversibilidad en el proceso. Estos resultados fueron los mismos para las otras dos especies en estudio. Por lo tanto, el mecanismo propuesto en el inciso anterior se remplazaría por un proceso  $N \rightarrow A \rightarrow D$  tanto para la papaína sin inhibir como para las especies transformadas.

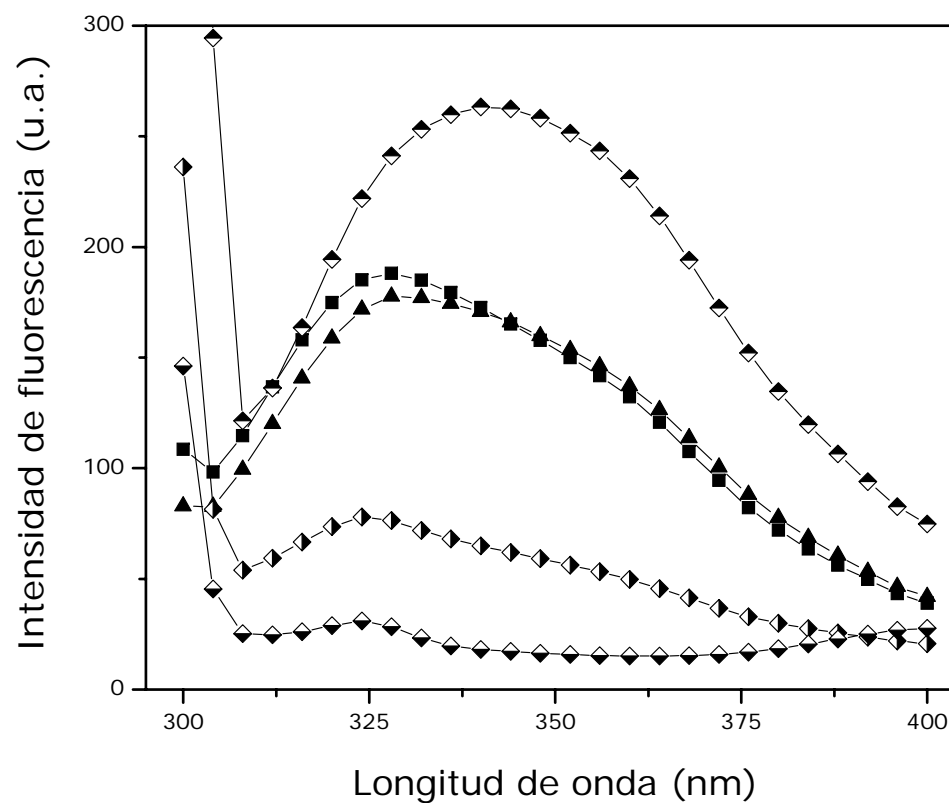
Se realizaron estudios de autohidrólisis para descartar este fenómeno como la causa de irreversibilidad, también se descartó la presencia de especies irreversiblemente oxidadas en la Cys<sup>25</sup> de la papaína comercial, con la finalidad de



probar que el mecanismo observado se debe al desplegamiento ácido de la enzima y no al proceso de desplegamiento de la especie irreversiblemente oxidada. En una electroforesis nativa se aplicaron muestras de enzima activa a pH 5 y pH 2, conformaciones N y A, respectivamente. En el gel, los carriles de las muestras ácidas no mostraron ninguna evidencia presumible de la fragmentación de proteína. En las muestras a pH ácido lo más probable era este resultado, porque la papaína presenta actividad en un intervalo de 4 – 8.5 [24].



**Figura 9.** Espectros de Fans de la CXP: pH 5-■-, pH 2 -▲- y pH 5' (después de la adición de NaOH 1M a la muestra de pH 2) a diferentes tiempos: 0 h -◊-, 24 h -◊-, 408 h -◊-, obtenidos a una longitud de onda de excitación de 380 nm y 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS.



**Figura 10.** Espectros de FI de la CXP: pH 5 -■-, pH 2 -▲- y pH 5' (después de la adición de NaOH 1M a la muestra de pH 2) a diferentes tiempos: 0 h -◇-, 24 h -◇-, 408 h -◇-, obtenidos a una longitud de onda de excitación de 292 nm y 20°C. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.85  $\mu$ M.

#### 4.6. Curvas de desnaturalización térmica en función del tiempo

La cinética del proceso  $N \rightarrow A$  se estudió para las tres especies a pH 2 y a diferentes temperaturas por medio de las técnicas de DC, Fi y Fans, las curvas cinéticas se siguieron por el cambio en el tiempo de la señal espectroscópica a una longitud de onda fija de 224, 334 y 484 nm, respectivamente. En las dos técnicas de fluorescencia se presentó el fenómeno de fotooxidación (figura 14), pero éste fue corregido antes del análisis de los resultados (figura 15), como se discute en otro apartado.

Las curvas de desnaturalización térmica obtenidas por las tres técnicas se ajustaron a un análisis de doble exponencial ( $y = Ae^{-k_1x} + Be^{-k_2x} + C$ ), pues un modelo más sencillo ( $y = Ae^{-k_1x} + C$ ) no logró describir apropiadamente los resultados experimentales. El ajuste a una doble exponencial nos indica la existencia de un intermediario cinético y por lo tanto dos estados de transición en el proceso de desplegamiento de N a A. Sin embargo, este ajuste conlleva dificultades para la determinación de las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$ , lo que se manifiesta en grandes variaciones en los valores correspondientes a las diferentes técnicas a la misma temperatura. Estas variaciones llevaron en un inicio a proponer intermediarios diferentes para cada técnica. Decidimos probar si la existencia de un solo intermediario podría explicar satisfactoriamente el conjunto de la evidencia experimental, por lo que se realizó un ajuste de manera simultánea para las tres técnicas. Inicialmente fue necesario normalizar todas las curvas de desnaturalización térmica en un intervalo de 0 a 1, observándose que a la misma temperatura todas se sobrepusieron (datos no mostrados). El ajuste simultáneo consistió en utilizar los mismos valores de las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  en las tres técnicas y permitir que las amplitudes A, B y C de la función a la doble exponencial tomaran valores diferentes en cada método espectroscópico (Figura 11).

Esta forma de tratar los datos proporcionó buenos resultados, ya que permitió proponer la existencia de más de dos estados de transición en el proceso de desplegamiento  $N \rightarrow I \rightarrow A$  (el primero de ellos se localiza entre N e I y el segundo entre I y A) y el mismo mecanismo para las tres especies  $N \rightarrow I \rightarrow A \rightarrow D$ , pero sobre todo demostrar que se tiene el mismo intermediario cinético observable en las tres técnicas. También analizando las formas de las curvas con respecto a las amplitudes de A y B y los ajustes simultáneos, se observó que el intermediario I es prácticamente idéntico a la especie A, particularmente en los eventos seguidos por DC, y que alrededor del 90% del cambio se puede asignar a la primera etapa del mecanismo como lo muestra la señal en Fans, en contrapartida con el 50% de cambio total observado en Fi. Englobando todos los resultados, la estructura del intermediario tiene una conformación parecida a un glóbulo fundido similar a la estructura de A, pero más compacta. La cantidad de estructura secundaria es idéntica y la accesibilidad de ANS es similar, por lo tanto el cambio de  $I \rightarrow A$  sólo envolvió la pérdida de estructura terciaria, esto se mostró con la señal intensa en Fans. Este intermediario se trató de detectar por medio de una electroforesis de IEF, más no se logró observar su presencia a pesar de los diferentes tiempos de incubación que se le permitieron a las muestras de PAP y CXP a pH 2.

En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de  $k_1$  y  $k_2$ , en donde se puede observar que las constantes de velocidad de la CBP son mayores que los de la PAP, lo cual nos indica que la modificación química realizada sobre el residuo de Cys<sup>25</sup> sí modifica la estabilidad de esta especie, pues se requiere un menor tiempo para lograr un cambio sobre su estructura.

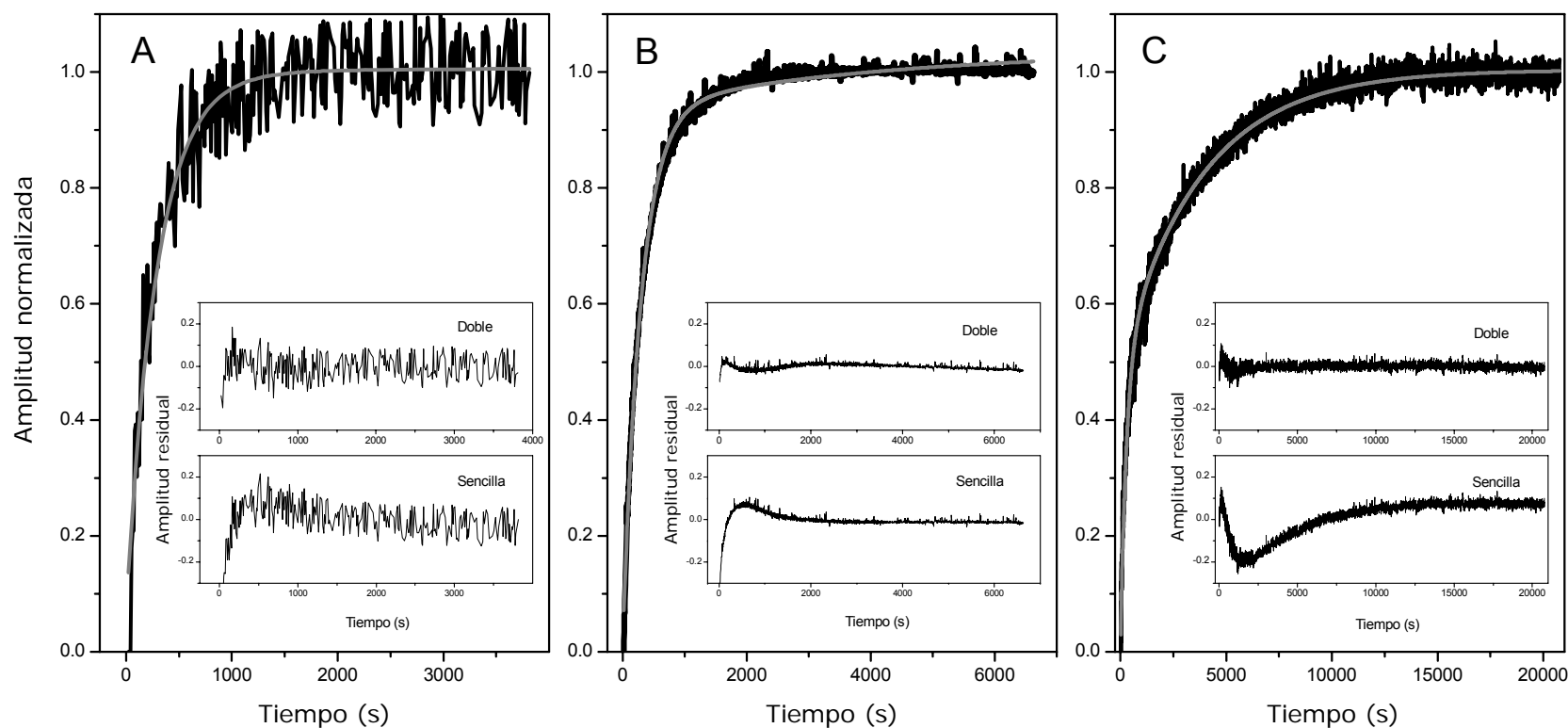
A partir de las constantes de velocidad obtenidas a pH 2 (tabla 3) se hizo uso de la ecuación de Eyring:

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{K_B}{h} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} \quad (4)$$

donde:  $k$  representa las constantes de velocidad ( $k_1$  o  $k_2$ , respectivamente),  $K_B$  es la constante de Boltzmann,  $h$  la constante de Planck y  $R$  la constante de los gases, mientras que  $\Delta S^\ddagger$  y  $\Delta H^\ddagger$  representan el cambio en la entropía y entalpía de activación, respectivamente. A partir de la pendiente de una gráfica de  $\ln(k/T)$  contra  $(1/T)$  se estimaron los valores de  $\Delta H^\ddagger$  y de la ordenada al origen de  $\Delta S^\ddagger$ , asumiendo que el cambio de capacidad calorífica de transición ( $\Delta C_p^\ddagger$ ) es cero (Figura 12). Este procedimiento se realizó para las tres especies estudiadas (Tabla 4), en donde puede observarse que los valores de los parámetros termodinámicos de activación para la CBP son comparables a los de la PAP, sin embargo existe una diferencia significativa entre éstos y los de la CXP. Estos resultados concuerdan con la idea de que la estabilidad de la CXP es mayor.

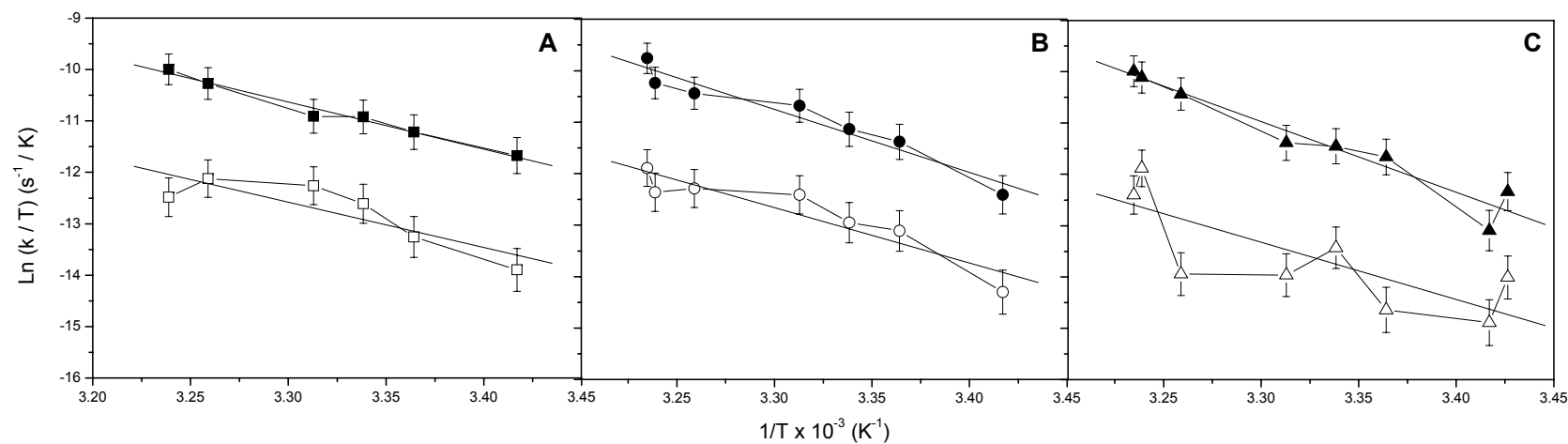
T (°C)	S-carboximetil papaína		S-carbamoilmetil papaína		Papaína sin modificar	
	$k_1 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_1 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_1 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
18.7					12.8	2.4
19.5	24.9	2.7	11.9	1.8	6.0	1.0
24.1	40.0	5.2	33.9	6.0	25.6	1.3
26.4	54.2	10.0	43.7	7.1	31.8	4.4
28.7	55.3	14.3	69.5	12.3	34.3	2.6
33.7	106.2	16.7	90.0	14.1	90.1	2.7
35.6	140.9	11.7	110.7	13.2	124.9	21.3
36			178.5	21.2	141.6	12.7

**Tabla 3.** Constantes de velocidad para la CXP, CBP y PAP obtenidas a partir del ajuste simultáneo a una doble exponencial de las curvas de desnaturalización a pH ácido en función del tiempo seguidas por DC, Fans y Fi.



**Figura 11.** Curvas de desplegamiento por pH ácido en función del tiempo y ajustes simultáneos de la CXP en DC (A), Fans (B) y Fi (C). La señal fue seguida a 224, 480 y 380 nm, respectivamente. Estos experimentos corresponden a 27.5°C y pH 2, la concentración de proteína modificada fue de 0.85  $\mu$ M en todas las técnicas.





**Figura 12.** Gráfico de Eyring. Las líneas rectas representan el mejor ajuste lineal para los datos experimentales obtenidos del ajuste simultáneo de Fi, Fans y DC para cada temperatura y especie, a través de los cuales se obtienen los parámetros cinéticos de CXP (A), CBP (B) y PAP (C), respectivamente. Estos experimentos corresponden a una concentración de proteína de 0.85  $\mu\text{M}$ .

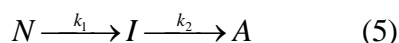
	$\Delta H^{\#}_1$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	$\Delta H^{\#}_2$	$\Delta S^{\#}_1$ (J K <sup>-1</sup> mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^{\#}_2$
S-carboximetil papaína	76.2 ± 5.3	73.3 ± 21.3	-34.6 ± 179.9	-60.4 ± 126.7
S-carbamoilmetil papaína	102.1 ± 11.3	89.2 ± 15.7	50.0 ± 160.2	-8.4 ± 145.7
Papaína sin modificar	115.5 ± 12.0	87.8 ± 29.4	92.3 ± 157.7	-19.2 ± 99.9

**Tabla 4.** Cambios de entalpía y entropía de activación para la CXP, CBP y PAP obtenidas a pH 2 a partir de la pendiente de una gráfica de ln (k / T) contra 1 / T.

#### 4.7. Simulación de poblaciones

A partir de un programa de simulación de poblaciones se determinó la cantidad de cada especie presente durante el proceso cinético. A partir de estos resultados puede estimarse el intervalo de tiempo donde se manifiesta la máxima población de los estados que intervienen en el proceso de desplegamiento de la papaína, estos datos fueron de utilidad para realizar experimentos de electroforesis, reversibilidad y actividad en los tiempos correctos para obtener información espectroscópica de las especies propuestas y los cambios conformacionales que las generan.

El programa se elaboró en una hoja de cálculo siguiendo un modelo de tres estados, el cual considera un intermediario y dos reacciones consecutivas. En este caso las conformaciones N, I y A están relacionadas por el siguiente mecanismo.



En este modelo los datos cinéticos pueden ser analizados empleando una ecuación de doble exponencial, así como las ecuaciones cuyo objetivo es calcular la población esperada de cada especie involucrada y estimar el efecto de los cambios conformacionales del proceso en la señal experimental medida durante el proceso de formación de I e A:

Concentración total de proteína:  $P_T = [N] + [I] + [A] \quad (6)$

Fracción molar total:  $f_N + f_I + f_A = 1 \quad (7)$

Constantes de equilibrio del proceso:  $k_1 = \frac{[I]}{[A]} \quad (8a) \quad k_2 = \frac{[A]}{[I]} \quad (8b)$

Amplitud de la señal:  $y = y_N f_N + y_I f_I + y_A f_A \quad (9)$

---

Ecuación de una doble exponencial en función de A y N, respectivamente:

$$y = A \exp^{-k_1 t} + B \exp^{-k_2 t} + y_A \quad (10a) \quad y = A(\exp^{-k_1 t} - 1) + B(\exp^{-k_2 t} - 1) + y_N \quad (10b)$$

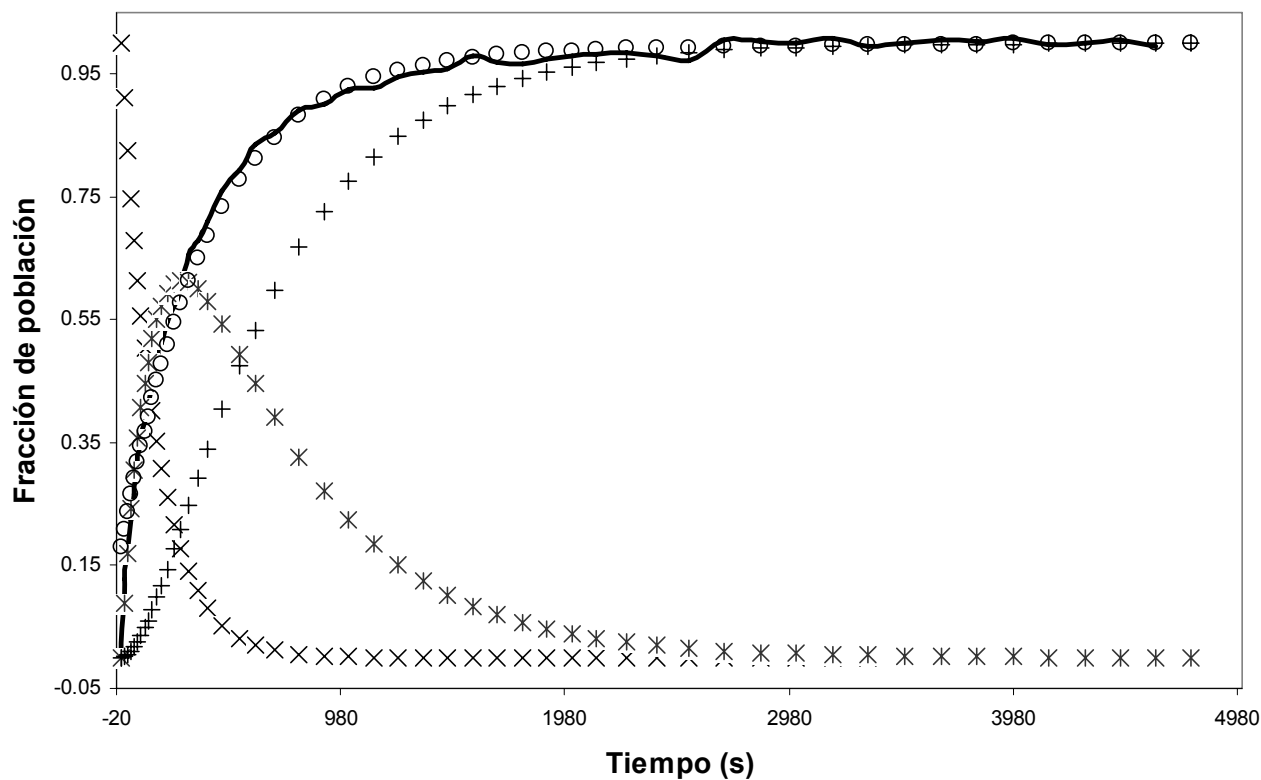
Definición de las fracciones molares de las conformaciones:

$$f_N = \exp^{-k_1 t} \quad (11a) \quad f_I = 1 - f_N - f_A \quad (11b) \quad f_A = 1 - \left[ \left( \frac{k_1}{k_1 - k_2} \right) \exp^{-k_2 t} + \left( \frac{k_2}{k_1 - k_2} \right) \exp^{-k_1 t} \right] \quad (11c)$$

Amplitudes de la señal:

$$A = (y_N - y_I) + \left[ k_2 \left( \frac{y_I - y_A}{k_2 - k_1} \right) \right] \quad (12a) \quad B = -k_1 \left( \frac{y_I - y_A}{k_2 - k_1} \right) \quad (12b)$$

Con los datos experimentales de las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$ , así como amplitudes  $A$ ,  $B$  y  $C$  (esta última igual a 1 por estar normalizado los datos) se obtuvieron los valores de las fracciones molares de las especies  $f_N$ ,  $f_I$  y  $f_A$ , (ecuaciones 11a, 11b y 11c, respectivamente) datos que posteriormente alimentaron a la ecuación de doble exponencial en función de A (ecuación 10a) hasta obtener un grafico similar al experimental (Figura 13).



**Figura 13.** Gráfica de la simulación de poblaciones siguiendo un modelo  $N \rightarrow I \rightarrow A$ , fracción:  $\times$  N,  $*$  I,  $+$  A,  $\bigcirc$  el cambio en la señal esperado con datos obtenidos del modelo y, finalmente, con línea continua se describe la curva de desplegamiento experimental. Los datos proporcionados para la simulación corresponden a una curva de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo de la PAP a 24.1°C y pH 2.

#### 4.8. Irreversibilidad del estado I

Se siguió la actividad residual de PAP utilizando HAMC y espectroscopía de fluorescencia a una longitud de excitación de 380 nm y emisión de 460 nm según el proceso descrito para reversibilidad en métodos espectroscópicos. La muestra se preparó a pH 2 y se incubó a una temperatura de 24.1°C, el tiempo lo proporcionó la simulación de poblaciones y corresponde al máximo de población de los estados N, A e I. Las constantes  $k_1$  y  $k_2$ , con valores de  $3.4 \times 10^{-3}$  y  $2.6 \times 10^{-4} \text{ seg}^{-1}$ , (295 y 3845 seg) respectivamente, fueron utilizadas para calcular las poblaciones de las especies de papaína. La actividad de N se analizó al tiempo cero, en contraste A, I y D y la reversibilidad de cada uno de estos estados sí requieren del tiempo de incubación, así como la adición de una pequeña alícuota de base para regresar a pH 7 y realizar estos últimos estudios. Finalmente fue analizada la actividad cuando a 1500  $\mu\text{L}$  de HAMC se le adicionaron 40  $\mu\text{L}$  de la especie en incubación y se siguió la señal espectroscópica.

Los resultados nos muestran que la solución con alta concentración de I tiene una actividad parcial, sin embargo pierde paulatinamente este comportamiento aun cuando se intenta regresar a su conformación nativa (Tabla 5). Lo mismo sucede con los estados A y D, donde no observamos actividad y volvimos a verificar que estas conformaciones mantienen el mismo comportamiento irreversible.

<b>Especies</b>	<b>Actividad (<math>\mu\text{M min}^{-1}</math>)</b>
N	412 700 $\pm$ 880
A	297 700 $\pm$ 850
Reversibilidad de A	24 630 $\pm$ 30
I	21 750 $\pm$ 10
Reversibilidad de I	129 000 $\pm$ 750

**Tabla 5.** La actividad de la PAP fue determinada por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 380 nm y 24.1°C, utilizando HAMC 0.15 mM. La concentración de proteína en todos los casos fue de 0.02  $\mu\text{M}$ .

---

#### 4.9. Estudios para dilucidar las diferencias conformacionales entre N, A e I

Verificamos el estado de ionización de la CXP, realizando una electroforesis en condiciones nativas en un gel de gradiente medio 8-25 y tiras reguladoras de Phast System, tratadas en regulador de glicina 36 mM y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  60 mM, pH 2 con la finalidad de modificar el pH y simular un ambiente propicio para la formación del estado A. Analizamos muestras de las tres especies CXP, CBP y PAP con una concentración  $\sim 0.03$  mM preparadas en regulador de acetatos 30 mM pH 5 o en glicina-HCl 30 mM pH 2 para analizar la cinética de formación del estado A y al estado A formado. En el gel se aprecia una diferencia muy pequeña y no significativa en la velocidad de migración en las muestras de CXP.

Con este experimento no podemos asegurar lo que nos proponíamos dilucidar, si la CXP había aportado una carga negativa a la estructura de la papaína modificada químicamente. Cabe mencionar que el entorno modifica el pKa de la Cys<sup>25</sup> hasta un valor de 4 (pKa de 8 cuando se encuentra libre) y lo mismo podría estar ocurriendo sobre el grupo carboximetil (modificación química realizada sobre la Cys<sup>25</sup>). Por lo tanto, las interacciones de la carga negativa podrían ser una de las causas de las diferencias entre las especies y su estabilidad estructural.

Posteriormente, con el mismo objetivo de esclarecer la conformación de los estados N, A e I, realizamos una serie de espectros rápidos en el DC siguiendo el cambio de la señal en la región del ultravioleta lejano (190-250 nm) para estimar la cantidad de estructura secundaria presente en cada uno de estos estados. Utilizamos papaína sin modificar en regulador de glicina-HCl 30 mM, pH 2 a 18.7°C. Para decidir qué espectro corresponde a cada estado y cuales forman parte de la trayectoria cuidamos los tiempos de obtención de cada espectro. Al final, usando las constantes de velocidad experimentales y realizando una simulación de poblaciones, logramos estudiar la solución con un máximo de



concentración del estado I. La figura 2 nos muestra los espectros de N, A e I, dos para este último representan el intervalo de tiempo donde I tiene su máximo de población en la trayectoria del desplegamiento  $N \rightarrow A$ . Podemos observar cómo los espectros simulados de I son superponibles sobre los experimentales (Figura 2).

Finalmente utilizando los programas contenidos en el servidor k2d [67], estimamos la cantidad de estructura secundaria para cada una de las especies (Tabla 2). De estos datos se desprende que el cambio conformacional de N a A corresponde a una gran pérdida del contenido de hélice alfa (cambio de 0.27 a 0.09), es decir, sólo 19 de los 57 residuos helicoidales nativos permanecieron en el estado A.

#### **4.10. Estudios para eliminar fenómenos causados por factores externos a la inhibición.**

##### **Fotooxidación**

Al realizar las curvas de desplegamiento térmico en función del tiempo utilizando Fi y Fans se observó al final del trazo cinético una disminución constante de la señal. Esto ocurrió para todas las especies en estudio (PAP, CBP y CXP) y a todas las temperaturas trabajadas (Figura 14). Por esta razón se realizaron varios experimentos con la finalidad de corroborar si la existencia de este fenómeno se debía a la fotooxidación o forma parte del proceso de desplegamiento de las especies en estudio.

Uno de los primeros experimentos consistió en comprobar si la disminución de la intensidad de fluorescencia era provocada por el desgaste y uso constante de la lámpara (10 h diariamente). Por lo cual, se tomaron espectros a 20 °C durante un

mes aproximadamente de una solución de N-acetil-L-triptofanil-etil-éster, solución que se utilizó como referencia antes de iniciar y finalizar el día trabajo en el fluorómetro. Sin embargo, los espectros no mostraron ninguna diferencia durante este tiempo (datos no mostrados), así que se descartó la idea de que la disminución de la intensidad de la señal se debía a un envejecimiento constante de la lámpara en el transcurso del día.

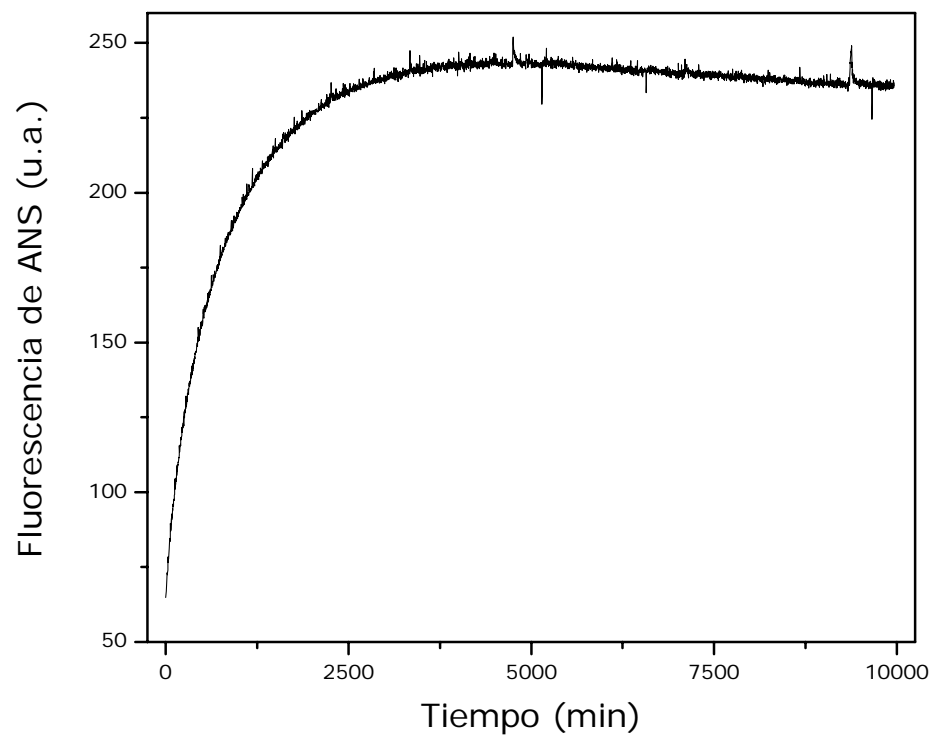
Al mismo tiempo se realizaron pruebas para comprobar la fotooxidación tanto en Fi como de Fans. Estas pruebas consistieron en provocar cambios de pendiente al impedir la excitación de la muestra, no permitiendo el paso del haz de luz incidente proveniente de la lámpara por periodos de media hora y sólo excitando durante 1 minuto entre estos periodos. Este procedimiento se inició a los tiempos en los cuales se presenta el fenómeno, observándose al limitar el uso de lámpara a 1 minuto durante periodos de media hora un valor de pendiente mucho menor en comparación con la pendiente obtenida de la muestra que está completamente expuesta al haz de luz incidente durante periodos largos, esta diferencia es de aproximadamente 1:3 (Figura 15).

La disminución de la pendiente al reducir la intensidad de irradiación de la muestra, sugiere que este fenómeno se debe a la fotodescomposición de la proteína y no al proceso  $N \rightarrow A$  o  $A \rightarrow D$ . Una posible explicación alterna es la existencia de agregación (discutida y descartada en el siguiente apartado).

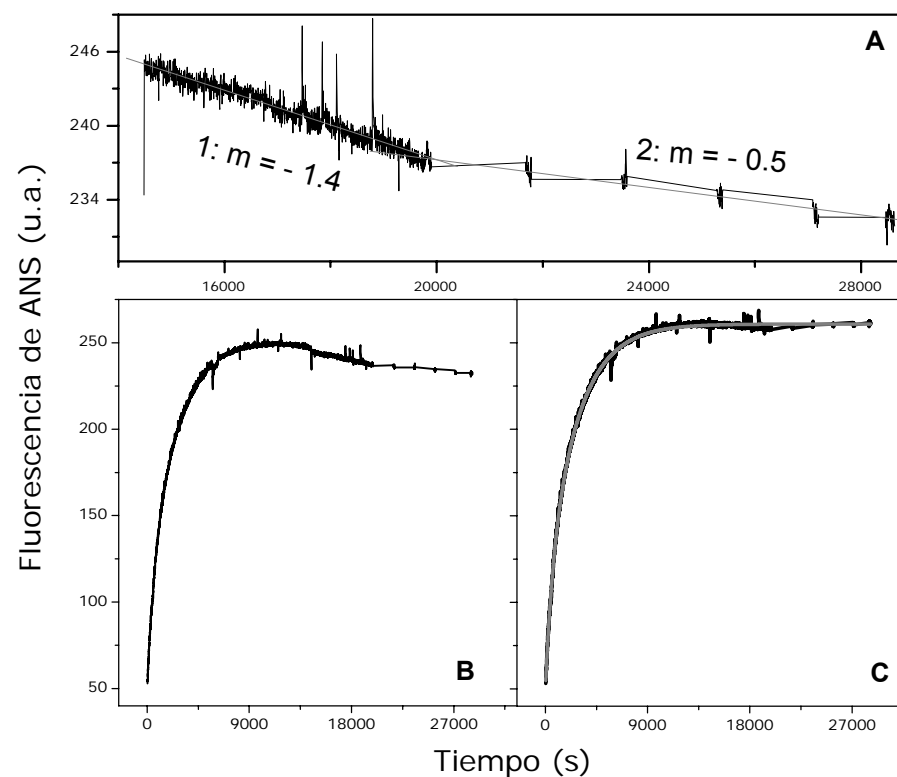
El fenómeno de fotodescomposición fue corregido antes del análisis de cada experimento. En el intervalo de tiempos largos, donde los puntos presentaron el fenómeno se extrapolaron todos los puntos y se restó el comportamiento final extrapolado al trazo cinético (figura 15).

## Agregación

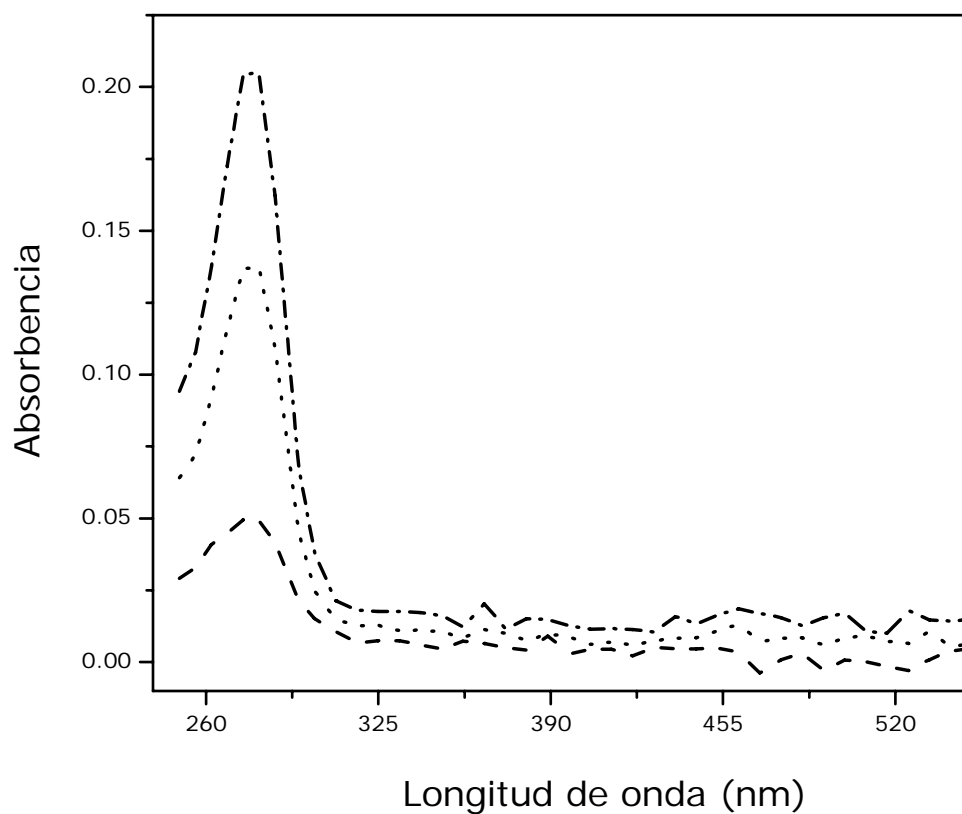
Al sospechar la existencia de posibles agregados se realizaron curvas de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo a distintas concentraciones: 0.85, 2.4 y 3.5  $\mu\text{M}$  utilizando Fi. Los resultados no son compatibles con la presencia de agregación, pues al ajustar estas curvas al modelo de doble exponencial, los valores para las constantes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  resultaron ser muy parecidos en los experimentos con las tres concentraciones ensayadas (Tabla 6). Esta independencia de la cinética con la concentración nos indica que no se está formando una especie multimérica o agregada. Aún así, se decidió determinar los espectros de UV para las tres muestras anteriores, volviéndose a encontrar que no existe la agregación, ya que en los espectros no se observa dispersión de radiación en la región de 310 a 400 nm (Figura 16).



**Figura 14.** Curva de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo de la CXP en Fans a 25 °C y pH 2. A partir de una longitud de onda de excitación de 380 nm y emisión a 484 nm. La concentración de proteína fue de 0.85  $\mu\text{M}$  y con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS.



**Figura 15.** Curva de desplegamiento a pH ácido en función del tiempo de la CXP en Fans a 20 °C y pH 2. A partir de una longitud de onda de excitación de 380 nm y emisión a 484 nm. La concentración de proteína fue de 0.85  $\mu\text{M}$  y con proporción molar de 1:100 respecto a la concentración de ANS. **A)** Curva con tiempo muerto equivalente a 14500 s, empieza a recolectarse cuando se manifiesta el fenómeno de fotooxidación en las líneas con pendiente distinta: (1) La muestra estuvo expuesta de manera continua al haz de luz incidente por 5000 s y (2) La muestra estuvo expuesta por periodos de 1 minuto al haz de luz incidente. **B)** Curva de desplegamiento con el fenómeno presente. **C)** Curva de desplegamiento con el fenómeno corregido.



**Figura 16.** Espectros de UV correspondientes a la papaína sin modificar después de haber sido desplegada a 37.5 °C y pH 2 a las siguientes concentraciones: 0.85 μM --, 2.4 μM ..... y 3.5 μM ---. Estos espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$k_1 \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^3 \text{ (s}^{-1}\text{)}$
0.85	$15.0 \pm 2.3$	$2.5 \pm 1.2$
2.40	$15.1 \pm 2.2$	$4.7 \pm 0.7$
3.50	$14.4 \pm 1.4$	$4.4 \pm 0.3$

**Tabla 6.** Constantes de velocidad para la PAP obtenidas a partir del ajuste individual a un modelo de exponencial doble de las curvas de desnaturalización a pH ácido en función del tiempo a diferentes concentraciones a 37.5°C y determinadas por Fi.

## 5. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que la estabilidad de la papaína es modificada por la naturaleza del derivatizante y que el reporte de la existencia de A no es un artificio de la interacción del inhibidor con el sitio activo. Esto se desprende de los espectros y los resultados obtenidos de las curvas de desnaturalización ácida en función del tiempo en las diferentes técnicas espectroscópicas al comparar las muestras de CXP y CBP con la PAP.

En las tres especies a pH 2 los cambios en la señal inducidos por el pH 2 están relacionados con la pérdida de contactos terciarios. En Fi el cambio de la señal (desplazamiento al rojo) se debe a la exposición de residuos de triptófano y en DC los cambios indican una pequeña reducción del contenido de estructura helicoidal (aproximadamente 34 residuos), este resultado es compatible con un reporte sobre la pérdida helicoidal en la región del dominio N-terminal [51], donde la estructura es principalmente hélice. La Fans a 484 nm ha indicado la existencia inequívoca de un estado intermediario ácido (A), Jagnadaham et al. [46] en su trabajo sobre la CXP demuestran que este intermediario posee ambos dominios plegados, aunque no existen contactos remanentes de estructura terciaria. En la PAP y la CBP sucede lo mismo, la formación de un estado A con características similares, aunque con estabilidad diferente, la causa de esta diferencia radica en la carga del derivatizante y su interacción con el momento dipolar de la hélice  $\alpha$  que contiene a la Cys<sup>25</sup> (residuo de aminoácido encargado de la actividad), y de modificación química. En los resultados se puede observar que la estabilidad de las especies estudiadas decrece de la siguiente forma: CBP, PAP y CXP. Aún, con estas diferencias, se puede generalizar para todas las especies un proceso de desplegamiento de más de dos estados al pasar del estado nativo (N) al estado desnaturalizado (D).



---

El estado A, ha mostrado tener un tiempo de vida lo suficientemente grande para aislar el proceso  $N \rightarrow A$  del  $A \rightarrow D$ . Sin embargo, el primero de estos procesos es irreversible a juzgar por la pérdida constante de la señal de Fi y sugirieron Edwin y Jagannadham [46]. Además, por la pérdida de conformación continua de la especie A, se puede concluir que ésta no es termodinámicamente estable y no retiene la mínima actividad funcional. Esto confirma que la región del sitio activo no sólo es importante para la actividad sino también para la estabilidad de la estructura.

El cambio de conformación se corrobora con el trabajo realizado sobre la estructura cristalográfica de papaína (PDB ID 9PAP), modificada como CBP en donde se observa la fuerza interdominio por la interacción iónica entre el oxígeno aniónico del grupo carboximetil de la Cys<sup>25</sup> dominio I con el grupo indol de la His<sup>159</sup> del dominio II. Esta interacción iónica puede ser la responsable de las diferencias cinéticas en la formación de A, como lo muestra la naturaleza bifásica de los experimentos seguidos por DC y por fluorescencia, los cuales sugieren la existencia de otro estado intermediario: I.

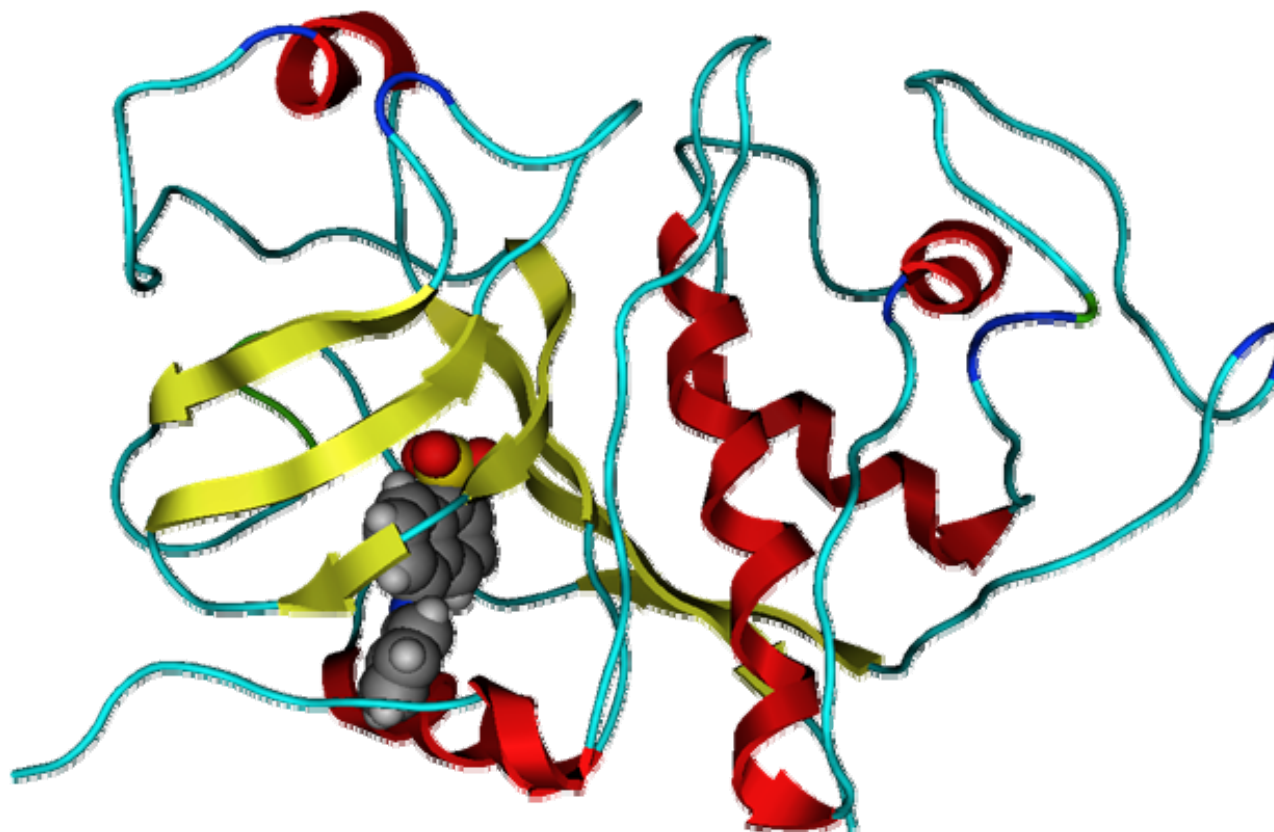
El estado intermediario I es cinético y se localiza bajo condiciones ácidas en el proceso de desplegamiento de  $N \rightarrow A$ . Este mecanismo implica la existencia de dos estados de transición, el primero se localiza en el proceso desplegamiento de  $N \rightarrow I$  y el segundo en el proceso de desplegamiento de  $I \rightarrow A$ . Los estudios en I y A, indican que estas conformaciones son formas inactivas, pero no por ello menos interesantes. La especie A mantiene gran parte de su estructura secundaria intacta, estructura similar a N. Los resultados son suficientes para distinguir las trayectorias de los procesos en estudio como  $N \rightarrow I$  e  $I \rightarrow A$ . A partir de allí, podemos concluir que el mecanismo global que describe el desplegamiento de la papaína a pH 2 es de más de dos estados, al pasar de su estado nativo al estado desnaturalizado según el siguiente esquema  $N \rightarrow I \rightarrow A \rightarrow D$ .

Asumiendo la validez del mecanismo propuesto, se exploraron los sitios posibles para enlazar ANS como molécula reportera. Para tal efecto se utilizaron simulaciones de dinámica molecular sobre la estructura de papaína sin inhibir con los residuos de Glu y Asp protonados para simular el efecto de un pH ácido. Las simulaciones localizaron tres cavidades principales para ocultar al ANS y intensificar la intensidad de su señal (figuras 5 y 6), a) un centro hidrofóbico en el dominio II dentro de un barril beta (Figura 17); las otras dos cavidades se localizan en regiones del interdominio, b) entre la hélice 1 y 3 y un barril beta del dominio II, y c) una cavidad formada por la hélice 1 y el segmento 12-17 con el barril beta del dominio II. Los resultados son consistentes con los obtenidos para dicroísmo circular, donde se sugirió la correspondencia del glóbulo fundido con un desplegamiento parcial del dominio I, lo cual permite albergar tres moléculas de ANS. Sin embargo, el decrecimiento de la fluorescencia intrínseca durante el paso  $N \rightarrow I$  se asigna a cambios en los residuos de triptófano 26 y 70, situados en hélices del dominio, por lo tanto los cambios en la etapa  $I \rightarrow A$  pueden ser causados por la modificación de las condiciones del medio y otros residuos de triptófano, situados en el dominio II.

Al comparar los cambios de las entalpías de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) obtenidas a pH 2 para estas tres especies con las reportadas para otras proteasas sulfhídricas como la quimopapaína ( $230 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [22] y la caricaína ( $109 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) [43-44] se puede observar que los valores de  $\Delta H^\ddagger$  son del mismo orden de magnitud. Debe considerarse que estos últimos se obtuvieron a partir de curvas de desnaturalización térmica y no por el cambio de pH. Las diferencias en entalpía de activación podrían ser causadas no sólo por diferencias en secuencia y contactos sino por el efecto del pH en la estabilidad de estas proteínas y específicamente sobre sus conformaciones, pues a pesar de tener masas moleculares y estructuras cristalinas semejantes, el número y la identidad de residuos de aminoácidos ionizables no es el mismo, como se manifiesta en las diferencias de

los puntos isoeléctricos de estas proteasas 8.75, 10.3 y 11.0, para papaína, quimopapaína y caricaína, respectivamente.

En resumen la desnaturalización ácida de la papaína sin inhibir sigue un mecanismo secuencial  $N \rightarrow I \rightarrow A \rightarrow D$ . Irreversible en todas sus etapas, I representa un estado intermediario cinético poblado sólo durante los primeros minutos, A es una conformación similar a un glóbulo fundido estable durante varias horas y D es el estado desplegado de la molécula, el cual empieza a acumularse después de varias horas de incubación. Los resultados de la inhibición de la Cys<sup>25</sup> para generar las especies CBP y CXP son cualitativamente similares pero cuantitativamente distintos, lo que indica la importancia de este aminoácido en la estabilidad y cinética de desplegamiento de la papaína.



**Figura 17.** Modelado molecular resultado de la dinámica molecular a 500 K de una muestra de papaína sin modificar, simulando el proceso hacia el estado A. En su interior alberga una molécula de ANS.

## 6. CONCLUSIONES

- La papaína sigue un proceso de más de dos estados al pasar de su estado nativo a la conformación a pH 2.
- En las tres especies estudiadas existe el estado A. El tiempo de vida de la especie A es suficientemente grande para aislar el proceso  $N \rightarrow A$  del  $A \rightarrow D$ . El proceso  $N \rightarrow A$  no es reversible. A no es termodinámicamente estable, por lo cual no existe un equilibrio entre estas especies.
- Hasta el momento se ha detectado un estado intermediario cinético (I) y un estado intermediario a pH ácido (A). El estado I se localiza entre los estados N y A.
- La estabilidad de la papaína es afectada por la naturaleza del inhibidor, una causa de este comportamiento podría radicar en la interacción del inhibidor con la hélice  $\alpha$  (que contiene a la Cys<sup>25</sup>). El desplegamiento es secuencial, primero el dominio helicoidal.
- La existencia de un intermediario no se debe a heterogeneidad en la muestra o variaciones en los equipos, porque se descartaron la autohidrólisis, la fotooxidación, la oxidación de la Cys<sup>25</sup> y agregación, así como estándares de calibración en los equipos.
- Las entalpías de activación obtenidas para las tres especies son semejantes a las reportadas para otras proteasas sulfhidrúlicas.

## 7. PERSPECTIVAS

Aunque en este trabajo se caracterizó con detalle el proceso de desplegamiento de la PAP desde el estado N hasta el A, falta entender la etapa final  $A \rightarrow D$  a fin de precisar un modelo completo para su desnaturalización ácida. Dos razones existieron para no realizar estos experimentos, primero el proceso es lento y requiere tiempos más largos o temperaturas mayores. La otra razón, A es inactivo e irreversible por lo que el impacto biotecnológico asociado al proceso de desplegamiento de esta especie resulta limitado.

Por otra parte, una perspectiva más interesante consiste en probar sobre la Cys<sup>25</sup> otros isómeros con grupos de igual tamaño que aportaran una diferencia de carga para evaluar los cambios conformacionales o de estabilidad ocasionados por la interacción con el momento dipolar de la hélice que contiene al residuo 25. Con este mismo fin, es interesante verificar si una modificación (mutación) del residuo Cys<sup>25</sup> por Ala o Ser podría llevar a la reversibilidad del proceso  $N \rightarrow I$ , como se ha observado para otros miembros de la familia, como la catepsina B, y en su caso tratar de explicar la razón de dicho comportamiento.

Otra posibilidad, es realizar este trabajo en condiciones de pH más alto para buscar alternativas de reversibilidad, pues la posible aplicación tecnológica de resultados de estabilidad o recuperación de la actividad podría extrapolarse a otras proteasas sulfhidríticas de interés médico, industrial y de tecnología de los alimentos.

---

## 8. REFERENCIAS

1. Wiederanders B, Kaulmann G, Schilling K. (2003). Functions of propeptide parts in cysteine proteases. *Curr Protein Pept Sci.*, **4**(5), 309-26.
2. Schilling K, Körner A, Sehmisch S, Kreusch A, Kleint R, Benedix Y, Schlabrakowski A, Wiederanders B. (2009) Selectivity of propeptide-enzyme interaction in cathepsin L-like cysteine proteases. *Biol Chem.*, **390**(2), 167-74.
3. Vernet T, Berti PJ, de Montigny C, Musil R, Tessier DC, Ménard R, Magny MC, Storer AC, Thomas DY. (1995). Processing of the papain precursor. The ionization state of a conserved amino acid motif within the pro region participates in the regulation of intramolecular processing. *J Biol Chem.*, **270**(18), 10838-46.
4. Sanchez-Ruiz JM. (2010). Protein kinetic stability. *Biophys Chem.*, **148**(1-3),1-15.
5. Johnson SM, Wiseman RL, Sekijima, Green NS, Adamski-Werner SL, Kelly JW. (2005). Native state kinetic stabilization as a strategy to ameliorate protein misfolding diseases: a focus on the transthyretin amyloidoses. *Acc Chem Res.*, **38**(12), 911-21.
6. Bowman GR, Pande VS. (2010) Protein folded states are kinetic hubs. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **107**(24), 10890-5.
7. Ladokhin AS, Fernández-Vidal M, White SH. (2010) CD spectroscopy of peptides and proteins bound to large unilamellar vesicles. *J Membr Biol.*, **236**(3), 247-53.
8. Leandro J., et al., (2010) Phenylketonuria as a protein misfolding disease: The mutation pG46S in phenylalanine hydroxylase promotes self-association and fibril formation, *Biochim. Biophys. Acta*, EN PRENSA
9. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson BH. (2005) Transient interaction with nanoparticles "freezes" a protein in an ensemble of metastable near-native conformations. *Biochemistry*, **44**(30), 10093-9.
10. Tutar Y, Arslan D, Tutar L. (2010) Heat, pH induced aggregation and surface hydrophobicity of *S. cerevesiae* Ssa1 protein. *Protein J.*, **29**(7), 501-8.
11. Ahmad E, Fatima S, Khan MM, Khan RH. (2010) More stable structure of wheat germ lipase at low pH than its native state. *Biochimie*, **92**(7), 885-93.
12. Yadav SC, Jagannadham MV, Kundu S. (2010) Equilibrium unfolding of kinetically stable serine protease milin: the presence of various active and inactive dimeric intermediates. *Eur Biophys J.*, **39**(10), 1385-96.
13. Jacobs DJ. (2010) Ensemble-based methods for describing protein dynamics. *Curr Opin Pharmacol.*, Oct 19.
14. Wang GM, Sandberg WC. (2010) Complete all-atom hydrodynamics of protein unfolding in uniform flow. *Nanotechnology*, **21**(23), 235101.

15. Mickler M, Dima RI, Dietz H, Hyeon C, Hirumalai D, Rief M. (2007) Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using single-molecule experiments and simulations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(51), 20268-73.
16. Dardenne LE, Werneck AS, de Oliveira Neto M, Bisch PM. (2003) Electrostatic properties in the catalytic site of papain: A possible regulatory mechanism for the reactivity of the ion pair. *Proteins.*, **52**(2), 236-53.
17. Almeida PC, Nantes IL, Rizzi CC, Júdice WA, Chagas JR, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL. (1999) Cysteine proteinase activity regulation. A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* **274**(43), 30433-8.
18. Turk B, Turk D, Turk V. (2000) Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.*, **1477**(1-2), 98-111.
19. Wiederanders B. (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol.*; **50**, 691-713.
20. Yamamoto Y, Kurata M, Watabe S, Murakami R, Takahashi SY. (2002) Novel cysteine proteinase inhibitors homologous to the proregions of cysteine proteinases. *Current Protein and Peptide Science*, **3**, 231-238.
21. Baker EN, Drenth J. (1987) En: Biological macromolecules and assemblies. (Jurnek, FA y McPherson, A. Ed.) John Willey & Sons. Vol. 3, 313-368.
22. Arnon R. Papain, in: G.E. Perlman and L. Lorand (Eds.), *Methods in Enzymology, Proteolytic enzymes*, Academic Press, Vol. XIX, (1970), 227-252.
23. Liener IE. (1974) The sulfhydryl proteases. *Adv. Chemistry Series*, **136**, 146-219.
24. Bender ML y Brubacher L.J. (1964) The Preparation and properties of trans-Cinnamoyl-Papain. *J. Amer. Chem. Soc.*, **86**, 5333.
25. Kamhuis IG, Drenth J, Baker EN. (1985) Thiol proteases: Comparative studies based on the high-resolution structures of papain and actinidin, and on amino acid sequence information for cathepsins B and H, and stem bromelain. *J. Mol. Biol.*, **182**, 317-329.
26. Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu QL, Sahagian GC. (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch. Biochem. Biophys.*, **311**, 19-37.
27. Lundblad RL, Bradshaw RA. (1997) Applications of site-specific chemical modification in the manufacture of biopharmaceuticals: I. An overview. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **26**, 143-151.
28. Na BK, Kang JM, Cheun HI, Cho SH, Moon SU, Kim TS, Sohn WM. (2009) Cryptopain-1, a cysteine protease of *Cryptosporidium parvum*, does not require the pro-domain for folding. *Parasitology*, **136**:149-57.
29. Balls AK, Linewaver H, Thomson RR. (1937) Isolation and properties of crystalline papain. *Science*, **86**, 379-388.
30. Kimmel JR, Smith EL. (1954) Crystalline papain: I. Preparation, specificity, and activation. *J. Biol. Chem.*, **207**, 515-531.



- 
31. Glazer AN, Smith EL (1971) Papain and other sulfhydryl proteolytic enzymes. En: The Enzymes. Ed. P. D. Boyer. Academic, New York. Vol. III, 501-546.
  32. Smith EL, Kimmel JR, Brown DM. (1954) Crystalline papain: II. Physical studies; the mercury complex. *J. Biol. Chem.*, **207**, 533-549.
  33. Smith EL, Stockell A, Kimmel JR. Crystalline papain: III. Amino acid composition. (1954) *J. Biol. Chem.*, **207**, 551-561.
  34. Thomson OP. (1954) Crystalline papain: IV. Free amino groups and N-terminal sequence. *J. Biol. Chem.*, **207**, 563-574.
  35. Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R, Wolthers BG. (1971) Papain, X-Ray structure. En: The Enzymes (P. D. Boyer Ed.) Academic, New York. Vol. III, 485-499.
  36. Kamphuis IG, Kalk KH, Swarte MBA, Drenth J. (1984) Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **179**, 233-256.
  37. Drenth J, Jansonius JN, Koekoek R, Wolthers BG. (1971) The structure of papain. *Adv. Protein Chem.* **25**, 79-115.
  38. Linderström-Lang (1924) On the ionisation of proteins. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, **1**, 15-70.
  39. Privalov PL. (1979) Stability of protein small globular proteins. *Adv. Protein Chem.*, **33**, 167-241.
  40. Oliveberg M, Vuilleumier S, Fersht AR. (1994) Thermodynamic study of the acid denaturation of barnase and its dependence on ionic strength: Evidence for residual electrostatic interactions in the acid/thermally denatured state. *Biochemistry*, **33**, 8826-8832.
  41. Bashford D, Karplus M. (1990) pKa's of ionizable groups in proteins: atomic detail from a continuum electrostatic model. *Biochemistry*, **29**, 10219-10225.
  42. Gutiérrez-González, LH., Tesis de Maestría: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa (1997).
  43. Solís-Mendiola S, Gutiérrez-González, LH, Arroyo-Reyna A, Padilla-Zúñiga JA, Rojo-Domínguez A, Hernández-Arana A. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1388**, 363-372.
  44. López-Arenas L, Solís-Mendiola S, Hernández-Arana A. (1999) Estimating the degree of expansion in the transition state for protein unfolding: Analysis of the pH dependence of the rate constant for caricain denaturation *Biochemistry*, **38**, 15936--15943.
  45. Oliveberg M, Arcus VL, Fersht AR. (1995) pKa values of carboxyl groups in the native and denatured states of barnase: the pKa values of the denatured state are on average 0.4 units lower than those of model compounds. *Biochemistry*, **34**, 9424-9433.
  46. Edwin F, Jagannadham MV. (1998) Sequential unfolding papain in molten globule state. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **252**, 654-660.
  47. Padilla-Zúñiga AJ, Rojo-Domínguez A. (1998) Non-homology knowledge-based prediction of the papain prosegment folding pattern: a description of plausible folding and activation mechanisms. *Folding and Design*, **3**, 271-284.

48. Groves MR, Taylor MA, Scott M, Cummings NJ, Pickersgill RW, Jenkins JA. (1996) The prosequence of procaricain forms an  $\alpha$ -helical domain that prevents access to the substrate-binding cleft. *Structure*, **4**, 1193-1203.
49. Tello-Solís SR. (2000) *Afinidad*, **63**, 457-461.
50. Tiktopulo EI, Privalov PL. (1978) Papain denaturation is not a two-state transition. *FEBS Letters*, **91**, 57-58.
51. Hernández-Arana A, Soriano-García M. (1988) Detection and characterization by circular dichroism of a stable intermediate state formed in the thermal unfolding of papain. *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 170-175.
52. Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV. (2002) Stabilization of molten globule state of papain by urea. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **290**, 1441-1446.
53. Lundblan RL. Techniques in protein modification. CRC Press.
54. Sluyterman AE, Wijdenes J. (1980) The effect of thiol compounds on the autolysis of papain. *Eur. J. Biochem.*, **113**, 189-193.
55. Mitchel RE, Chaikes IM, Smith E. (1970) Chemistry and metabolism of macromolecules. The complete amino acid sequence of papain: additions and corrections. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3485-3492.
56. Shapira E, Arnon R. (1969) Cleavage of one specific disulfide bond in papain. *J. Biol. Chem.*, **244**, 1026-1032.
57. Cornely K, Crespo E, Earley M, Kloter R, Levesque A, Pickering M. (1999) Kinetics of Papain: An Introductory Biochemistry Laboratory Experiment. *J. Chem. Edu.*, **76**, 644-645.
58. Robinson GW. (1975) Isolation and characterization of papaya peptidase A from commercial chymopapain. *Biochemistry*, **14**, 427-468.
59. Ellman GL. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
60. Wright SK, Ronald EV. (1998) Evaluation of methods for the quantitation of cysteines in proteins. *Analytic. Biochem.*, **265**(1), 8-14.
61. Creighton TE. (1989) Protein Structure: A practical approach; Ed. IRL PRESS Oxford, pp 155-159.
62. Ménard R, Khouri HE, Plouffe C, Dupras R, Ripoll D, Vernet T, Tessier DC, Lalberté F, Thomas DY, Storer AC. (1990) A protein engineering study of the role of aspartate 158 in the catalytic mechanism of papain. *Biochemistry*, **29**(28), 6706-13.
63. Phast System, Separation Technique No. 111 (1991) Pharmacia LKB.
64. Phast System, Separation Technique No. 121 (1991) Pharmacia LKB.
65. Phast System, Development Technique No. 200 (1991) Pharmacia LKB.
66. Hennessey JP Jr, Johnson WC Jr. (1982) Experimental errors and their effect on analyzing circular dichroism spectra of proteins. *Anal Biochem.* **125**(1), 177-88.

- 
67. K2D Prediction of percentages of protein secondary structure from CD spectra. En: <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>. Noviembre, 2010.
  68. Sreerama N, Woody RW. (2000) Estimation of protein structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON y CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.*, **287**, 252-260.
  69. Manavalan P, Johnson WC Jr. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Anal. Biochem.*, **167**, 76-85.
  70. Compton LA, Johnson WC Jr. (1986) Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, **155**, 155-167.
  71. Chemical Computing Group. Molecular Operating Environment (MOE) En: [www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com). Noviembre, 2010.
  72. Song J, Xu P, Xiang H, Su Z, Storer AC, Ni F. (2000) The active-site residue Cys-29 is responsible for the neutral-pH inactivation and the refolding barrier of human cathepsin B. *FEBS Lett.*, **475**, 157-162.
  73. Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV. (2002) Stabilization of molten globule of papain by urea. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **290**, 1441-1446.
  74. Khatun S H, Rasheedi S, Hasan RK. (2002) Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 47-52.
  75. Huet J, Looze Y, Bartik K, Rausens V, Wintjens R, Boussard P. (2006) Structural characterization of the papaya cysteine proteinases at low pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **341**, 620-626.

# Metastability of Papain and the Molecular Mechanism for its Sequential Acid-Denaturation

Rosa Eréndira Fosado-Quiroz ·  
Arturo Rojo-Domínguez

Published online: 15 March 2011  
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

**Abstract** Acid unfolding of non-inhibited papain at pH 2 was studied by means of spectroscopic and electrophoresis techniques as well as activity assays. We found a molten globule like species (A state) similar to that previously reported for bromelain and S-carboxy-methyl-papain. We demonstrated that this A state is not thermodynamically stable but a metastable conformer which decays into an unfolded conformation in a few hours. The mechanism of acid unfolding to the A state proved to be completely irreversible, with a biphasic time evolution of spectroscopic signals characteristic of the existence of a kinetic intermediate. This latter species showed properties in-between native and A state such as secondary structure, exposition of hydrophobic area and tryptophan environment, but a native like hydrodynamic radius. Native papain seems to unfold at acid pH through at least two kinetic barriers, being its proregion mandatory to conduct and stabilize its active structure. Computer simulations of acid unfolding, followed by ANS docking, identified three regions of cavity formation induced by acid media which might be used as regions to be fortified by protein

engineering in the quest for extreme-resistant proteases or as hot-spots for protease inactivation.

**Keywords** Thiol or cysteine protease · Proteinase denaturation · Kinetic intermediate · Intrinsic and ANS fluorescence · Circular dichroism · Molecular mechanism of acid unfolding · Stability and irreversibility

## Abbreviations

CXP	S-carboxy-methyl papain
SDS	Sodium dodecyl sulfate
ANS	8-Anilino-1-naphthalensulfonic acid
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
CD	Circular dichroism
Fi	Intrinsic fluorescence
Fans	ANS fluorescence

## 1 Introduction

Native structure is responsible for protein function and its stability is determined by a complex balance of enthalpic and entropic contributions whose addition yields the specific landscape of free energy for each protein, in the particular conditions of its environment. Among the proteins studied, proteases are remarkably interesting since they are generally produced and folded as inactive zymogens, to avoid an uncontrolled proteolytic activity during their synthesis and storage [58]. Latent zymogens are then converted into the active enzymes by hydrolysis of a specific part of its polypeptidic chain, triggered by changes in the media [47, 55]. Their cleavage produces a molecule with proteolytic capability, frequently in a metastable state; this means a thermodynamically unstable conformation which is maintained

R. E. Fosado-Quiroz  
Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Coordinación  
Académica Región Altiplano, COARA, Carretera a Cedral Km  
5+600, Ejido San José de las Trojes, 78700 Matehuala, San Luis  
Potosí, Mexico

A. Rojo-Domínguez (✉)  
Departamento de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma  
Metropolitana, Unidad Cuajimalpa, Pedro Antonio de los Santos  
84, Col. San Miguel Chapultepec, 11850 Mexico, D.F., Mexico  
e-mail: arojo@correo.cua.uam.mx

R. E. Fosado-Quiroz · A. Rojo-Domínguez  
Departamento de Química, Universidad Autónoma  
Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Apartado Postal 55-534,  
09340 Mexico, D.F., Mexico

by a kinetic barrier whose height is known as the activation energy of unfolding. Knowledge of the molecular basis of this barrier allows in principle the engineering of the structure in order to modify its kinetic stability [7, 46]; on the one hand to increase it to achieve a longer shelf-life of a product or resistance to the conditions of industrial processes [12, 46]; and on the other hand, to find sensitive regions for specific inhibitors capable of denaturing or interfering with the structure in a drug design process [29]. Moreover, there is a renovated dedication for detecting these types of metastable conformations [66] and even the subproteome of kinetically stable proteins [61]. For these and other reasons, the molecular knowledge of protein folding kinetics has been recently declared as a “classic grand challenge in molecular biophysics” [6]. The use of circular dichroism and other spectroscopic techniques to study metastability of proteins of medical, nanotechnological or biochemical interest has been widely used in recent publications [32, 33, 36] employing pH as denaturing agent [2, 62], as well as the use of computer simulations or combined experimental-computational approaches to understand the process in molecular detail [28, 39].

The archetype of the papain-like proteases is precisely papain [3, 16]; this is the most abundant group of cysteine proteases [54], also named family C1 of the clan CA [57]. These enzymes have long been implicated in a wide variety of human diseases [3, 55] and hence they are potential targets for specific inhibitor design [63]. Also, the proteolytic activity of these proteins has been used or prevented in food and industrial processing, organic synthesis, cosmetic and pharmaceutical purposes, among other uses [9, 10, 44, 52, 53]. Recently there has been a renewed interest in the study of the intermediate species and the unfolding/refolding process of the mature form of cysteine proteases, used in different biotechnological applications [11, 17, 31, 40].

Cysteine or thiol proteinases are biologically produced as inactive zymogens with an N-terminal proregion composed of 40–110 amino acid residues, required for the proper folding and expression of the rest of the chain [55], and a 200–260-residue protease moiety. During activation, proregions are hydrolyzed leaving the enzymes in a metastable but active conformation. These enzymes share not only its catalytic triad –formed by Cys25, His159 and Asn175, papain numbering– but also its folding pattern. The structure of the mature enzyme is constituted by two domains of about the same size named L and R; the first in the N-terminus of the sequence mainly made up by alpha helices; and the other is a beta barrel formed by seven strands, and two small helices flanking the top and bottom of the barrel. Residues of the active site are situated in both domains; therefore, this site is located in the interdomain crevice [54, 56].

It is known that the stability of proteins is reduced at extreme pH values due to the repulsive interactions between

ionic groups, causing the denaturation of the macromolecule [34, 35]. This decrement of the stability has been observed and documented for several proteins [1, 13, 41, 43, 45]. Particularly, this behavior has been observed in the irreversible thermal denaturation of two enzymes closely related to papain: caricain and chymopapain. In the study of these cysteine proteases a strong effect of the pH on their thermodynamic parameters of activation was observed, caused by the great number of ionic pairs in their structures [34, 48]. Acid unfolding studies would also contribute to the identification of native contacts which should be intact for proper refolding of the enzyme, thus suggesting the possible action of prosegment as a foldase or chaperon-like agent [8, 23, 65]. Also, it would show the most sensitive zones of the structure to acid-pH jump, and the first steps needed to unfold the structure, thus providing a theoretical scaffold for structural engineering of papain and other proteases to increase their resistance to acid media.

Papain, a 212 residue cysteine proteinase, is widely used in industrial processes [12] and its denaturation has proved to be completely irreversible in an ample variety of conditions, with the exception of an acid denatured form at pH 2, reported as stable and with characteristics of a molten globule [18], and a partial reversibility reported for thermally unfolded papain at pH 2.6 [26]. Reversibility was also reported for the very first steps of the process to arrive at the acid state of caricain [27]. The spectroscopic signals of the acid state of papain (A) reported reversible, were found to return to the native state when the neutral pH were restored, although the same group reported later that papain acid denaturation was irreversible from pH 2 in the presence of urea [19]. In addition, the lack of proteolytic activity was also reported after unfolding of all four papaya proteases [27]. Some of these studies were performed on an inhibited S-carboxy-methyl-papain derivative to avoid the possibility of autoproteolysis during the experiments.

In this work, we studied the acid denaturation of non-inhibited papain since this species allows the use of activity assays to check for renaturation and for residual activity of intermediate species, and also because it has been reported in a member of this family, cathepsin B, that mutation of the active site Cys to Ala significantly modifies its stability and reversibility upon denaturation [50]. Since the active site interacts with atoms of both domains, we also explored the effect of the presence of a negative charge in the interdomain region through the derivatization of Cys25. Finally we explored the stability of papain and the kinetics of its unfolding through the use of spectroscopic, biochemical, and computational tools. The purpose of these experiments is to find details of the molecular mechanism of its acid denaturation, to characterize the atomic properties of some of the intermediate species, and to investigate the reversibility of the denaturation process, due to

published controversial results regarding the possibility of reversibility at least in the early events of mature enzyme unfolding. The interest of these studies deals, on the one hand, with basic science, since one of the most elusive and important tasks in structural biology is the study of protein conformational changes. Much work has been done on single-domain protein structures [62] and it is important to complement our knowledge with studies of more complex structures, like the unfolding of the two-domain structure of papain. On the other hand, protease activity has been employed in a variety of biotechnological processes and for medical and drug design purposes, therefore, molecular knowledge of the stability of papain as archetype of a family would shed light on their rational stabilization or inhibition. Knowledge derived from the studies of papain acid unfolding might indicate some modifications to the structure to stabilize it [12] against acid media, for example for its use as an oral drug in antihelminthic treatments, as proposed by Huet et al. [27]. It will also allow us to understand the role of some residues for drug design in the search for specific inhibitors against papain-like human cathepsins [21, 59] and even against newly identified proteins of medical interest which contain the catalytic triad of papain but are unrelated in sequence [64].

## 2 Methods

### 2.1 Materials

2× crystallized papain (EC 3.4.22.2) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO) lots 101H7090, 67H7020 and 17H70116. Protein concentration was determined by its specific absorbance,  $A_{278\text{nm}} = 2.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [22]. The active form at pH 5 was identical to the spectroscopic and electrophoretic properties previously reported for this protein [5, 14], and it was used without further purification throughout this study. Homogeneity of the preparation was checked by SDS and native PAGE in homogeneous gels (12.5%), performed in a Phast System (Amherstam). Silver staining of similar native gels were used to demonstrate the absence of autoproteolytic events after papain assays at pH 2.0. ANS (8-anilino-1-naphthalene-sulfonic acid) was also purchased from Sigma. A stock solution of ANS 15 mM was prepared in Gly-HCl 50 mM, pH 2 for further use. The concentration of ANS was determined using an extinction coefficient of  $\epsilon = 5,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 350 nm [30].

### 2.2 Preparation of S-Carboxy-Methyl Papain (CXP)

We optimized the protocol for complete papain inhibition. The free thiol group of papain was reduced dissolving the enzyme at a final concentration of  $1.6 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $69 \mu\text{M}$ )

in a pH 5 solution with a 500-fold molar excess of cysteine and a 100-fold molar excess of EDTA. This solution was incubated at room temperature for 30 min under nitrogen atmosphere. Then a 1,000-fold molar excess of iodoacetic acid, previously adjusted to pH 5, was added; and the final mixture was allowed to react first during 30 min with nitrogen bubbling at room temperature and then at least during 5 h at 4 °C. All solutions were prepared in sodium acetate buffer 30 mM, pH 5. After inhibition of the enzyme, excess reagents were removed by exhaustive dialysis against the same acetate buffer. The final preparation showed no detectable activity.

### 2.3 Titration of Free Thiol Groups

The free-sulfhydryl content of papain before and after inactivation was assayed first reducing the thiol group as described for the CXP preparation and then titrated with 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) as proposed by Ellman [60]. The protein sample was first extensively dialyzed against sodium acetate buffer to remove cysteine excess, and then 20  $\mu\text{L}$  of previously filtered 8 mM DTNB, in TRIS buffer 0.30 M, pH 8 were added to 75  $\mu\text{L}$  of protein solution ( $1.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ). The nitrothiobenzoate produced was quantified by its absorbance at 412 nm using an extinction coefficient of  $14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [15].

### 2.4 Enzyme Assay

Papain ( $0.020 \text{ mg mL}^{-1}$ ) was first activated during 10 min with cysteine and EDTA as described for the CXP preparation. Activity of an enzyme solution ( $5.2 \times 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$ ) was determined at 25 °C against N-CBZ-Phe-Arg 7-amido-4-methyl-coumarin hydrochloride [38] (0.15 mM). Reaction rates were monitored by 7-amino-4-methyl-coumarin production in an ISS K2 spectrofluorometer with excitation and emission wavelengths of 380 and 460 nm, respectively; and slit widths of 10 and 5 nm for excitation and emission, respectively.

### 2.5 Acid Denaturation of Papain

Acid denaturation of papain was monitored with different spectroscopic techniques after mixing 80  $\mu\text{L}$  of a stock papain solution prepared in sodium acetate buffer (pH 5, 30 mM) to 2,920  $\mu\text{L}$  of a Gly-HCl buffer (pH 2.0, 50 mM) previously incubated at the temperature of the experiment. Final protein concentration was  $0.85 \mu\text{M}$  ( $0.020 \text{ mg mL}^{-1}$ ) and rapid mixing was promoted by magnetic stirring inside 1.0 cm pathlength cuvettes. At the end of all kinetic experiments the final pH was measured and found to be in the 1.96–2.03 interval. Temperature in all instruments was controlled with a Peltier type cell holder and actual



temperatures within the cell were measured with an immersible thermistor probe.

## 2.6 Circular Dichroism Spectra

Circular dichroism (CD) measurements were recorded at 20 °C in a JASCO J-715 spectropolarimeter. Conformational changes in the secondary structure of the protein were monitored in the region of the far ultraviolet (190–250 nm). Spectral data were expressed as mean residue ellipticities,  $[\theta]$ . The instrument was first calibrated with (+)-10-camphor-sulfonic acid [25] and lysozyme 1.4  $\mu\text{M}$  (0.02 mg mL<sup>-1</sup>) was used regularly as an intensity standard in the far UV region. Secondary structure content was estimated from CD spectra using the methods implemented in k2d [4].

## 2.7 Fluorescence Spectra

Fluorescence measurements were carried out in an ISS K2 spectrofluorometer. For intrinsic fluorescence (Fi) of the protein, excitation of tryptophan residues was at 292 nm and emission was recorded from 300–400 nm. For ANS fluorescence (Fans), excitation was at 380 nm and emission spectra were collected between 400 and 600 nm. All spectra were obtained at 20 °C. The molar ratio of protein to ANS was 1:100 [18]. In all cases, slit widths of 10 and 5 nm for excitation and emission, respectively, were used. To compensate drifts in lamp intensity, the spectra of a solution of N-acetyl-L-tryptophanyl-ethyl-ester 0.13 mM was determined regularly at the start and at the end of day work and used to correct the small variations in fluorometer response.

## 2.8 Denaturation Kinetics

Kinetics of the conformational changes at different temperatures was also monitored by CD, Fi and Fans. Low temperatures made the slow transition difficult to follow up to the end, while high temperatures precluded precision in the first transition. We found a balance between these two problems at 30 °C, where all the rest of the experiments were performed. The process was initiated by an abrupt change of pH, caused by the addition of 80  $\mu\text{L}$  of a stock solution of the protein, (originally dissolved in sodium acetate buffer 30 mM, pH 5) to 2,920  $\mu\text{L}$  of a solution of Gly-HCl 50 mM, pH 2 already stabilized to the temperature of the experiment. The concentrations and final volumes utilized in the three techniques were the same, 0.85  $\mu\text{M}$  (unless otherwise stated) and 3,000  $\mu\text{L}$ , respectively. The kinetic traces were followed at a fixed wavelength of 224, 334 and 484 nm, for DC, Fi and Fans, respectively. Temperature was controlled with Peltier type

cell holders and actual temperatures within the cell (stirred with 1 cm pathlength) were measured with an immersible thermistor probe. At the end of all kinetic experiments the final pH was measured and found to be in the 1.96–2.03 interval. Reversibility was assayed by a sudden addition of 55–80  $\mu\text{L}$  of NaOH 1.0 M with vigorous stirring, yielding pH jumps measured to be in the 5.0–9.0 range. The effect of aggregation was ruled out by finding the same kinetics results followed by Fi at PAP concentrations 0.85, 2.4 and 3.5  $\mu\text{M}$ , and also by the absence of light scattering at 300–350 nm of the solutions after the experiment.

## 2.9 Molecular Modeling

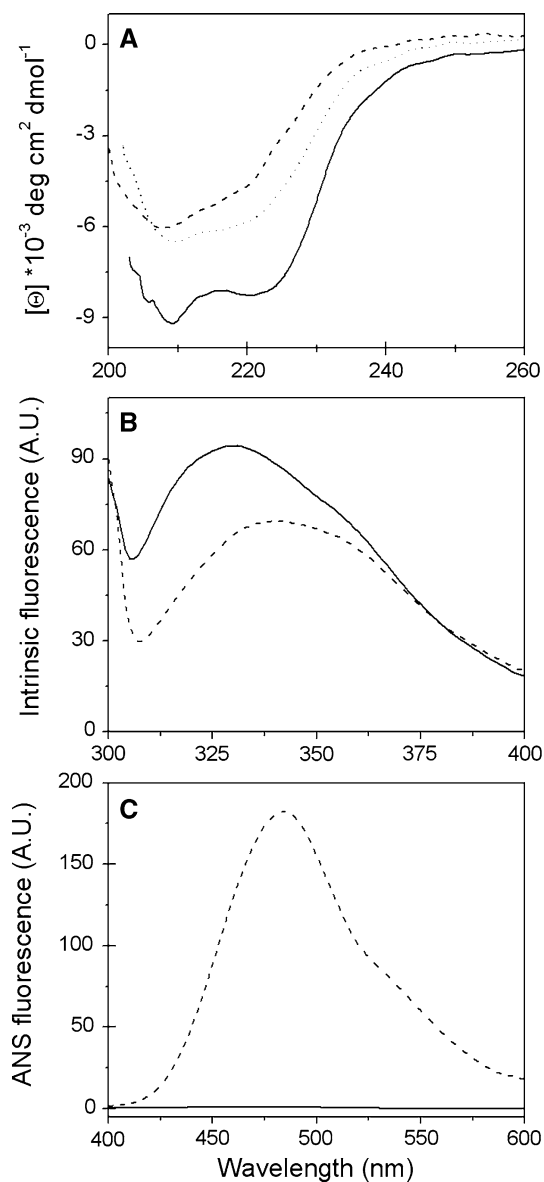
All computer experiments and structural analysis were carried out with the Molecular Operating Environment (MOE) package ([www.chemcomp.com](http://www.chemcomp.com)) with the CHARMM22 force field. Papain crystallographic structure was downloaded from PDB (file ID 9PAP) and prepared by removing all non-protein atoms with the exception of 195 crystallographic water molecules. All hydrogen atoms were added and optimized with heavy atoms fixed. Then two papain files were constructed, one representative of near-neutral pH with standard amino acid partial charges and Cys25 in thiolate form, and the other in highly acid media with all carboxylate and thiol groups protonated and therefore, electrically neutralized. Both structures were energy minimized and constituted the starting point of independent 6 ns molecular dynamics (MD) simulations at 300 K. With the aim of accelerating the denaturation process, the final conformers of each of these simulations were then submitted to a second MD simulation but now at 500 K during 10 ns. ANS molecule was constructed and its partial charge assigned with MMFF94x forcefield. Conformer search on ANS yielded nine structures with low energy which were independently docked to potential binding sites on papain conformers, extracted as snapshots from MD trajectories. Many ANS binding sites with favorable interaction scores were found on the surface of the enzyme, but in this part of the simulation we focused on finding cavities where ANS can be buried in the interior of the protein structure. Different schemes of energy minimization of such modeled complexes did not significantly changed results discussed in this work.

## 3 Results

### 3.1 Characterization of the Acid State of Papain

We found that non-inhibited papain (PAP), when subjected to pH 2.0, rapidly undergoes conformational changes which are reflected in its spectroscopic properties.

Characteristics of far-UV CD spectra registered immediately after lowering the pH to 2.0 indicate that the protein retains a considerable amount of its native secondary structure, although some elements of regular structure have already been lost, as judged from the reduced ellipticity at 208 and 222 nm (Fig. 1a). Estimation of secondary structure in the acid (A) state from CD spectra is not straightforward since unfolded-chain contributions to CD are not easily included in the basis spectra used for deconvolution. Yet, results from spectrum analysis are in agreement with a reduction in the helical content of ca. 16% according with



**Fig. 1** Papain spectra at 20 °C obtained from far-UV CD (a), intrinsic fluorescence (b), and ANS binding (c). Spectra correspond to native enzyme (pH 5, *continuous line*) and A state (pH 2, *dashed line*). CD spectrum of a sample incubated at pH 2.0 during 10 min and then returned to pH 5 is also shown (*dotted line*)

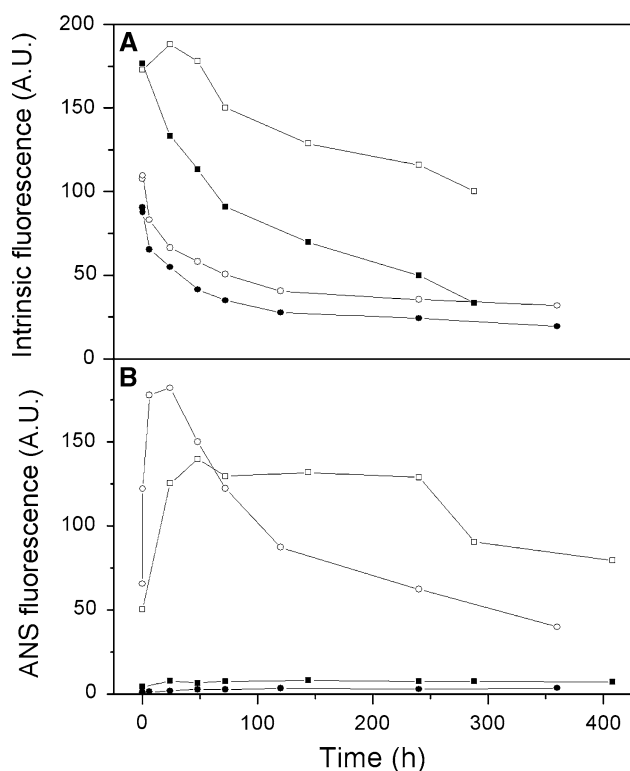
k2d estimations [4], which corresponds to conformational changes in 34 helical residues out of a total of 212 residues. In contrast, reduction of pH induced a red shift in the fluorescence emission maximum (from 330 to 340 nm), indicating that some or all of its five tryptophan residues are more exposed to solvent at low pH (Fig. 1b). These structural modifications taking place in acid medium are also paralleled by a large increase in the ANS binding capacity of PAP as seen in the Fans spectrum (Fig. 1c). In spite of the spectroscopic differences between native (N) papain and its acid form (A), we found that these molecular species display nearly identical electrophoretic mobility in non-denaturing polyacrylamide gels, suggesting that both conformations do not differ significantly in hydrodynamic radius and ionization state. Alternatively, it is possible that a greater mobility toward the anode, which would be expected at low pH due to protonation of some carboxyl side chains, is counterbalanced by some increase in molecular size. In any case, it is evident that the A state has a compact conformation.

From all of the above evidence, it is clear that at pH 2.0 unmodified papain adopts a conformation which resembles a molten globule, similar to that previously found with derivatives of this enzyme (or of other plant thiol proteinases) in which the active-site Cys had been blocked by forming either S-carboxy-methyl [20], S-carboxy-amido-methyl [24] or S-thio-methyl [27] derivatives. But since it has been reported that removal of the thiol group confers stability against denaturation of cathepsin B [50], a protease homologous to papain, our results on the non-inhibited enzyme demonstrate that the A state is an intrinsic molecular conformation of papain and not an artifact caused by its chemical derivatization. As a reference to compare with non inhibited papain (PAP), we also performed our studies on S-carboxy-methyl papain (CXP) which not only inhibits the proteolytic activity but also inserts a negative charge to the active site Cys residue, similar to the charge of this amino acid in its native form.

### 3.2 Metastable Nature of the Acid State

Formation and stability of the A state was first studied by following both, intrinsic and ANS-bound, fluorescence in unmodified papain samples kept at 4.0 °C for several days (Fig. 2). In these conditions, the A state appears in 6 h, but its structure is not stable slowly decreasing after 24 h giving rise to an apparently unfolded form (U), as judged from the loss of Fans intensity and a further decrease of intrinsic fluorescence in a slow kinetic phase. CD experiments (not shown) confirmed that the U form displays a far-UV spectrum with less than half of its initial ellipticity at 220 nm. For comparative purposes, the effect of pH 2.0 on CXP is also shown in Fig. 2. Even though PAP and CXP acquire a





**Fig. 2** Long term stability of A state followed by its intrinsic fluorescence and ANS binding. *Filled* and *empty circles* correspond to spectra of papain at pH 5 (native) and pH 2 (A state), respectively. Samples were incubated at 4 °C, and tempered to 20 °C prior to spectrum acquisition. Similar *curves* are presented for carboxymethyl papain with *filled* and *empty squares*

similar molten-globule like structure at pH 2.0, their acid forms are not equally stable, showing differences in the kinetics of their formation and unfolding. As can be seen in Fig. 2, the A state seems to be more resistant to unfolding in CXP. This result is consistent again with the finding that mutation of the active site cysteine (Cys 29) of cathepsin B to Ala or Ser modifies its stability [50], possibly due to the interdomain location of the active site Cys which interacts with atoms of both domains.

Reversibility of the N to A transition was tested by measuring the enzyme activity of PAP solutions whose pH was brought back to neutrality after they had been incubated at pH 2.0 for different periods. Different lots of commercial papain were tested, and in all cases no significant activity regain was detected. CD studies, made in parallel, showed that the secondary structure of PAP is also affected irreversibly by incubation at low pH (Fig. 1a). It should be mentioned that irreversibility is not due to autolysis, since PAGE experiments did not reveal the existence of protein fragments, also in accordance to the fact that papain is not active as a protease at pH below 4. On the other hand, native PAP, which is actually derived from its zymogen by scission of a large proregion of about

100 residues, might be indeed a metastable state. That is, the proregion may be essential for refolding of the molecule [42] from either A or U states. In this regard, most of the previous spectroscopic studies on thermal or acid denaturation of S-carboxy-methyl or S-methyl-thio derivatives of plant thiol proteinases have found that these processes are essentially irreversible [20, 26, 27, 49]; in contrast, reversibility of acid-denatured CXP has been reported only once in the literature [18]. Being a metastable entity, native PAP would have only temporal stability controlled by the kinetics of its transformation to other conformations. As can be seen in Fig. 2, the A state appears first as an intermediate in a pathway leading to unfolded PAP in a subsequent step; however, the latter reaction seems to be slow enough to allow studying the kinetic phases of A formation essentially isolated from its unfolding. Below, we present results of studies aimed at characterizing formation of the acid molten globule.

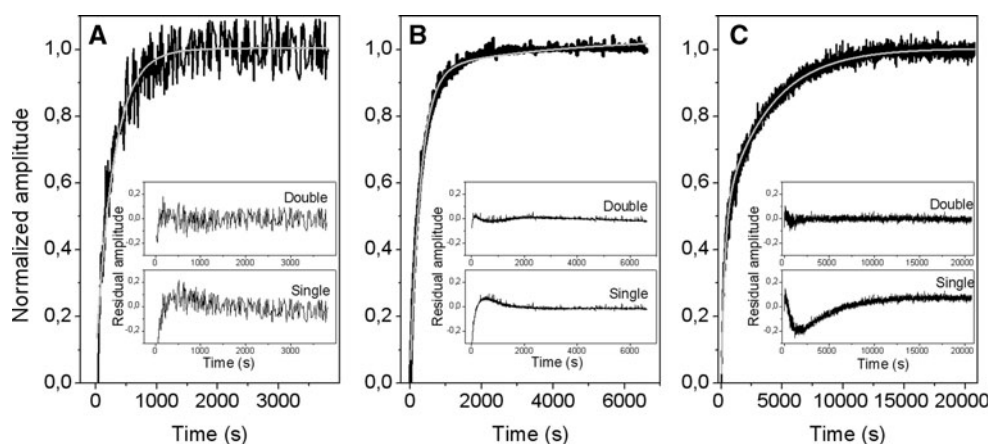
### 3.3 Kinetics of Acid State Formation

The time evolution of the N to A process of unmodified papain (PAP) was followed by means of intrinsic and ANS fluorescence, and by CD spectroscopy. When using both fluorescence techniques, we observed a continuous linear drift of the signal at the end of kinetic traces. We found this drift was caused by photobleaching, since shutting the UV source at regular intervals notably reduced the slope of the drift. Photobleaching effect was extrapolated to the whole time interval of the experiment from a linear fitting to the final part of the kinetic trace, and subtracted from experimental points in all fluorescence assays prior to their analysis. Figure 3 shows the time course of the corrected intrinsic (334 nm) and ANS (484 nm) fluorescence intensity, as well as the ellipticity (224 nm) of PAP after an abrupt change of pH from 5.0 to 2.0, at  $30.0 \pm 0.2$  °C. It should be noted that after 1-h incubation at this temperature, Fans intensity is still at its maximum, indicating that the amount of unfolded protein is not yet significant. We also followed the N to A process with the same techniques but collecting series of consecutive spectra in order to obtain kinetic plots at different wavelengths; results were similar to those of Fig. 3 at any proper wavelength chosen.

One of the most relevant features of the kinetic traces followed by any of the three methods is its complex nature. Indeed, they cannot be appropriately described by a single exponential function, requiring at least two exponential functions (Eq. 1) for good fitting, as the plots of residuals in Fig. 3 indicate.

$$y = Ae^{-k_1x} + Be^{-k_2x} + C \quad (1)$$

This behavior suggests the existence of at least one intermediate kinetic species during acid denaturation, as is



**Fig. 3** Time courses for papain acid denaturation followed by CD (a), ANS binding (b), and intrinsic fluorescence (c). Signals were followed at 224, 480 and 380 nm, respectively. These experiments were run at pH 2,  $30.0 \pm 0.2$  °C and papain concentration of

$0.85 \mu\text{M}$ . Smooth lines are double exponential decay curves simultaneously fitted to all three kinetic traces. Insets show the result of subtracting the fitted single or double exponential decay curves to experimental data

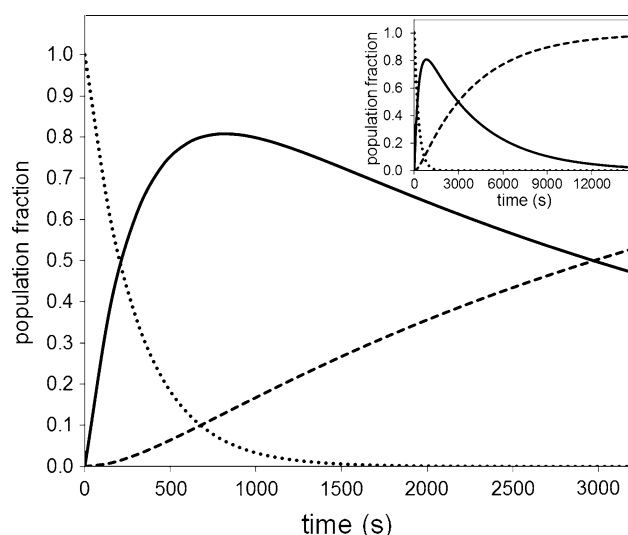
commonly assumed for biphasic time courses [37]. To find if the presence of a single intermediate is compatible with all the experimental results, the double-exponential function (Eq. 1) was simultaneously fitted to all three sets of normalized experimental traces. During this global adjustment, the constants  $k_1$  and  $k_2$  were restricted to be identical for the three techniques, as must happen for a unique intermediate species, but amplitudes (A and B in Eq. 1) were allowed to vary independently in each case, since this kinetic species might change differently the spectroscopic signal of each technique. Simultaneous fitting gave satisfactory reconstruction of experimental data (Fig. 3), with average values of at least two replicas of the experiments for each of the commercial lots of papain of  $3.4 \times 10^{-3} \pm 7 \times 10^{-4}$  and  $2.6 \times 10^{-4} \pm 6 \times 10^{-5}$   $\text{seg}^{-1}$  for  $k_1$  and  $k_2$  constants, respectively. Simultaneous compatibility of the three time courses with identical kinetic constants leads us to propose a mechanism involving the existence of a single kinetic intermediate (I) between N and A:



According to the amplitudes A and B from Eq. (1) for the three different techniques shown in Fig. 3 we found that CD signal of intermediate I is practically identical to that from the A species. In addition, about 90% of the total change in Fans can be assigned to the first step of the mechanism shown above, but only around 50% of the total change in Fi. These results depict the structure of I as a molten globule somewhat more compact than A. Moreover, when comparing I with A, we found nearly identical secondary structure and similar ANS accessibility, being the  $\text{I} \rightarrow \text{A}$  step a process mainly involving changes in tertiary structure, as reflected by changes in the packing of some tryptophan side chains and

only a slight increment in ANS binding. It should be stated that the existence of a kinetic intermediate I in the papain unfolding mechanism is consistent with that previously reported for chymopapain, a closely related protein with almost 60% identity in sequence [35].

Given the aforementioned molecular characteristics of intermediate I, it was interesting to test if this species might be able to return to the native conformation. A kinetic simulation of populations of the species involved, based on the average values obtained for  $k_1$  and  $k_2$ , allowed us to estimate that I would reach its maximal concentration (i.e.,  $81 \pm 4\%$  of the total protein) at  $800 \pm 80$  s after the initial jump to pH 2.0 (Fig. 4). Some samples incubated 800 s in acid solution were subjected to a second pH jump by the addition, with efficient stirring, of enough concentrated NaOH solution to change the pH to a value between 5 and 8. Figure 5 shows that this neutralization prevents papain from further unfolding, but no reversibility is observed, even with extremely short incubation times at pH 2, since the magnitude of the spectroscopic probe remains unaffected after base addition. Indeed, the inset in Fig. 5 shows that after jump to pH 2.0, incubation for 20 s, and a second jump to pH 5, as described by curve 2 of Fig. 5, the CD spectra of the resulting solution lays in between native and A state, suggesting that it contains a mixture of folded enzyme and irreversibly unfolded A state. Reversibility after 10 s of acid denaturation by a jump to pH 9 yielded similar results with different proportion of species. Activity assays performed on samples treated by this procedure are too complex to interpret due to the presence of a significant population of native molecules, the possibility of partial activity on the intermediate, and due the difficulties of estimating this partial activity and of determining precisely the population of the different species. Under these

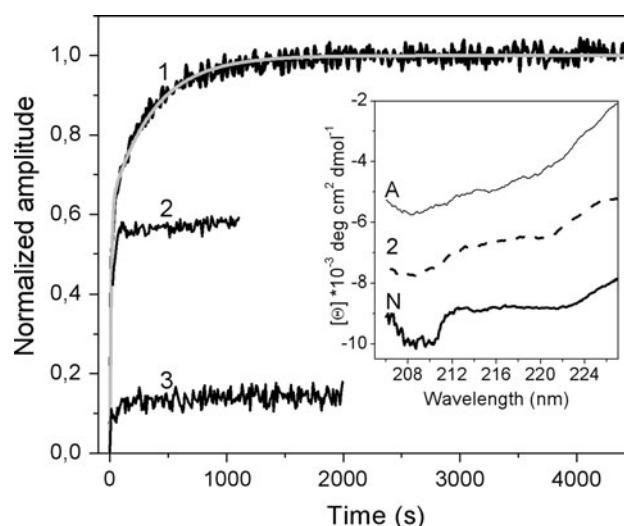


**Fig. 4** Fractional population of the different species involved in papain denaturation kinetics, N (native, dotted line), I (kinetic intermediate, continuous line) and A (acid species, dashed line). Curves shown were calculated with Eq. (1) using the average value of the kinetic constants determined at 30 °C. Inset represents the same population evolution but with an extended time axis to show full conversion of I to A state

circumstances we can claim that no conclusive evidence of structural or activity regain can be detected, which means that no reversibility of I to N could be observed.

#### 4 Discussion

We demonstrated in this work, that the existence of an A state of papain is not an artifact due to carboxy-methylation of the active-site Cys with iodo-acetic acid. Indeed, as Fans, intrinsic fluorescence, and CD showed, both CXP and PAP give rise to similar molten-globule-like structures when subjected to pH 2.0. Estimation of secondary structure in the A state from CD spectra indicates a reduction in the helical content. This is compatible with the report of a loosely-folded region in the N-terminus domain of papain [26], whose structure is mainly helical, and named as domain L. Edwin and Jaganadaham [18], in their study of CXP, demonstrated that the A state of this molecule possesses a high amount of secondary structure, although no tertiary contacts remain in its structure. These characteristics are completely similar to those found by us for non-inhibited PAP. However, it is shown here that formation of A state, and its subsequent transformation to the unfolded protein, occur more slowly when the enzyme is inhibited. Since the only chemical difference between PAP and CXP is the anionic carboxy-methyl group, covalently bound to the active-site thiol which is located at the domain interface, it can be proposed that this region is important not



**Fig. 5** Unfolding kinetics of papain at 30 °C followed by ellipticity changes at 224 nm (curve 1), adjustment to Eq. (1) (smooth trace in gray) and the refolding attempts induced by a pH-jump to pH 5 (curve 2) and pH 9 (curve 3) applied to solutions after 20 or 10 s of incubation at pH 2, respectively. Inset shows the CD spectra of A state (top), of species present after curve 2 of this figure (center) and native state (bottom)

only for activity but also for the stability of the structure. A more detailed study of this fact is currently under course in our laboratory. Indeed, a model of CXP constructed from papain crystallographic structure (PDB ID 9PAP) shows a strong interdomain ionic interaction between the anionic oxygen of carboxy-methyl group in papain domain L (residue 25) with the indole group of His159 in domain R, also a part of the active site. This ionic interaction might be responsible for the difference in kinetics experiments of A species formation, and is absent in unmodified papain since the free thiol group is expected to be completely protonated at pH 2.0.

It was found that formation of the A state follows irreversible, biphasic kinetics; thus suggesting, on the one hand, that an intermediate species appears on-pathway in this reaction (cf. [51]); and on the other hand, the irreversible nature of both kinetic steps further supports that native (or mature) papain is a metastable state. Some possible caveats against this straightforward mechanism should, however, be recognized; for example, heterogeneity in samples of native PAP or side reactions, such as aggregation or protein autolysis taking place in acid medium, might also lead to biphasic curves and irreversibility. Nevertheless, SDS-PAGE and electrofocusing failed to reveal any fragments of the protein upon incubation at pH 2.0, demonstrating the absence of an autoproteolytic event. Likewise, titration of the single free thiol of the enzyme (Cys25, in the active site) with Ellman reagent yielded a stoichiometry close to unity, indicating a single oxidation

state for this residue and thus suggesting sample homogeneity. In addition, results obtained from three different lots of the commercial enzyme gave identical behavior. Papain aggregation during or after unfolding was also discarded by the absence of significant light scattering in the 300–350 nm region and also by the invariance of the kinetic constants with protein concentration in the interval from 0.83 to 3.5  $\mu\text{M}$ .

Assuming the validity of the proposed mechanism we explored the possible sites for ANS binding and therefore, of its fluorescence. We first performed molecular dynamics (MD) simulations on unmodified papain structure, with protonated Glu and Asp residues to simulate the effect of the acid media. Several snapshots from MD at 300 and 500 K were then subjected to an ANS docking simulation, with the aim of finding cavities for binding this fluorescent probe in the interior of the protein, so no attention was given to superficial ANS binding to PAP. The main cavities were identified as follows: (a) the most frequent one in the hydrophobic core of domain R inside the beta barrel; while the other two are interdomain situated, (b) between the beta barrel of domain R and helices 1 and 3 of L; and (c) in a cavity formed by helix 1, the segment 12–17 and the beta barrel of domain R. Our docking results are consistent with the CD results previously discussed, suggesting that the proposed molten globule have a rather loose domain L with the rest of the structure able to bind up to three ANS molecules in its interior. Furthermore, the decrement of  $F_i$  during the  $N \rightarrow I$  step might be assigned to changes in tryptophan residues 26 and 69, situated in helices of domain L; while the rest of the intrinsic fluorescence change (step  $I \rightarrow A$ ) could be caused by changes in the environment of the other three tryptophan residues, situated in domain R close to the found ANS binding sites.

In conclusion, we propose the following sequential mechanism for acid-induced papain denaturation:  $N \rightarrow I \rightarrow A \rightarrow U$ . In this scheme, all the steps are irreversible, I represents a kinetic intermediate species populated only during the initial minutes when the process is carried out at 30.0 °C, with a high amount of secondary structure but with its tertiary contacts broken; A is a molten globule like species stable for a few hours, and U is the final unfolded molecule, whose formation takes more than 5 h at 30.0 °C (Fig. 3c) and more than 24 h at 4 °C (Fig 2b). Biotechnological applications derived from this work may contribute to propose a peptide to refold papain from its intermediate conformers as its proregion does [42, 55], or to design a stabilized metastable state of papain [12] reinforcing contacts in the interdomain interface and between residues 12–17 with the rest of the structure. For medical purposes, inhibition of pernicious cysteine protease targets might search for drugs promoting domain L or interdomain destabilization, avoiding negatively charged

molecules targeted to the active site, since this negative charge has a stabilizing effect.

**Acknowledgments** We gratefully acknowledge the significant contribution of Dr. Andrés Hernández-Arana to this work and financial support from CONACYT (México) with grants 105532, ECOS-M05S01 and the fellowship 123806 to R.E.F.-Q.

## References

1. Agyare KK, Damodaran S (2010) *J Agric Food Chem* 58:1946–1953
2. Ahmad E, Fatima S, Khan MM, Khan RH (2010) *Biochimie* 92:885–893
3. Almeida PC, Nantes IL, Rizzi CC, Júdice WA, Chagas JR, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL (1999) *J Biol Chem* 274:30433–30438
4. Andrade MA, Chacón P, Merelo JJ, Morán F (1993) *Prot Eng* 6:383–390. <http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>
5. Baker EN, Drenth J (1987) In: Jurnak FA, McPherson A (eds) *Biological macromolecules y assemblies*. Wiley, New York, pp 313–368
6. Bowman GR, Pande VS (2010) *Proc Natl Acad Sci USA* 107:10890–10895
7. Cabrita LD, Bottomley SP (2004) *Eur Biophys J* 33:83–88
8. Cappetta M, Roth I, Díaz A, Tort J, Roche L (2002) *Biol Chem* 383:1215–1221
9. Chen CX, Jiang B, Carrey EA, Zhu LM (2010) *Appl Biochem Biotechnol* 162:1506–1516
10. Cheriyan S, Abraham ET (2010) *J Hazard Mater* 176:1097–1100
11. Chevigné A, Dumez ME, Dumoulin M, Matagne A, Jacquet A, Galleni M (2010) *Biochim Biophys Acta* 1800:937–945
12. Choudhury D, Roy S, Chakrabarti C, Biswas S, Dattagupta JK (2009) *Phytochemistry* 70:465–472
13. Clark AT, Smith K, Muhandiram R, Edmondson SP, Shriver JW (2007) *J Mol Biol* 372:992–1008
14. Compton LA, Johnson WC (1986) *Anal Biochem* 155:155–167
15. Creighton TE (1989) In: Creighton TE (ed) *Protein structure a practical approach*. IRL Press, Oxford, p 157
16. Dardenne LE, Werneck AS, de Oliveira Neto M, Bisch PM (2003) *Proteins* 52:236–253
17. Devaraj KB, Kumar PR, Prakash V (2009) *Int J Biol Macromol* 45:248–254
18. Edwin F, Jagannadham MV (1998) *Biochem Biophys Res Commun* 252:654–660
19. Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 290:1441–1446
20. Edwin F, Sharma YV, Jagannadham MV (2002) *Biochem Biophys Res Commun* 290:1441–1446
21. Frizler M, Stimberg M, Sisay MT, Gütschow M (2010) *Curr Top Med Chem* 10:294–322
22. Glazer AN, Smith EL (1971) In: Boyer PD (ed) *The enzymes*, vol 3. Academic Press, New York, pp 501–546
23. Gutiérrez-González LH, Rojo-Domínguez A, Cabrera-González NE, Pérez-Montfort R, Padilla-Zúñiga AJ (2006) *Arch Biochem Biophys* 446:151–160
24. Haq SK, Rasheedi S, Khan RH (2002) *Eur J Biochem* 269:47–52
25. Hennessey JP Jr, Johnson WC Jr (1982) *Anal Biochem* 125:177–188
26. Hernández-Arana A, Soriano-García M (1988) *Biochim Biophys Acta* 954:170–175
27. Huet J, Looze Y, Bartik K, Raussens V, Wintjens R, Boussard P (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 341:620–626

28. Jacobs DJ (2010) *Curr Opin Pharmacol* (In press)
29. Johnson SM, Wiseman RL, Sekijima Y, Green NS, Adamski-Werner SL, Kelly JW (2005) *Acc Chem Res* 38:911–921
30. Khurana R, Udgaonkar JB (1994) *Biochemistry* 33:106–115
31. Kramer G, Paul A, Kreusch A, Schüler S, Wiederanders B, Schilling K (2007) *Protein Expr Purif* 54:147–156
32. Ladokhin AS, Fernández-Vidal M, White SH (2010) *J Membr Biol* 236:247–253
33. Leandro J, Simonsen N, Saraste J, Leandro P, Flatmark T (2011) *Biochim Biophys Acta* 1812:106–120
34. López-Arenas L, Solís-Mendiola S, Hernández-Arana A (1999) *Biochemistry* 38:15936–15943
35. López-Arenas L, Solís-Mendiola S, Padilla-Zúñiga J, Hernández-Arana A (2006) *Biochim Biophys Acta* 1764:1260–1267
36. Lundqvist M, Sethson I, Jonsson BH (2005) *Biochemistry* 44:10093–10099
37. Mason JM, Hagemann UB, Arndt KM (2007) *J Biol Chem* 282:23015–23024
38. Ménard R, Khouri HE, Plouffe C, Dupras R, Ripoll D, Vernet T, Tessier DC, Lalberté F, Thomas DY, Storer AC (1990) *Biochemistry* 29:6706–6713
39. Mickler M, Dima RI, Dietz H, Hyeon C, Thirumalai D, Rief M (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20268–20273
40. Nallamsetty S, Dubey VK, Pande M, Ambasht PK, Jagannadham MV (2007) *Biochimie* 89:1416–1424
41. Oliveberg M, Vuilleumier S, Fersht AR (1994) *Biochemistry* 33:8826–8832
42. Padilla-Zúñiga AJ, Rojo-Domínguez A (1998) *Fold Des* 3:271–284
43. Privalov PL (1979) *Adv Protein Chem* 33:167–241
44. Ramundo J, Gray M (2008) *J Wound Ostomy Cont Nurs* 35(3):273–280
45. Roongsawang N, Promdonkoy P, Wongwanichpokhin M, Sornlake W, Puseenam A, Eurwilaichitr L, Tanapongpipat S (2010) *FEMS Yeast Res* 10:909–916
46. Sánchez-Ruiz JM (2010) *Biophys Chem* 148:1–15
47. Schilling K, Körner A, Sehmisch S, Kreusch A, Kleint R, Benedix Y, Schlabrakowski A, Wiederanders B (2009) *Biol Chem* 390:167–174
48. Solís-Mendiola S, Gutiérrez-González LH, Arroyo-Reyna A, Padilla-Zúñiga J, Rojo-Domínguez A, Hernández-Arana A (1998) *Biochim Biophys Acta* 1388:363–372
49. Solís-Mendiola S, Rojo-Domínguez A, Hernández-Arana A (1993) *Biochim Biophys Acta* 1203:121–125
50. Song J, Xu P, Xiang H, Su Z, Storer AC, Ni F (2000) *FEBS Lett* 475:157–162
51. Street TO, Barrick D (2009) *Protein Sci* 18:58–68
52. Swanson MC, Boiano JM, Galson SK, Grauvogel LW, Reed CE (1992) *Am Ind Hyg Assoc J* 53:1–5
53. Traversa E, Machado-Santelli GM, Velasco MV (2007) *Int J Pharm* 335:163–166
54. Turk B, Turk D, Turk V (2000) *Biochim Biophys Acta* 1477:98–111
55. Vernet T, Berti PJ, de Montigny C, Musil R, Tessier DC, Ménard R, Magny MC, Storer AC, Thomas DY (1995) *J Biol Chem* 270:10838–10846
56. Wang J, Xiang YF, Lim C (1994) *Protein Eng* 7:75–82
57. Wiederanders B (2003) *Acta Biochim Pol* 50:691–713
58. Wiederanders B, Kaulmann G, Schilling K (2003) *Curr Protein Pept Sci* 4:309–326
59. Wiener JJ, Sun S, Thurmond RL (2010) *Curr Top Med Chem* 10:717–732
60. Wright SK, Viola RE (1998) *Anal Biochem* 265:8–14
61. Xia K, Manning M, Hesham H, Lin Q, Bystroff C, Colón W (2007) *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17329–17334
62. Yadav SC, Jagannadham MV, Kundu S (2010) *Eur Biophys J* 39:1385–1396
63. Yamamoto Y, Kurata M, Watabe S, Murakami R, Takahashi SY (2002) *Curr Protein Pept Sci* 3:231–238
64. Yao Q, Cui J, Zhu Y, Wang G, Hu L, Long C, Cao R, Liu X, Huang N, Chen S, Liu L, Shao F (2009) *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3716–3721
65. Zhang Q, Buckle AM, Law RH, Pearce MC, Cabrita LD, Lloyd GJ, Irving JA, Smith AI, Ruzyla K, Rossjohn J, Bottomley SP, Whisstock JC (2007) *EMBO Rep* 8:658–663
66. Zhang S, Xia K, Chung WK, Cramer SM, Colón W (2010) *Protein Sci* 19:888–892





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00063

Matricula: 098181156

MECANISMO MOLECULAR DE LA  
DESNATURALIZACION ACIDA DE  
LA PAPAINA

En México, D.F., se presentaron a las 9:00 horas del día 31 del mes de mayo del año 2011 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA
- DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA
- DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ CARDOZA
- DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO
- DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS (QUIMICA)  
DE: ROSA ERENDIRA FOSADO QUIROZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*Aprobar*

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



*Rosa*

ROSA ERENDIRA FOSADO QUIROZ  
ALUMNA

REVISÓ

*[Signature]*

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

*[Signature]*

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES  
VEREDIA

PRESIDENTE

*[Signature]*

DR. ANDRES HERNANDEZ ARANA

VOCAL

*[Signature]*

DRA. DOLORES SILVIA SOLIS MENDIOLA

VOCAL

*[Signature]*

DRA. CLAUDIA GUADALUPE BENITEZ  
CARDOZA

VOCAL

*[Signature]*

DR. DANIEL ALEJANDRO FERNANDEZ  
VELASCO

SECRETARIO

*[Signature]*

DR. RAFAEL ARTURO ZUBILLAGA LUNA