



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

**ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD
CINÉTICA DE QUIMOPAPAÍNA**

**EFEECTO DEL PH EN LOS
PARÁMETROS DE ACTIVACIÓN**

TESIS QUE PRESENTA

LUIS HORACIO GUTIÉRREZ GONZÁLEZ

PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO DE

MAESTRO EN QUÍMICA

Octubre de 1996

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

UNIDAD IZTAPALAPA

Este trabajo se realizó, bajo la dirección del Dr. Andrés Hernández Arana y del Dr. Alfonso Arroyo Reyna, en el Área de Biofísicoquímica, Departamento de Química, de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A mis padres

A mis hermanas

A Selene

AGRADECIMIENTOS

Deseo manifestar mi reconocimiento:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el apoyo brindado a través de la beca de Maestría con número de registro 84679 y del convenio No.473100-5-3771N.

A la Dra. Silvia Solís Mendiola y al Dr. Arturo Rojo Domínguez, por su generosa colaboración y valiosas sugerencias.

A los profesores y compañeros del Área de Biofísicoquímica, por su constante estímulo.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1	Estructura nativa	1
1.2	Desnaturalización	4
1.3	Efecto de agentes desnaturalizantes	8
1.4	Quimopapaína	9
1.5	Objetivos	12

2. ANÁLISIS DE DATOS

2.1	Teoría de los dos estados	15
2.2	Modelos irreversibles	16
2.3	El estado de transición	19
2.4	Efecto del pH sobre los parámetros de activación de la desnaturalización	26

3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1	Materiales	31
3.2	Dicroísmo circular	31

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Desnaturalización térmica de quimopapaína	34
4.2	Caracterización de los parámetros termodinámicos del estado de transición	38
4.3	Efecto de la variación del pH en los parámetros de activación de la desnaturalización	43

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

	REFERENCIAS	55
--	-------------	----

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estructura nativa

La función biológica de una proteína está determinada por su estructura, en la cual se definen cuatro niveles o tipos de organización: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

La estructura primaria se refiere a la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica. Puesto que el número de aminoácidos diferentes que pueden aparecer en dicha cadena es de 20, el número de posibles combinaciones en una secuencia lineal es extremadamente elevado. Estos aminoácidos tienen en su cadena lateral diversos grupos funcionales, que pueden diferir en su carácter aromático o alifático, así como en su carga eléctrica, volumen y polaridad (Lehninger *et al.*, 1993; Bohinski, 1978).

La estructura secundaria consiste en conformaciones regulares y repetitivas de aminoácidos en distintas secciones de la cadena, en donde los ángulos diedros de la cadena principal tienen valores bien determinados. Los enlaces de hidrógeno entre los átomos de los grupos amida y de los grupos laterales pueden hacer que la cadena de aminoácidos se pliegue en el espacio y adopte configuraciones estables. Las estructuras secundarias más comunes son las hélices α y las hojas β . En la primera de éstas, la cadena se enrolla en sentido dextrógiro y los grupos laterales se colocan en el exterior de la hélice. En la segunda, la cadena de aminoácidos adopta una conformación en zig-zag, debido a los puentes de hidrógeno que se establecen entre secciones distintas

de la cadena principal. Si bien son posibles otros tipos de estructuras secundarias (como los giros), las dos mencionadas anteriormente son las más comunes, ya que, por una parte, son estabilizadas por puentes de hidrógeno y, por otra, minimizan las repulsiones estéricas y electrostáticas entre residuos.

La estructura terciaria se refiere a la manera en que la cadena polipeptídica se pliega en el espacio tridimensional, acomodando las estructuras secundarias y las secuencias aleatorias que las unen en una configuración estrechamente plegada y, en el caso de las proteínas globulares, compacta. La mayoría de los residuos hidrofóbicos se orientan hacia el interior de la proteína, y la mayoría de los polares hacia el exterior, es decir, hacia el solvente acuoso. La estructura cuaternaria se refiere al modo en que se ubican en el espacio las cadenas polipeptídicas de las proteínas que constan de más de una cadena; entre dichas cadenas puede no haber enlaces covalentes. Las estructuras terciaria y cuaternaria se estabilizan por enlaces químicos, fundamentalmente de naturaleza no covalente.

Las proteínas tienden a adoptar, bajo ciertas condiciones, una estructura específica singular, llamada estructura nativa, aunque, en principio, sea posible un número muy elevado de configuraciones tridimensionales para una secuencia determinada de aminoácidos. La información codificada en dicha secuencia y en las condiciones del solvente son suficientes para dirigir el plegamiento de la cadena polipeptídica (Jaenicke, 1993), si bien, *in vivo*, puede ser necesaria la participación de proteínas coadyuvantes, entre las que destacan las chaperonas. Sin embargo, estas proteínas coadyuvantes no transmiten información estereoquímica, sino que intervienen en el particionamiento cinético entre el plegamiento y las reacciones colaterales en el ambiente celular. Otros factores no codificados en la secuencia de aminoácidos pueden ser

esenciales en el proceso de plegamiento; entre éstos puede mencionarse a algunos ligandos, tales como iones, cofactores y componentes unidos covalentemente a la proteína, como carbohidratos, que contribuyen a la estabilidad de la macromolécula.

Hasta la fecha no se ha comprendido a un nivel molecular la relación precisa entre secuencia y estructura tridimensional. Se sabe, sin embargo, que el proceso de plegamiento debe estar unívocamente definido, pues sólo un sistema con una conformación tridimensional claramente definida -y, a la vez, flexible- la estructura nativa, puede desempeñar funciones tan delicadas y específicas como las de las proteínas (Schmid, 1992).

El estudio de las interacciones intramoleculares puede conducir a la comprensión de la estructura de la proteína y de la forma en que los componentes de un polipéptido se ensamblan en la proteína nativa. Este último sistema ha sido definido como el estado de energía libre mínima (esto es, el más estable) o como el estado de formación cinética más rápida (Schmid, 1992). En favor de la definición termodinámica se ha argumentado que los estados desplegado y nativo existen en equilibrio termodinámico dentro de la transición de desdoblamiento; este estado nativo es el mismo que se encuentra en condiciones fisiológicas, como temperatura cercana a la ambiente, pH neutro y ausencia de agentes desestabilizantes. Por otra parte, se ha argumentado que, desde un punto de vista biológico, es importante alcanzar la estructura nativa en un tiempo relativamente corto. Ambos puntos de vista pueden ser conciliados si se toma en cuenta la posibilidad de que haya procesos de plegamiento ordenados que, por una sucesión de estados intermedios específicos, conduzcan a la formación rápida del estado nativo termodinámicamente más favorecido. De acuerdo con lo que se ha llamado "principio de consistencia cinética" (Go,

1983), las rutas de plegamiento favorecidas cinéticamente conducen al estado de energía libre mínima. Estos procesos ordenados garantizan la formación rápida de la estructura nativa y provocan la aparición de barreras energéticas más grandes para los procesos que llevan a estructuras no funcionales que para los que llevan a la estructura nativa (Schmid, 1992).

1.2 Desnaturalización

Se da el nombre de desnaturalización al proceso por el cual la proteína pierde sus estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria y se transforma en una distribución de conformaciones aleatorias de aminoácidos. La secuencia primaria permanece inalterada. Sin embargo, las propiedades físicas y químicas cambian y, en particular, se pierden las propiedades enzimáticas. Una consecuencia de la desnaturalización es la disminución en la solubilidad de la molécula, pues los grupos hidrofóbicos ubicados en el interior quedan expuestos al solvente acuoso. La disminución en la solubilidad puede facilitar la interacción entre grupos no polares de diferentes cadenas conformadas al azar, lo que puede provocar, a su vez, la agregación (Van Holde, 1979).

El proceso de desnaturalización de una proteína puede ser desencadenado por un cambio en las condiciones del entorno de la molécula, como un aumento en la temperatura, un aumento o disminución del valor del pH o la presencia de algún agente desnaturalizante (como urea o clorhidrato de guanidina) (Privalov, 1979; Timasheff, 1993). Se tiene evidencia de que el grado de desdoblamiento que puede alcanzar una proteína es independiente, desde un punto de vista termodinámico, del método de desnaturalización (Privalov, 1979). Una proteína

en condiciones de disolución extremas no necesariamente estará completamente desplegada, es decir, desprovista de cualquier estructura residual ni será capaz de comportarse como una cadena aleatoria. Tampoco se tendrán necesariamente formas similares al final de procesos de desnaturalización diferentes, pues la naturaleza heterogénea de las secuencias de polipéptidos hará que, bajo condiciones de desnaturalización semejantes, los segmentos se comporten como si estuvieran en solventes distintos. Sin embargo, no es sencillo decidir cuán cerca de la cadena aleatoria se halla la conformación desplegada obtenida. En consecuencia, es necesario suponer, al menos inicialmente, que el proceso de desnaturalización idealizado no es sino la transición a un estado desplegado con estructura próxima a la de la cadena aleatoria (Privalov, 1979).

Los estudios sobre el desplegamiento de las proteínas pueden permitir obtener información acerca de los mecanismos de plegamiento. En general, bajo condiciones de plegamiento, las proteínas desnaturalizadas llegan rápidamente al replegamiento completo pasando por una serie de equilibrios entre conformaciones intermedias (Creighton, 1988). La velocidad de reacción de desnaturalización cambia uniformemente con el cambio de las condiciones ambientales; por el contrario, como la naturaleza del estado desplegado difiere de acuerdo con las condiciones de desnaturalización (Segawa y Sugihara, 1984), la velocidad de plegamiento cambia de modo no uniforme. En consecuencia, es más sencillo analizar la cinética del desplegamiento (Fersht *et al.*, 1990). Esto permite utilizar los estudios de desplegamiento para definir el último estado de transición en el camino de plegamiento, de modo que, en vez de buscar sitios de nucleación en el estado desplegado, puede ser más

conveniente buscar eventos de "nucleación" (desestabilización local) de desplegamiento en el estado nativo (Creighton, 1988).

Se ha comprobado que, para proteínas pequeñas de un solo dominio y con masas moleculares inferiores a 35,000 Da, la desnaturalización es un proceso completamente reversible, de modo que, en principio, es posible aplicar la termodinámica de los sistemas en equilibrio al estudio de la desnaturalización a través de la determinación de los cambios de entalpía, energía libre, entropía y capacidad calorífica (Labhardt, 1982; Sturtevant, 1987). Con este enfoque del problema se ha encontrado que la desnaturalización de las proteínas es un proceso altamente cooperativo, que involucra a toda la macromolécula y que está acompañado por un enorme incremento en la entalpía y en la entropía (Privalov, 1979; Ptitsyn, 1994). La estabilidad de la proteína se define como el trabajo requerido para el rompimiento cooperativo de toda la estructura de la molécula. Para una proteína en solución, este trabajo corresponde a la diferencia de energía libre de Gibbs entre los estados nativo y desnaturalizado (Privalov, 1979).

Se ha aceptado generalmente que la desnaturalización es un proceso de "todo o nada", con una constante de velocidad única que se aplica a todas las moléculas de una proteína particular (Creighton, 1988), pues la expansión de un glóbulo debe rebasar un cierto umbral para permitir la isomerización rotacional de las cadenas laterales; aquí se encontraría el origen de una barrera de energía libre (o estado de transición) entre los estados nativo y desnaturalizado (Shakhnovich y Finkelstein, 1989). En el equilibrio, las conformaciones parcialmente plegadas no se observan en una fracción significativa de las moléculas, de modo que el desplegamiento se presenta por completo o no se presenta. Algunos estudios recientes, sin embargo, parecen indicar la existencia

de al menos dos tipos de estructuras bien determinadas en el proceso de desplegamiento (Ptitsyn, 1994). Se ha argumentado, incluso, que una de dichas estructuras, el llamado glóbulo fundido, podría ser un tercer estado termodinámico para las proteínas, además del nativo y del desnaturalizado. Actualmente parece estar fuera de duda la existencia de este estado, si bien aún hay discusiones en torno a su definición precisa. En los sistemas en los que aparece, se lo encuentra por lo general en condiciones ácidas; la molécula tiene un tamaño ligeramente mayor que en su forma nativa (un incremento del 10 al 20 % en el radio molecular), contiene cantidades significativas de estructura secundaria y muestra poca o ninguna evidencia de estructura terciaria (Matthews, 1993). Al considerar el proceso inverso, esto es, el plegamiento de una proteína, es posible que el tipo de reacciones tempranas que conducen al glóbulo fundido siga una condensación continua de la proteína desplegada a una forma más compacta, en vez de seguir una transición de dos estados. En consecuencia, podría reforzarse la concentración local de cadenas laterales no polares, lo que a su vez podría acelerar el colapso hidrofóbico de la cadena polipeptídica y la formación de un sistema de puentes de hidrógeno.

Para proteínas mayores o de varios dominios, con una masa molecular superior a los 35,000 Da, el proceso de desnaturalización es más complejo, ya que puede haber especies intermediarias estables (Hernández-Arana y Soriano-García, 1988). Hay proteínas multidominio cuyo desplegamiento es reversible (Dill, 1990). Sin embargo, el desplegamiento suele ser irreversible, es decir, la molécula no recupera totalmente su estructura ni sus propiedades nativas al volver a someterla a las condiciones iniciales; un ejemplo de este comportamiento se encuentra en la termolisina (Sánchez-Ruiz *et al*, 1988). Se ha sugerido que la desnaturalización irreversible puede ajustarse a dos modelos

de primer orden distintos: el de dos estados o el de Lumry-Eyring (Lumry y Eyring, 1954).

1.3 Efecto de agentes desnaturalizantes

En la desnaturalización por medio de agentes caotrópicos como la urea o el clorhidrato de guanidina (GuHCl), el desplegamiento está acompañado por la interacción no covalente del agente desnaturalizante con las moléculas de proteína. La desestabilización desencadenada por la adición de este tipo de agentes puede ser explicada por los cambios de energía libre que acompañan la transferencia de la proteína en los estados nativo y desplegado desde el agua hasta una solución desnaturalizante, es decir, por los cambios en energía libre de interacción con los desnaturalizantes de los grupos proteínicos que quedan expuestos al solvente durante el desplegamiento (Tanford, 1970; Timasheff, 1993).

La desnaturalización necesita de una concentración elevada del agente caotrópico (1-8 M), lo que indica que las interacciones no pueden ser ni fuertes ni específicas. La desnaturalización es entonces una consecuencia particular de un fenómeno termodinámico general, la unión preferencial de los componentes del solvente a la proteína, es decir, una solvatación preferencial (Timasheff, 1993). Para explicar este proceso se utiliza la teoría termodinámica de soluciones de tres componentes, en la cual se toma explícitamente en consideración el agua. Los agentes estabilizantes (o cosmotrópicos) son excluidos preferencialmente del dominio de la proteína, mientras que los agentes caotrópicos se unen preferencialmente a la proteína. En consecuencia,

la acción de un agente cualquiera se define exclusivamente por el balance entre las afinidades de la proteína con el agua y con el agente particular, y puede variar desde la preferencia fuerte por el agua hasta la preferencia fuerte por el cosolvente (Timasheff, 1993).

Los agentes caotrópicos pueden llegar a romper las interacciones no covalentes que definen la conformación nativa. De hecho, estudios comparativos de los espectros de resonancia magnética nuclear de proteínas desnaturalizadas por GuHCl y de sus aminoácidos constituyentes muestran una gran semejanza, lo que confirma el punto de vista de que las proteínas disueltas en GuHCl se comportan prácticamente como cadenas aleatorias (McDonald *et al.*, 1971).

1.4 Quimopapaína

La familia de enzimas denominadas proteasas sulfhidrúlicas vegetales (PSV) tiene una actividad proteolítica que depende del grupo tiol de un residuo de cisteína de su secuencia de aminoácidos. La familia de las proteasas sulfhidrúlicas también incluye enzimas análogas que se encuentran en animales (las catepsinas) y algunos microorganismos (Kamphuis *et al.*, 1985a; Moore, 1969). Las PSV pueden obtenerse del látex, endocarpio y zumo, o bien del tallo, las hojas o las raíces de una gran variedad de plantas. Por ejemplo, en el endocarpio de la piña (*Ananas comosus*) y del kiwi (*Actinidia chinensis*) se encuentran la bromelaína (Takahashi *et al.*, 1973) y la actinidina (Carne y Moore, 1978), respectivamente, y de las hojas de la cebada (*Hordeum vulgare*) se puede obtener la aleuraína (Holwerda y Rogers, 1992).

La quimopapaína, la papaína y la caricaína se extraen del látex de papaya (*Carica papaya*) (Baker y Drenth, 1987). Si bien se obtienen de una misma fuente vegetal, son tipos particulares de proteínas que pueden ser identificados tanto por su secuencia de aminoácidos como por sus propiedades fisicoquímicas. Tienen una elevada homología en sus secuencias de aminoácidos; al comparar pares de proteínas se encuentra que el porcentaje de residuos idénticos va del 40 al 90 % (Padilla-Zúñiga, 1993).

La quimopapaína es una de las PSV más ampliamente estudiadas. Su secuencia de aminoácidos ha sido completamente determinada (Watson *et al.*, 1990); se sabe que consta de 218 residuos (que se indican en la Fig. 1.1), con un peso molecular de 24,000 Da (Solís-Mendiola *et al.*, 1989) y un punto isoelectrico entre 10.1 y 10.6 (Brocklehurst *et al.*, 1981). La proteína consta de 68 grupos protonables, que se indican en la Tabla 1.1.

```

1           10           20           30
YPQSIDWRAKGA VTPVKNQGACGSCWAFSTIATV
           40           50           60
EGINKIVTGNLLELSEQELVDCDKHSYGCKGGYQT
70           80           90           100
TSLQYVANNGVHTSKVYPYQAKQYKCRATDKPGP
           110           120           130
KVKITGYKRVPSNCETSFLGALANQPLSVLVEAG
           140           150           160
GKPFQLYKSGVFDGPCGTKLDHAVTAVGYGTS
170           180           190           200
DGKNYIIKNSWGPNWGEKGYMRLKRQSGNSQGT
           210           218
CGVYKSSYYPFKGFA

```

FIGURA 1.1 Secuencia de aminoácidos de la quimopapaína (Watson *et al.*, 1990).

Tipo de residuo	Número de residuos	pK _a
Tyr: N-ter (+)	1	9.11
Ala: C-ter (-)	1	2.34
Arg (+)	5	12.48
Lys (+)	21	10.79
His (+)	3	6.00
Asp (-)	7	3.65
Glu (-)	7	4.25
Cys (-)	8	8.35
Tyr (-)	15	10.13

TABLA 1.1 Residuos protonables de la quimopapaína. Se indica el valor de pK_a para residuos aislados en agua.

También se tiene información acerca de la actividad catalítica de la quimopapaína (Buttle y Barret, 1984), su topografía (Watson *et al.*, 1990; Dubois *et al.*, 1988; Carey *et al.*, 1983), reactividad (*Enzyme Handbook*, 1991), contenido de estructura secundaria (Solís-Mendiola *et al.*, 1992) y estabilidad termodinámica (Solís-Mendiola *et al.*, 1993).

A la fecha se ha determinado por difracción de rayos X la estructura tridimensional de tres PSV: papaína (Kamphuis *et al.*, 1985b), actinidina (Baker, 1980) y caricaína (Pickersgill *et al.*, 1991). De la estructura de estas tres proteínas es posible deducir algunas características estructurales comunes, probablemente compartidas por otras PSV, entre ellas la quimopapaína. Se sabe que constan de dos dominios estructurales de aproximadamente 100 residuos cada uno, es decir, unos 200 por cadena polipeptídica. El sitio catalítico, que se localiza en la hendidura interdominio, está formado por tres aminoácidos: cisteína del primer dominio, e histidina y asparagina del segundo.

En este sitio, el grupo sulfhidrilo de la cisteína interacciona fuertemente con el imidazol de la histidina, que a su vez se relaciona con el carbonilo de la cadena lateral de la asparagina (Padilla-Zúñiga, 1993).

A partir de la estructura cristalográfica de la caricaína se ha elaborado recientemente un modelo computacional para la quimopapaína basado en simulaciones (minimizaciones y dinámicas) moleculares (Padilla-Zúñiga, 1993). Este modelo prevé una región fundamentalmente α y otra fundamentalmente β , es decir, una clasificación estructural que coincide con un patrón $\alpha + \beta$ (Manavalan y Johnson, 1983), muy similar a las estructuras cristalográficas conocidas de otras PSV. Sin embargo, el espectro de dicroísmo circular sugiere que se trata de una proteína del tipo α/β (Solís-Mendiola *et al.*, 1992).

1.5 Objetivos

Se ha comprobado mediante estudios calorimétricos que la desnaturalización de la quimopapaína es un proceso irreversible (Solís-Mendiola *et al.*, 1993). Un proceso de esta naturaleza puede ajustarse al modelo de dos estados o al de Lumry-Eyring, que conducen a valores distintos de las constantes de velocidad y de las etapas limitantes en las cinéticas de desnaturalización; un objetivo importante de nuestra investigación, por consiguiente, consiste en la determinación de los parámetros cinéticos que permitan decidir cuál es el modelo que se ajusta mejor a la desnaturalización de la quimopapaína.

Otra de las metas importantes de este trabajo consiste en la determinación de los parámetros termodinámicos que caracterizan el estado de transición entre el estado nativo y el desnaturalizado en la quimopapaína. A pesar de que el

desplegamiento de quimopapaína es un proceso irreversible, si la etapa limitante del proceso consiste en el desplegamiento de la proteína nativa, sería de esperarse que tales parámetros fueran similares a los de otras proteínas cuya desnaturalización es reversible. Los estudios realizados hasta la fecha (Jackson y Fersht, 1991b; Pohl, 1968a,b; Segawa y Sugihara, 1984) indican que la entalpía de activación de la desnaturalización en diversas proteínas (como lisozima y tripsina) es constante en un intervalo de temperaturas de aproximadamente 20 grados; sin embargo, como se trata de proteínas cuyo desplegamiento es reversible, no es posible extender mucho más el intervalo de temperaturas estudiado, pues a temperaturas cercanas a la ambiente sería importante el efecto de replegamiento. Por el contrario, en la quimopapaína sí es posible, en principio, observar la desnaturalización a temperaturas cercanas a la ambiente. Por consiguiente, un objetivo de este trabajo consiste en determinar, por medio de estudios de cinética de desnaturalización de la quimopapaína a diversas temperaturas, los valores de la entropía y la entalpía de activación en un intervalo más amplio de temperaturas (de unos 40 grados, entre 25 y 65° C), observar su posible variación y establecer una comparación con los valores para otras proteínas.

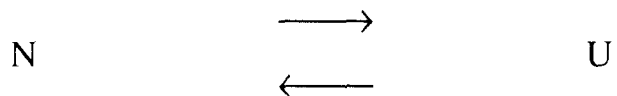
A la fecha se conocen la energía y la entalpía de activación de varias proteínas (como lisozima, tripsina y quimotripsina). Los estudios correspondientes (Jackson y Fersht, 1991b; Pohl, 1968a,b; Segawa y Sugihara, 1984; Oliveberg y Fersht, 1996) se han efectuado en condiciones diversas y en diferentes intervalos de pH. Para la tripsina se han hecho experimentos a valores de pH entre 1.1 y 2.2 (Pohl, 1968b); para la quimotripsina, entre 2.11 y 2.51 (Pohl, 1968a); para la lisozima, entre 2.0 y 4.0 (Segawa y Sugihara, 1984) y, para la barnasa, entre 1.5 y 3.0 (Oliveberg y Fersht, 1996). Para los

intervalos de pH mencionados, la entalpía de activación, al parecer, permanece constante (con la excepción de la barnasa, donde hay un cambio de alrededor del 14 %). Uno de los objetivos del presente estudio es, por tanto, analizar la posible variación para la quimopapaína -a valores de pH distintos y en intervalos más amplios, entre 1.1 y 3.5- de las funciones termodinámicas mencionadas anteriormente.

2. ANÁLISIS DE DATOS

2.1 Teoría de los dos estados

El desdoblamiento reversible de proteínas pequeñas de un solo dominio es usualmente un proceso cooperativo en el cual, en el equilibrio, sólo se encuentran apreciablemente poblados los estados nativo (N) y desplegado (U). En este caso, las transiciones de desplegamiento se describen mediante un modelo de dos estados



en el que no hay intermediarios estables. Este proceso de dos estados es, al parecer, una consecuencia de numerosas interacciones -fundamentalmente coulombianas y de van der Waals- cuyo balance determina la estabilidad del estado completamente plegado (Schmid, 1992).

Si se estudia el desdoblamiento de una proteína por diferentes métodos espectroscópicos, como fluorescencia o dicroísmo circular, la fracción f_N de moléculas nativas como función del parámetro de desplegamiento está descrita por

$$f_N = \frac{\theta - \theta_U}{\theta_N - \theta_U}$$

donde θ es cualquier propiedad física que cambie durante la transición; θ_N y θ_U son, respectivamente, los valores de dicha propiedad en los estados nativo y desnaturalizado (Cantor, 1980; Privalov, 1979). La constante de equilibrio de este proceso está dada por

$$K = \frac{f_D}{f_N} = \frac{1-f_N}{f_N} = \frac{\theta - \theta_N}{\theta_U - \theta}$$

donde f_D es la fracción de moléculas en estado desplegado, y con la cual pueden calcularse los parámetros termodinámicos usuales

$$\Delta G = -RT \ln K$$

$$\Delta H = -R \frac{\partial \ln K}{\partial (1/T)}$$

$$\Delta S = \frac{\Delta H_0 - \Delta G_0}{T}$$

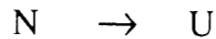
y el cambio en la capacidad calorífica a presión constante

$$\Delta C_p^0 = \left(\frac{\partial \Delta H^0}{\partial T} \right)_p = T \left(\frac{\partial \Delta S^0}{\partial T} \right)_p$$

2.2 Modelos irreversibles

En la mayoría de los estudios sobre desplegamiento de proteínas puede suponerse la existencia de dos estados relacionados por transformaciones reversibles; es decir, se supone que existen condiciones en las cuales se

establece un equilibrio entre los estados N y U. Sin embargo, hay proteínas en cuyo desplegamiento no existe un estado de equilibrio, de modo que se hace necesaria la aplicación de modelos irreversibles. Se ha sugerido que la desnaturalización irreversible de una proteína puede ajustarse a dos modelos de primer orden distintos, el de dos estados



o el de Lumry-Eyring (Lumry y Eyring, 1954)



donde N representa el estado nativo de la proteína, U la conformación desplegada y D el estado irreversiblemente desnaturalizado. La aplicación de cada uno de estos modelos a un conjunto de datos experimentales conduce a predicciones distintas acerca de los valores de las constantes de velocidad y de las etapas limitantes.

En el modelo de Lumry-Eyring, el desplegamiento de proteínas involucra por lo menos dos etapas: a) un desplegamiento reversible de la proteína nativa N, y b) una alteración irreversible de la proteína desplegada U, que produce un estado final D incapaz de volver al estado nativo (Sánchez-Ruiz, 1992). En el modelo de Lumry-Eyring, en consecuencia, para determinadas condiciones, el desplegamiento será parcialmente reversible (Lepock *et al.*, 1992). En particular, un calentamiento a velocidad de barrido constante, seguido por cualquier método espectroscópico, proporcionará información acerca de las constantes de equilibrio entre los estados N y U. Si se detiene el calentamiento en las cercanías de la temperatura de transición T_m , antes de que concluya la

transición, y se vuelve a la temperatura inicial, podrá saberse qué modelo describe mejor el proceso. Si éste se ajusta a un modelo de dos estados, la señal permanecerá inalterable (Figura 2.1); por el contrario, si se ajusta al modelo de Lumry-Eyring, la señal tenderá a regresar, al menos parcialmente, a su valor inicial (Tello-Solís y Hernández-Arana, 1995).

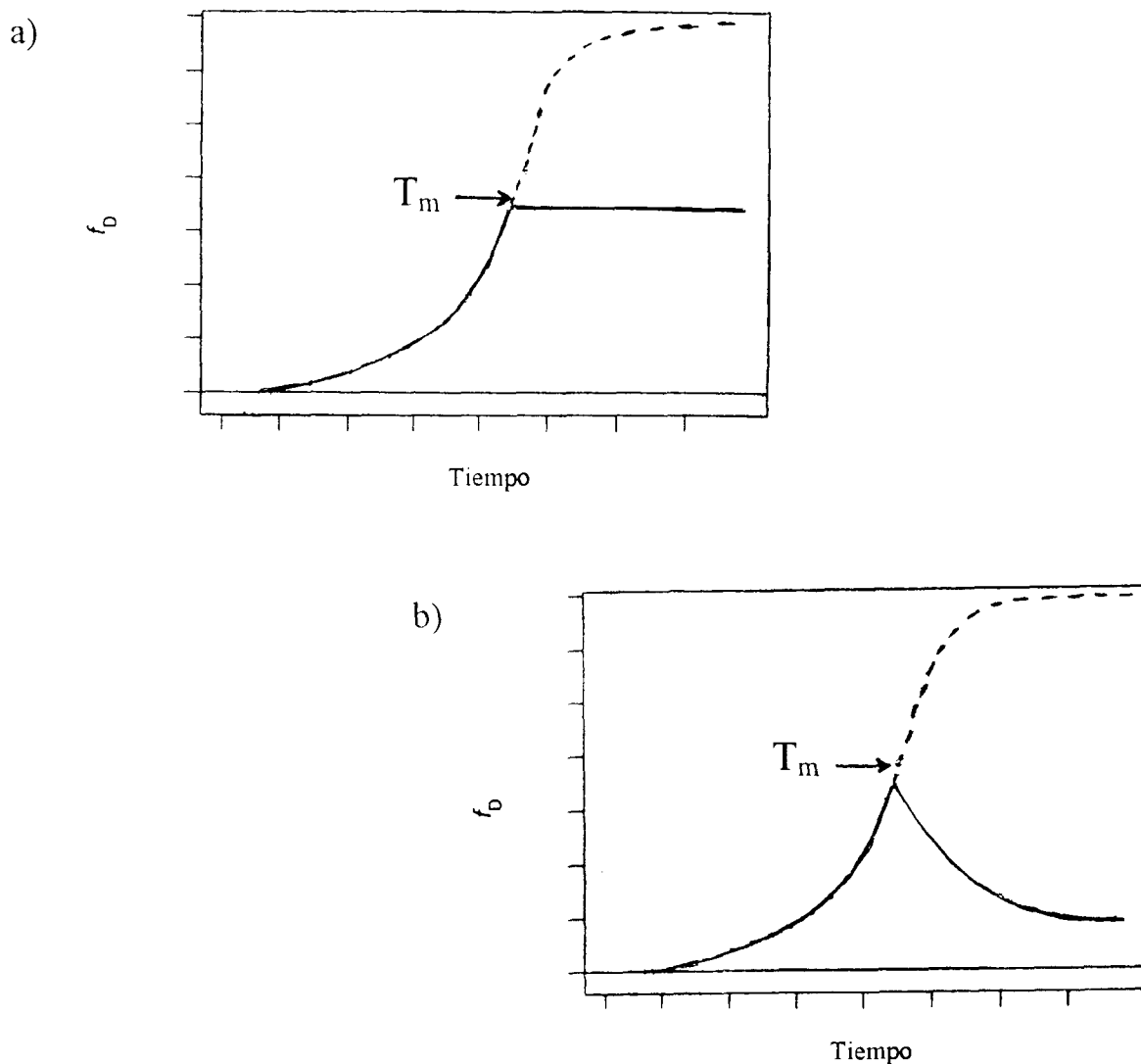


FIGURA 2.1 Calentamiento de una proteína a velocidad de barrido constante hasta una temperatura inferior a la T_m , y enfriamiento subsecuente. a) Modelo de dos estados. b) Modelo de Lumry-Eyring. En ambos casos, la línea punteada representa la transición completa.

2.3 El estado de transición

Si bien, en la mayoría de los casos, el plegamiento de proteínas parece estar bajo control termodinámico (Matthews, 1993), algunos estudios recientes sobre desnaturalización de proteínas, así como refinamientos en la precisión de los experimentos, han generado dudas en torno a la exactitud del modelo de dos estados y, en general, en torno al enfoque termodinámico del problema de la estabilidad de proteínas. Los estudios de equilibrio pueden ser utilizados para obtener información acerca de los mecanismos de desdoblamiento; sin embargo, puede obtenerse más información por medio de estudios cinéticos, con los que puede calcularse la dependencia temporal del proceso de desdoblamiento (Schmid, 1992). Por lo demás, la presencia de intermediarios -cuya identificación y análisis estructural son necesarios para la comprensión de las rutas de plegamiento- usualmente sólo se detecta mediante estudios cinéticos. En ocasiones, bajo ciertas condiciones, se han encontrado intermediarios con concentraciones en equilibrio que permiten estudios estructurales directos (Richards, 1992).

Los datos conocidos para diversas proteínas permiten establecer un bosquejo del proceso de plegamiento y de las al menos tres etapas que lo componen (Figura 2.2; Matthews, 1993). En un principio, la proteína desplegada se colapsa hasta una forma más compacta que contiene proporciones importantes de superficies no polares y de estructura secundaria. Esta estructura tiene estabilidad termodinámica marginal e incluye un conjunto de conformaciones en equilibrio dinámico con elementos estructurales no nativos. El contenido relativamente elevado de estructura secundaria implica que la variedad de estados es mucho menor que en la proteína desplegada. Esta etapa

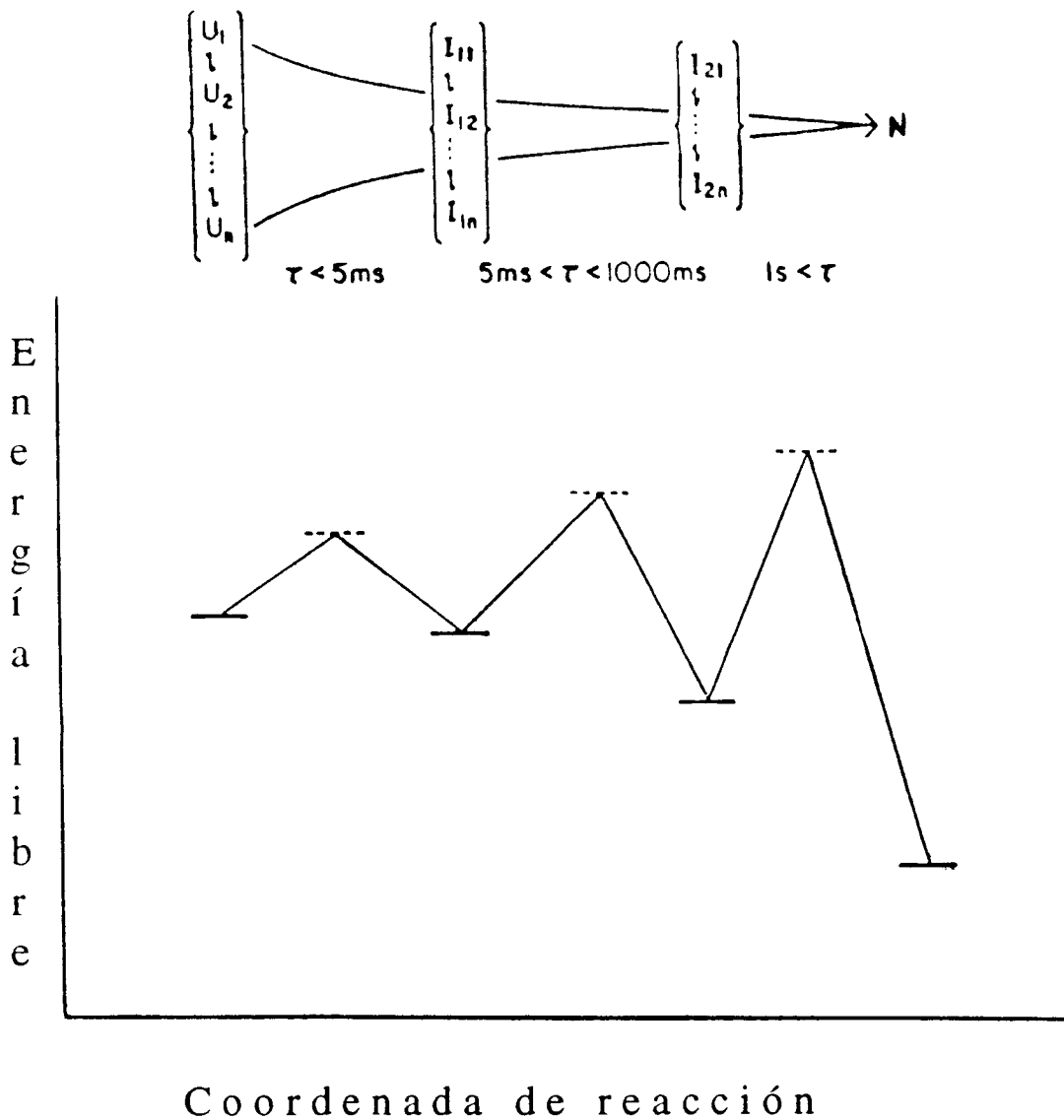


FIGURA 2.2 Esquema general de las reacciones de plegamiento de proteínas. Se indica el aumento progresivo de la estabilidad a través de una serie de reacciones cada vez más lentas. Las llaves en torno a las formas desplegadas U e intermedias I reflejan los conjuntos de conformaciones presentes en cada etapa del proceso. Con la disminución del tamaño de las llaves a lo largo de la coordenada de reacción de plegamiento, se señala la disminución en la magnitud del conjunto. Los intervalos temporales son aproximados y dependerán tanto de la proteína específica como de las condiciones ambientales (Matthews, 1993).

se presenta en un tiempo menor a 5 ms. En la etapa entre 5 y 1000 ms se desarrolla con más detalle la estructura secundaria y empieza a formarse la estructura terciaria. Aparecen elementos de la estructura nativa y se alcanza una estabilidad mensurable. La etapa final del plegamiento corresponde a la aparición de interacciones no covalentes en toda la proteína y de la estructura secundaria final.

El plegamiento puede ser considerado, entonces, como un proceso de desarrollo progresivo de la estructura y la estabilidad a través de un conjunto de reacciones cada vez más lentas. El producto de cada etapa de plegamiento, con excepción de la final, es un conjunto de especies relacionadas pero no idénticas. El proceso consiste entonces en una serie de transiciones entre variedades de estructuras que están en equilibrio dinámico dentro de cada conjunto dado (Matthews, 1993). Conforme se desarrollan estructuras de orden más elevado, se reduce el tamaño de los conjuntos antes mencionados hasta llegar a la estructura nativa única. Puesto que la interconversión entre cada conjunto es de tipo exponencial simple, puede haber un estado de transición común (Matthews, 1993). En consecuencia, el aspecto decisivo en los mecanismos de plegamiento puede consistir no en los intermediarios transitorios, sino en las barreras energéticas que los separan.

Puesto que los procesos de plegamiento y desplegamiento de una proteína son intramoleculares, su cinética es relativamente simple, de modo que resulta posible caracterizar la etapa limitante de la reacción, es decir, el estado de transición, para ambos procesos (Creighton, 1988).

En una reacción química de una sola etapa, el estado de transición se define como la estructura con energía libre más elevada. En una reacción con varios intermediarios, la reacción de cada intermediario involucra un estado de

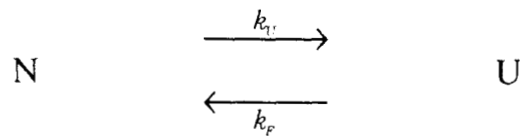
transición individual. El estado de transición de toda la reacción se toma como el estado con energía de transición más elevada. El estado de transición para la reacción de plegamiento y desplegado de una proteína constituye un ejemplo de una reacción con muchos intermediarios (Matouschek *et al.*, 1989). Esto no está en contradicción con la suposición de la existencia de dos estados en los estudios de equilibrio, porque generalmente todos los intermediarios están a una energía libre elevada con respecto a los estados plegado y desplegado.

En el plegamiento de proteínas la definición del estado de transición de la etapa limitante puede complicarse, pues en el camino de reacción puede haber intermediarios más estables que el estado inicial. En este caso, el estado de transición limitante de la reacción es la transición con energía libre más elevada que sigue al intermediario estable. La cinética puede proveer entonces información acerca de la diferencia de energía entre el estado de transición y el intermediario estable.

Por el llamado principio de reversibilidad microscópica (Matouschek *et al.*, 1989), el estado de transición para el plegamiento, bajo las mismas condiciones y para un proceso reversible, es el mismo que para el desplegado. En general, se supone que el estado de transición tanto para el plegamiento como para el desplegado es, en una primera aproximación, una forma distorsionada de alta energía de la conformación nativa (Goldenberg y Creighton, 1985). Esta energía elevada se debe probablemente a la necesidad de romper la cooperatividad de las interacciones que estabilizan el estado nativo. La estructura del estado de transición para el plegamiento es, por consiguiente, parecida a la del estado nativo, con una proporción elevada de estructura secundaria y con interacciones significativas en el núcleo

hidrofóbico. Esto es consistente con la idea de que el estado de transición ocurre tardíamente en la ruta de plegamiento (Creighton, 1988; Fersht *et al.*, 1990).

Como el proceso de desdoblamiento es de tipo intramolecular, la cinética de este proceso puede ser descrita en términos de ecuaciones de primer orden. Si se supone que inicialmente sólo está presente la forma nativa de la proteína, se tiene que, para la reacción



la velocidad de reacción es

$$- \frac{d f_N}{d t} = k_U f_N - k_F f_U$$

donde k_U y k_F son, respectivamente, las constantes de velocidad de desplegamiento y plegamiento.

Si se define $f_N = f_N^{\text{eq}} + \Delta f_N$ y $f_D = f_D^{\text{eq}} + \Delta f_D$, donde las Δf son desviaciones del equilibrio, se llega a (Cantor y Schimmel, 1980)

$$- \frac{d \Delta f_N}{d t} = (k_U + k_F) \Delta f_N$$

cuya solución es

$$\Delta f_N = \Delta f_N^0 \exp(-\lambda t)$$

donde $\lambda = k_U + k_F$ y donde Δf_N^0 es el valor de Δf_N al tiempo $t = 0$.

Si se mide una propiedad física y , donde

$$y = f_N y_N + f_D y_D$$

y donde

$$\Delta y = y - y^{eq} = y_N \Delta f_N + y_D \Delta f_D = \Delta y_0 \exp(-\lambda t)$$

se obtiene

$$\frac{\Delta y}{\Delta y_0} = \exp(-\lambda t)$$

donde Δy_0 es la desviación de y al tiempo $t=0$ desde su valor de equilibrio y^{eq} .

La última ecuación indica que la gráfica de $\ln(\Delta y / \Delta y_0)$ contra t debe ser lineal, si es válido el modelo de dos estados (Cantor y Schimmel, 1980). Además, la pendiente de la recta debe ser independiente de las condiciones iniciales.

Si la gráfica de $\ln(\Delta y / \Delta y_0)$ contra t es bifásica, la reacción de desdoblamiento no seguirá el modelo simple de dos estados; dicha reacción ocurrirá probablemente en dos etapas (Cantor y Schimmel, 1980).

En la descripción cinética de una reacción es necesario caracterizar los estados tanto intermedios como activados. La teoría del estado de transición puede ser aplicada si el proceso de desdoblamiento sigue una secuencia bien ordenada. El estado de transición activado puede ser caracterizado sólo con grandes dificultades, puesto que, por definición, el estado activado nunca está poblado; esto se debe a que representa el punto de energía libre más elevada a

lo largo de la ruta de desdoblamiento. Sólo es posible deducir sus propiedades si se caracterizan las velocidades de reacción en la zona de transición y si se comparan con los estados inicial y final del desdoblamiento (Schmid, 1992).

Aplicando la teoría de las velocidades absolutas de reacción, la constante de velocidad del proceso de desplegamiento puede ser expresada como

$$k = \frac{k_B T K^*}{h} = \frac{k_B T}{h} \exp \left(- \frac{\Delta G^*}{RT} \right)$$

donde $\Delta G^* = -RT \ln K^*$ es el cambio de la energía libre de activación, K^* es la constante de pseudoequilibrio para el estado activado, y k_B , h y R son las constantes de Boltzmann, Planck y de los gases, respectivamente (Laidler, 1971; Frost y Pearson, 1961). De esta última ecuación se deduce que

$$\ln \left(\frac{k}{T} \right) = \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) - \frac{\Delta G_U^*}{RT} = \ln \left(\frac{k_B}{h} \right) - \frac{\Delta H_U^*}{RT} + \frac{\Delta S_U^*}{R}$$

donde se tomó $\Delta G_U^* = \Delta H_U^* - T\Delta S_U^*$.

Si con los datos experimentales de la cinética de desdoblamiento se construye una gráfica de $\ln (k / T)$ contra $1 / T$ (gráfica de Eyring), pueden calcularse la entalpía de activación, ΔH_U^* , y la entropía de activación, ΔS_U^* , del proceso (Figura 2.3).

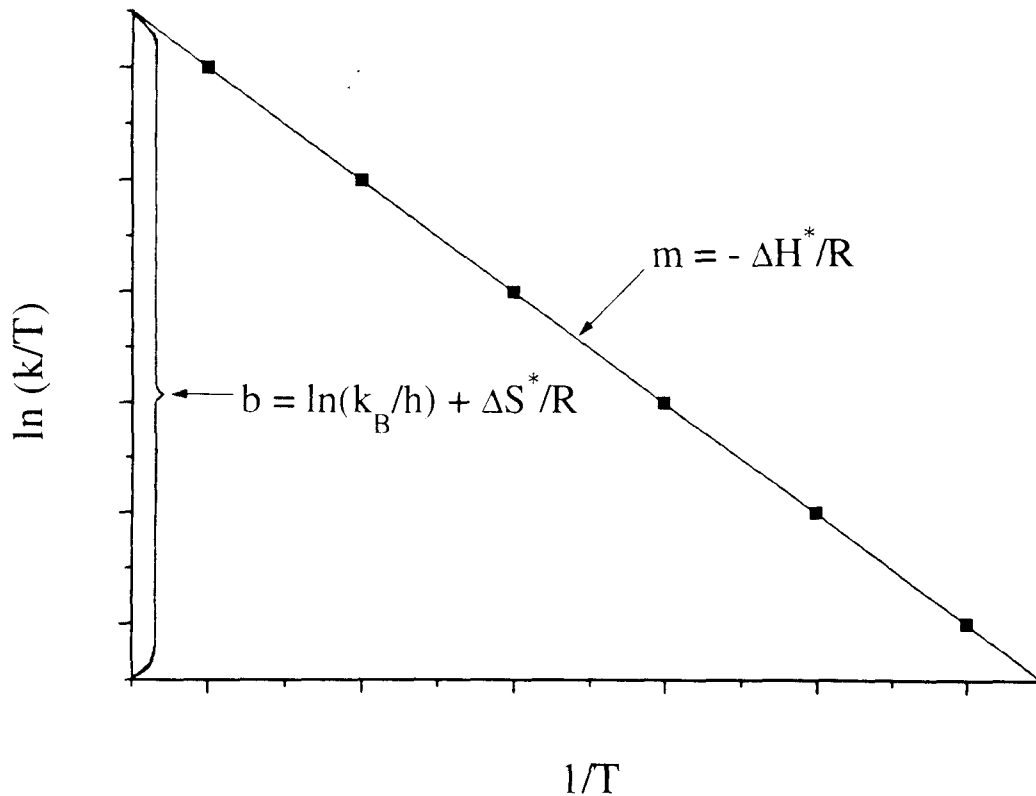


FIGURA 2.3 Gráfica de Eyring para el desplegamiento de una proteína.

2.4 Efecto del pH sobre los parámetros de activación de la desnaturalización

La posible variación de los parámetros termodinámicos de activación en la desnaturalización de quimopapaína con respecto al pH sería una indicación de que la estructura de la proteína puede ser modificada de alguna manera por la presencia de iones H^+ en el medio. Esta modificación puede deberse al efecto de los protones sobre los puentes de hidrógeno y los puentes salinos, que se manifestará en los cambios en la carga de la proteína.

Una manera de evaluar el cambio con el pH del número de protones unidos a la proteína consiste en la aplicación de la ecuación

$$\Delta n(H^+) = - \left(\frac{\partial \log K^*}{\partial pH} \right)_{T,P}$$

(Oliveberg y Fersht, 1996), que muestra que Δn , la diferencia entre el número de protones unidos al estado nativo y al de transición, es igual al negativo de la pendiente de una gráfica de $\log K^*$ contra el pH. El valor de $\log K^*$ se calcula a partir de la ecuación

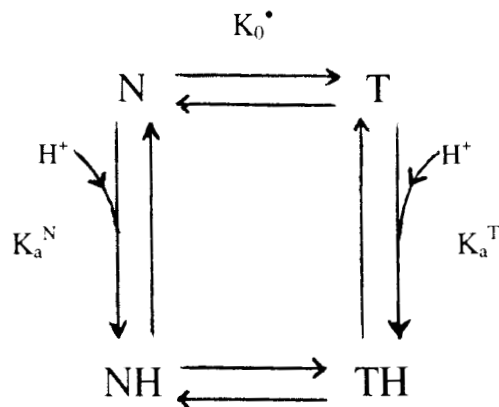
$$\Delta G^* = -RT \ln K^*$$

(sección 2.1), de donde se obtiene

$$\Delta n(H^+) = \frac{1}{2.303RT} \frac{\partial \Delta G^*}{\partial pH}$$

La variación del pH afectará los parámetros termodinámicos de activación del desplegamiento de la quimopapaína, pues el pK_a de los residuos protonables semiocultos en la superficie de la proteína será modificado por la mayor o menor presencia de protones en sus inmediaciones. Esto, a su vez, afectará los puentes de hidrógeno cercanos a la superficie y, por tanto, la estabilidad general de la proteína. Para explicar la dependencia de la energía libre de activación, ΔG^* , con respecto al pH, es necesario considerar la diferencia entre dos estados, el nativo, N, y el nativo protonado, NH, es decir, a un valor de pH más bajo. Supondremos, en un principio, que la proteína

contiene un solo tipo de residuo protonable. Cada uno de los estados mencionados alcanzará, en el proceso de desplegamiento, un estado de transición T y TH, respectivamente, tal como se indica en el esquema siguiente:



K_0^* representa una constante de pseudoequilibrio entre el estado nativo N y el de transición T. K_a^N y K_a^T son las constantes de disociación del residuo protonable definidas para el estado nativo y de transición, respectivamente. Estas últimas constantes tendrán, en general, valores distintos, pues en el estado de transición se modificará parcialmente la estructura terciaria y, por tanto, las distancias entre los distintos residuos.

Para el ciclo termodinámico descrito anteriormente se puede calcular una constante de equilibrio aparente K_{app}^* , que depende de las concentraciones de los estados de transición (T y TH) y de los estados nativos (N y NH), y que se puede expresar como

$$K_{app}^* = \frac{[T] + [TH]}{[N] + [NH]} = K_0^* \left(\frac{1 + (K_a^T)^{-1} [H^+]}{1 + (K_a^N)^{-1} [H^+]} \right)$$

donde K_0^* se define como $[T]/[N]$.

Si se supone que hay en la proteína n grupos protonables idénticos (esto es, con la misma pK_a), se llega a la expresión

$$K_{app}^* = K_0^* \left(\frac{1 + \left(K_a^T \right)^{-1} \left[H^+ \right]}{1 + \left(K_a^N \right)^{-1} \left[H^+ \right]} \right)^n$$

con la cual se obtiene la energía libre de activación

$$\Delta G_{app}^* = \Delta G_0^* - 2 \cdot 303 nRT \log \left\{ \frac{1 + \left(K_a^T \right)^{-1} \left[H^+ \right]}{1 + \left(K_a^N \right)^{-1} \left[H^+ \right]} \right\}$$

y la entalpía libre de activación

$$\Delta H_{app}^* = \Delta H_0^* + n \left[H^+ \right] \left\{ \frac{\left(K_a^T \right)^{-1} \Delta H_a^T}{1 + \left(K_a^T \right)^{-1} \left[H^+ \right]} - \frac{\left(K_a^N \right)^{-1} \Delta H_a^N}{1 + \left(K_a^N \right)^{-1} \left[H^+ \right]} \right\}$$

donde ΔH_a^T y ΔH_a^N son las entalpías de ionización de los residuos protonables en los estados de transición y nativo, respectivamente. ΔG_0^* y ΔH_0^* son, respectivamente, la energía libre de activación y la entalpía de activación que se alcanzarían cuando los residuos estuvieran completamente disociados.

El cambio en el número de protones unidos a la proteína como función de la concentración de protones en el medio está dado por

$$\Delta n(H^+) = \frac{d \log K_{app}^*}{d \log [H^+]} = n \left(\frac{\left(K_a^T \right)^{-1} [H^+]}{1 + \left(K_a^T \right)^{-1} [H^+]} - \frac{\left(K_a^N \right)^{-1} [H^+]}{1 + \left(K_a^N \right)^{-1} [H^+]} \right)$$

Los resultados anteriores pueden ser generalizados fácilmente para el caso en que se tengan tipos distintos de residuos protonables.

3. MÉTODOS EXPERIMENTALES

3.1 Materiales

Se utilizó quimopapaína parcialmente purificada (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, U.S.A.). Se aisló la forma molecular más abundante (Solís-Mendiola, 1994) por cromatografía líquida de intercambio catiónico de alta resolución, de acuerdo con la metodología reportada por diversos autores (Solís-Mendiola *et al.*, 1992). Con el fin de impedir la autólisis durante los experimentos de desdoblamiento, el sitio activo fue inhibido irreversiblemente con iodoacetamida (Solís-Mendiola *et al.*, 1989). Todos los demás reactivos fueron de grado analítico. La concentración de la proteína fue determinada por medio del coeficiente de absorción de luz ultravioleta a 280 nm (o coeficiente de extinción, $A^{1\%}_{1\text{cm},280\text{nm}}=18.3$) (Robinson, 1975; Polgár, 1981).

3.2 Dicroísmo circular

Se utilizó un espectropolarímetro JASCO J-500A con celdas de 1 mm y de 1 cm de trayectoria óptica, con chaqueta de circulación de agua conectada a un baño térmico HAAKE NK-22. La temperatura se registró directamente en la celda óptica con un termómetro digital COLE-PARMER 8402-20.

Se efectuaron estudios de cinética a diversas temperaturas y a un pH de 2.17. En un principio se estudió la cinética de desnaturalización sin recurrir a

un agente desestabilizante. Se colocaban en la celda óptica 2 ml de un regulador de glicina 0.05 M y pH 2.17, y se permitía que se alcanzara una temperatura estable. Después se inyectaban 0.2 ml de una solución concentrada de quimopapaína (entre 1.50 y 1.80 mg/ml) y se observaba la variación de la señal de elipticidad a 220 nm. Este proceso se efectuó para temperaturas entre los 40 y los 65 grados centígrados.

Con el objeto de obtener información acerca del proceso de desplegamiento en estructuras de la proteína de distintos órdenes, se compararon los procesos cinéticos de desnaturalización en regiones espectrales distintas. Se estudiaron ambos casos a una temperatura de 60 grados centígrados, en regulador de glicina 0.05 M y pH de 2.17. En la región del ultravioleta lejano, en la que se detectan los enlaces de tipo peptídico, se siguió el proceso de desplegamiento a una longitud de onda de 220 nm -en la celda de 1 mm de trayectoria óptica- y con una concentración final de entre 0.11 y 0.13 mg/ml (como en los estudios descritos anteriormente). En el ultravioleta cercano, es decir, en la región correspondiente a los residuos de tipo aromático, se utilizó una longitud de onda de 271 nm -en la celda de 1 cm de trayectoria óptica- y una concentración final de entre 0.36 y 0.43 mg/ml.

A continuación se estudió el proceso de desnaturalización acelerado por un agente desestabilizante, clorhidrato de guanidina (GuHCl). En este caso se observó la desnaturalización a diversas concentraciones de desnaturalizante (manteniendo idénticos el pH y la concentración de glicina) con el fin de extrapolar hasta una concentración cero y poder calcular la energía de activación de desnaturalización en ausencia de desnaturalizante (Jackson y Fersht, 1991a). Este proceso se efectuó a tres temperaturas: 25, 35 y 45 grados centígrados.

Finalmente, se estudió el efecto de la temperatura en la cinética de desnaturalización, a diferentes valores de pH. Se colocaron en la celda óptica 2 ml de un regulador de glicina 0.05 M con valores de pH en el intervalo entre 1.1 y 3.5. Se repitió el procedimiento mencionado anteriormente, inyectando 0.2 ml de una solución concentrada de quimopapaína (entre 1.35 y 1.60 mg/ml) en el mismo regulador y se observó la variación de la señal de dicroísmo circular a 220 nm.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desnaturalización térmica de quimopapaína

Se ha demostrado mediante estudios calorimétricos (Solís-Mendiola *et al.*, 1993) que la desnaturalización de la quimopapaína es irreversible. Los estudios cinéticos permiten determinar con mayor precisión el modelo específico al cual se ajusta dicha desnaturalización. De hecho, la ausencia de un estado reversiblemente desplegado U fue demostrada mediante un experimento en el que una muestra de proteína, en regulador de glicina 0.05 M y a un pH de 2.17, se calentó con una velocidad de barrido de 1 °C/min hasta una temperatura $T=56.7^{\circ}\text{C}$, en la cual se había completado aproximadamente la mitad de la transición. Luego se enfrió bruscamente la muestra hasta su temperatura original $T=25^{\circ}\text{C}$. El cambio en la señal de dicroísmo circular a 220 nm provocado por el calentamiento no se revirtió (ver Figura 4.1). De aquí podría concluirse que la desnaturalización térmica de quimopapaína, como otras PSV (Arroyo-Reyna y Hernández-Arana, 1995), es consistente con el modelo de dos estados; es decir, no existe un estado U desplegado reversiblemente en equilibrio con la proteína nativa.

En nuestro estudio se analizaron también las cinéticas de desnaturalización de quimopapaína a temperaturas entre 40 y 65 grados, a un pH de 2.17. Los límites del intervalo de temperaturas se eligieron por motivos prácticos. A 40°C , el proceso de desnaturalización tardó más de un mes. Por encima de 65°C , en cambio, era tan rápido que resultaba imposible seguir el

proceso de desplegamiento. Siguiendo el proceso de desplegamiento térmico a un pH de 2.17 y a diversas temperaturas, fue posible construir gráficas de $\ln(\Delta y / \Delta y_0)$ contra el tiempo. Las constantes de velocidad calculadas a partir de dichas gráficas aparecen en la Tabla 4.1. Como se puede apreciar en la Figura 4.2, tales gráficas son lineales, de modo que, con esta evidencia, sería posible concluir que el proceso de desnaturalización se ajusta a un modelo de dos estados, al menos en los intervalos temporal y térmico directamente observados. En cada uno de los experimentos hubo un tiempo de mezclado de aproximadamente dos minutos, durante el cual no fue posible obtener ninguna señal confiable. Podría ocurrir que el proceso de desnaturalización se ajustase a un modelo distinto en las primeras decenas de segundos. Para poder hacer observaciones en este intervalo, sería necesario contar con un equipo de flujo retenido. Sin embargo, se cuenta con medios indirectos para decidir cuál es la etapa limitante en este proceso, pues la extrapolación de la gráfica de $\ln(\Delta y)$ a un tiempo $t = 0$ indica la fracción de proteína nativa presente en el momento de

T (K)	k (min ⁻¹)	σ
313.15	0.00005	0.000003
323.15	0.00254	0.00009
328.15	0.01602	0.00038
333.15	0.03365	0.00152
336.15	0.16097	0.00690
338.15	0.32903	0.01974

TABLA 4.1 Constantes de velocidad a diversas temperaturas a un pH de 2.17. σ es la desviación estándar del ajuste de k.

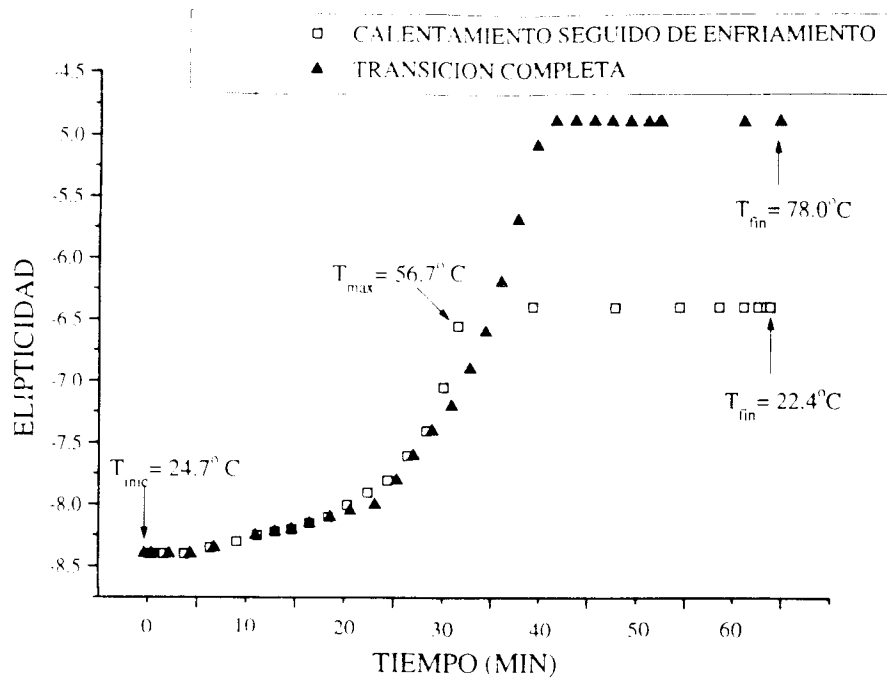


FIGURA 4.1 Cambio con la temperatura de la señal de dicroísmo circular de quimopapaína a 220 nm, en regulador de glicina 0.05 M, pH 2.17. La velocidad de barrido fue de $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. En la transición incompleta se alcanzó una temperatura máxima de 56.7°C y se enfrió bruscamente hasta llegar a la temperatura inicial.

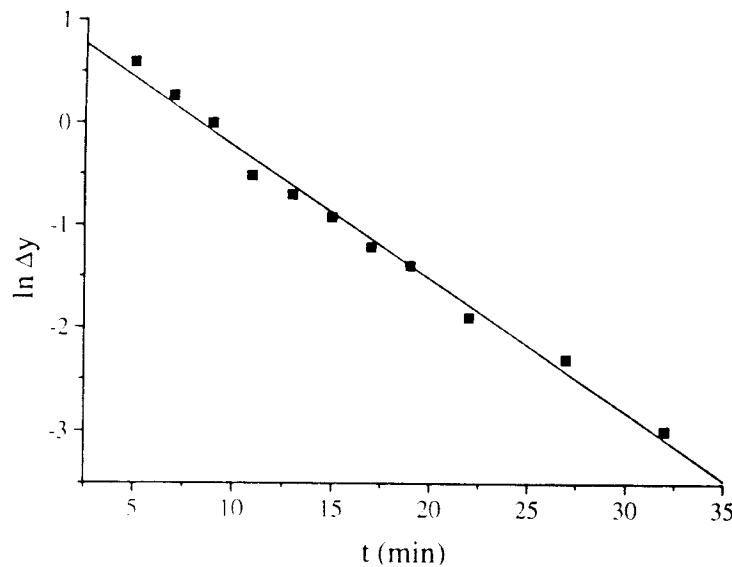


FIGURA 4.2 Gráfica de $\ln(\Delta y)$ contra el tiempo para el desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05 M, pH 2.17 y temperatura de 63°C .

efectuar la mezcla; en todos los casos se obtuvo un valor muy cercano al de la concentración inicial, lo que indica que no existe una etapa rápida que involucre un cambio estructural considerable. Además, es posible concluir que no hay modificaciones detectables en la pendiente de la gráfica antes mencionada en los primeros segundos del desplegamiento, lo cual también indica un proceso monofásico y, por consiguiente, un mecanismo de dos estados.

Las mediciones cinéticas por dicroísmo circular a distintas longitudes de onda permiten caracterizar residuos definidos de la cadena polipeptídica. A una longitud de onda de 220 nm se observan las señales de los enlaces peptídicos. Con esto es posible calcular, en un estudio cinético, la velocidad de modificación en la estructura secundaria. Por otro lado, a una longitud de onda de 271 nm, se detectan preferencialmente los residuos de tipo aromático, de modo que, con un estudio cinético, se siguen los cambios en la estructura terciaria de la proteína. Puesto que los distintos tipos de grupos laterales se estabilizan a través de transformaciones diferentes, es necesario que los enlaces se modifiquen simultáneamente de manera cooperativa, lo que posibilita el paso de la configuración nativa a la desplegada. La determinación de las constantes

$k_{\text{arom}} (\text{min}^{-1})$	σ_{karom}	$k_{\text{pept}} (\text{min}^{-1})$	σ_{kpept}	$k_{\text{arom}} / k_{\text{pept}}$	$\sigma_{\text{(karom/kpept)}}$
0.03799	0.00053	0.10370	0.00887	0.37	0.032
0.06597	0.00175	0.04815	0.00230	1.37	0.075
0.09046	0.00253	0.15806	0.00422	0.57	0.022
0.02542	0.00044	0.05806	0.00158	0.44	0.012

TABLA 4.2 Comparación de las constantes de velocidad en aromáticos y en peptídicos a $T = 60^\circ \text{C}$, pH 2.17. Las σ son las desviaciones estándar del ajuste.

de velocidad a una misma temperatura y a un mismo pH, y a longitudes de onda de 220 y 271 nm, permite comparar los procesos cinéticos en regiones espectrales distintas, es decir, para estructuras de distinto orden en la proteína. Los resultados de esta comparación aparecen en la Tabla 4.2. Los cocientes $k_{\text{AROM}} / k_{\text{PEPT}}$ de dicha tabla son del mismo orden de magnitud, sin tendencia definida, y las diferencias entre los dos juegos de constantes están dentro de la variación observada en cada juego. Además, fue muy complicado controlar exactamente la temperatura; en cada caso había diferencias de aproximadamente 0.3 K, que podían tener un efecto apreciable sobre las constantes de velocidad. Si hubiera más de una etapa en el proceso, las constantes de velocidad respectivas tendrían probablemente valores muy diferentes, tal vez hasta en un orden de magnitud. Por tanto, los datos permiten suponer que las observaciones en las dos regiones espectrales siguen el mismo proceso cinético. Esto permitiría concluir que, en el caso de la desnaturalización de quimopapaína, no se observa un estado intermediario del tipo llamado glóbulo fundido.

4.2 Caracterización de los parámetros termodinámicos del estado de transición.

Al construir la gráfica de Eyring con las constantes de velocidad de la Tabla 4.1, es posible calcular los parámetros termodinámicos de activación del desplegamiento en el intervalo de temperaturas señalado. Los valores calculados aparecen en la Tabla 4.3.

pH	ΔH^* (kJ/mol)	$\sigma_{\Delta H^*}$ (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/molK)	$\sigma_{\Delta S^*}$ (kJ/molK)
2.17	300.86	17.74	0.667	0.054

TABLA 4.3 Parámetros termodinámicos de activación de la desnaturalización a pH 2.17. σ es la desviación estándar.

La energía libre de activación depende de la temperatura. Si se toma el punto medio del intervalo de temperaturas, es decir, $T = 326.6$ K, el valor resultante será $\Delta G^* = 82.88$ kJ/mol, con una desviación estándar $\sigma_{\Delta G^*} = 19.57$ kJ/mol.

La entalpía de activación reportada para la lisozima es de 200 kJ/mol (Segawa y Sugihara, 1984), mientras que para la quimotripsina es de 340 kJ/mol (Pohl, 1968a). Esto nos indica que la entalpía de activación de la quimopapaína es del mismo orden de magnitud que la de otras proteínas. Como se trata de macromoléculas con características estructurales muy diferentes, es posible concluir que el paso hacia el estado de transición está controlado por barreras energéticas muy similares, que pueden involucrar modificaciones estructurales también semejantes.

Los estudios realizados hasta la fecha en proteínas como lisozima y tripsina indican que la entalpía de activación de la desnaturalización es constante en un intervalo de temperaturas de unos 20 grados, en experimentos realizados a un pH constante. Con el objeto de ampliar el intervalo de temperaturas estudiado, se decidió acelerar el proceso de desnaturalización con un agente desestabilizante, el clorhidrato de guanidina (GuHCl), de modo que fue posible observar la desnaturalización de la quimopapaína en un tiempo razonable (del orden de unas cuantas horas). Se realizaron estudios cinéticos a

Molaridad GuHCl	k (min ⁻¹)	ln k
3.1152	0.0287	-3.5512
3.6691	0.0475	-3.0462
4.0590	0.1566	-1.8540
4.5065	0.2547	-1.3678
	$k_0 = 0.00014 \pm 0.00008$	

TABLA 4.4 Extrapolación de la constante de velocidad en ausencia de desnaturizante a T = 25° C.

diversas concentraciones de GuHCl y a tres temperaturas: 25, 35 y 45 grados Celsius. Para cada temperatura, se calculó la constante de velocidad a cada concentración de GuHCl y se hizo una extrapolación hasta una concentración cero del agente desnaturizante, tal como se indica en la Tablas 4.4, 4.5 y 4.6.

La que habría sido la constante de velocidad en ausencia de desnaturizante se calculó de acuerdo con la expresión

$$\log k = \log k_0 + m [\text{GuHCl}]$$

donde k y k₀ son las constantes de velocidad en presencia y en ausencia de agente desnaturizante, respectivamente, y [GuHCl] representa la concentración de desnaturizante expresada en moles por litro (Matouschek *et al.*, 1989). Con las constantes de velocidad calculadas por este método se elaboró una gráfica de Eyring, con la cual fue posible calcular los parámetros termodinámicos de activación del desplegamiento en presencia de desnaturizante. Los resultados aparecen en la Tabla 4.7.

Molaridad GuHCl	k (min ⁻¹)	ln k
1.8037	0.0187	-3.9776
2.2378	0.0292	-3.5322
2.7299	0.1036	-2.2667
3.1152	0.1905	-1.6582
	$k_0 = 0.00057 \pm 0.00022$	

TABLA 4.5 Extrapolación de la constante de velocidad en ausencia de desnaturizante a T = 35° C.

Molaridad GuHCl	k (min ⁻¹)	ln k
0.4703	0.0238	-3.7393
0.9460	0.0376	-3.2815
1.3194	0.0570	-2.8656
1.8037	0.0879	-2.4316
	$k_0 = 0.01494 \pm 0.00142$	

TABLA 4.6 Extrapolación de la constante de velocidad en ausencia de desnaturizante a T = 45° C.

pH	ΔH^* (kJ/mol)	$\sigma_{\Delta H^*}$ (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/molK)	$\sigma_{\Delta S^*}$ (kJ/molK)
2.17	180.32	46.82	0.318	0.152

TABLA 4.7 Parámetros termodinámicos de activación de la desnaturización térmica de quimopapaína. Las constantes de velocidad utilizadas se extrapolaron para una concentración cero de GuHCl. Las σ son las desviaciones estándar del ajuste.

La energía libre de activación en presencia de desnaturalizante también puede calcularse a partir del punto medio del intervalo de temperaturas, $T = 308$ K. En este caso se obtiene $\Delta G^* = 82.45$ kJ/mol. Puesto que las incertidumbres de la entalpía y la entropía de activación son bastante grandes, la desviación estándar de la energía libre de activación, $\sigma_{\Delta G^*} = 66.21$ kJ/mol, alcanza un valor extremadamente elevado.

En la Figura 4.3 se representan las gráficas de Eyring en presencia de desnaturalizante (extrapolado a concentración cero) y en ausencia de desnaturalizante. Se esperaba que la recta obtenida en presencia de GuHCl (con constantes de velocidad extrapoladas hasta una concentración cero) fuese una prolongación de la recta obtenida sin desnaturalizante, es decir, que la pendiente de ambas rectas (de la que se calcula la entalpía de activación) y sus ordenadas al origen fuesen similares. Sin embargo, los valores de ΔH^* para ambos casos son bastante diferentes, incluso si se toman en cuenta las incertidumbres respectivas, pues la entalpía de activación de desnaturalización en presencia de clorhidrato de guanidina sólo representa un 60% del valor en ausencia de desestabilizante. Se esperaba que el agente desestabilizante modificase la cinética de desplegamiento, pero no los parámetros termodinámicos del proceso obtenidos al extrapolar a concentración cero del agente. Al parecer, la ecuación citada no es válida en nuestro caso. Esto podría deberse a la naturaleza iónica del clorhidrato de guanidina -un electrólito del tipo 1:1-, que haría necesario considerar un tratamiento más preciso de las interacciones de electrólitos, como se describen en la teoría extendida de Debye-Hückel (Alberty, 1994).

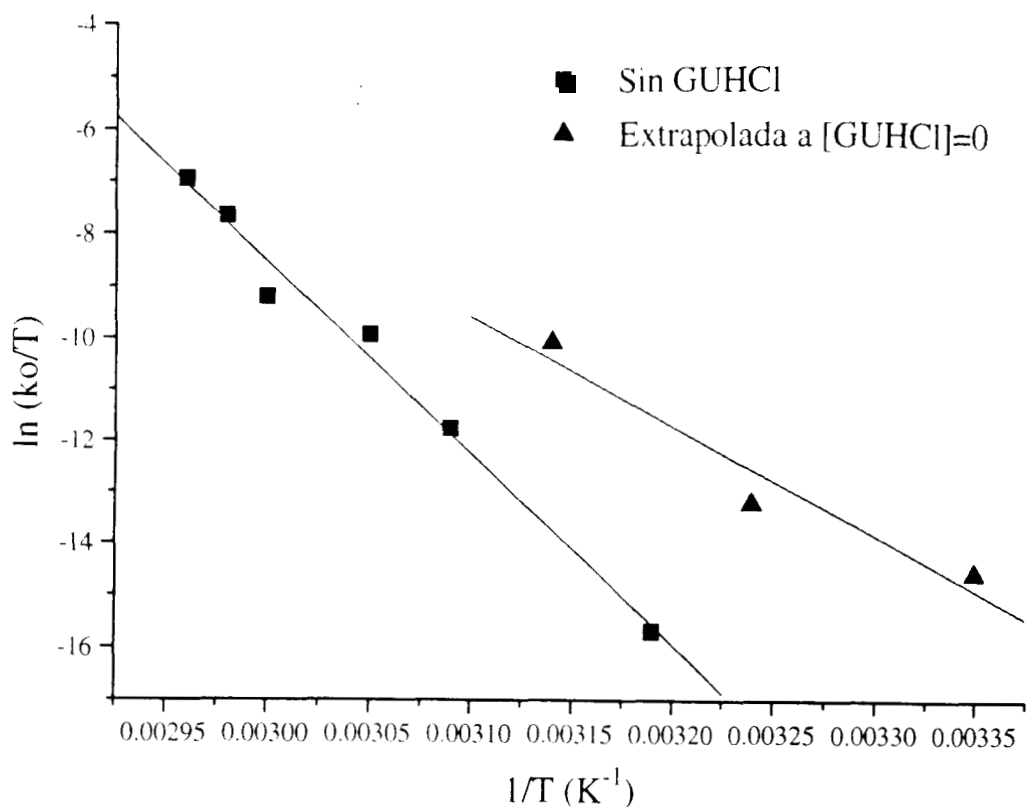


FIGURA 4.3 Gráficas de Eyring para el desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05 M, pH 2.17, en presencia y en ausencia de GuHCl.

4.3 Efecto de la variación del pH en los parámetros de activación de la desnaturalización

En los estudios realizados hasta la fecha (Tabla 4.8) se ha observado que, para diversos intervalos de pH, la entalpía de activación de la desnaturalización permanece aproximadamente constante. Con el objeto de averiguar si existen variaciones en los parámetros termodinámicos de la desnaturalización en intervalos más amplios de pH, se efectuaron estudios cinéticos a diferentes valores de pH (1.1, 1.5, 1.8, 2.2, 2.55, 2.9, 3.2 y 3.5). Para cada caso, evidentemente, los intervalos de temperaturas requeridos eran distintos, con un

valor mínimo de 28 grados (pH 1.1) y uno máximo de 85 (pH 3.5). Con las constantes de velocidad obtenidas se construyeron gráficas de Eyring para cada valor de pH (Figura 4.4) y se calcularon los parámetros termodinámicos correspondientes, ΔH^* y ΔS^* , que aparecen en la Tabla 4.9. De estos resultados se concluye claramente que la entalpía de activación del desplegamiento de quimopapaína disminuye con el pH. Además, las gráficas de Eyring a cada pH son lineales, lo que indica que el cambio de la capacidad calorífica durante el desplegamiento entre el estado nativo y el de transición es despreciable.

Proteína	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/molK)	pH	$\Delta(\Delta H^*)$	$\Delta(\Delta S^*)$	Referencia
Inhibidor de quimotripsina 2	157.6	0.21	6.3	-	-	Jackson y Fersht, 1991b
Barnasa	150.5-171.4	0.27-0.31	1.5-3.0	14 %	16 %	Oliveberg y Fersht, 1996
Lisozima	200	0.35	2.0-4.0	-	-	Segawa y Sugihara, 1984
Tripsina	277.5	0.59	1.1-2.2	-	-	Pohl, 1968b
Quimotripsina	340.6	0.87	2.1-2.5	-	-	Pohl, 1968a

TABLA 4.8 Parámetros termodinámicos de desnaturalización para diversas proteínas. El desplegamiento de todas las proteínas incluidas es reversible.

Las energías libres de activación de cada valor de pH, calculadas para el punto medio del intervalo de todas las temperaturas medidas, $T = 329.65$ K, aparecen en la Tabla 4.10.

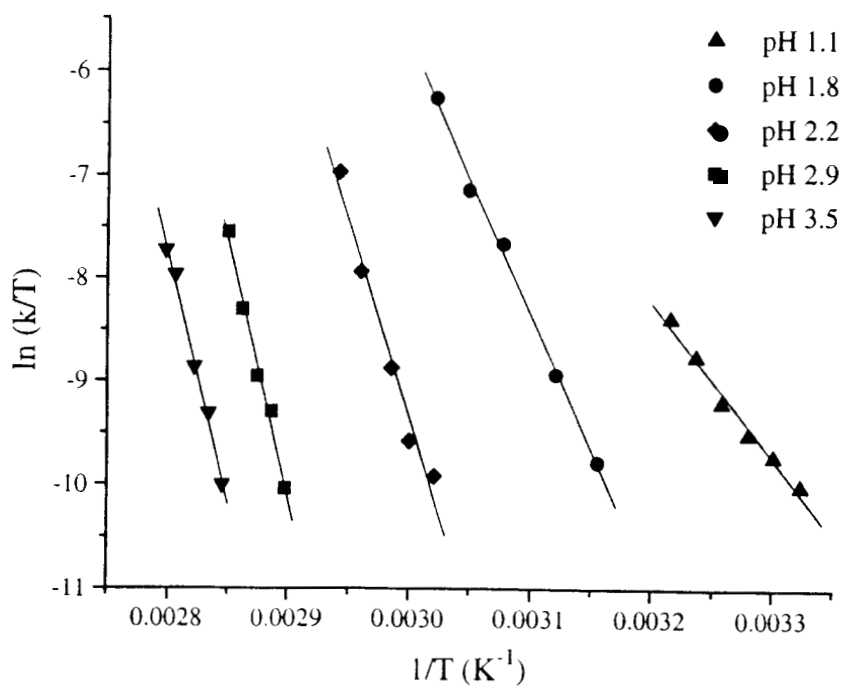
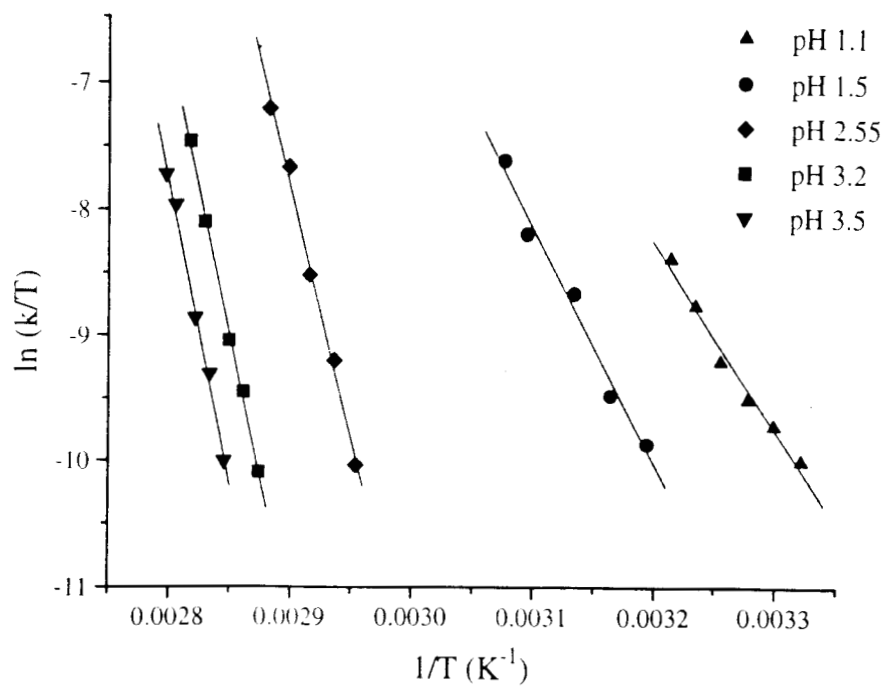


FIGURA 4.4 Gráficas de Eyring para el desplegamiento de quimopapaína en regulador de glicina 0.05 M, a distintos valores de pH.

pH	ΔH^* (kJ/mol)	$\sigma_{\Delta H^*}$ (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/molK)	$\sigma_{\Delta S^*}$ (kJ/molK)
1.1	125.35	8.12	0.17	0.03
1.5	156.55	12.17	0.25	0.04
1.8	217.53	7.32	0.44	0.02
2.2	312.55	29.24	0.70	0.09
2.55	327.05	15.96	0.72	0.05
2.9	404.63	25.96	0.93	0.07
3.2	377.90	12.52	0.84	0.04
3.5	397.76	17.41	0.88	0.05

TABLA 4.9 Parámetros termodinámicos de activación de desnaturalización a distintos valores de pH. Las σ son las desviaciones estándar del ajuste.

pH	ΔG^* (kJ/mol)	$\sigma_{\Delta G^*}$ (kJ/mol)
1.1	69.60	12.80
1.5	72.75	17.95
1.8	72.06	9.86
2.2	83.01	41.68
2.55	89.79	22.95
2.9	99.43	34.75
3.2	101.47	18.20
3.5	105.91	23.99

TABLA 4.10 Energía libre de activación a distintos valores de pH y a una temperatura $T=330$ K. Se tomó el punto medio del intervalo de temperaturas. σ es la desviación estándar del ajuste.

Para explicar cualitativamente la variación de la entalpía de activación de la desnaturalización con el pH es necesario considerar los efectos de los protones libres en el medio sobre la estructura de la proteína. Supongamos que se tiene una proteína con un residuo protonable rodeado por cargas permanentes. En el estado desplegado, donde la cadena polipeptídica se encuentra expuesta al solvente, la separación espacial de los residuos es máxima, de modo que el agua del medio bloquea las interacciones residuo-residuo. Por tanto, la pK_a del residuo en el estado desplegado será probablemente similar a la del aminoácido aislado en agua. En el estado nativo de la proteína, por el contrario, donde el residuo ocupa un lugar específico e interactúa con otros residuos, el valor de pK_a puede diferir del valor de pK_a del residuo aislado en agua. Esta diferencia tiene un origen electrostático de tres tipos (Bashford y Karplus, 1990; Oliveberg *et al.*, 1994):

1. Interacción del residuo con otros residuos ionizados de la proteína. Las cargas positivas cercanas harán disminuir su pK_a , mientras que las negativas lo harán aumentar.

2. Interacción con cargas parciales distintas de los grupos ionizables, como dipolos en los enlaces peptídicos, residuos polares, agua y momentos dipolares inducidos por elementos estructurales mayores, como hélices.

3. Efecto de desolvatación, debido al proceso energéticamente desfavorable de transferir un grupo cargado desde un buen solvente, como el agua, hasta el interior hidrofóbico de la proteína. Esto favorecerá la inserción en la proteína de la forma neutra del residuo y, por tanto, incrementará su pK_a . Si el residuo se localiza en la superficie de la proteína, el efecto será mínimo.

La introducción de un residuo cargado perturbará electrostáticamente los valores de pK_a de todos los demás residuos ionizables en la proteína. En consecuencia, los valores de pK_a ya no serán constantes, sino que variarán con el pH, que desempeñará un papel fundamental en el desplegamiento de la proteína.

En la sección 2.4 se dedujeron ecuaciones que relacionan los cambios en ΔG^* y ΔH^* del desplegamiento de una proteína con la variación del pH. En el caso de ΔG^* , si se asignan valores a la pK_a de los residuos protonables, y si se decide el tipo y el número de estos que hay en el intervalo de pH estudiado, es posible ajustar dicha ecuación a los datos experimentales indicados en la Tabla 4.10. En la Tabla 1.1 aparecen el total de residuos protonables de la quimopapaína y sus pK_a esperados, si estuviesen aislados en agua. En la zona de pH entre 1.1 y 3.5 hay un máximo de 3 tipos de residuos protonables (terminal C(-), Asp y Glu), con un total en el número de residuos de 15. Al asignar a la pK_a de cada residuo en el estado nativo distintos valores, se generaron, por medio del programa ORIGIN, modelos que representan con buena aproximación curvas de titulación para ΔG^* . En la Figura 4.5 se reproduce la curva generada con los valores del mejor ajuste, indicados en la Tabla 4.11.

Número de residuos	pK_a^N	pK_a^T
3	3.2	3.58
7	2.25	3.04
4	1.3	1.6

TABLA 4.11 Valores de pK_a obtenidos mediante el ajuste de la expresión de ΔG^* teórica a los valores experimentales de la Tabla 4.9. Se tomó ΔG_0^* , el valor de la energía libre con el pH más cercano a la neutralidad, igual a 115 kJ/mol.

Tipo de residuo	Grupo α -carboxilo	Asp	Glu
ΔH_a (kJ/mol)	-1.67	-4.64	-1.59

TABLA 4.12 Entalpía de ionización de residuos aislados en agua, a 25⁰ C; sólo se consideran los residuos protonables en la quimopapaína en un intervalo de pH entre 1.1 y 3.5 (Pfeil y Privalov, 1976).

Para los tres tipos de residuos protonables se detectó un incremento en la pK_a , es decir, una disminución en la constante de disociación, entre los estados nativo y de transición. Esto indica que en el estado de transición se facilita la protonación de los residuos. Es posible que haya puentes salinos -semiocultos en la superficie del estado nativo- que fuesen más fácilmente protonados (a valores de pH bajos) en el estado de transición.

En el proceso de ajuste para la entalpía de activación del desplegamiento, ΔH^* , se toman como base los valores de pK_a ya calculados para la energía libre de activación. Adicionalmente, se supone que la entalpía de ionización de los residuos protonables en el estado nativo, ΔH_a^N , permanece cercana a los valores de dicho parámetro en los residuos aislados en agua, que se indican en la Tabla 4.12. Con esto es posible efectuar un ajuste para los valores de la entalpía de activación del desplegamiento, que aparecen en la Tabla 4.9; no se incluyen en el cálculo los grupos protonables con $pK_a^N = 3.2$ y $pK_a^T = 3.58$, pues estos valores son muy parecidos al del residuo aislado, lo que implica que las entalpías de ionización en los estados nativo y de transición serán también muy similares. Al utilizar la ecuación para ΔH_{app}^* deducida en la sección 2.4, se llega a los valores de entalpía de ionización de los residuos protonables señalados en la Tabla 4.13. La gráfica obtenida en el ajuste aparece en la Figura 4.6.

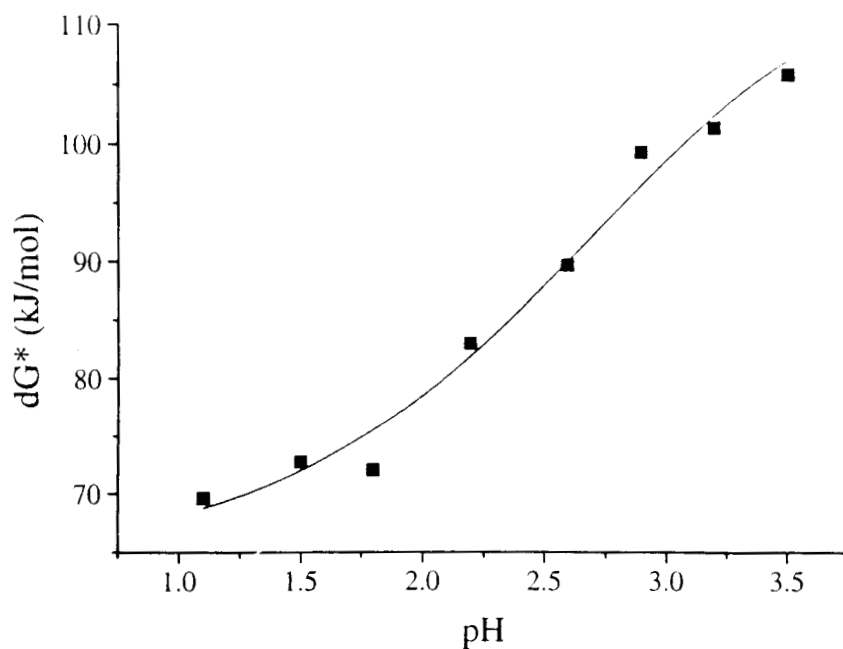


FIGURA 4.5 Curva de ajuste para la energía libre de activación del desplegamiento de quimopapaína. $\chi^2 = 4.18$.

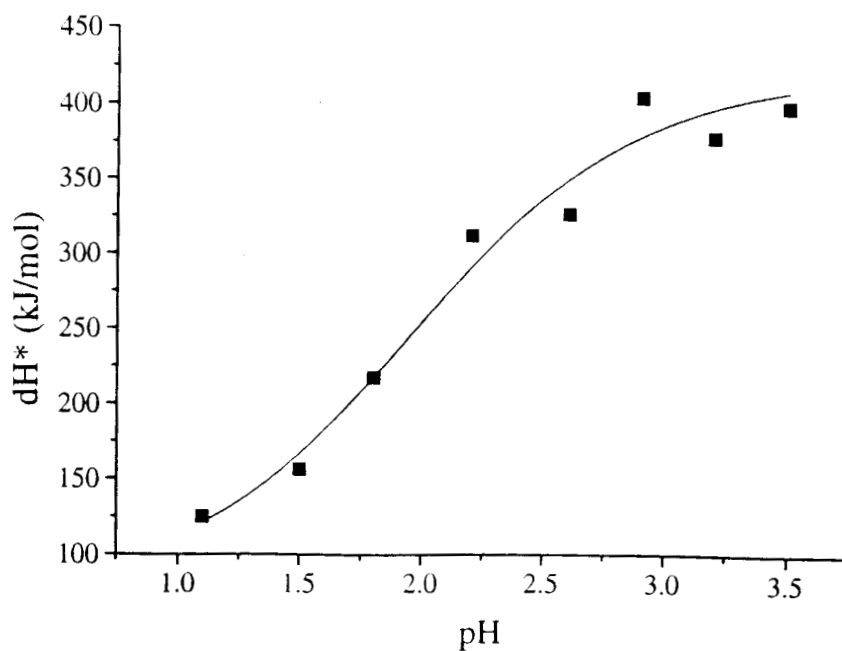


FIGURA 4.6 Curva de ajuste para la entalpía de activación del desplegamiento de quimopapaína. $\chi^2 = 346.47$.

Número de residuos	ΔH_a^N (kJ/mol)	ΔH_a^T (kJ/mol)
7	-5	-6.5
4	-4	-80.2

TABLA 4.13 Valores de la entalpía de ionización obtenidos mediante el ajuste de la expresión de ΔH_{app}^* teórica a los datos experimentales de la Tabla 4.9. ΔH_0^* , el valor de la entalpía de activación en el pH más cercano a la neutralidad, se tomó igual a 420 kJ/mol.

Para los dos tipos de residuos protonables considerados en el cálculo, se obtuvo que la entalpía de ionización del estado de transición es más negativa que la del estado nativo. Esto concuerda con los datos experimentales para el cambio de entalpía con el pH, pues permite explicar el cambio en la entalpía del ciclo termodinámico deducido en la sección 2.4. Por otra parte, indica también que la protonación de los residuos en el estado de transición requiere de menos energía que en el estado nativo, es decir, que podría haber residuos involucrados en puentes salinos en el estado nativo que quedasen con una carga positiva neta menor en sus cercanías.

El cambio del pH tendrá en consecuencia un efecto sobre los estados de ionización de los residuos ionizables de la proteína, pues un residuo ionizable contribuirá a la diferencia en el número de protones ligados a la proteína nativa y al estado de transición sólo en el caso de que su ionización en la proteína nativa sea diferente de su ionización en el estado de transición. Esto indica que, al disminuir el pH, podrían surgir diferencias en los estados de ionización de los residuos ionizables en ambos estados, lo que contribuiría a la desestabilización de la proteína. Por tanto, en el intervalo observado de pH, el estado activado tiene una carga mayor que el estado nativo. Para explicar este aumento en la carga es necesario suponer un cambio en la conformación de la proteína, que

podría ser consecuencia, a su vez, de cambios en la protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos. La interacción de los residuos protonables de la superficie de la proteína tendría un efecto desestabilizador, pues la repulsión electrostática contribuiría al aflojamiento de la estructura cercana a la superficie. Esto tendría como consecuencia un aumento en la superficie de la molécula y en el número de residuos expuestos, lo que en conjunto afectaría los eventos iniciales del desplegamiento. Además, haría disminuir la separación energética entre el estado nativo y el de transición.

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Entre los puntos más importantes que se pueden mencionar en nuestro trabajo se encuentran:

+ Hay fuerte evidencia de que el proceso de desdoblamiento de quimopapaína, en el intervalo de temperatura analizado, se ajusta a un modelo de dos estados. Además, el estado de transición en el desplegamiento parece corresponder a una conformación compacta que se encuentra más cerca de la proteína nativa que de la desplegada.

+ A diferencia de otras proteínas estudiadas, la entalpía de activación de la desnaturalización de quimopapaína depende del pH, lo que podría ser indicio de que el estado de transición de la quimopapaína difiere notablemente del estado nativo. Hay reportes recientes (Oliveberg y Fersht, 1996) acerca de un cambio en la entalpía de activación de la barnasa con el pH, lo que indica que estructuras comunes a diversas proteínas (en este caso, los residuos protonables semiocultos en la superficie) podrían estar involucradas en el proceso de desestabilización al ser expuestas a concentraciones elevadas de protones. La protonación de residuos de la superficie provocaría un efecto de repulsión electrostática que, a su vez, podría inducir un desarreglo parcial de la estructura secundaria cercana a la superficie de la molécula y la exposición de puentes salinos.

+ Las ecuaciones deducidas para explicar el cambio de ΔG^* y ΔH^* con el pH dan resultados aparentemente correctos. Sin embargo, son necesarios estudios más detallados de la protonación de residuos para explicar satisfactoriamente este mecanismo. En particular, podría ser necesario efectuar titulaciones calorimétricas que permitiesen determinar con mayor precisión el proceso de protonación de la proteína. Asimismo, con el objeto de estudiar el efecto de la modificación de residuos protonables particulares, podrían realizarse, por mutagénesis dirigida, algunas sustituciones de grupos próticos en la quimopapaína.

+ La ecuación utilizada generalmente para extrapolar el valor de las constantes de velocidad de desplegamiento a una concentración cero de desnaturalizante parece no ser válida en nuestro caso, lo que indicaría que el clorhidrato de guanidina no es un buen ejemplo de agente desestabilizante para la quimopapaína. La naturaleza iónica del GuHCl podría ser un factor importante en esta discrepancia, de modo que son necesarios estudios comparativos del efecto de la urea y el clorhidrato de guanidina, así como experimentos en los que varíe la fuerza iónica de la solución.

REFERENCIAS

1. Alberty, R. A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1207**, 1-11.
2. Arroyo-Reyna, A. y Hernández-Arana, A. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1248**, 123-128.
3. Baker, E. N. (1980) *J. Mol. Biol.* **141**, 441-484.
4. Baker, E. N. y Drenth, J. (1987) En *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F. A. y McPherson, A., eds.), Vol. 3, John Wiley & Sons, Nueva York, pp. 313-368.
5. Bashford, D. y Karplus, M. (1990) *Biochemistry* **29**, 10219-10225.
6. Bohinski, R. C. (1978) *Bioquímica*, Fondo Educativo Interamericano, Nueva York, pp. 111-152.
7. Brocklehurst, K., Baines, B. S. y Kierstan, M. P. J. (1981) *Top. Enzyme Ferment. Biotechnol.* **5**, 262-335.
8. Buttle, D. J. y Barrett, A. J. (1984) *Biochem. J.* **223**, 81-88.
9. Cantor, C. R. y Schimmel, P. R. (1980) *Biophysical Chemistry, Part III*, W. H. Freeman, Nueva York, pp. 1075-1107.
10. Carey, P. R., Ozaki, Y. y Storer, A. C. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **117**, 725-731.
11. Carne, A. y Moore, C. H. (1978) *Biochem. J.* **173**, 73-83.
12. Creighton, T. E. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5082-5086.
13. Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7132-7155.
14. Dubois, T., Jacquet, A., Schnek, A. G. y Looze Y. (1988) *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* **369**, 733-740.

15. *Enzyme Handbook* (1991) (Schomburg, D. y Salzmann, M., eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
16. Fersht, A. R., Kellis, J. T., Matouschek, A. T. E. L. y Serrano, L. (1990) *Nature* **343**, 602.
17. Frost, A. A. y Pearson, R. G. (1961) *Kinetics and Mechanism*, segunda edición, John Wiley, Nueva York, pp. 77-102.
18. Go, N. (1983) *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **12**, 183-210.
19. Goldenberg, D. P. y Creighton, T. E. (1985) *Biopolymers* **24**, 167-182.
20. Hernández-Arana, A. y Soriano-García, M. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 170-175.
21. Holwerda, B. C. y Rogers, J. C. (1992) *Plant Physiol.* **99**, 848-855.
22. Jackson, S. E. y Fersht, A. R. (1991a) *Biochemistry* **30**, 10428-10435.
23. Jackson, S. E. y Fersht, A. R. (1991b) *Biochemistry* **30**, 10436-10443.
24. Jaenicke, R. (1993) *Chemtracts-Biochemistry & Molecular Biology* **4**, 1-30.
25. Kamphuis, I. G., Drenth, J. y Baker, E. N. (1985a) *J. Mol. Biol.* **182**, 317-329.
26. Kamphuis, I. G., Kalk, K. H., Swarte, M. B. A. y Drenth, J. (1985b) *J. Mol. Biol.* **179**, 233-256.
27. Labhardt, A. M. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 331-335.
28. Laidler, K. J. (1971) *Cinética de reacciones*, Alhambra, Madrid, pp. 81-84.
29. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. (1993) *Principios de Bioquímica*, segunda edición, Omega, Barcelona.
30. Lepock, J. R., Ritchie, K. P., Kolios, M. C., Rodahl, A. M., Heinz, K. A. y Kruuv, J. (1992) *Biochemistry* **31**, 12706-12712.
31. Lumry, R. y Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120.

32. Manavalan, P. y Johnson, W. C. (1983) *Nature (London)* **305**, 831-832.
33. Matouschek, A., Kellis, J. T., Serrano, L. y Fersht, A. (1989) *Nature* **340**, 122-126.
34. Matthews, C. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 653-683.
35. McDonald, C. C., Phillips, W. D. y Glickson, J. D. (1971) *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 235-246.
36. More, S. (1969) En *Structure and Function Relationships of Proteolytic Enzymes*, (Desnuelle, P., Neurath, H. y Ottesen, M., eds.), Academic Press, Nueva York, pp. 289-297.
37. Oliveberg, M. y Fersht, A. (1996) *Biochemistry* **35**, 6795-6805.
38. Oliveberg, M., Vuilleumier, S. y Fersht, A. (1994) *Biochemistry* **33**, 8826-8832.
39. Padilla-Zúñiga, A. J. (1993) *Tesis de maestría*, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
40. Pfeil, W. y Privalov, P. L. (1976) *Biophysical Chemistry* **4**, 41-50.
41. Pickersgill, R. W., Rizkallah, K. P., Harris, G. W. y Goodenough, P. W. (1991) *Acta Cryst.* **B47**, 766-771.
42. Pohl, F. M. (1968a) *Eur. J. Biochem.* **4**, 373-377.
43. Pohl, F. M. (1968b) *Eur. J. Biochem.* **7**, 146-152.
44. Polgár, L. (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 262-269.
45. Privalov, P. L. (1979) *Adv. Protein Chem.* **33**, 167-241.
46. Ptitsyn, O. B. (1994) *Protein Eng.* **7**, 593-596.
47. Richards, F. M. (1992) En *Protein Folding* (Creighton, T. E., ed.), W. H. Freeman, Nueva York, pp. 1-58.
48. Robinson, G. W. (1975) *Biochemistry* **14**, 3695-3700.

49. Sánchez-Ruiz, J. M. (1992) *Biophys. J.* **61**, 921-935.
50. Sánchez-Ruiz, J. M., López-Lacomba, J. L., Cortijo, M. y Mateo, P. L. (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652.
51. Schmid, F. X. (1992) En *Protein Folding* (Creighton, T. E., ed.), W. H. Freeman, Nueva York, pp. 197-241.
52. Segawa, S.-I. y Sugihara, M. (1984) *Biopolymers* **23**, 2473-2488.
53. Shakhnovich, E. I. y Finkelstein A. V. (1989) *Biopolymers* **28**, 1667-1680.
54. Solís- Mendiola, S., Zubillaga-Luna, R., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (1989) *Biochem. J.* **257**, 183-186.
55. Solís-Mendiola, S., Arroyo-Reyna, A. y Hernández-Arana, A. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1118**, 288-292.
56. Solís-Mendiola, S., Rojo-Domínguez, A. y Hernández-Arana, A. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* **1203**, 121-125.
57. Sturtevant, J. M. (1987) *Ann. Rev. Phys. Chem.* **38**, 463-488.
58. Takahashi, N., Yasuda, Y., Goto, K., Miyake, T. y Murachi, T. (1973) *J. Biochem.* **74**, 355-373.
59. Tanford, C. (1970) *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95.
60. Tello-Solís, S. R. y Hernández-Arana, A. (1995) *Biochem. J.* **311**, 969-974.
61. Timasheff, S. N. (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 67-97.
62. Van Holde, K. E. (1979) *Bioquímica Física*, Alhambra, Madrid.
63. Watson, D. C., Yaguchi, M. y Lynn, K. R. (1990) *Biochem. J.* **266**, 75-81.