



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA
DEPARTAMENTO DE QUIMICA**

AISLAMIENTO Y ESTUDIO
CONFORMACIONAL DE
FORMAS MULTIPLES
DE LA QUIMOPAPAINA

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

TESIS QUE PRESENTA:

D. SILVIA SOLIS MENDIOLA
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN QUIMICA

JURADO: Dr. Barbarín Arreguín Lozano
M. en C. Rafael A. Zubillaga Luna
Dr. Andrés Hernández Arana

MEXICO, D. F.

JUNIO 1989

091031

Sups. Mayo. 90

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Andrés Hernández Arana en el Laboratorio de Biofisiocoquímica del Area de Química Inorgánica, Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.

091031

A MIS PADRES

A MIS HERMANAS Y HERMANO

A MAX

A G R A D E C I M I E N T O S

Agradezco el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, a través de la beca de Maestría con número de registro 52233.

A la Secretaría de Educación Pública por el apoyo financiero al Laboratorio de Biofisiocoquímica, convenio PROIDES 87-01-0116.

Al Dr. Andrés Hernández Arana por su apoyo y dirección y a todos mis compañeros y amigos.

I N D I C E

1.	INTRODUCCION	
1.1	Introducción General	1
1.2	Proteasas Tiólicas	5
1.3	Objetivos	11
2.	MATERIALES Y METODOS	
2.1	Quimopapaína	12
2.2	Otros reactivos	13
2.3	Aislamiento y Purificación	13
2.4	Coeficiente de Extinción	16
2.5	Actividad Proteolítica	17
2.6	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	18
2.7	Determinación de Masas Moleculares	19
2.7.1	Filtración en Gel Tradicional	21
2.7.2	Filtración en Gel en presencia de Guanidina	22
2.7.3	Electroforesis en Poliacrilamida en presencia de SDS	23
2.8	Dicroísmo Circular	24
3.	RESULTADOS Y DISCUSION	
3.1	Aislamiento y Purificación	28
3.1.1	Modificación del pH del Eluyente	29
3.1.2	Variación en el Programa del Gradiente Salino	31

3.1.3	Flujo de la Fase Móvil	33
3.2	Coeficiente de Extinción	38
3.3	Actividad Proteolítica	39
3.4	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida	40
3.5	Determinación de Masas Moleculares	40
3.5.1	Filtración en Gel Tradicional	40
3.5.2	Filtración en Gel en presencia de Guanidina	42
3.5.3	Electroforesis en Poliacrilamida en presencia de SDS	46
3.6	Dicroísmo Circular	50
3.7	Conformación de Proteinasa A	54
4.	CONCLUSIONES	60
5.	PERSPECTIVAS	61
6.	BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION GENERAL.

Existen muchas clases de proteínas globulares, cada una de ellas especializada en una función biológica. La mayoría de las proteínas poseen actividad catalítica y se puede decir, salvo escasas excepciones, que todas las enzimas son proteínas.

La estructura de una molécula de proteína es de suma importancia para determinar su actividad biológica. Se reconocen cuatro niveles o tipos de estructura dentro de una proteína. Estos niveles de estructura se designan: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

Estructura primaria. Establece de modo específico la secuencia de los diferentes aminoácidos de la cadena polipeptídica. Es interesante señalar que el número de proteínas diferentes conocidas es muy grande, siendo para una bacteria del orden de varios miles y estimándose para un mamífero en millones⁽¹⁾. Sin embargo, los aminoácidos que constituyen a las proteínas pueden limitarse a sólo 20 con la eventual aparición, en casos muy particulares, de algún otro diferente^(2,3). Estos aminoácidos tienen en su cadena lateral una variedad de grupos funcionales, pudiendo ser aromáticos o alifáticos, con carga o sin ella y de

tamaños y polaridades variables.

Estructura secundaria. Es el arreglo de aminoácidos formando, en diferentes porciones de la cadena, estructuras regulares y repetitivas, donde los ángulos diedros de la cadena de la proteína adquieren valores bien determinados. La cadena de aminoácidos puede plegarse en el espacio estabilizándose por medio de enlaces de hidrógeno que se establecen entre los átomos de las uniones peptídicas. Dos de las estructuras secundarias más comunes son la hélice alfa y la hoja beta. En la primera, la cadena se enrolla tomando una disposición semejante a la de un resorte donde las cadenas laterales se disponen hacia el exterior de la hélice⁽⁴⁾. En la segunda, la cadena de proteína adquiere una conformación del tipo zig-zag, con sus cadenas laterales situadas en los vértices de la estructura^(4,5). Dada la gran flexibilidad de la cadena, podría esperarse un número amplio de diferentes estructuras secundarias, pero las dos descritas anteriormente son preferidas, debido a que minimizan repulsiones de tipo estérico entre los grupos R y además son estabilizadas por puentes de hidrógeno.

Estructura terciaria. Se refiere al modo como la cadena polipeptídica se curva o se pliega acomodando las estructuras secundarias y los segmentos que las unen para formar la estructura estrechamente plegada y compacta de las

proteínas globulares.

Estructura cuaternaria. Pone de manifiesto cómo se disponen en el espacio las cadenas polipeptídicas de una proteína que posee más de una cadena. La mayor parte de las proteínas con masa molecular superior a los 50000 Da, fibrosas o globulares, contienen dos o más cadenas polipeptídicas, entre las cuales pueden no existir enlaces covalentes⁽²⁾.

Las estructuras terciarias y cuaternarias están formadas por enlaces químicos, fuertes y débiles, todos ellos participando en la estabilización de estas estructuras. En las proteínas globulares las cadenas laterales de los aminoácidos hidrofóbicos se encuentran generalmente dirigidos hacia su interior y están interaccionando entre sí a través de fuerzas de Van der Waals. Por otro lado, la mayoría de los residuos polares están dirigidos hacia el exterior de la proteína, donde interaccionan con el solvente. Las fuerzas que determinan la estructura terciaria, son debidas a enlaces tanto covalentes como no covalentes. De los enlaces covalentes el más importante es el disulfuro (-S-S-), formado a partir de dos residuos de cisteína, ya que su presencia determina en algunos casos el plegado de la cadena polipeptídica. Los reactivos que atacan al grupo disulfuro modifican, radicalmente, las propiedades biológicas de la proteína ya que éstas

dependen fundamentalmente de la estructura terciaria. Agentes como el mercaptoetanol o el ditioneitol, que reducen el enlace disulfuro a dos tioles (-SH), pueden llegar a desnaturalizar una proteína.

Algunas interacciones débiles tiene una participación en la estabilidad de la estructura terciaria de las proteínas. Los agentes capaces de destruir estas interacciones pueden, por lo tanto, desnaturalizar a las proteínas⁽⁶⁾. Hay enlaces por puente de hidrógeno que estabilizan las estructuras secundaria y terciaria. Existen interacciones electrostáticas entre grupos cargados o polares⁽⁷⁾ y enlaces hidrofóbicos entre cadenas laterales apolares las cuales pueden estar muy distanciadas entre si en la estructura primaria, pero muy cercanas en la conformación final de la molécula⁽⁴⁾. También existen enlaces aromáticos por sobreposición de regiones donde se encuentran electrones deslocalizados en anillos aromáticos, e incluso enlaces de coordinación de diversas partes de la proteína con un ión metálico⁽³⁾.

La desnaturalización es el proceso por el cual una proteína pierde su estructura nativa, para tomar una conformación aleatoria. Este proceso no rompe los enlaces peptídicos, por lo que la estructura primaria permanece inalterada. Sin embargo, las propiedades enzimáticas se pierden y en general las propiedades físicas y químicas

muestran cambios⁽⁸⁾. Por ejemplo, la solubilidad de la molécula disminuye al desnaturalizarse, debido a que los grupos hidrofóbicos aglutinados en el interior de la molécula quedan expuestos al solvente acuoso. Otro fenómeno muy común causado por el desdoblamiento de la cadena es la agregación, debida a la unión prácticamente irreversible de cadenas conformadas al azar. Esto produce turbidez en la solución, debido a la formación de partículas en suspensión^(8,9).

Las causas por las que una proteína se desnaturaliza son varias pero todas consisten en un cambio extremo en las condiciones del entorno de la molécula. Tales cambios pueden ser aumento de temperatura, extremos de pH, presencia de agentes químicos, etc.

La estructura terciaria está determinada por la estructura primaria, teniendo la secuencia de aminoácidos la información necesaria y suficiente para que la proteína adquiriera una configuración tridimensional específica⁽⁶⁾.

2. PROTEASAS TIOLICAS.

Las proteasas tiólicas o cisteínicas comprenden un grupo de enzimas cuya actividad proteolítica depende del grupo tiol de un residuo de cisteína. Están ampliamente distribuidas a través de los sistemas vivos, encontrándose

en animales, plantas y bacterias, en los cuales actúan con una variedad de funciones. Hay evidencia de que la mayor parte de ellas pertenecen a una familia de enzimas homólogas, similares tanto estructural como funcionalmente⁽¹⁰⁾.

Las proteasas tiólicas más conocidas son aquellas derivadas de fuentes vegetales, porque son las que se obtienen más fácilmente y en mayor cantidad. Debido a su obtención en grandes cantidades, las proteasas tiólicas vegetales son ampliamente utilizadas en procesos industriales, tan diversos como, ablandamiento de carne, clarificación en manufactura de cerveza⁽¹⁰⁾, etc.; respecto a su función metabólica, se sugiere que pueden actuar como agentes protectores contra infecciones fúngicas en la planta⁽¹¹⁾.

Otros estudios, empleando pruebas de reactividad, han mostrado que el sistema cis-his parece ser una característica común de las enzimas tiólicas de plantas y animales⁽¹²⁻¹⁴⁾. Cuando se analizan las especificidades y los modos de enlace similares mostrados por algunas de esas enzimas^(11,15,16), detectados por espectroscopía de resonancia raman⁽¹⁷⁻¹⁹⁾, los resultados indican que ellas comparten estructuras con sitios activos y mecanismos de acción similares. Además, existe una gran similitud en las proteasas cisteínicas, la cual ha sido demostrada por

estudios recientes de sus secuencias de aminoácidos⁽¹⁰⁾, de forma que las características estructurales comunes y las variaciones en su conformación están ahora delineadas con mayor claridad.

En estudios previos sobre proteinasas cisteínicas (11,20,21), se le ha dado énfasis al estudio de las enzimas vegetales, particularmente a la papaína, la cual se ha visto como un ejemplo típico. La molécula de esta proteína consiste de una sola cadena polipeptídica de 212 residuos de aminoácidos y tiene una masa molecular de 23350 Da⁽¹⁰⁾.

Existe una gran variedad de proteasas tiólicas caracterizadas por sus masas moleculares y por sus puntos isoeléctricos. Casi todas estas enzimas tienen masas moleculares estimadas en un intervalo de 20000 a 28000 Da. Los puntos isoeléctricos son muy variables, lo que probablemente es un reflejo de los medios ambientes biológicos diferentes en los cuales operan.

En algunos casos se pueden aislar enzimas múltiples de la misma fuente; al menos tres enzimas distintas que poseen actividad proteolítica (papaína, quimompapaína y proteinasa A, en proporción de 5, 27 y 18%, respectivamente⁽²²⁾), han sido caracterizadas a partir del látex de papaya (Carica papaya)⁽²⁰⁻²³⁾. La fracción de quimompapaína parece contener un número aun no determinado

de enzimas con características similares⁽²³⁻²⁶⁾. Estas formas múltiples de una misma fuente no son simples productos de degradación ya que en la mayoría de los casos hay diferencia, claramente establecida, en la secuencia de aminoácidos y en algunas de sus propiedades físicas.

Al igual que la papaína, la quimopapaína es una tiolenzima que es activada por cisteína o cianuro y es inhibida por reactivos que protegen el grupo tiol^(27,28). Las especificidades al substrato de papaína y quimopapaína, muestran un considerable grado de similitud^(27,29,30). En contraste a la papaína, la quimopapaína es muy estable a valores de pH ácidos^(31,32).

Entre las enzimas de los vegetales la quimopapaína difiere en que aparentemente tiene 2 grupos tiol libres, siendo activo enzimáticamente sólo uno de ellos^(23,33). También presenta algunas particularidades en sus propiedades cinéticas⁽³⁴⁾. Pero probablemente pertenece a la misma familia estructural como las otras enzimas cisteínicas de vegetales.

Las proteinasas de látex de papaya pueden dividirse de acuerdo a sus puntos isoeléctricos en tres grandes grupos de basicidad (Tabla I). Debido a esta diferencia, las tres enzimas son separadas por cromatografía de intercambio iónico. Recientemente se ha reportado⁽²³⁾ la existencia de cuatro formas de quimopapaína llamadas A y B₁-B₃ en orden

de incremento de basicidad.

T A B L A I

Proteasas	Masa Molecular	Punto Isoeléctrico	Ref.
Papaína	23350	8.75	(11)
Quimopapaína	35000	10.1-10.6	(20)
	26-28000		(35)
Proteinasa A	24000	11.0	(20,35)

Un análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de la porción N-terminal de las enzimas del látex de papaya demostró inequívocamente la presencia de al menos cuatro proteínas diferentes, cada una originada de un gen individual⁽³⁶⁾.

Se observó una homología muy extensa para los 17 primeros residuos de aminoácidos (Tabla II) lo cual indicó que papaína, proteinasa A y quimopapaína provienen de un gen ancestral común⁽³⁶⁾. Debido a lo anterior, Polgár ha sugerido que pueden ser consideradas como isoenzimas⁽²⁶⁾.

T A B L A I I

SECUENCIA PARCIAL DE AMINOACIDOS PARA PROTEASAS DE
CARICA PAPAYA ⁽³⁶⁾ .

Papaína	Ile	Pro	Glu	Tyr	Val	Asp	Trp	Arg	Gln	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys
Quimopapaína	Tyr	Pro	Glu	Ser	Ile	Asp	Trp	Arg	Ala	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Lys
Proteinasa A	Leu	Pro	Glu	Asn	Val	Asp	Trp	Arg	Lys	Lys	Gly	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Arg

En suma, al presente no tenemos suficiente información para clasificar apropiadamente las diferentes formas moleculares de la quimopapaína.

3. OBJETIVOS.

Lo expuesto hasta aquí pone de manifiesto que la información existente, acerca de la estructura y función de las proteasas cisteínicas de los vegetales, es limitada, principalmente la que corresponde a las formas múltiples de la quimopapaína, ya que a la fecha, son pocos los estudios dedicados al conocimiento estructural de esta proteasa.

El objetivo del presente trabajo es contribuir al estudio de las formas múltiples de quimopapaína. El estudio se realizó siguiendo diferentes etapas:

- a) Determinar las condiciones experimentales para la separación de las formas múltiples de quimopapaína.
- b) Caracterización de 4 formas de quimopapaína.
- c) Comparación de estructuras conocidas con la probable estructura de la quimopapaína.

MATERIALES Y METODOS

1. QUIMOPAPAÍNA

Para la separación de las formas múltiples de la quimopapaína se utilizaron como material de partida dos lotes de quimopapaína comercial con las siguientes características:

- 1) Lote 14F-81251 (EC.3.4.22.6) de Sigma Chemical, parcialmente purificada, libre de papaína y lisozima.
- 2) Lote 74F-8199 (EC.3.4.22.6) de Sigma Chemical, cromatográficamente purificada, libre de papaína, lisozima y proteinasa A.

La homogeneidad de las muestras de las formas múltiples de la quimopapaína ya aisladas, se demostró mediante el empleo de varias técnicas: Cromatografía de filtración en gel HPLC, cromatografía de intercambio iónico HPLC, electroforesis tradicional en poliacrilamida.

La concentración de las muestras fue estimada espectrofotométricamente a 280 nm, utilizando los coeficientes de extinción determinados en el presente trabajo.

2. OTROS REACTIVOS.

Se utilizó hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) comercial, grado I Sigma Chemical Co.

El resto de los compuestos usados fueron grado reactivo.

3. AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

La purificación de las proteínas es de gran importancia, ya que para realizar cualquier estudio sobre ellas, lo primero que hay que considerar es su pureza, con lo cual aseguramos que los resultados obtenidos corresponden exclusivamente a la proteína estudiada.

La quimopapaína es una enzima proteolítica que se autohidroliza fácilmente, siendo necesario mantenerla a bajas temperaturas para evitar la hidrólisis. Debido a lo anterior, todos los tratamientos fueron realizados en frío (baño de hielo a 4°C).

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) presenta una gran cantidad de ventajas con respecto a la cromatografía tradicional, por ejemplo, versatilidad, rapidez, reproducibilidad, estabilidad y sensibilidad.

Los polielectrolitos tales como las proteínas se unen a los intercambiadores de iones a través de la formación de uniones electrostáticas entre cargas de signo opuesto entre

la macromolécula adsorbida y el intercambiador de iones. Mientras mayor sean el número de uniones y la carga de los iones, mayor será la afinidad. Estas uniones electrostáticas individuales se están dissociando constantemente y reformando a medida que los iones de sal compiten por los sitios de unión. Cuando las sustancias que se van a separar se mueven lentamente en comparación al líquido eluyente se obtienen los picos mejor resueltos⁽³⁷⁾.

Las formas múltiples de la quimopapaína se separaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando una columna de intercambio catiónico TSK-CM3SW de 75 mm de longitud y 7.5 mm de diámetro interno, en un cromatógrafo de líquidos Varian 5020B. Se inyectaron 10 µl de la quimopapaína comercial lote 14F-81251, la cual fue preparada a una concentración de 10 mg/ml.

Las condiciones cromatográficas experimentales más adecuadas para la mejor separación de las formas múltiples de la quimopapaína se determinaron mediante la modificación de parámetros tales como el valor de pH, el flujo y la variación del gradiente salino.

pH. Se prepararon soluciones reguladoras a diferentes valores de pH: 7.0, 6.4 y 6.0, a partir de sales de fosfatos a una concentración total de 0.05M más 0.02% de NaN_3 , también se preparó una solución reguladora de pH 5.0 con acetatos 0.05M y 0.02% de NaN_3 .

FLUJO. Se eluyeron muestras de quimopapaína a diferentes flujos (1.0, 0.5, 0.3 y 0.2 ml/min), manteniendo constantes el pH y el gradiente.

GRADIENTE SALINO. A pH y flujo constantes, se obtuvieron cromatogramas con diferentes programas para el gradiente, dichos programas fueron: a) lineales con gradiente 3.5, 2.59, 1.89 y $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$; b) cóncavo; c) convexo y d) escalonado.

Se utilizó como fase móvil un sistema binario, el regulador de fosfatos previamente descrito como solución A y la misma solución con NaCl 1M como eluyente B.

A partir de los cálculos de resolución se eligieron las condiciones de elución más adecuadas, de acuerdo al efecto del pH, al flujo del eluyente y al programa del gradiente, se hicieron corridas preparativas en las que se inyectaron 10 mg de la quimopapaína comercial, lote 74F-8100, disueltos en 1 ml del regulador apropiado.

Se llevaron a cabo recromatografías en las que fue necesario concentrar las muestras colectadas, utilizando cartuchos inmersibles Millipore para ultrafiltración, con límites de exclusión de 10000 Daltons.

Una vez aisladas las formas múltiples de la quimopapaína, se procedió a investigar su grado de pureza, sus masas moleculares y el análisis conformacional de cada una de ellas.

4. COEFICIENTE DE EXTINCIÓN

El tratamiento cuantitativo de la absorción de energía radiante por la materia, depende del principio general de la ley de Beer: $A = abc^{(38)}$, donde:

A = Absorbancia

a = Constante de proporcionalidad llamada absortividad

b = Espesor de la muestra absorbente de luz (cm)

c = Concentración de la especie absorbente (mg/ml)

La ley de Beer indica que la absortividad es una constante independiente de la concentración, la longitud de la trayectoria y la intensidad de la radiación incidente. La absortividad es una propiedad de una sustancia. La magnitud de a depende de las unidades utilizadas por b y c. La constante de absortividad o coeficiente de extinción se expresa en $\text{ml mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$ si la masa molecular del material absorbente es desconocida.

El coeficiente de extinción determinado en las muestras de las formas múltiples de la quimopapaína fue medido a partir de las soluciones de esta proteína, de acuerdo al procedimiento siguiente: se concentraron las muestras a 0.20 mg/ml aproximadamente y se dializaron contra agua desionizada durante 72 horas. Se les midió su absorbancia a 280 nm en una celda de 1 cm de recorrido óptico y se determinó su volumen con la mayor exactitud posible, se

colocaron en recipientes vacíos previamente pesados y se evaporó el solvente de las muestras en una estufa a 100°C, durante 24 horas, dejando enfriar el residuo en un desecador para finalmente determinar su masa.

5. ACTIVIDAD PROTEOLITICA.

La actividad proteolítica se determinó utilizando caseína como sustrato⁽³⁵⁾. Se activaron 0.25 ml de solución enzimática a una concentración entre 0.05 y 0.20 mg/ml de la siguiente forma: se adicionó 0.75 ml de cisteína (0.1M en cisteína y 0.01M en EDTA), dejando en incubación las muestras durante 5 min a 35°C. La reacción se inició agregando 1 ml de caseína (1% p/v), dejando transcurrir 10 min exactamente y manteniendo la misma temperatura anterior; después se añadieron 3 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 5%, a fin de detener la reacción. La mezcla se dejó en reposo durante 30 min; posteriormente se centrifugó y se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. En estas condiciones la unidad de actividad corresponde al cambio de 1.0 unidad de absorbancia/minuto. La actividad específica es la unidad de actividad por mg de enzima⁽³⁹⁾.

6. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Hay varios tipos de electroforesis que son útiles para el análisis y la separación de proteínas. En la electroforesis de zona se puede separar una mezcla de proteínas basándose en la carga eléctrica y el tamaño molecular; generalmente se utilizan geles de almidón o de poliacrilamida como materiales de soporte. Al final del experimento la posición y la cantidad de proteína en un gel se determinan por aplicación de un colorante que tiñe a éstas una vez fijadas al material de soporte por precipitación; la intensidad de la coloración retenida es proporcional a la cantidad de proteína.

La electroforesis se realizó en un aparato Multiphor LKB 2117 con placas horizontales de gel de poliacrilamida (2 x 115 x 250 mm), preparadas al 5%, utilizando un regulador de imidazol con una concentración de 0.05M y un pH 7.0.

La concentración de las muestras analizadas fue entre 0.2 y 2.0 mg/ml; se colocaron 10 µl de muestra en cada una de las ranuras de la placa y se aplicó un campo eléctrico de 12 V/cm, durante 2.5 horas. El tratamiento posterior para la placa fue: 30 min en solución fijadora, mezcla de ácido tricloroacético al 17.1% (p/v), ácido sulfosalicílico al 5.1% (p/v) y metanol al 30.0% (v/v); 60

min en solución de teñido, mezcla de metanol al 45.4% (v/v), azul de coomassie R-250 0.25% (p/v) y ácido acético glacial 9.2% (v/v); de 2 a 5 horas en solución de desteñido, que es una mezcla de etanol 30.0% (v/v), ácido acético 10.0% (v/v); y 60 min en solución preservadora, que es una mezcla de etanol 30.0% (v/v), ácido acético 10.0% (v/v), glicerol 10.0% (v/v), ésto fue de acuerdo al procedimiento descrito en la ref. 40.

7. DETERMINACION DE MASAS MOLECULARES

La determinación de masas moleculares de proteínas es indispensable en la resolución de una gran variedad de problemas. En la elucidación de la estructura primaria de una proteína el conocimiento de la masa molecular permite establecer el contenido de los diferentes residuos en la cadena. Asimismo, cualquier estudio fisicoquímico de proteínas, estructural o de interacción, requiere del conocimiento de las masas moleculares.

Los métodos utilizados para determinar masas moleculares permiten también establecer la homogeneidad y en algunos casos, la identificación de una muestra.

Para determinar masas moleculares de biomoléculas, se han utilizado varias técnicas. Una técnica de uso común es la cromatografía de filtración en gel. Esta se basa en

un efecto de tamiz molecular en el que el material de la columna cromatográfica logra retener mayor tiempo a las moléculas con menor radio efectivo⁽⁴¹⁾. En el caso de proteínas globulares, se ha observado una correlación lineal entre el tiempo de retención y el logaritmo de la masa molecular⁽⁴¹⁾. Sin embargo, es necesario considerar la diferencia en la forma de las moléculas, ya que dos proteínas globulares con la misma masa pero con radios efectivos distintos presentan diferentes tiempos de retención. A fin de evitar este problema, se ha sugerido el empleo de un agente desnaturalizante para inducir la conformación de cadena aleatoria en las proteínas⁽⁴²⁾. El cloruro de guanidina (GuHCl) 6M ha demostrado su efectividad en este sentido, disminuyendo además las interacciones de las proteínas con el material de empaque de la columna, que en algunos casos afectan significativamente los resultados.

Con el desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se ha aumentado la rapidez y precisión de la técnica de filtración en gel, permitiendo además el empleo de cantidades menores de muestra.

La electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS)⁽⁴³⁾, es otra técnica ampliamente utilizada. La función del detergente es cambiar la conformación nativa de la proteína, además de enmascarar las cargas para que

la movilidad de las muestras se deba exclusivamente a su masa molecular; con esto se elimina la influencia de la forma de la estructura nativa y de la composición de residuos ionizables.

Para determinar las masas moleculares de las formas múltiples de la quimopapaína se utilizaron 3 métodos:

- a) Filtración en gel, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- b) Filtración en gel en presencia de guanidina, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).
- c) Electroforesis en presencia de dodecilsulfato de sodio.

7.1 FILTRACION EN GEL TRADICIONAL

Se usó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 5020B, con una columna TSK-2000SW de 7.5 mm de diámetro interno x 30 cm de longitud, con guarda columna TSK-GSWP de 7.5 cm de longitud.

En la filtración en gel tradicional (sin guanidina) las muestras se disolvieron en regulador de fosfatos 0.05M, pH 6.8 con NaCl 0.1M y 0.02% de NaN_3 . Se inyectaron 10 μl de cada muestra con una concentración de 1 mg/ml. La elución se hizo con el mismo regulador, a un flujo de 0.5 ml/min. Las muestras se detectaron por su absorción a 280 nm, en un detector Varian UV-100. La columna se calibró

con los siguientes estándares: citocromo c (Mr 12384), lisozima (14300), mioglobina (16950), papaína (23350), ovalbúmina (43000), albúmina y su dímero (68000 y 136000).

7.2 FILTRACION EN GEL EN PRESENCIA DE GUANIDINA

Las masas moleculares se determinaron por filtración en gel en presencia de GuHCl, de acuerdo a una modificación del procedimiento descrito por Fish, et al.⁽⁴²⁾, utilizando preparaciones con una concentración de 0.20 mg/ml de proteína. Estas muestras se incubaron previamente durante 8 horas en GuHCl 6M y 2-mercaptoetanol 0.1M, regulando el pH a 8.6 con tris-hidroximetil amino-metano (Tris); posteriormente se carboximetilaron con iodoacetamida 0.12M por 1 hora, a temperatura ambiente. Se inyectaron 10 µl de cada una de las soluciones de proteína desnaturalizada en una columna TSK-2000SW y se eluyeron con GuHCl 6M, a un flujo de 0.5 ml/min. En la calibración de la columna se utilizaron los siguientes estándares: aprotinina (Mr 6500), citocromo c (12384), lisozima (14300), mioglobina (16950), papaína (23350) y anhidrasa carbónica (29000).

Para evitar la autohidrólisis, se carboximetilaron los sitios activos tanto de la papaína como de las quimopapaínas antes del tratamiento desnaturalizante. Para

ésto, se activaron con mercaptoetanol 0.1M durante 30 min y posteriormente se les adicionó iodoacetamida 0.12M, dejándolas reaccionar durante 60 min. Una vez bloqueados los sitios activos de las muestras, se les aplicó el tratamiento descrito anteriormente.

7.3 ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECILSULFATO DE SODIO (SDS).

La electroforesis se realizó en un aparato Multiphor LKB 2117, con placas horizontales (2 x 115 x 250 mm) de gel de poliacrilamida al 10% en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), utilizando un regulador de imidazol 0.05M, pH 7.0 y SDS al 2% (p/v). La desnaturalización con SDS se realizó en muestras con una concentración de 0.2 a 2.0 mg/ml, adicionando SDS al 1% (p/v), dejando 2 min en ebullición y agregando 10 µl de mercaptoetanol. Antes de la desnaturalización, a las proteasas se les bloqueó su sitio activo; para esto se adicionó mercaptoetanol 0.32M durante 1 hora y posteriormente se agregó iodoacetamida sólida para tener una concentración final de 0.6M, dejando reaccionar durante 30 min.

Posteriormente, se colocaron 10 µl de muestra en cada una de las ranuras de la placa y se sometieron a un campo eléctrico de 12 V/cm durante 2 horas. La tinción de la

placa se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en la ref. 40.

La determinación de las masas moleculares de las muestras problema (quimopapaínas), se hizo en base a una comparación con estándares, los cuales fueron: citocromo c (Mr 12384), lisozima (14300), γ -globulina cadena ligera y cadena pesada (23500 y 50000), tripsinógeno (23991), ovalbúmina (43000), α -1-glicoproteína (44000) y albúmina y su dímero (68000 y 136000).

8. DICROISMO CIRCULAR.

Algunos métodos que aportan información estructural global para las proteínas son la dispersión rotatoria óptica (DRO) y el dicroísmo circular (DC).

La estructura secundaria de una proteína, se puede determinar por los métodos siguientes: espectroscopía infrarroja, raman y dicroísmo circular. De los tres el más poderoso es el dicroísmo circular⁽⁴⁴⁾.

En la figura 1 se muestra el diagrama esquemático de un espectropolarímetro⁽⁴⁵⁾. Los equipos comunes permiten utilizar radiación electromagnética en el intervalo de longitudes de onda de 180 a 700 nm.

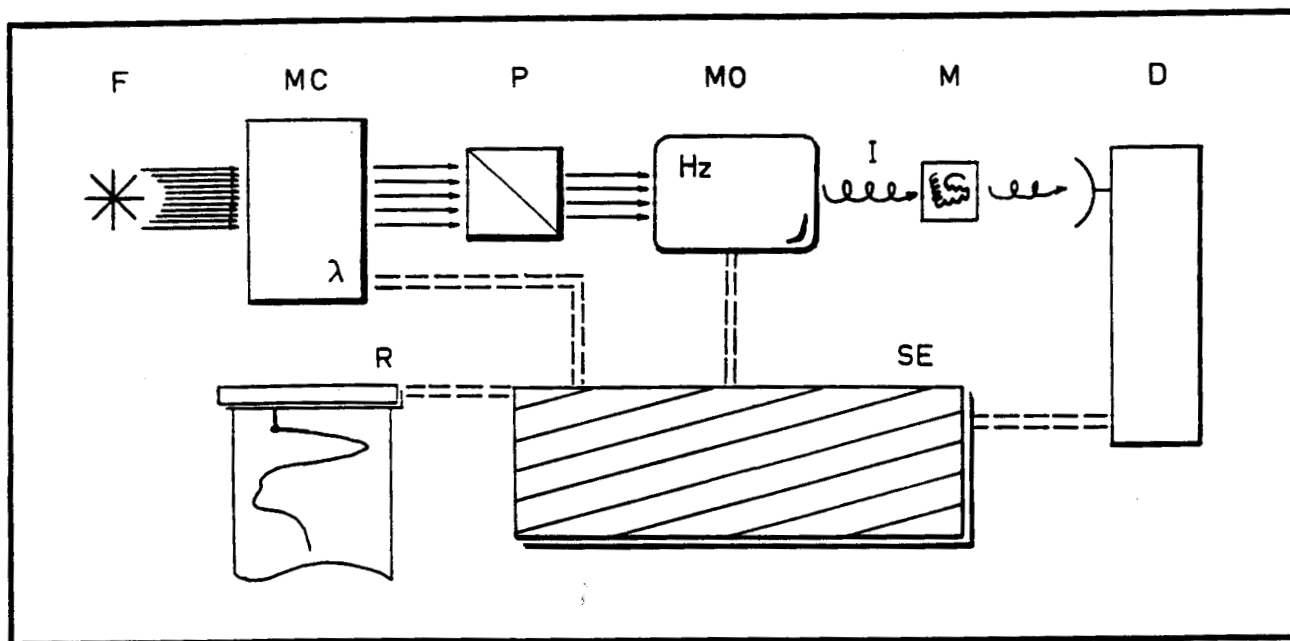


Fig. 1. DIAGRAMA ESQUEMATICO DE UN ESPECTROPOLARIMETRO.

F = fuente

MC = monocromador

P = prisma

MO = modulador

I = haz incidente

M = muestra

D = detector

R = registrador

y SE = sistema electrónico

La radiación de una fuente muy estable y de gran intensidad (F) pasa a través de un monocromador (MC) y es polarizada en un plano por un prisma (P). A continuación, el modulador (MO) actúa como un retardador de la fase de uno de los componentes de la radiación. La variación en la fase depende de la señal eléctrica de alta frecuencia que el sistema electrónico (SE) del aparato emite y que es recibida por el modulador. De esta forma, el haz incidente (I) está alternativamente formado por luz circularmente polarizada a la derecha y a la izquierda. El haz atraviesa la muestra (M) y al emerger es convertido en una señal eléctrica por el detector (D). El sistema electrónico calcula la diferencia entre la absorción de radiación circularmente polarizada en ambos sentidos, convirtiéndola en el valor numérico de la elipticidad y graficándola contra la longitud de onda en el registrador (R).

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron a 25°C en un espectropolarímetro JASCO modelo J-500A, el cual se calibró con ácido d-10-canforsulfónico⁽⁴⁶⁾. Los experimentos se realizaron con soluciones de 0.10 a 0.20 mg/ml en una celda de 0.1 cm para la región del ultravioleta (UV) lejano (190-250 nm), y de 0.15 a 0.60 mg/ml en celda de 1 cm para la zona de UV cercano (330-250 nm). Previamente, las muestras se dializaron durante 72 horas a 4°C, contra un regulador de fosfatos 0.01M, pH 7.0.

La concentración de las muestras se determinó por absorción de luz, utilizando los coeficientes de extinción ($A_{1\text{cm},280}^{1\%}$) determinados para cada componente. La elipticidad por residuo medio, $[\theta]$, se calculó utilizando una masa molecular de 110 g mol^{-1} por residuo, de acuerdo a la relación:

$$[\theta] = 100 \cdot \theta / c \cdot l \text{ (grados cm}^2 \text{ decimol}^{-1}) \text{ (47)}$$

donde

$[\theta]$ = elipticidad molar por residuo

θ = elipticidad

c = concentración molar de residuos

l = longitud de recorrido óptico, en cm.

El contenido de estructuras secundarias se estimó mediante un ajuste de mínimos cuadrados a los espectros de base de Hennessey y Johnson⁽⁴⁴⁾.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. AISLAMIENTO Y PURIFICACION.

A fin de determinar las condiciones experimentales adecuadas para una mejor separación de las muestras a estudiar, se procedió al análisis de los cromatogramas obtenidos para cada una de las muestras, con diferentes parámetros de operación, dichos parámetros consisten en:

- a) Modificación del pH del eluyente.
- b) Variación en el programa del gradiente salino.
- c) Flujo de la fase móvil.

La resolución se evaluó a partir de la separación lograda en los cromatogramas, utilizando la ecuación⁽⁴⁸⁾ siguiente:

$$R = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{w_2 + w_1}{2}} = \frac{2 \Delta t}{w_2 + w_1}$$

donde:

t_{R2} y t_{R1} son tiempos de retención de los componentes eluidos, medidos en el máximo del pico.

Δt = es la diferencia entre los tiempos de aparición entre el pico 2 y el pico 1.

w_1 = ancho de la base del pico 1 en unidades de tiempo.

w_2 = ancho de la base del pico 2 en unidades de tiempo.

1.1 MODIFICACION DEL pH DEL ELUYENTE.

La figura 2 muestra tres cromatogramas, obtenidos cuando se modificó el valor del pH de la solución de elución, manteniendo constantes el flujo del eluyente y el programa del gradiente. Los tres cromatogramas presentan la misma forma, sin embargo, el tiempo de retención varía entre cada una de ellos. En la Tabla III se observan los datos obtenidos, a partir del cálculo de la resolución entre los tres picos principales contenidos en cada uno de los cromatogramas de la figura 2 (aplicando la ecuación descrita anteriormente).

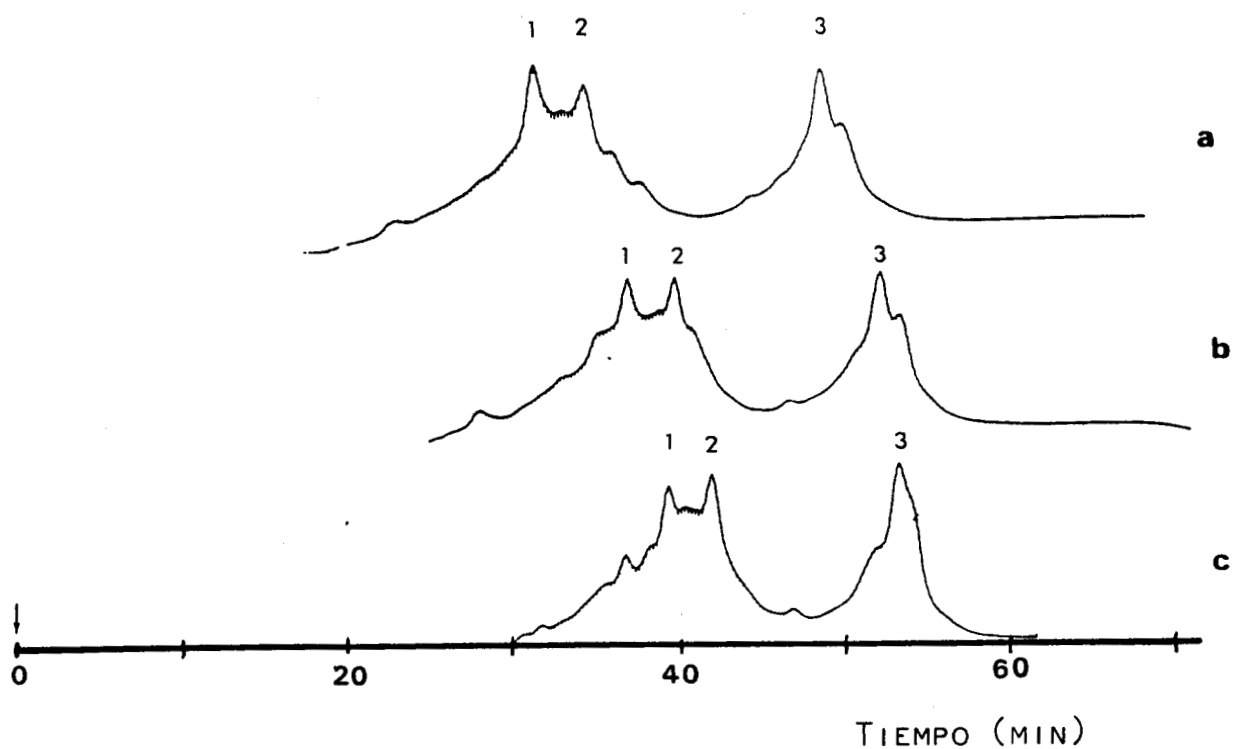


Fig. 2. Cromatogramas de quimopapaína comercial (lote 14F-81251) en función del pH. a) pH 7.2, b) pH 6.6, c) pH 5.9. Columna TSK-CM3SW, flujo 0.4 ml/min, gradiente salino $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$.

T A B L A I I I

#91031

pH	RESOLUCION	
	R_{12}	R_{23}
5.94	0.619	2.074
6.66	0.587	2.029
7.20	0.763	3.109

Flujo 0.4 ml/min.

Gradiente $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$.

1.2 VARIACION EN EL PROGRAMA DEL GRADIENTE SALINO.

La programación del gradiente salino se realizó para diferentes funciones: cóncava, convexa, escalonada y lineal, manteniendo constantes el flujo (0.5 ml/min) y el pH (6.4). A partir de los resultados se determinó que las funciones lineales permitieron una mejor separación. Dentro de las funciones lineales se varió el gradiente de NaCl con 3.5, 2.59, 1.89 y $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$, con el fin de determinar el gradiente óptimo. La figura 3 y la Tabla IV muestran la variación del gradiente y la resolución obtenida en cada caso, observándose que la resolución es

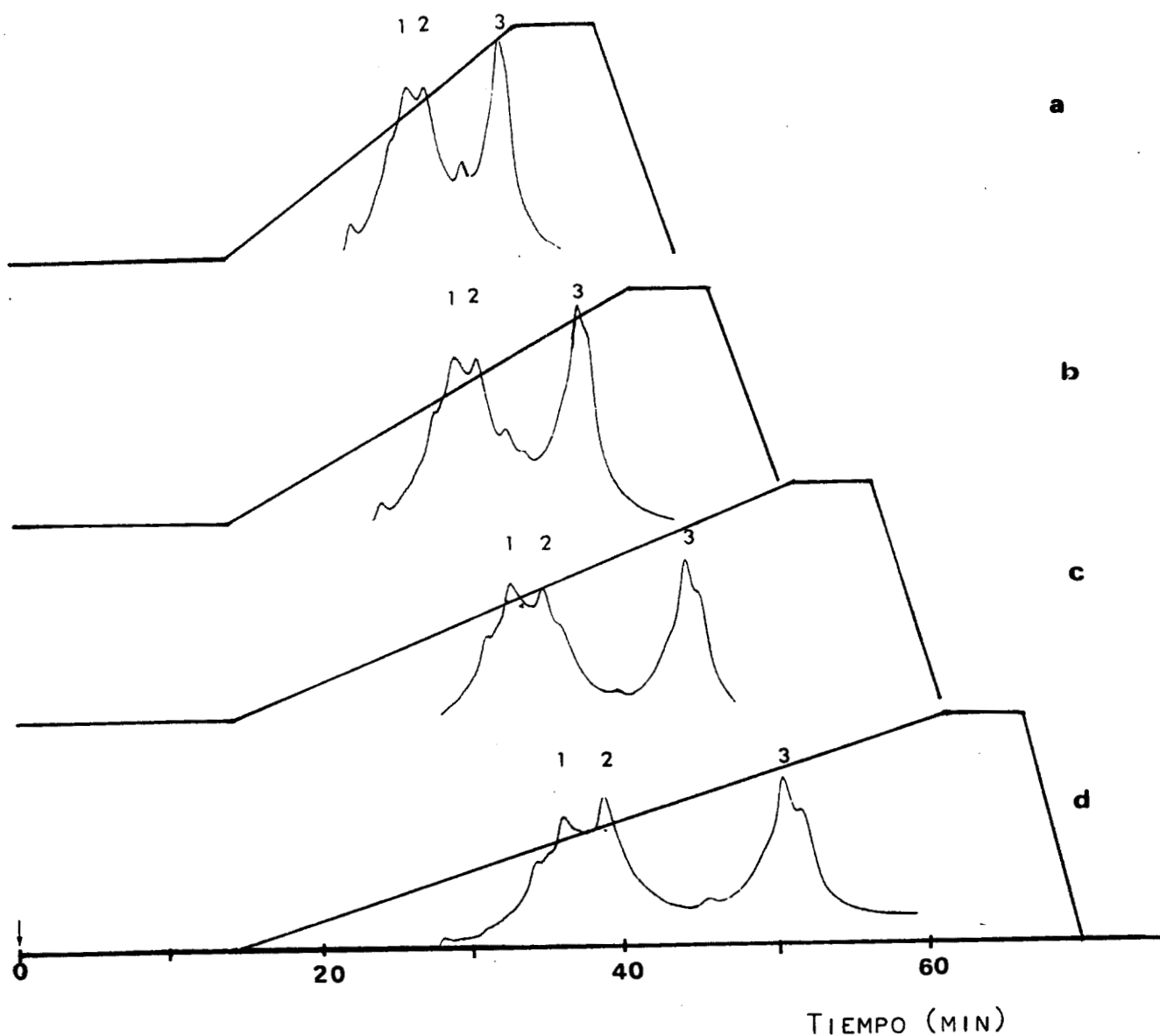


Fig. 3. Cromatogramas de quimopapaína comercial (lote 14F-81251) en función del gradiente.
 a) $3.50 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$, b) $2.59 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$,
 c) $1.89 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$ y d) $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$.
 Flujo 0.5 ml/min, pH 6.4 y 0.0 a 0.7 M de NaCl.

inversamente proporcional al gradiente.

T A B L A I V

GRADIENTE M min ⁻¹ X 10 ²	RESOLUCION	
	R ₁₂	R ₂₃
3.50	0.090	1.330
2.59	0.060	1.570
1.89	0.380	1.680
1.49	0.420	2.137

Flujo 0.5 ml/min.

pH 6.4

1.3 FLUJO DE LA FASE MOVIL.

La variación del flujo de la fase móvil manteniendo constante el gradiente, 1.49×10^{-2} M min⁻¹, y pH 6.4, ocasiona que se modifique la resolución de acuerdo a la figura 4 y la Tabla V, donde se observa que los valores de resolución pasan por un máximo para un valor de 0.5 ml/min.

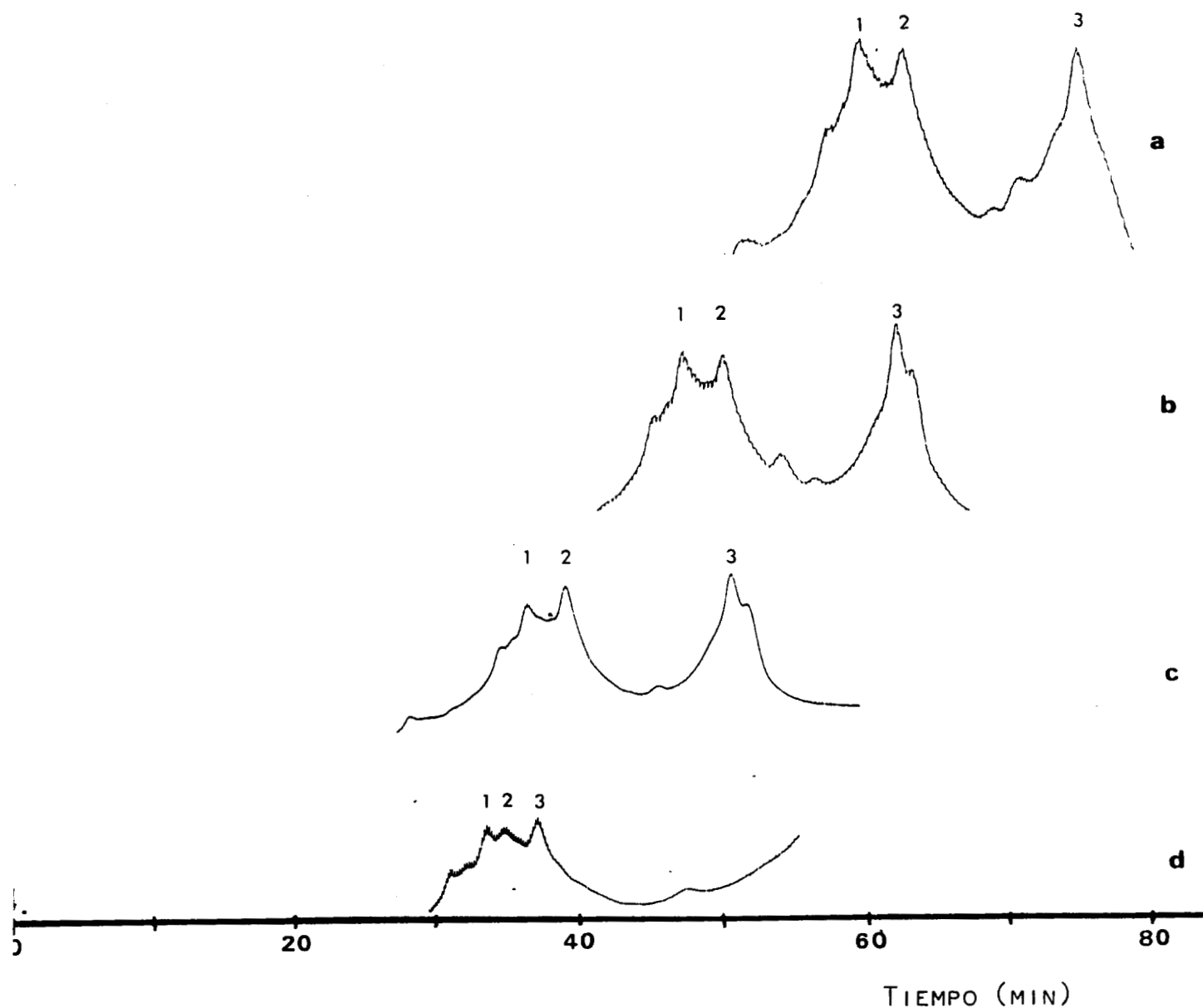


Fig. 4. Cromatogramas de quimopapaína comercial (lote 14F-81251) en función del flujo del eluyente. a) 0.2 ml/min, b) 0.3 ml/min, c) 0.5 ml/min y d) 1.0 ml/min. Gradiente $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$ y pH 6.4.

T A B L A V

FLUJO ml/min	RESOLUCION	
	R_{12}	R_{23}
0.2	0.260	1.400
0.3	0.410	1.600
0.5	0.420	2.137
1.0	0.393	0.727

Gradiente $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$.

pH 6.4

En resumen las condiciones óptimas de elución para este trabajo fueron:

pH 7.0

Gradiente $1.49 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$ (0.0 a 0.7 M de NaCl).

Flujo 0.5 ml/min.

A diferencia del lote 14F-81251 de quimopapaína comercial, el lote 74F-8199 de quimopapaína comercial no muestra el último pico observado en los cromatogramas anteriores, lo cual nos indica que el segundo lote trabajado tenía mayor pureza.

Las condiciones experimentales determinadas para el primer lote se utilizaron en el análisis del segundo lote, ya que después de haber realizado diferentes pruebas, se observó que las condiciones óptimas para ambos lotes coincidieron.

En la figura 5(a) se muestra el perfil de elución de la cromatografía de quimopapaína comercial (lote 74F-8199). Las cuatro fracciones marcadas con barras del I al IV se colectaron por separado y se recromatografiaron dos veces en las mismas condiciones. En la segunda recromatografía se obtuvieron picos razonablemente simétricos (figura 5(b)), y el material colectado, como lo indican las barras, fue el que se utilizó para estudios posteriores.

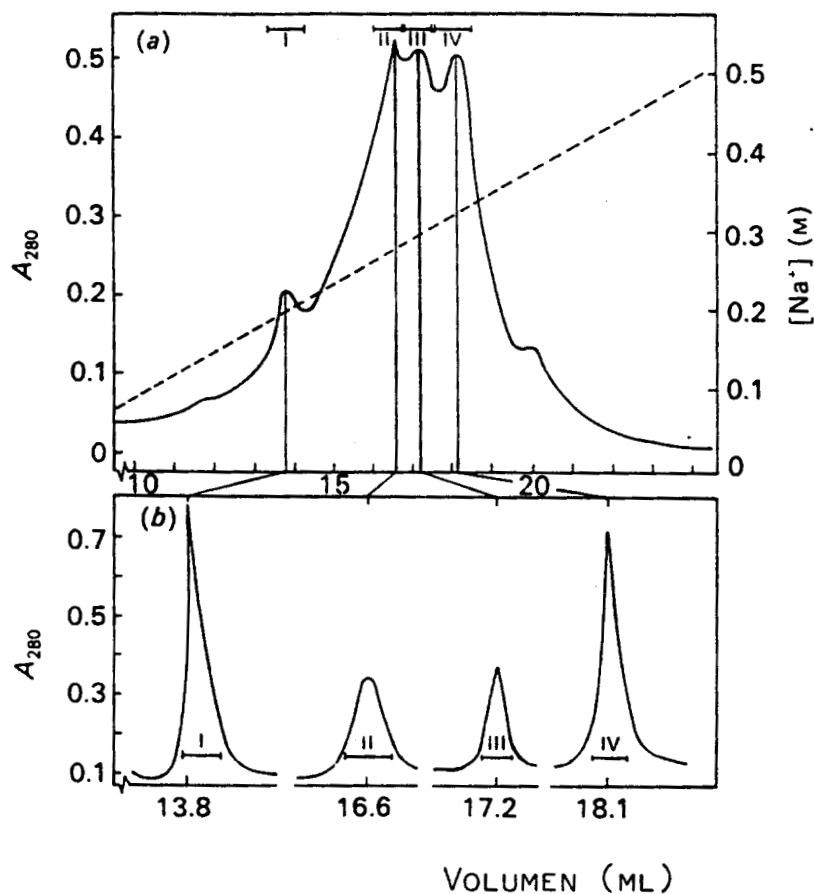


Fig. 5. a) Cromatogramas de quimopapaína comercial (lote 74F-8199). Se observaron 4 picos principales, localizados en las zonas, entre barras, I,II,III y IV, los cuales corresponden a los volúmenes eluidos de 13.8, 16.6, 17.2 y 18.1 ml respectivamente. Gradiente salino de (0.0-0.7M), pH 7.0, columna TSK-CM3SW.

b) Cromatogramas de las fracciones I,II,III y IV colectadas según se muestra en a). Segunda recromatografía bajo las mismas condiciones de operación del cromatograma a).

2. COEFICIENTE DE EXTINCION.

La Tabla VI lista los valores de los coeficientes de extinción de las cuatro formas múltiples de quimopapaína, determinadas espectrofotométricamente a 280 nm, 1 cm de recorrido óptico y al 1% (p/v).

T A B L A V I

COMPONENTE	COEFICIENTE DE EXTINCION
	ml/cm (10mg)
I	16.3
II	19.4
III	18.2
IV	18.4

Los coeficientes de extinción determinados en este trabajo para los componentes III y IV concuerdan muy bien con el valor de 18.3 reportado por Robinson⁽³⁵⁾ para la fracción de quimopapaína completa.

3. ACTIVIDAD PROTEOLITICA.

A partir de los coeficientes de extinción (Tabla VI) se determinó la actividad específica de cada uno de los componentes de la quimopapaína, según se muestra en la Tabla VII.

T A B L A V I I

COMPONENTE	ACTIVIDAD ESPECIFICA
	unidades/mg
I	0.369
II	0.420
III	0.403
IV	0.982

Los valores obtenidos son comparables con los resultados de actividad específica reportados para la quimopapaína A⁽²⁸⁾ que van de 0.9-1.07 unidades/mg, en el caso de la quimopapaína B⁽³³⁾ el valor es de 3.4 unidades/mg.

4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Los cuatro componentes aislados de la quimopapaína mostraron ser homogéneos por electroforesis en gel de poliacrilamida.

5. DETERMINACION DE MASAS MOLECULARES.

5.1 FILTRACION EN GEL TRADICIONAL

En la figura 6 se muestra la gráfica del logaritmo de la masa molecular contra el coeficiente de distribución (Kd) de cada proteína, obtenidos por filtración en gel HPLC en ausencia de guanidina. El coeficiente de distribución se determinó por la relación:

$$Kd = \frac{V_e - V_v}{V_m - V_v}$$

donde:

V_e = volumen de elución de la proteína.

V_v = volumen vacío de la columna, determinado como el volumen de elución de la dextrana azul (masa molecular $\geq 10^6$ Da).

"91031

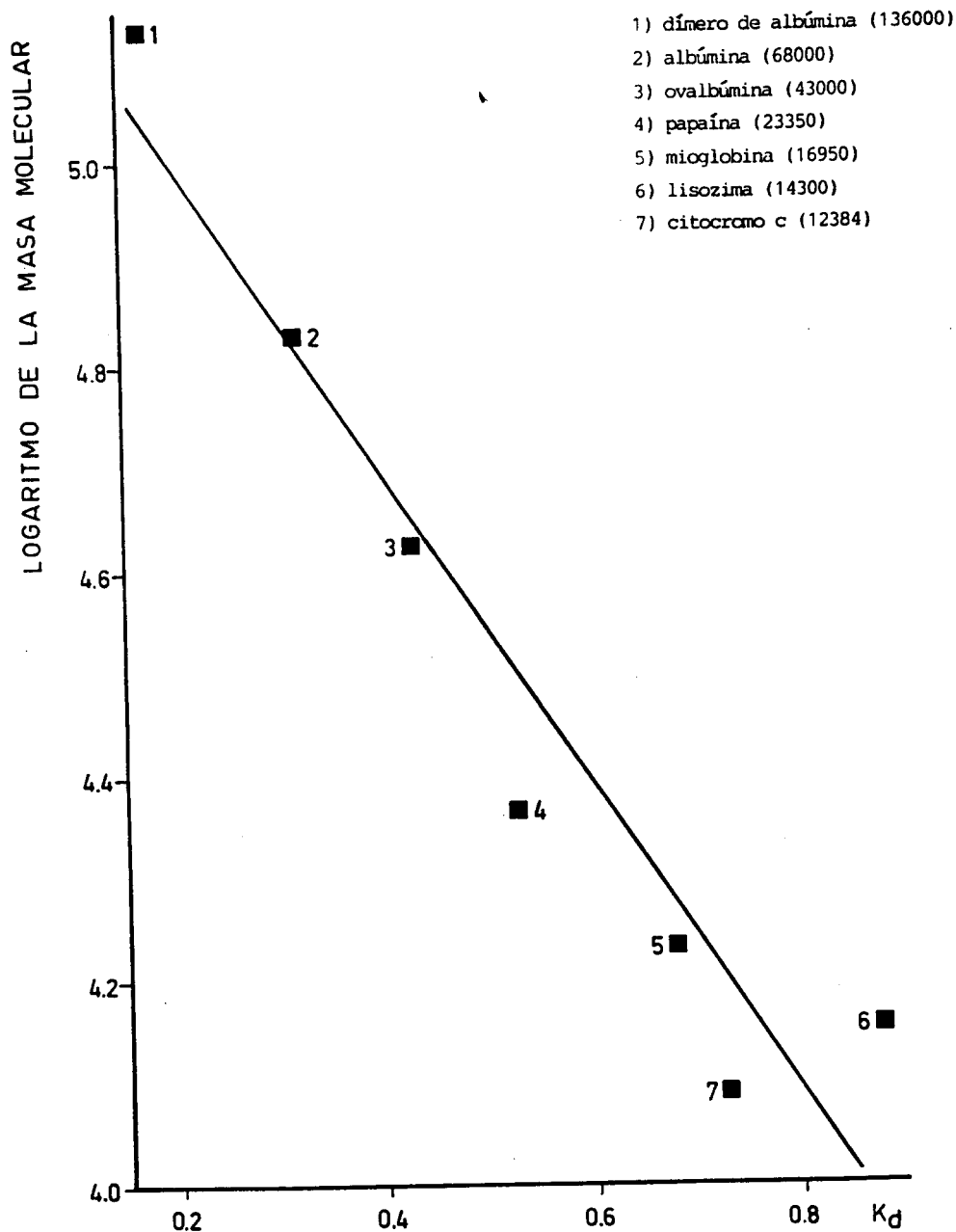


Fig. 6. Gráfica del logaritmo de la masa molecular contra el coeficiente de distribución (K_d) para proteínas, obtenida por cromatografía de filtración en gel HPLC tradicional.

V_m = volumen máximo de elución, determinado para mercaptoetanol (masa molecular = 78.1 Da).

Los puntos experimentales en esta curva fueron obtenidos con citocromo c, lisozima, mioglobina, papaína, ovalbúmina y albúmina. Puede observarse que la lisozima presenta un comportamiento anormal, debido posiblemente, a interacciones con el material de empaque. Esto aumenta la desviación estándar en el ajuste de los puntos a una recta y con ello la incertidumbre en las determinaciones de masas moleculares.

5.2 FILTRACION EN GEL EN PRESENCIA DE GUANIDINA

En la figura 7 se muestra la gráfica equivalente a la de la figura 6, pero usando hidrocloreto de guanidina (GuHCl) 6M como eluyente y usando como estándares: aprotinina, citocromo c, lisozima, mioglobina, papaína y anhidrasa carbónica. Puede observarse que el agente desnaturante disminuye la dispersión de los puntos experimentales, mejorándose la correlación. Esto era de esperarse, dado que en estas condiciones el volumen de elución y el coeficiente de distribución (K_d) de las muestras, depende exclusivamente de la longitud de la cadena polipeptídica, y por lo tanto de su masa molecular⁽⁴²⁾.

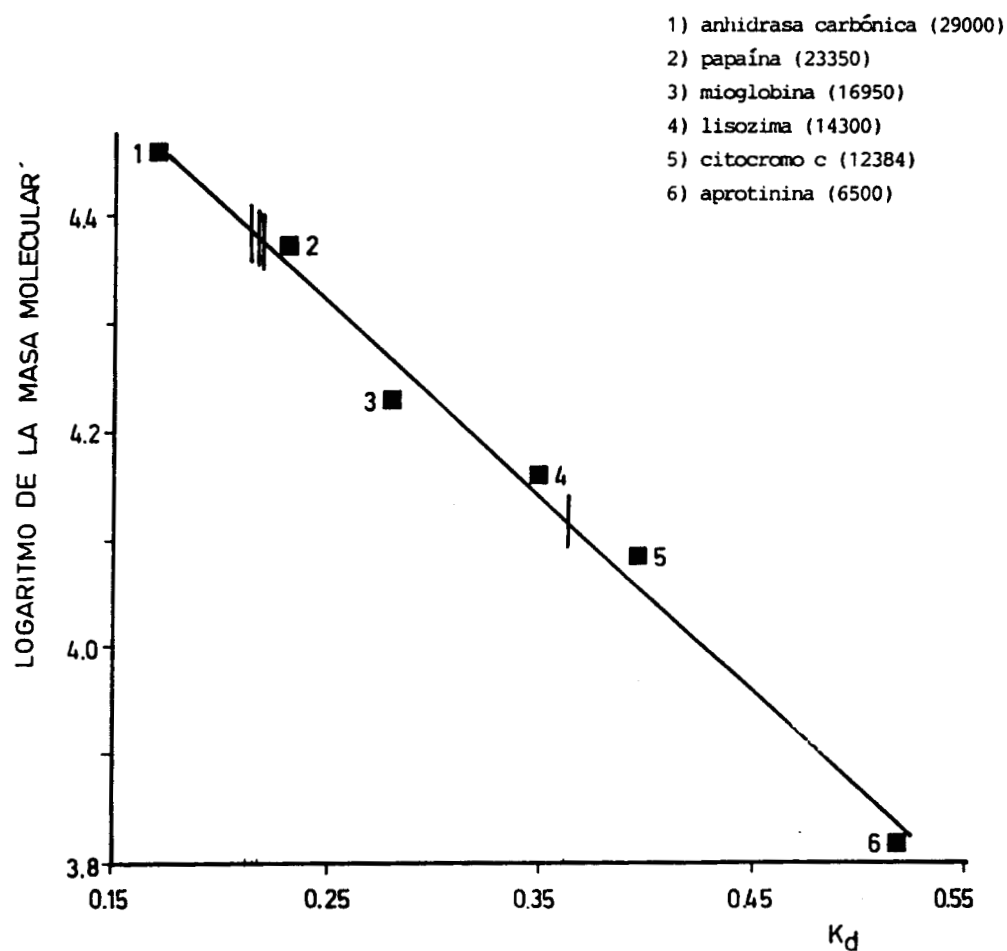


Fig. 7. Gráfica del logaritmo de la masa molecular contra el coeficiente de distribución (K_d) para proteínas, obtenidas por cromatografía de filtración en gel HPLC en presencia de hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) 6M.

Además, al generalizar la conformación de las proteínas utilizadas a cadenas aleatorias, se elimina la influencia de la forma de las diferentes estructuras nativas.

En la figura 8 se muestran los perfiles de elución de las cuatro formas múltiples de la quimopapaína. La Tabla VIII muestra las masas moleculares determinadas por este método.

T A B L A V I I I

COMPONENTE	MASA MOLECULAR (DA)
I	24000 y 13100
II	24400
III	24100
IV	24400

Los componentes II y IV se eluyen como picos únicos y relativamente simétricos con volúmenes de elución prácticamente idénticos; para estos dos componentes se calculó una masa molecular de 24400 Da, a partir de la

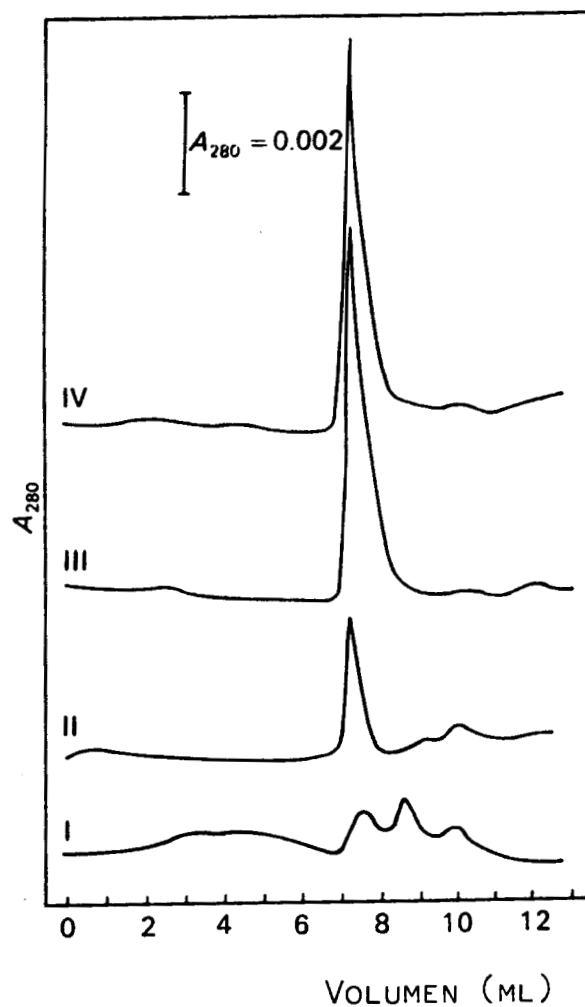


Fig. 8. Cromatografía de filtración en gel (GPC) para determinar las masas moleculares de las fracciones aisladas de quimopapaína. Columna TSK-2000SW, flujo 0.5 ml/min, eluyente hidrocloreuro de guanidina (GuHCl) 6M.

curva de calibración de la columna (figura 7). También el componente III se eluyó como un solo pico, en un volumen cuya masa molecular correspondiente fue de 24100. En contraste, en el perfil de elución del componente I se observaron dos picos principales con masas moleculares correspondientes a 24000 y 13100. Las masas moleculares determinadas en este trabajo para los componentes II, III y IV concuerdan muy bien con el valor de 24200 reportado recientemente⁽⁴⁹⁾. Por otro lado, nuestros resultados confirman que las quimopapaínas están formadas por una sola cadena polipeptídica, puesto que se observa un sólo pico en la filtración en gel, después de la desnaturalización y el rompimiento de los enlaces disulfuro. En el caso del componente I, la presencia de dos o más picos en el perfil de elución, sugiere que este componente minoritario consiste de una mezcla de proteínas hidrolíticamente transformadas.

5.3 ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE DODECILSULFATO DE SODIO (SDS).

Además se llevó a cabo la determinación de las masas moleculares, de las cuatro formas moleculares de la quimopapaína, por el método tradicional de electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio.

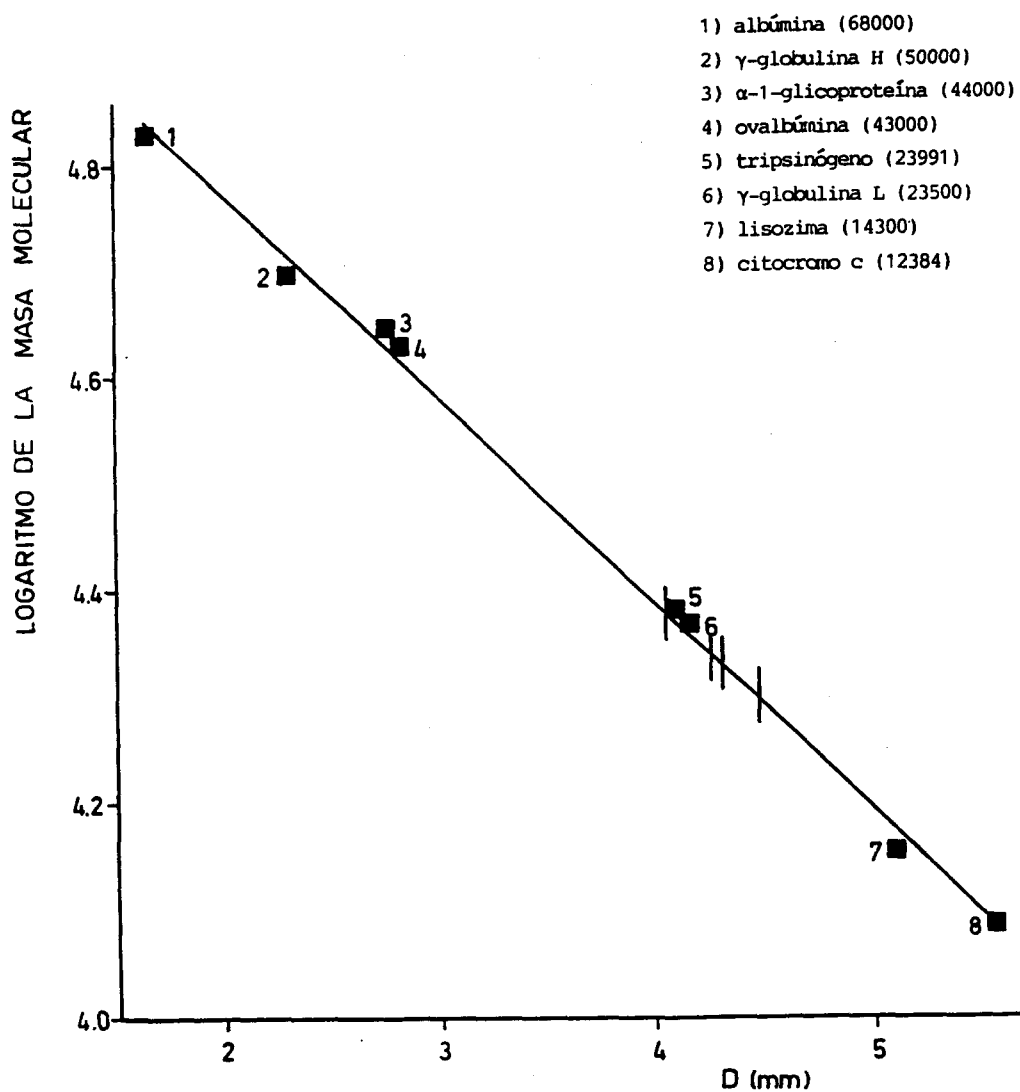


Fig. 9. Gráfica del logaritmo de la masa molecular contra el desplazamiento de las proteínas, (mm), obtenida por electroforesis en poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS).

En la figura 9 se observa la gráfica de logaritmo de masa molecular contra el desplazamiento, en mm, de las proteínas sobre la placa de electroforesis. Las muestras estándares utilizadas en esta curva fueron: citocromo c, lisozima, γ -globulina cadena ligera y cadena pesada, tripsinógeno, ovalbúmina, α -1-glicoproteína y albúmina. Con este método se observaron bandas anchas y difusas, lo cual dificultó la determinación precisa de las masas moleculares de las quimopapaínas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IX.

T A B L A I X

COMPONENTE	MASA MOLECULAR (DA)
I	24000
II	21500
III	22000
IV	20100

Las masas obtenidas por filtración en gel en presencia de guanidina fueron muy semejantes, mientras que las

obtenidas por electroforesis, presentaron una mayor dispersión, encontrándose entre 20,100 y 24,000.

El método de filtración en gel en presencia de guanidina (fig. 7), nos permitió determinar con mayor exactitud las masas moleculares de las formas múltiples de la quimopapaína, a diferencia del método de filtración en gel tradicional, el cual presentó dispersión de los puntos experimentales (fig. 6). Además, muestra varias ventajas sobre el método de electroforesis para la determinación de masas moleculares, las cuales se describen a continuación:

- a) Las determinaciones de masas moleculares se realizan en menos tiempo.
- b) La concentración de la muestra empleada es menor, lo cual es importante para los casos en que se dispone de poca muestra.
- c) Una vez obtenida la curva de calibración para el intervalo de masas moleculares deseadas, se emplea para determinar infinidad de masas moleculares desconocidas. Sin embargo, en el método de electroforesis se requiere una comparación con las muestras estándares, para cada determinación.

6. DICROISMO CIRCULAR.

La figura 10 muestra los espectros de DC de las formas aisladas de la quimopapaína. Puede notarse que para los componentes II a IV, los espectros son muy similares, tanto en la región UV lejana como en la cercana, mientras que el espectro del componente I es diferente. La primera es la región comprendida entre 190 y 250 nm (UV lejano), en la que el espectro de DC de una proteína es debido fundamentalmente a la conformación secundaria⁽⁴⁴⁾. Comunmente se acepta que a cada tipo de estructura secundaria corresponde un espectro característico de DC⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. A partir de la información de DC de una proteína en particular pueden estimarse, mediante una regresión lineal múltiple⁽⁴⁴⁾, la fracción o porcentaje de cada una de las estructuras secundarias: hélice, hoja beta antiparalela, hoja beta paralela, giros y cadenas aleatorias o irregulares. También se hizo el cálculo introduciendo la restricción de que la suma de fracciones fuese igual a la unidad, a través del empleo de un multiplicador indeterminado de Lagrange^(46,54).

Los resultados obtenidos (Tabla X) de las estructuras secundarias en los componentes de quimopapaína, indican que el análisis fue satisfactorio para los componentes II, III y IV, puesto que la suma de fracciones de estructura fue

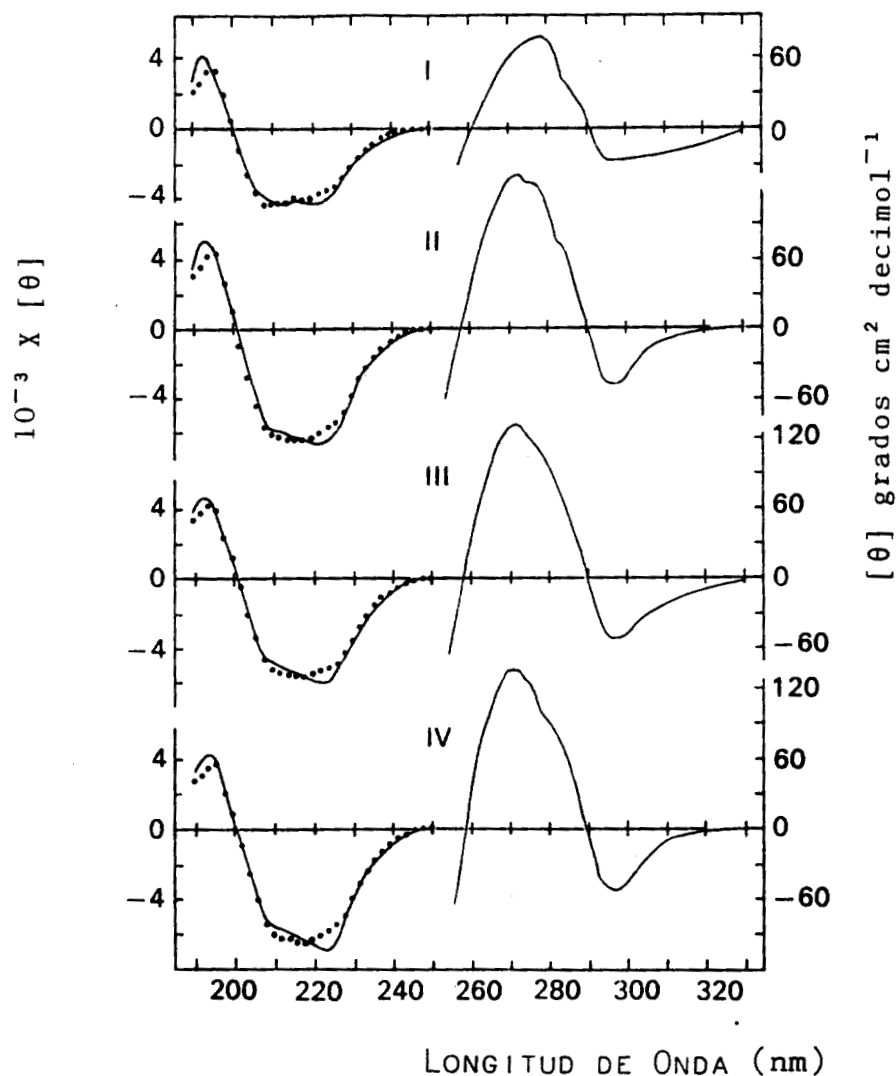


Fig. 10. Espectros de Dicroísmo Circular de cuatro componentes de quimopapaína.

En la región de UV lejano (190-250 nm) se muestran las curvas para la obtención de la estructura secundaria. En la región UV cercano (250-310 nm) se muestran las curvas de los residuos aromáticos. pH 7.0 a 25°C.

T A B L A X

CONTENIDO DE LA ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LOS CUATRO COMPONENTES DE
QUIMOPAPAINA

MUESTRA	HELICE	HOJA BETA ANTIPARALELA	HOJA BETA PARALELA	GIROS	OTRAS	TOTAL
I	0.140	0.098	0.020	0.109	0.207	0.574
	0.163	0.240	0.044	0.220	0.334	1.000
II	0.224	0.119	0.055	0.164	0.395	0.956
	0.226	0.134	0.058	0.175	0.408	1.000
III	0.197	0.096	0.062	0.140	0.370	0.865
	0.205	0.141	0.070	0.175	0.410	1.000
IV	0.228	0.113	0.062	0.167	0.430	1.000
	0.228	0.113	0.062	0.167	0.430	1.000
PAPAINA	0.240	0.080	0.070	0.150	0.440	0.980

cercano a la unidad; además, las curvas reconstruidas a partir de los resultados de este análisis se ajustaron muy bien a los espectros experimentales (figura 10). En el caso del componente I, una suma de fracciones de 0.574 indica que el análisis fue pobre.

La segunda es la zona comprendida entre 250 y 310 nm (UV cercano) en la que los residuos de aminoácidos aromáticos en un ambiente asimétrico, y los enlaces disulfuro son generalmente responsables de la señal de DC de una proteína⁽⁵³⁾. Dichas bandas pueden entonces ser asignadas a residuos aromáticos específicos o a enlaces disulfuro^(53,55,56).

La estructura secundaria de los tres componentes principales de la quimopapaína es casi idéntica, lo mismo que su estructura terciaria alrededor de las cadenas laterales aromáticas, si se juzga a partir de los espectros de DC. Esta similitud en ciertas regiones de la estructura terciaria parece extenderse a la papaína, cuyo espectro de DC⁽⁵⁷⁾ muestra las características principales de las curvas de la figura 10, esto es, una banda negativa alrededor de 300 nm y una progresión de bandas positivas a 288, 279 y 273 nm (fig. 14).

7. CONFORMACION DE LA PROTEINASA A.

Los perfiles de elución en la columna de intercambio catiónico, de las dos muestras de quimopapaína usadas se muestra en la figura 11. Puede observarse que la preparación parcialmente purificada (lote 14F-81251) muestra una zona extra de picos que es eluída a altas concentraciones de NaCl. Este resultado ya ha sido reportado por Robinson⁽³⁵⁾, quién identificó la última fracción eluída (figura (11b)) como la proteinasa A.

La fracción marcada entre barras en la figura 11b fue aislada, concentrada y recromatografiada en las mismas condiciones; se obtuvo un pico bastante simétrico, como se observa en la figura 12. El material colectado de la recromatografía fue usado para los estudios de dicroísmo circular y de actividad proteolítica. La actividad específica, sobre caseína, de la enzima aislada fue de 0.25 unidades/mg, valor inferior al reportado para las distintas formas de quimopapaína (Tabla VII).

En las figuras 13 y 14 se presentan los espectros de dicroísmo circular de la forma más abundante de la quimopapaína, de la papaína⁽⁵⁸⁾ y la proteinasa A estudiada en esta parte del trabajo. En la zona correspondiente a las estructuras secundarias (figura 13),

es evidente que el espectro de la proteinasa A es muy similar al de la quimopapaína, mientras que difiere significativamente de aquel que corresponde a la papaína. Algo semejante ocurre en la posición de las señales de dicroísmo circular en la región aromática del espectro (figura 14). De acuerdo a lo anterior, nuestros resultados sugieren que la proteinasa A es estructuralmente muy similar a las quimopapaínas y que, tal vez, debiera clasificarse como una forma más de éstas y no como una enzima aparte.

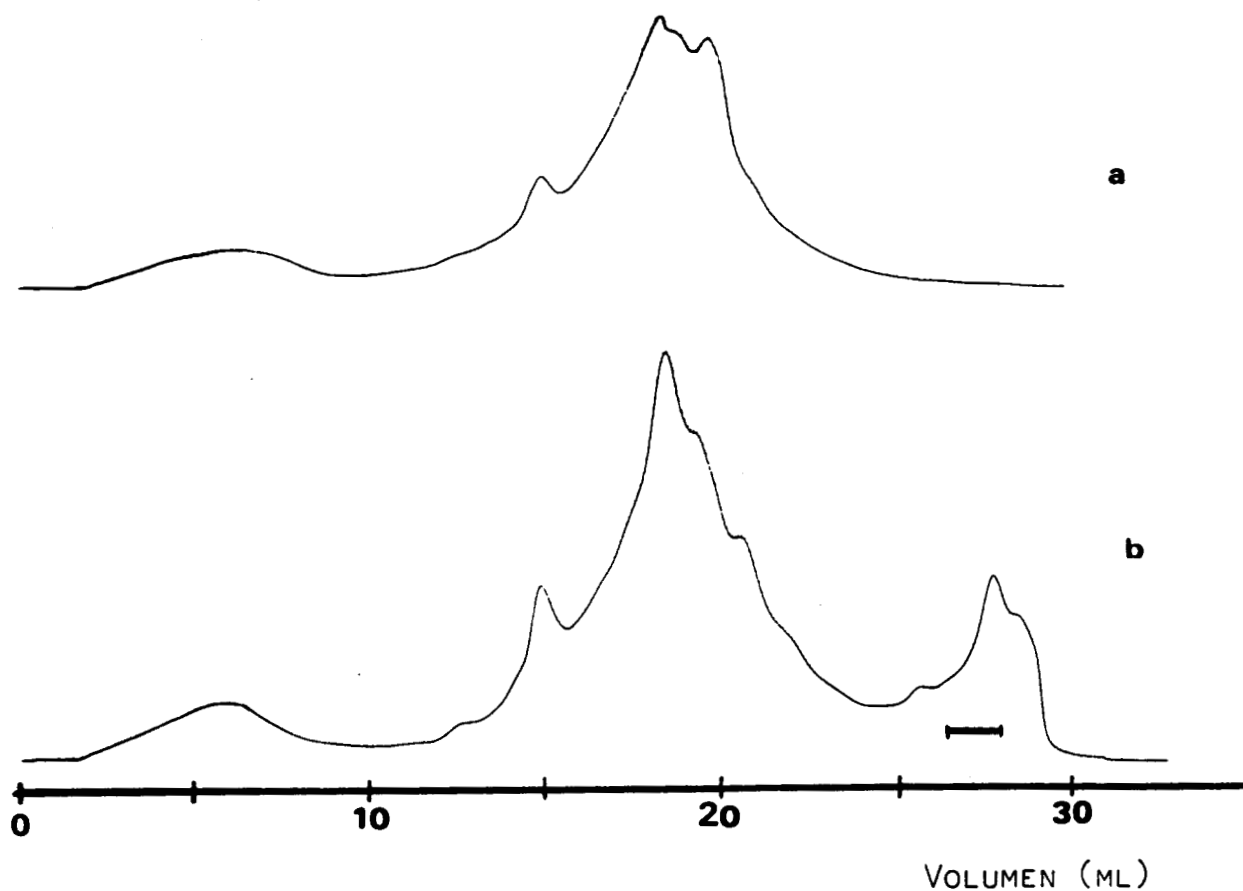


Fig. 11. Cromatogramas de quimopapaína comercial a) Lote 74F-8199 y b) Lote 14F-81251. Columna TSK-CM3SW, pH 7.0, flujo 0.5 ml/min, gradiente salino $1.23 \times 10^{-2} \text{ M min}^{-1}$.

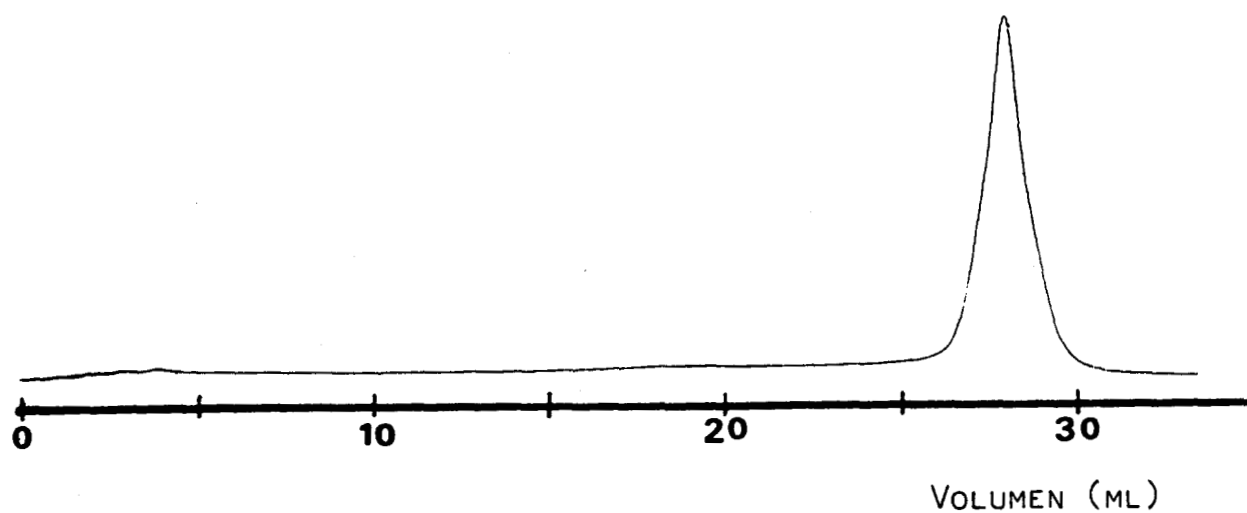


Fig. 12. Recromatografía de la fracción indicada entre barras en la Fig. 11 b).

grados $\text{cm}^2 \text{decimol}^{-1}$

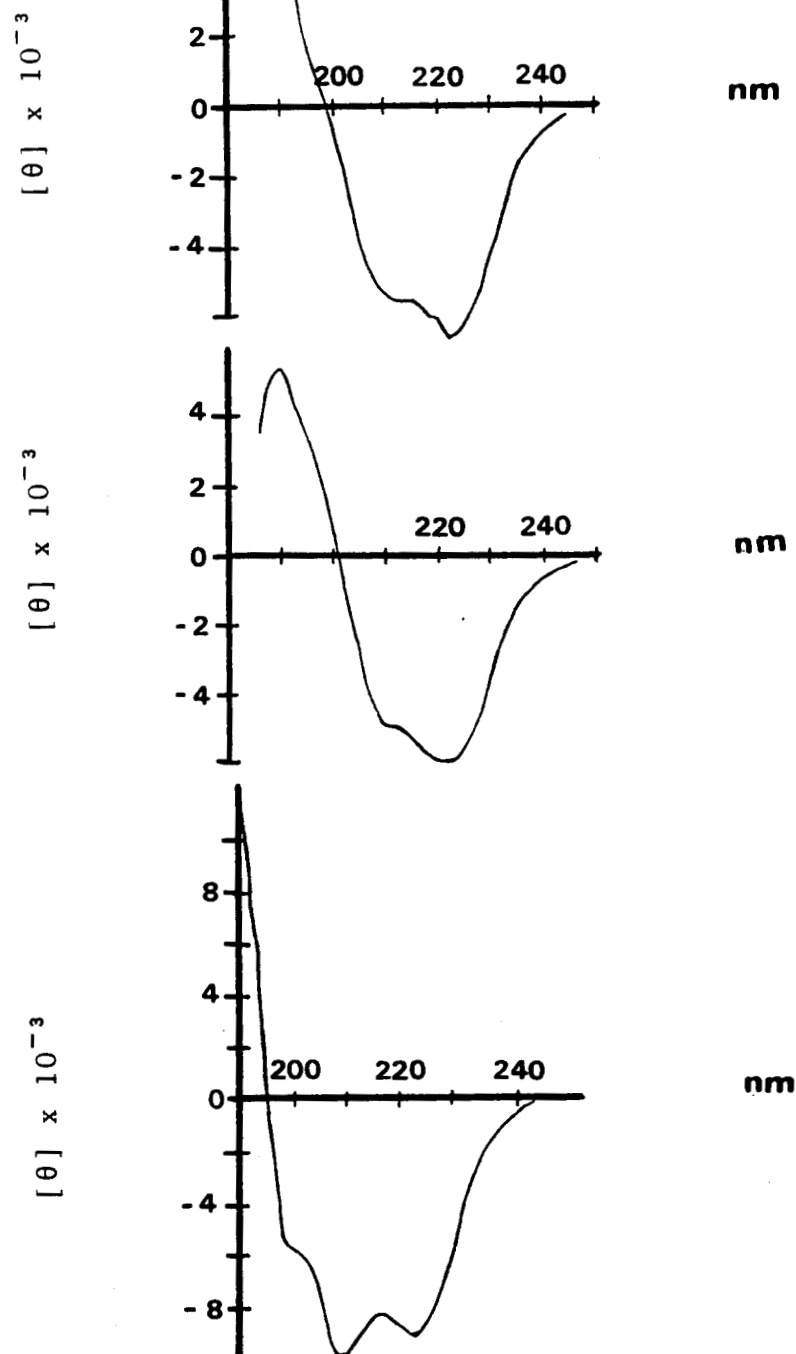


Fig. 13. Espectros de Dicroísmo Circular en la región de UV lejano. a) proteinasa A, b) quimopapaína y c) papaína.

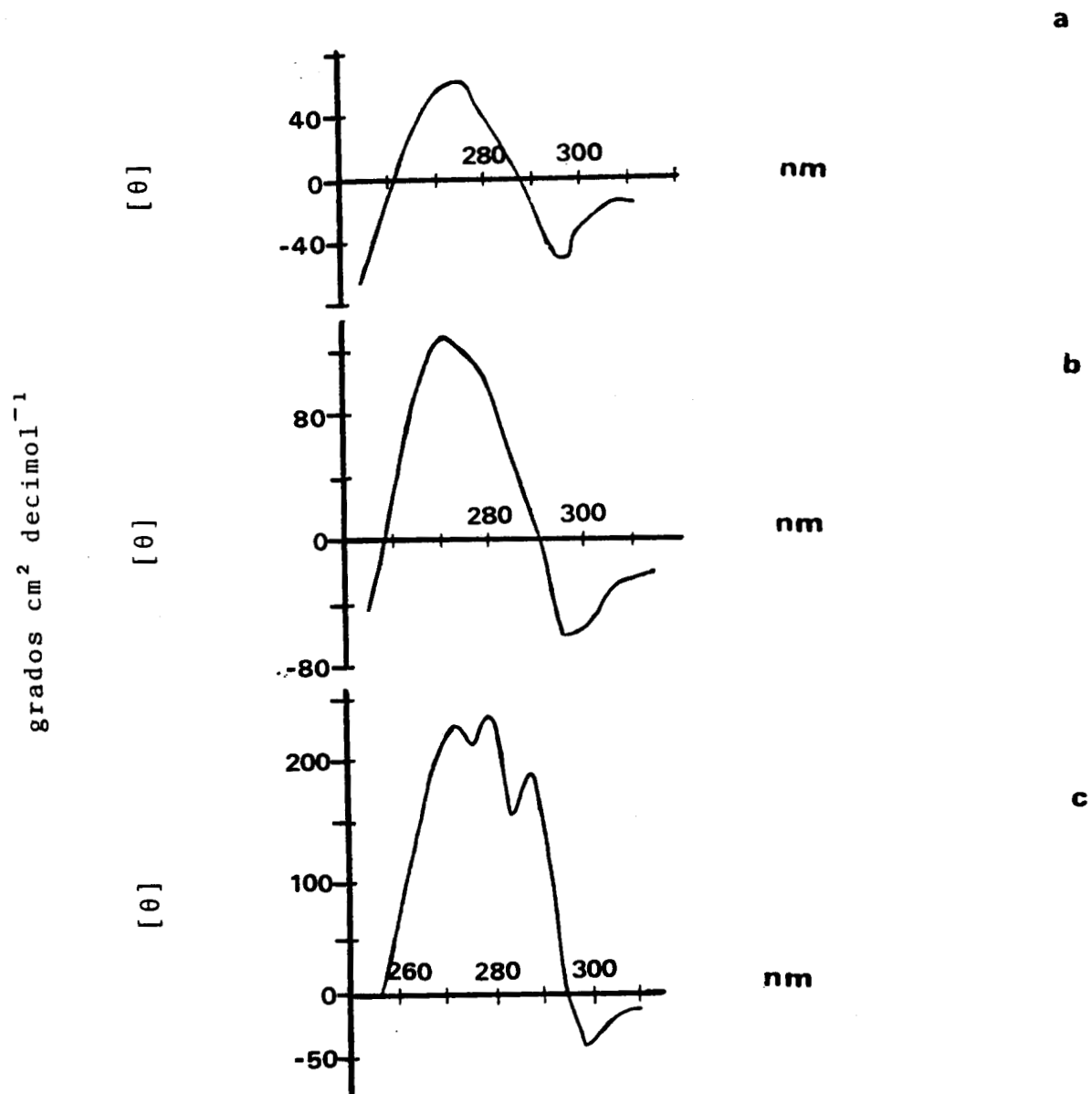


Fig. 14. Espectros de Dicroísmo Circular en la región de UV cercano (aromáticos). a) proteinasa A, b) quimopapaína y c) papaína.

CONCLUSIONES

El conjunto de estudios realizados a las fracciones de quimopapaína, nos permitieron confirmar que la fracción I, está compuesta de una mezcla de proteína nativa y fragmentos de autohidrólisis, lo cual se dedujo después de haber analizado los resultados obtenidos por los diferentes métodos, siendo en casi todos los casos muy diferente a los datos obtenidos para las fracciones II, III y IV, las cuales muestran un comportamiento similar entre ellas.

Los estudios de masas moleculares, contenido de estructuras secundarias y del ambiente cercano a los cromóforos aromáticos, permiten concluir que las fracciones II, III y IV son muy similares a la papaína, lo cual se fundamenta en la idea de que las proteasas tiólicas vegetales tienen como origen una molécula ancestral común⁽¹⁶⁾. Sin embargo, a pesar de que las fracciones más abundantes de quimopapaína (II, III y IV) son muy semejantes a la papaína, es posible distinguirlas por medio de dicroísmo circular, ya que los espectros muestran diferencias significativas entre ellas y la papaína.

P E R S P E C T I V A S

91031

Existe un gran número de investigaciones sobre el aislamiento y caracterización de la quimopapaína (23-26,35). Sin embargo, faltan por estudiar aspectos relacionados con la secuencia de aminoácidos⁽⁵⁹⁾, así como los mecanismos de desnaturalización. Estos estudios permitirían establecer si las formas de esta enzima están constituidos por dos dominios estructurales, como ocurre con la papaína⁽⁶⁰⁾.

El curso que debe tomar la investigación sobre la quimopapaína, es hacia el conocimiento total de sus estructuras (primaria, secundaria y terciaria). Parte de esta información podría obtenerse por medio del estudio del mecanismo de desnaturalización usando técnicas espectroscópicas o bien calorimetría diferencial de barrido. Estos métodos experimentales podrían ayudar a determinar la existencia de un intermediario estable durante el desdoblamiento de la proteína, y también podrían indicar si tal intermediario correspondería o no al desdoblamiento de un dominio de la cadena polipeptídica. En efecto, la existencia de dominios estructurales permite suponer, con evidencia experimental, la presencia de intermediarios en el proceso de desnaturalización. Dado que los dominios estructurales son relativamente

independientes, se ha encontrado en algunos casos^(61,62) que uno de ellos es menos estable frente al desnaturalizante, sufriendo la pérdida de su estructura antes que el otro dominio y originando así, que la desnaturalización se lleve a cabo a través de un intermediario parcialmente desnaturalizado^(63,64).

BIBLIOGRAFIA

- (1) Brandts, J.F. y Hunt, L. (1967) J.Amer.Chem.Soc. 89:19, 4326-4838.
- (2) Lehninger, A.L. (1982) "Bioquímica". Omega. Barcelona, España.
- (3) Bohinsky, R.C. (1978) "Bioquímica". Fondo Educativo Interamericano, México.
- (4) Ghélis, C. y Yon, J. (1982) "Protein Folding". Academic Press, N.Y. USA.
- (5) Dickerson, R.E. y Geis, I. (1969) "The Structure and Action of Proteins". W.A. Benjamin, Inc. Cal., USA.
- (6) Herrera, E. (1986) "Bioquímica". Ed. Interamericana, México, D.F.
- (7) Richards, E.G. (1980) "An Introduction to the physical properties of large molecules in Solution". Cambridge University Press. USA.
- (8) Van Holde, K.E. (1979) "Bioquímica Física". Alhambra. Madrid, España.
- (9) Jirgensons, B. (1973) "Optical Activity of Proteins and other Macromolecules". Springer-Verlag, N.Y., USA.
- (10) Baker, E.N. & Drenth, J. (1987) in Biological Macromolecules and Assemblies (Jurnak, F.A. & McPherson, A., eds.), vol. 3, pp. 313-368, John Wiley and Sons, N.Y.
- (11) Glazer, A.N. and Smith, E.L. (1971) In "The Enzymes", 3a. Ed. Vol. III, 501-546, Academic Press.
- (12) Brocklehurst, K. (1982). Methods Enzymol. 87C, 427-469.
- (13) Baines, B.S., and Brocklehurst, K. (1982) Biochem.J. 205, 205-211.
- (14) Willenbrock, F., and Brocklehurst, K. (1985) Biochem.J. 227, 511-519.

- (15) Barrett,A.J., and Kirschke,H. (1981) *Methods Enzymol.* 80, 535-561.
- (16) Lynn,K.R. and Yaguchi,M. (1983) *Phytochemistry* 22, 2485-2487.
- (17) Carey,P.R., Ozaki,Y., and Storer, A.C. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 117, 725-731.
- (18) Storer,A.C., Lee,H., and Carey,P.R. (1983) *Biochemistry* 22, 4789-4796.
- (19) Brocklehurst,K., Carey,P.R., Lee,H.H., Salih,E., and Storer,A.C. (1984) *Biochem. J.* 223, 649-657.
- (20) Brocklehurst,K., Baines,B.S., and Kierstan,M.P.J. (1981) *Top. Enzyme Ferment, Biotechnol.* 5, 262-335.
- (21) Lowe,G. (1976) *Tetrahedron* 32, 291-302.
- (22) Shack,P. (1967) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 36, 67.
- (23) Brocklehurst,K. & Salih,E. (1983) *Biochem.J.* 213, 559-560.
- (24) Khan,I.U. & Polgar,L. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* 760, 350-356.
- (25) Brocklehurst,K., Baines,B.S., Salih,E., and Hatzoulis,C. (1984) *Biochem.J.* 221, 553-554.
- (26) Polgár,L. (1984) *Biochem.J.* 221, 555-556.
- (27) Ebata,M. & Yasunobu,K.T. (1962) *J. Biol. Chem.* 237, 1086-1094.
- (28) Cayle,T., Saletan,L.T., and Lopez-Ramos,B. (1964) *Wallerstein Lab. Commun.* 27, Nos. 93/94, 87.
- (29) Johansen,J.T. and Ottesen,M. (1968) *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* 36, 265.
- (30) Ebata,M. and Takahashi,Y. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 118,201.
- (31) Jansen,E.F. and Balls,A.K. (1941) *J. Biol. Chem.* 137, 459.
- (32) Kunimitsu,D.K. & Yasunobu,K.T. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 139,

405-417.

- (33) Baines,B.S. and Brocklehurst,K. (1982) J.Protein Chem. 1, 120-139.
- (34) Brocklehurst,K., Baines,B.S., and Hushiri,M.S. (1980) Biochem. J. 189, 189-192.
- (35) Robinson,G.W. (1975) Biochemistry 14, 3695-3700.
- (36) Lynn,K.R. & Yaguchi,M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 581, 363-364.
- (37) Peterson,A. (1975) "Intercambiadores Celulósicos de iones", Ed. El Manual Moderno,S.A. México.
- (38) Ewing,G.W. (1978) "Métodos Instrumentales de Análisis Químicos" Mc Graw Hill.
- (39) Arnon,R. (1970) Methods Enzymol. 19, 227-252.
- (40) Weber,K. & Osborn,M. (1975) in The Proteins (Neurath, H. & Hill,R.L., eds.), vol. 1, pp. 200-201, Academic Press, N.Y.
- (41) Andrews,P. (1964) Biochem. J. 91, 222-233.
- (42) Fish,W.W., Mann,K.G. & Tanford,C. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4989-4994.
- (43) Weber,K., Pringle,J.R. y Osborn,M. (1972) Methods Enzymol. 26, 3-27.
- (44) Hennessey,J.P. & Johnson, W.C. (1981) Biochemistry 20, 1085-1094.
- (45) Bayley,P. (1980) "An Introduction to Spectroscopy for Biochemists", (S.B.Brown Ed.) Academic Press.
- (46) Hennessey,J.P. and Johnson,W.C. (1982) Anal. Biochem. 125, 177-188.
- (47) Japan Spectroscopic Co., LTD. Instruction Manual (1985). Tokyo, Japan.
- (48) Johnson,E. and Stevenson, R., Basic Liquid Chromatography (1978)

Varian Associates, Inc.

- (49) Kórodi, I., Asbóth, B. & Polgár, L. (1986) *Biochemistry* 25, 6895-6900.
- (50) Woody, R.W. (1977) *J. Polymer Sci. Macromolecular Review*, 12, 181.
- (51) Chang, C.T., Wu, C.S.C. y Yang, J.T. (1978) *Analytical Biochem.* 91, 13.
- (52) Bolotina, I.A., Chekhov, V.O. y Lugauskas, V.Y. (1979) *International Journal of Quantum Chemistry XVI*, 819.
- (53) Strickland, E.H. (1974) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 2, 113-175.
- (54) Magar, E. Magar (1972) "Data Analysis in Biochemistry and Biophysics", Academic Press. N.Y. and London.
- (55) Horwitz, J., Strickland, E.H. y Billups, C. (1970) *Journal of the American Chemical Society* 92, 2119.
- (56) Holladay, L.A., Hamands, R.G. Jr., y Puett, D. (1974) *Biochemistry* 13, 1653.
- (57) Su, Y.Y.T. & Jirgensons, B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* 181, 137-146.
- (58) Hernández-Arana, A. (1982) Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. de Química.
- (59) Bergmeyer, H.U. (1974) "Methods of Enzymatic Analysis", Academic Press. USA.
- (60) Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R. and Wolther, B.G. (1971) in *the Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), vol. 3, pp. 485-499, Academic Press, N.Y.
- (61) Tiktopulo, E.I. and Privalov, P.L. (1978) *FEBS Lett* 91, 57-58.

- (62) Hernández-Arana, A. and Soriano-García, M. (1988) Biochem. Biophys. 954, 170-175.
- (63) Kim, P.S. y Baldwin, R.L. (1982) Ann. Rev. Biochem. 51, 459.
- (64) Lumry, R., Biltonen, R. y Brandts, J.F. (1966) Biopolymers 4, 917.