



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

DESNATURALIZACION TERMICA DE LA
PEPSINA DE CERDO

T E S I S

Q U E P R E S E N T A

Q. BERNARDO ROMERO GARCIA

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE

MAESTRO EN QUIMICA

MEXICO, D. F.

JULIO DE 1999



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

Este trabajo se realizó bajo la dirección del
Dr. Salvador R. Tello Solís en el área de
Biofísicoquímica, Departamento de Química,
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

UNIDAD IZTAPALAPA

Dedicatorias

- A mis padres por su apoyo, comprensión y amor.
- Con todo cariño para quién siempre ha escuchado, animado, consolado y más que nada motivado a seguir adelante, mi amigo, Jesucristo.
- Con amor para todos los que sabiendo o no, son mis amigos y que han enriquecido mi vida.

ACTITUD DE BÚSQUEDA

Cuando en tu vida concluye una etapa, cuando una cima logras conquistar, cuando obtenemos al fin lo que deseábamos alcanzar, cuando después de la euforia natural al deleitarnos con la victoria de un sueño convertido en realidad nos enfrentamos a un espacio vacío y nuestro espíritu busca con ansia realizar una nueva conquista, es cuando encontramos el tesoro que cada día podemos acrecentar y en la dimensión de nuestra búsqueda estará nuestra grandeza.

Buscar es un camino que nos lleva a la sorpresa diaria de algo diferente, así en cada amanecer debemos proponernos algo nuevo, descubrir, con esta actitud jamás el aburrimiento nos alcanzará y mantendremos entonces nuestra capacidad de asombro, pues a cada instante de nuestra vida existirán dimensiones por conocer, áreas no descubiertas en la ciencia o en la técnica, rasgos desconocidos en los seres vivos y en nosotros mismos.

Tu búsqueda será el pasaporte para vivir sin hastío, en un crecimiento continuo, sin más límites que los que tú quieras imponerte, en un camino sin final, un sendero de luz que jamás dejará en la obscuridad tu espíritu.

Conserva por siempre esa chispa para que ilumine por siempre tu ser, nunca ceses de buscar y siempre podrás encontrar. En ti mismo existe la grandeza infinita de Dios, en esa búsqueda la encontrarás y una vez conociendolo, tus fronteras se convertirán en inmensidad no conocida del creador.

Cornejo, M.A., "Compromisos con la vida", Editorial Grad, México (1994).

Agradecimientos

- Al Dr. Salvador R. Tello Solís por su apoyo y dirección.
- A todos los doctores del área de Biofísicoquímica, por sus consejos e inspiración.
- A mis compañeros del área de Biofísicoquímica.
- A mis compañeros de posgrado, gracias por su apoyo y estímulo.
- A todos los doctores del Departamento de Química de la UAM, por sus consejos, motivación y ayuda.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico de los proyectos 473100-5-3771N y 400200-5-29124E.

Mis padres y mis maestros
han sembrado en mí,
semillas de verdad,
a su tiempo podré dar,
los mejores frutos.

Índice de materias

Capítulo 1

Introducción	2
Proteasas ácidas	3
Propiedades Físicas	4
Secuenciación	5
Arquitectura molecular	5
Puentes Disulfuro	6
Sitio activo	7
Estructuras similares en todas las proteasas ácidas	8
Pepsina	9
Propiedades físicas de la pepsina	10
Secuenciación de la pepsina	10
Arquitectura molecular de la pepsina	11
Desnaturalización	14
Inhibición	16
Objetivo	16

Capítulo 2

Tratamiento de Datos	18
Modelo de dos estados reversible	18
Modelos para procesos irreversibles	19
Modelo de dos estados irreversible	19
Modelo de Lumry- Eyring	21

Capítulo 3

Procedimiento experimental	24
Purificación de la pepsina	24
Reactivos	24
Cromatografía de filtración en gel	24
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	24
Determinación de la concentración de la proteína	25
Electroforesis	25

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS	25
Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa	25
Revelado de la placa	26
Inhibición de la enzima	26
Estudio por Dicroísmo Circular	26
Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano	26
Curvas de transición en UV lejano	27
Curvas de calentamiento-enfriamiento en UV lejano	27
Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano	27
Curvas de transición en el UV cercano	28
Curvas de calentamiento-enfriamiento en el UV cercano	28

Capítulo 4

Resultados y Discusión	30
Purificación de la Pepsina	30
Cromatografía de filtración en gel	30
Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	30
Inhibición de la enzima	30
Electroforesis en gel de poliacrilamida	33
Dicroísmo Circular	33
Estudio del cambio en la estructura secundaria	33
Efecto de la velocidad de calentamiento en la desnaturalización térmica ...	37
Estimación de la entalpía de van't Hoff aparente	42
Estimación directa de la entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH})	45
Curvas de transición a 220 nm	49
Estudio del cambio en la estructura terciaria	49
Curva de transición a 289 nm	52

Capítulo 5

Conclusiones y perspectivas	57
-----------------------------------	----

Capítulo 6

Referencias	59
Apendice A	64

Capítulo 1

Introducción

Introducción

La función biológica de una proteína está determinada por su estructura tridimensional, la cual es única y se encuentra estabilizada por múltiples interacciones débiles. Las interacciones hidrofóbicas proporcionan una contribución mayor a la estabilización de la estructura globular en la mayoría de las proteínas solubles; los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas adquieren su estado óptimo con la estructura termodinámicamente más estable¹.

Se conocen cuatro tipos de niveles de organización: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria. El término de estructura primaria hace referencia a la secuencia de aminoácidos y a la localización de los puentes disulfuro. La estructura secundaria está definida por la relación espacial entre los aminoácidos adyacentes. La estructura terciaria es la conformación tridimensional de la cadena polipeptídica entera. La estructura cuaternaria hace referencia a las relaciones espaciales entre subunidades polipeptídicas que se encuentran fuertemente asociadas¹.

Las proteínas se pueden clasificar en diferentes formas: a) Por su función biológica (por ejemplo: proteínas de defensa natural, digestivas, de transporte, sanguíneas, hormonales respiratorias, represoras, receptoras, ribosomales, etc.), b) Por su composición (la cual se puede dividir a grandes rasgos en dos clases: proteínas simples y proteínas conjugadas) y c) por las diferencias en la conformación tridimensional total (proteínas fibrosas y globulares)².

Las proteínas desempeñan gran diversidad de funciones: actúan como catalizadores, como elementos estructurales en los sistemas contráctiles, como reserva de elementos nutritivos y como vehículos de transporte, también actúan como hormonas y como elementos de protección¹.

La información obtenida del estudio de las proteínas predice la existencia de dos tipos de estructura secundaria regular: la hélice α y la hoja β . Ambas se caracterizan porque presentan una estructura óptima de enlaces por puentes de hidrógeno entre el nitrógeno de la amida y el oxígeno del carbonilo del esqueleto polipeptídico. La estabilidad de estas estructuras está influenciada por su contenido de aminoácidos y la situación relativa de estos en la secuencia. El giro β es otro tipo de estructura secundaria no repetitiva comúnmente presente en proteínas¹.

Las proteínas globulares tienen estructuras terciarias muy complejas y a menudo tienen varios tipos de estructura secundaria en la misma cadena polipeptídica. A las proteínas que actúan como catalizadores se les llama enzimas y estas se clasifican, basándose en la reacción que catalizan, en seis clases principales por acuerdo de la "International Enzyme Commission" las cuales son: oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas, liasas, isomerasas y ligasas². Las enzimas proteolíticas o proteasas catalizan la hidrólisis de proteínas, dentro de esta clase se encuentran las proteasas sericas³, sulfhidricas o cisteinicas⁴ y las ácidas o aspárticas⁵.

Proteasas ácidas

Las proteasas ácidas son una clase de enzimas proteolíticas que tienen actividad catalítica óptima en un intervalo de pH ácido. Hoy en día, el nombre más aceptado de estas enzimas es aspárticas o proteasas aspárticas por la presencia de dos residuos reactivos de ácido aspártico que se encuentran en el sitio activo. Pertenecen a esta clase las enzimas gástricas, pepsina y quimosina (renina), así como algunas proteasas lisosomales, tales como la catepsina D, E y renina⁵. La mayoría de las proteasas ácidas se encuentran presentes en los animales, (por ejemplo: estómago de vertebrados), plantas (semillas, nepentha, sarracenia, etc.), hongos (*Penicillium janthinellum*, *A. satoi*, *R. chinensis*, etc.) y protozoarios (*T. pyriformis*).

A pesar de su importancia clínica y fisiológica, las proteasas ácidas han sido poco estudiadas en su estructura y en su mecanismo de acción catalítica. La pepsina fue la primera proteína cuyos cristales se examinaron por técnicas de difracción de rayos X, las cuales probaron, concluyentemente, que las proteínas tienen una estructura tridimensional bien definida^{6, 7}.

Propiedades Físicas

Hofmann⁵ y Fruton⁸ revisaron las propiedades químicas y biológicas de las proteasas ácidas encontrando las siguientes similitudes: a) Tienen esencialmente la misma masa molecular (de alrededor de 35,000 Daltones), b) presenta una cadena polipeptídica sencilla de alrededor de 325 aminoácidos y un alto porcentaje de residuos ácidos a básicos. Una comparación de la composición de aminoácidos para varias proteasas ácidas sugiere que todas poseen aproximadamente el mismo número de residuos hidrofóbicos y un casi número idéntico de residuos aromáticos, por lo que exhiben una amplia especificidad del sustrato, a diferencia de las proteasas serínicas que muestran muy limitada especificidad. Todas las proteasas ácidas exhiben un comportamiento similar (pero no idéntico) en su preferencia, por el lado hidrofóbico de la cadena de los aminoácidos que contribuyen al enlace peptídico que hidrolizan. Además, muestran especificidades que dependen del número de aminoácidos en ambos lados del enlace susceptible.

El sitio activo de las proteasas ácidas está caracterizado por la presencia de dos residuos activos de ácido aspártico, uno sensible a compuestos epóxicos⁹, mientras que el otro es sensible a compuestos diazo en presencia de iones¹⁰ Cu^{2+} , ambos tipos de compuestos producen inhibición de la actividad catalítica. Con base en la secuencia conocida de la pepsina de cerdo¹¹, se conoce que la inhibición de los compuestos epóxicos y diazo se realiza en los residuos de aspártico Asp32 y Asp215, respectivamente. Las mediciones de la dependencia de actividad enzimática en función del pH, muestran que los grupos carboxilo Asp32 y Asp215 tienen valores de pKa

alrededor de 1.2 y 4.5, respectivamente¹², esto implica que dentro del intervalo de pH óptimo de actividad catalítica, Asp32 está ionizado mientras que Asp215 está protonado. Todas las proteasas ácidas se inhiben por pepstatina, un oligopéptido aislado de cultivos de *Streptomyces*.¹³

Secuenciación

Se conoce la secuencia completa de aminoácidos de la pepsina de cerdo¹¹, de la quimotripsina bovina¹⁴ y penicillopepsina¹⁵, además de secuencias parciales de información para varias proteasas ácidas de mamíferos y hongos^{16,17}. La comparación de estas secuencias revela homología entre varias de ellas. La cantidad de residuos idénticos representa un 32% del total de residuos entre pepsina porcina y penicillopepsina¹⁸. La secuencia de aminoácidos alrededor de los ácidos aspárticos catalíticamente activos es idéntica en todas las enzimas estudiadas, este hallazgo sugiere que las proteasas ácidas de diferentes fuentes podrían estar relacionadas al haberse originado de un gen ancestral común.

Aunque las secuencias homólogas implican generalmente homología conformacional y, por lo tanto, un mecanismo catalítico común, es sólo a través de una comparación directa de las estructuras tridimensionales de cristalografía de rayos X que se obtienen evidencias para justificar la presencia de estructuras homólogas entre las enzimas¹⁸.

Arquitectura molecular

La estructura molecular de las proteasas ácidas es bilobular con una extensa fisura entre los dos dominios, las dimensiones moleculares son aproximadamente 37 x 46 x 64 Å. Los dominios son de casi igual tamaño, la cadena polipeptídica se pliega primero en un lóbulo y luego en el otro y posteriormente ambos lóbulos se conectan a través de un simple fragmento de cadena

polipeptídica. Así un lóbulo contiene el grupo N-terminal mientras que el otro, el grupo C-terminal. La molécula entera está constituida esencialmente de hojas β -antiparalelas y hay sólo 3 o 4 pequeñas regiones de α -hélice, conteniendo de 1.5 a 2.5 giros. Una característica general es la presencia de varios giros- β (en forma de horquilla)⁷.

El lóbulo del grupo C-terminal consiste en varias hojas β extendidas que envuelven aproximadamente un núcleo de carácter hidrofóbico, el lóbulo N-terminal contiene una bolsa bien conocida y localizada en uno de los lados de la fisura. En las enzimas de *Rhizopus* y de *Endothia*, esta bolsa contiene un sitio de iodización y la presencia de cadenas aromáticas dentro de la bolsa, sugiere un ambiente hidrofóbico. Como la pepsina y otras proteasas ácidas tienen reportado que perdieron actividad catalítica con la iodización¹⁹, ésto indica que es un sitio que contribuye a la especificidad. La superficie externa de esta bolsa consiste de una horquilla con hojas plegadas sobre el interior de naturaleza hidrofóbica. Datos de rayos X sugieren que esta hoja plegada puede ser flexible y por consiguiente presentar un mecanismo estructural que específicamente proviene de interacciones secundarias que se pueden poner en juego.

Puentes Disulfuro

En la secuencia de aminoácidos de la pepsina porcina, hay tres puentes disulfuro en los residuos 45-50, 206-210 y 250-283. La estructura tridimensional de tres enzimas de hongos (*Rhizopus*, *Endothia* y *Phenicillium janthinellum*), muestran un puente S-S en 250-283, este parece conservarse entre las proteasas ácidas; la estructura molecular sugiere que el giro asociado de la cadena polipeptídica puede jugar un rol para mantener la integridad estructural de la enzima¹⁸.

Se conoce la composición de aminoácidos para las tres enzimas de hongos, y muestra que, sólo para la enzima de *Rhizopus*, se tiene un segundo puente S-S. Estudios de rayos X revelan ésto

en los residuos 45-50, sin embargo, en ambas enzimas penicillopepsina y *Endothia*, los residuos 45-50 están localmente cubiertos de un lado y la cadena peptídica entre los residuos 45-50 está arreglada en conformación similar que en la enzima de *Rhizopus*¹⁸.

Sitio activo

Los residuos activos de ácido aspártico, Asp32 y Asp215 se localizan en el interior de la fisura entre los lóbulos en proximidad y accesibles al disolvente. El mapa de densidad electrónica sugiere interacciones por puente de hidrógeno entre ambas cadenas de estos residuos de ácido aspártico. James y Williams²⁰ han reportado en estudios cristalográficos, que en el ácido maleico las dos interacciones de grupos carboxilo (comparten un protón) y presentan un valor de pK_a de 1.8 y 6.1. Hsu et al.¹⁸ proponen una compartición similar entre los dos grupos carboxilo para explicar los valores de pK_a observados de Asp32 y Asp215. De estudios cinéticos de pepsina y otras proteasas ácidas, Voynick et al.²¹ han sugerido que las proteasas ácidas poseen un sitio activo extendido tal que puede acomodar más de dos residuos hidrofóbicos flanqueando los enlaces a hidrolizar. Se han realizado estudios con péptidos sintéticos de varias longitudes son usados para mostrar que el sitio activo de las proteasas ácidas puede amoldarse a la cadena peptídica de 7 residuos²², esto implica que el sitio activo puede extenderse sobre una longitud aproximada de 25 Å. Los análisis de rayos X muestran que la fisura entre los lóbulos tiene un largo de 25 Å para la enzima de *Rhizopus*, la molécula inhibidora se ha localizado dentro de esta fisura²³ y que se ha identificado como la región de unión del sitio activo.

Información del tamaño y extensión del sitio activo viene de estudios cristalográficos de la enzima de *Rhizopus* unido a la pepstatina²⁴. Como se menciono anteriormente la pepstatina es un potente inhibidor para las proteasas ácidas, y es un hexapéptido con solamente residuos hidrofóbicos en su secuencia en una estrecha conformación. La pepstatina tiene un largo de

aproximadamente 20 Å e igualmente se une en la región de la fisura en extensa conformación cubriendo un largo de aproximadamente 20 Å. Esto es consistente con las propuestas mencionadas anteriormente²⁴.

La región plegada encierra una bolsa específicamente en el lóbulo N-terminal que interacciona íntimamente con la pepstatina. Además que Asp32 parece estar ligado fuertemente con alguna parte de la molécula de la pepstatina. Detalles respecto a la estructura característica de la interacción enzima-pepstatina se realizaron por técnica de cristalografía de rayos X²⁴.

Estructuras similares en todas las proteasas ácidas

Se tienen datos disponibles que apoyan la generalización de que todas las proteasas ácidas indistintamente de su fuente de origen, tienen estructura tridimensional similar y cualquier diferencia en especificidad del sustrato o tipo de catálisis, puede explicarse basándose en las siguientes consideraciones estructurales: (a) el giro (horquilla) constituye una protección para la bolsa hidrofóbica específica la cual puede moverse hacia afuera y esto altera la extensión de las interacciones secundarias con las moléculas del sustrato, (b) los dos lóbulos pueden moverse hacia adentro o afuera uno con respecto al otro y esto altera la extensión de las interacciones secundarias con las moléculas de sustrato, (c) algunos de los residuos que cubren la parte superior de la fisura pueden cambiar de un miembro a otro de la misma clase sin alterar el mecanismo catalítico²⁵.

Hay propuestas tentativas concernientes al mecanismo de acción pero es muy prematuro tener un mecanismo catalítico de las proteasas ácidas en general.

El estudio estructural de la pepsina humana así como el de otras proteasas aspárticas tiene gran aplicabilidad en el diseño de fármacos, que aseguran su biodisponibilidad de tipo oral y su

acción específica dirigida a la inhibición de proteasas aspárticas, tal como renina o la proteasa de HIV²⁶.

Pepsina

La pepsina es una enzima comúnmente conocida que se localiza en los jugos gástricos del sistema digestivo de la mayoría de los animales y del ser humano, siendo trascendental en el proceso de la digestión. La pepsina es importante, porque es una de las pocas enzimas que cataliza bajo condiciones fisiológicas extremadamente ácidas para la ruptura de las cadenas polipeptídicas. Debido a que la pepsina funciona en tales condiciones fisiológicas, es secretada como un zimógeno en forma inactiva (pepsinógeno). El pepsinógeno no ataca las células que hay en la pared del estómago. Pero si hay mucha pepsina localizada cerca de la pared del estómago entonces, está empieza a corroer dicha pared y a causar muchos problemas estomacales tales como úlcera gástrica. Si esta condición continua seguida de una reproducción acelerada de bacterias, la úlcera puede empeorar porque la pared no puede reponerse a la misma velocidad. Lo más interesante acerca de la pepsina es que no sólo se halla en el tracto digestivo de los humanos, sino también en el tracto digestivo de muchos animales. Un ejemplo es que se localiza en el tracto digestivo del cerdo. Otra cosa interesante que se halló es que aún cuando la pepsina puede hacer mucho daño al estómago, la digestión no puede ser posible sin ella²⁷.

Hay diversas proteasas gástricas estrechamente relacionadas las cuales son llamadas pepsinas (pepsina A, pepsina B, pepsina C). La diferencia entre ellas involucra pequeñas variaciones del pH óptimo, especificidad para algunos sustratos, variación de la estructura primaria y el punto isoelectrico²⁸.

Los primeros estudios de las propiedades químicas y bioquímicas de las proteínas se realizaron en la pepsina, siendo la segunda enzima que fue cristalizada⁷ y la primera enzima en ser

caracterizada en su secuencia. Además de ser usada como modelo de difracción de rayos X⁷.

29.

La pepsina posee una especificidad muy amplia, pero ataca preferentemente a los enlaces peptídicos en los que intervienen con los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), así como metionina y leucina, péptidos pequeños, pero muy pocos aminoácidos libres³⁰.

Propiedades físicas de la pepsina

La pepsina A tiene una masa molecular promedio de 35,000 Daltones para varias especies^{28, 31}. El punto isoeléctrico de la pepsina está reportado entre 2.25³² y 2.85³³. Diversas determinaciones del coeficiente de sedimentación de la pepsina porcina cristalizada tienen un valor de $s_{20,w}=2.9 - 3.3$ S y el coeficiente de difusión ($D_{20,w}$)³⁴ es cerca de $9 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ seg}^{-1}$; la rotación óptica específica de la pepsina a pH 4.6 y 25°C ($[\alpha]_{600} = -63.5^\circ$; $[\alpha]_{400} = -178^\circ$) y la $\lambda_c = 216$ nm. Una característica de la dispersión rotatoria óptica es que no cambia apreciablemente por breve exposición a concentraciones 8M de urea o 3 M de guanidina³⁵. Por otra parte, el valor de λ_c decrece en la presencia de LiCl y si se incrementa la temperatura arriba de 60°C; ambos cambios son acompañados por la pérdida de la actividad enzimática. La absorptividad molar a 278 nm es de $51 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ³⁶. Estudios de la dispersión óptica y dicroísmo circular de la pepsina indican que hay cambios conformacionales cerca de pH 1.1 y pueden mostrar un pequeño efecto Cotton y bandas dicroicas en la región de 260-290 nm²⁸.

Secuenciación de la pepsina

La pepsina porcina A es la primera proteasa aspártica a la cual se le determinó completamente su secuencia de aminoácidos⁷. Tiene un total de 326 aminoácidos, recientemente se determinó

la secuencia de DNA que codifica para la síntesis de la pepsina porcina la cual también confirma esta observación en el número de aminoácidos³⁷. En la figura 1 se muestra la estructura primaria de la pepsina de cerdo⁷.

ILE ¹	GLY	ASP	GLU	PRO ⁵	LEU	GLU	ASN	TYR	LEU ¹⁰	ASP	THR	GLU
TYR	PHE ¹⁵	GLY	THR	ILE	GLY	ILE ²⁰	GLY	THR	PRO	ALA	GLN ²⁵	ASP
PHE	THR	VAL	ILE ³⁰	PHE	ASP	THR	GLY	SER ³⁵	SER	ASN	LEU	TRP
VAL ⁴⁰	PRO	SER	VAL	THR	CYS ⁴⁵	SER	SER	LEU	ALA	CYS ⁵⁰	SER	ASP
HIS	ASN	GLN ⁵⁵	PHE	ASN	PRO	ASP	ASP ⁶⁰	SER	SER	THR	PHE	GLU ⁶⁵
ALA	THR	SER	GLN	GLU ⁷⁰	LEU	SER	ILE	THR	TYR ⁷⁵	GLY	THR	GLY
SER	MET ⁸⁰	THR	GLY	ILE	LEU	GLY ⁸⁵	TYR	ASP	THR	VAL	GLN ⁹⁰	VAL
GLY	GLY	ILE	SER ⁹⁵	ASP	THR	ASN	GLN	ILE ¹⁰⁰	PHE	GLY	LEU	SER
GLU ¹⁰⁵	THR	GLU	PRO	GLY	SER ¹¹⁰	PHE	LEU	TYR	TYR	ALA ¹¹⁵	PRO	PHE
ASP	GLY	ILE ¹²⁰	LEU	GLY	LEU	ALA	TYR ¹²⁵	PRO	SER	ILE	SER	ALA ¹³⁰
SER	GLY	ALA	THR	PRO ¹³⁵	VAL	PHE	ASP	ASN	LEU ¹⁴⁰	TRP	ASP	GLN
GLY	LEU ¹⁴⁵	VAL	SER	GLN	ASP	LEU ¹⁵⁰	PHE	SER	VAL	TYR	LEU ¹⁵⁵	SER
SER	ASN	ASP	ASP ¹⁶⁰	SER	GLY	SER	VAL	VAL ¹⁶⁵	LEU	LEU	GLY	GLY
ILE ¹⁷⁰	ASP	SER	SER	TYR	TYR ¹⁷⁵	THR	GLY	SER	LEU	ASN ¹⁸⁰	TRP	VAL
PRO	VAL	SER ¹⁸⁵	VAL	GLU	GLY	TYR	TRP ¹⁹⁰	GLN	ILE	THR	LEU	ASP ¹⁹⁵
SER	ILE	THR	MET	ASP ²⁰⁰	GLY	GLU	THR	ILE	ALA ²⁰⁵	CYS	SER	GLY
GLY	CYS ²¹⁰	GLN	ALA	ILE	VAL	ASP ²¹⁵	THR	GLY	THR	SER	LEU ²²⁰	LEU
THR	GLY	PRO	THR ²²⁵	SER	ALA	ILE	ALA	ASN ²³⁰	ILE	GLN	SER	ASP
ILE ²³⁵	GLY	ALA	SER	GLU	ASN ²⁴⁰	SER	ASP	GLY	GLU	MET ²⁴⁵	VAL	ILE
SER	CYS	SER ²⁵⁰	SER	ILE	ASP	SER	LEU ²⁵⁵	PRO	ASP	ILE	VAL	PHE ²⁶⁰
THR	ILE	ASP	GLY	VAL ²⁶⁵	GLN	TYR	PRO	LEU	SER ²⁷⁰	PRO	SER	ALA
TYR	ILE ²⁷⁵	LEU	GLN	ASP	ASP	ASP ²⁸⁰	SER	CYS	THR	SER	GLY ²⁸⁵	PHE
GLU	GLY	MET	ASP ²⁹⁰	VAL	PRO	THR	SER	SER ²⁹⁵	GLY	GLU	LEU	TRP
ILE ³⁰⁰	LEU	GLY	ASP	VAL	PHE ³⁰⁵	ILE	ARG	GLN	TYR	TYR ³¹⁰	THR	VAL
PHE	ASP	ARG ³¹⁵	ALA	ASN	ASN	LYS	VAL ³²⁰	GLY	LEU	ALA	PRO	VAL
ALA ³²⁶												

Figura 1

Estructura primaria de la pepsina de cerdo. Los superíndices indican la numeración de los aminoácidos.

Arquitectura molecular de la pepsina

La estructura terciaria de la molécula se muestra en la figura 2 y se observa que la enzima consta de dos dominios separados por una extensa fisura la cual contiene el sitio activo y el sitio de unión del sustrato^{38,39}, un dominio contiene el grupo N- terminal constituido por la primera mitad de la cadena polipeptídica que incluye los residuos del 1 al 175 aproximadamente, el otro

dominio contiene del 175 al 326 y constituye el dominio C-terminal. Sin embargo, el giro β que comprende los residuos del 309 al 326, se localizan entre los dos dominios, establece un contacto hidrofóbico con ambos dominios y puede ser considerado como parte de cualquier dominio²⁹.

La pepsina está caracterizada por una alta concentración de grupos con carga negativa (30 ácidos aspárticos y 13 ácidos glutámicos), además de un grupo fosfórico unido covalentemente a la Ser68 mientras que el número de grupos con carga positiva es sólo de 5⁷. Consecuentemente, el estado de ionización de los grupos carbonilo es determinado por el pH del medio que pueden influenciar fuertemente la estabilidad de la pepsina. Experimentos con soluciones de pepsina a diferentes pH usando técnicas ópticas muestran que los dos dominios tienen movibilidades independientes⁷.

La especial disposición de los grupos cargados en la molécula de la pepsina aseguran la estabilidad de la enzima a un pH bajo, para la mayor parte de las proteínas, el número de grupos ácidos o básicos no difieren mucho y por consiguiente a pH extremos, la carga total de la molécula se incrementa y la repulsión electrostática desestabiliza la estructura de la molécula. En la pepsina hay, contando la cadena N-terminal, sólo dos grupos cargados positivamente que no comparten su par iónico y están aparte de la estructura espacial⁴⁰. Las dimensiones de la enzima son aproximadamente de 37 x 46 x 64 Å⁴¹ y la masa molecular del lóbulo N-terminal es de 21,450 Daltones y para el C-terminal es de 13,200 Daltones⁴².



Figura 2

Esquema de la estructura tridimensional de la pepsina porcina en la que los listones rojos son α -hélices, los listones amarillos hojas- β , las líneas azules giros- β , en verdes el grupo C y N terminal y en negro los aminoácidos del sitio activo.

Desnaturalización

La estructura tridimensional de las proteínas puede destruirse mediante tratamientos que rompen las interacciones débiles en un proceso denominado desnaturalización, y puede ser inducido por cambios en los valores de pH, de fuerza iónica, por la presencia de sales inorgánicas, disolventes orgánicos o por la variación de la temperatura⁴³. La desnaturalización destruye la función proteica, lo que demuestra la relación entre estructura y función. El proceso de desnaturalización puede estudiarse observando los cambios que ocurren en diferentes propiedades de la proteína, tales como características espectroscópicas o actividad biológica. Entre las técnicas empleadas para los estudios de desnaturalización tenemos: proteólisis, pérdida de la actividad enzimática, cromatografía de exclusión, fluorescencia, espectroscopía diferencial ultravioleta, resonancia magnética nuclear, dicroísmo circular y calorimetría diferencial de barrido⁴⁴.

En el estudio de la estabilidad termodinámica de las proteínas, los principales resultados obtenidos indican que la desnaturalización de proteínas pequeñas (masa molecular menor a 35,000 Daltones) es generalmente un proceso reversible de una sola etapa, que involucra dos estados termodinámicos estables, el estado nativo y el estado desnaturalizado^{45, 46}. En estos casos es posible caracterizar termodinámicamente el proceso de desnaturalización a través de la determinación de los cambios de entalpía, energía libre, entropía y capacidad calorífica⁴⁷. El proceso de desnaturalización puede estudiarse en condiciones de equilibrio, bajo las cuales la transición es reversible; la información que se obtiene a partir de estos estudios sirve también para interpretar el proceso de adquisición de la estructura nativa⁴⁸.

Para proteínas de masa molecular mayor de 35,000 Daltones se ha observado que el proceso de desnaturalización es más complejo, ya que se pueden detectar especies intermediarias estables.⁴⁹ Además, dicho proceso incrementa su complejidad para el caso de proteínas

oligoméricas⁵⁰; sin embargo, es necesario trabajar con estos sistemas, ya que la mayoría de las proteínas involucradas en los fenómenos biológicos caen dentro de este grupo de proteínas. La desnaturalización e inactivación de la pepsina se da particularmente en la región de pH 6 a 7 o superior, donde se denomina comúnmente desnaturalización alcalina. La pepsina es estable a valores de pH bajos, pero es sensible a pH altos y se inactiva rápidamente de pH 6.5 a 7 o superiores. La pepsina pierde gradualmente la actividad en soluciones fuertemente ácidas a pH 1.5 y 50°C, el decaimiento de la actividad es paralela a la pérdida de nitrógeno, bajo estas condiciones, la autohidrólisis probablemente contribuye a la pérdida de la actividad. En soluciones muy ácidas, ocurre primero la desnaturalización seguida por la hidrólisis del enlace peptídico⁵¹.

La desnaturalización térmica de la pepsina, de acuerdo a estudios calorimétricos efectuados por Privalov *et al.*⁵², es un proceso complejo que se lleva a cabo en dos distintos estados que ocurren a diferentes temperaturas, en donde el segundo estado es completamente reversible. Estos estados corresponden a la fusión separada de las dos partes independientes de la molécula, esta empieza con el lóbulo N-terminal y el más estable es el C-terminal, en donde ninguna de las dos fases representa una transición de dos estados, el análisis de esas transiciones muestra que ambas partes de la molécula de la pepsina consiste de dos unidades cooperativas cuasi-independientes⁵². Makarov *et al.*⁵³ han sugerido que el número de regiones cooperativas o dominios energéticos en la pepsina son función del pH del medio ambiente de la molécula.

Todas las cuatro unidades cooperativas de la pepsina tienen una estructura compacta con un bien desarrollado núcleo hidrofóbico y además que dichas unidades deberían considerarse como dominios estructurales de la molécula, consecuentemente cada lóbulo de la molécula de la pepsina representa un bloque estructural consistente de dos dominios. La presencia de la pepsatina, hace que los dos dominios en el lóbulo N-terminal, cooperan en forma de un sistema único⁵².

Como se mencionó anteriormente, la pepsina se desnaturaliza en dos distintos estados ocurriendo cada uno a diferente temperatura. Además de que no se pueden considerar como dos pasos consecutivos, la transformación inducida por la temperatura de un sistema sencillo pero procede en más o menos subsistemas independientes los cuales difieren en la cantidad de los grupos ionizables⁵².

Sin embargo, tanto Privalov *et al.*⁵² como Makarov *et al.*⁵³ no hacen una propuesta definida y clara de un posible mecanismo de la desnaturalización térmica de la pepsina, por lo que basándonos en estos antecedentes nos planteamos el objetivo de este proyecto.

Inhibición

El papel del etanol es el de servir como inhibidor de la autohidrólisis de la pepsina, debido a que hace que se intensifiquen las interacciones entre las cargas electrostáticas comparado con el medio acuoso⁵³, esta inhibición es consecuencia de la formación de enlaces entre el grupo hidroxilo del etanol y uno de los carboxilos activos⁵⁴, dicha unión induce cambios conformacionales. Los cuales ocurren con el residuo de Asp-215 y además el etanol hace que cambie el ambiente local de los residuos⁵².

Objetivo

Estudio de la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo por dicroísmo circular para determinar el mecanismo de desplegamiento y la posible existencia de un intermediario estable durante el proceso.

Capítulo 2

Tratamiento de Datos

Tratamiento de Datos

Modelo de dos estados reversible

Asumiendo un modelo de dos estados para la desnaturalización reversible de una proteína, podemos analizar los datos de algún parámetro físico $[\phi]$ que pueda sufrir un cambio debido a la modificación de la conformación de una proteína al pasar del estado nativo $[N]$ al estado desnaturalizado $[D]$ y a partir de estos datos calcular la constante de equilibrio del proceso:



$$K = \frac{[D]}{[N]} \quad (1)$$

O bien en términos de la fracción nativa (f_N) y de la fracción desnaturalizada (f_D) de la proteína:

$$K = f_D / f_N = f_D / (1 - f_D) \quad (2)$$

Siendo:

$$f_N + f_D = 1 \quad (3)$$

f_D puede determinarse experimentalmente si se mide dicha propiedad física (ϕ) en función de la temperatura, para el estado nativo (ϕ_N), el estado desnaturalizado (ϕ_D) y cualquier punto de la transición a la temperatura T (ϕ_T).

$$f_D = [\phi_T - \phi_N] / [\phi_D - \phi_N] \quad (4)$$

Bajo este esquema la proteína posee solamente dos estados termodinámicos macroscópicos, el estado nativo y el estado desnaturalizado. La constante de equilibrio se puede expresar como:

$$K = [\phi_T - \phi_N] / [\phi_D - \phi_T] \quad (5)$$

Los parámetros termodinámicos ΔG° , ΔH° , se pueden obtener a partir de:

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (6)$$

$$\Delta H^\circ = -R \left[\frac{\partial \ln K}{\partial 1/T} \right]_P \quad (7)$$

Modelos para procesos irreversibles

Modelo de dos estados irreversible

La desnaturalización térmica de muchas proteínas es irreversible. Para explicar los cambios ocurridos en este proceso se ha utilizado el modelo irreversible de dos estados.



Donde N representa el estado nativo, D el estado desnaturalizado irreversible de la proteína y k_{ap} la constante de velocidad aparente de primer orden, la cual cambia con la temperatura según la ecuación de Arrhenius.

$$k_{ap} = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) \quad (8)$$

Sánchez- Ruiz *et al.*⁵⁵ derivaron varios métodos para calcular la energía de activación aparente E_{ap} , del proceso, a partir del análisis de curvas calorimétricas. Dos de estos métodos pueden ser adaptados para utilizar la información de los estudios por difracción circular⁵⁶.

El primer método relaciona el doble logaritmo de la fracción de proteína en el estado nativo (f_N) y el inverso de la temperatura:

$$\ln\left(\ln\frac{1}{f_N}\right) = \frac{E}{R}\left(\frac{1}{T_m} - \frac{1}{T}\right) \quad (9)$$

Entonces a partir de un gráfico del $\ln\{\ln[1/f_N]\}$ en función de $1/T$ se obtendrá una línea recta con pendiente igual a $-E/R$.

El segundo método relaciona la temperatura media (T_m) de la curva de transición del estado nativo al estado desnaturalizado, con la velocidad de calentamiento (v):

$$\ln\frac{v}{T_m^2} = \ln\frac{AE}{R} - \frac{E}{RT_m} \quad (10)$$

Donde A es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius. Por lo que, a partir de un gráfico del $\ln v/T_m^2$ en función de $1/T_m$, se obtendrá una línea recta con pendiente igual a $-E/R$. La constante de equilibrio aparente es:

$$K_{ap} = \frac{f_{D, ap}}{(1 - f_{D, ap})} \quad (11)$$

Donde $f_N = (1 - f_{D,ap})$ y $f_{D,ap}$ es la fracción aparente de la proteína nativa.

La entalpía de van't Hoff se deduce de la dependencia de la temperatura de la K_{ap} dando⁵⁷:

$$\frac{\partial(\ln K_{ap})}{\partial T} = \frac{\Delta H_{ap}}{RT^2} \quad (12)$$

Modelo de Lumry- Eyring

Un segundo modelo que explica la desnaturalización irreversible de una proteína es el modelo de Lumry-Eyring⁵⁸. El cual involucra la presencia de un estado nativo (N) un estado desdoblado (U), y un estado desnaturalizado irreversible (D).



Donde K es la constante de equilibrio para la transición de N a U (modelo III), k es la constante de velocidad de primer orden para la reacción de U a D que varía con la temperatura de acuerdo a la ecuación de Arrhenius.

Teniendo:

$$K = f_U / f_N \quad (13)$$

y

$$f_N + f_U + f_D = 1 \quad (14)$$

f_N la fracción nativa, f_U la fracción del estado desdoblado y f_D la fracción de la proteína desnaturalizada irreversiblemente, por lo tanto al aplicar este modelo a la desnaturalización térmica de una proteína que presente un intermediario estable, se podría en principio, calcular de manera directa la entalpía de van't Hoff para la reacción reversible, si es posible estimar los valores de f_N y f_U a varias temperaturas.

Capítulo 3

Procedimiento experimental

Procedimiento experimental

Purificación de la pepsina

Reactivos

Pepsina A de cerdo (EC 3.4.23.1) comercial de Sigma, Co. (Lote No.123H8035).

Etanol absoluto de Mallinckrodt.

Agua desionizada.

Cromatografía de filtración en gel

Se realizó la purificación de la pepsina A de cerdo (EC 3.4.23.1) comercial de Sigma (lote No.123H8035) por medio de una cromatografía de filtración en gel, usando una columna TSK HW-40(Merck) de 38 cm de largo y 2.5 cm de diámetro. Utilizando como eluyente una disolución reguladora de fosfatos 0.05 M a pH 6.0. La columna se encontró acoplada a un colector de fracciones LKB Bromma modelo 2111 con un sensor de UV LKB Bromma modelo 2138 y una bomba peristáltica LKB modelo P-1.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La purificación final se realizó por intercambio iónico en cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Empleando una columna Biogel DEAE-5-PW de 75 mm de altura y 7.5 mm de diámetro, acoplada a un cromatografo Varian Serie 9000. Se utilizó como eluyente una disolución reguladora de fosfatos 0.05 M pH 6.0, con un gradiente de KCl 1 M en la misma disolución de fosfatos. Las muestras fueron recromatografiadas bajo las mismas condiciones.

Por último, la muestra se desalinizó en una columna PD-10, utilizando el mismo regulador como eluyente.

Determinación de la concentración de la proteína

La concentración de proteína se determinó espectrofotométricamente por lectura de la absorbencia a 280 nm, utilizando un coeficiente de absortividad al 1% en celda de 1 cm de 14.1⁵⁹.

Electroforesis

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato de sodio), se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia LKB). Se usó una placa homogénea de gel de poliacrilamida 20% (0.45x43x50 mm), con un sistema regulador de 0.112M de acetato y 0.112M de Tris a pH 6.4 (Phastgel Homogenius 20) y dos tiras reguladoras (2% agarosa) conteniendo 0.2M de tricina, 0.2M de tris, 0.55% de SDS a pH 8.1. Se aplicó una corriente constante de 10 mA por 45 min a 15°C⁶⁰.

Electroforesis en gel de poliacrilamida nativa

La electroforesis en gel de poliacrilamida, se realizó en un equipo Phast System (Pharmacia LKB). Se uso una placa homogénea de gel de poliacrilamida 20% (0.45x43x50 mm), con un sistema regulador de 0.112M de acetato y 0.112M de Tris a pH 6.5 (Phastgel Homogenius 20) y dos tiras reguladoras (3% agarosa) conteniendo 0.88M de L-Alanina, 0.25M de tris, a pH 8.8. se aplicó una potencia constante de 2 W por 45 minutos a 15°C⁶¹.

Revelado de la placa

La fijación, teñido y desteñido se efectuó de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor (LKB)⁶².

Inhibición de la enzima

Para prevenir la autohidrólisis⁶³ la enzima fue inhibida con etanol al 10% (masa/volumen).

Estudio por Dicroísmo Circular

Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano

Los espectros de dicroísmo circular (DC) se obtuvieron en un espectropolarímetro Jasco J 500 A, calibrado con ácido (+)-10-canforsulfónico⁶⁴.

Los espectros obtenidos en la región del ultravioleta lejano (190-240 nm) para la determinación del contenido de la estructura secundaria y el estudio del cambio conformacional en función de la temperatura se realizaron en una celda con recorrido óptico de 0.1 cm, con chaqueta de circulación de agua y un baño HAAKE-NK-22 para el control de la temperatura. Se midió directamente la temperatura en la celda con un termómetro digital (Tegam modelo 872). La concentración de la enzima empleada fue de 0.711 mg/ml a un pH final de 6.2.

Los espectros de dicroísmo circular son reportados como elipticidad por residuo medio $[\theta]_{m.w.r.}$, la cual fue calculada utilizando una masa molecular de 110 por residuo^{65, 66}.

Curvas de transición en UV lejano

La desnaturalización térmica se siguió por el cambio en la elipticidad : a) a 230 nm y b) a 220 nm. El cambio de temperatura en la muestra de 15°C a 70°C, se realizó a velocidad de calentamiento constante, se seleccionaron éstas de 0.1 a 1.5 °C/min (con una precisión de ± 0.02 °C/min), las elipticidades observadas fueron transformadas a fracción aparente de proteína desnaturalizada $f_{D, ap}$ usando la ecuación 4.

Curvas de calentamiento-enfriamiento en UV lejano

Las curvas de calentamiento-enfriamiento se siguieron por el cambio en la elipticidad a) a 230 nm y b) a 220 nm. Para esto se hizo un calentamiento a velocidad controlada hasta una temperatura T' e inmediatamente se enfrió súbitamente (aprox. 10°C/min) hasta 25°C. Las elipticidades observadas fueron transformadas a fracción aparente de proteína desnaturalizada $f_{D, ap}$ usando la ecuación 4 y se calculó la constante de equilibrio usando la ecuación 5.

Espectros de dicroísmo circular en el UV cercano

Los espectros obtenidos en la región del ultravioleta cercano (250-330 nm) para la determinación del contenido de la estructura terciaria y el estudio del cambio conformacional en función de la temperatura se realizaron en una celda con recorrido óptico de 1.0 cm, con chaqueta de circulación de agua y un baño HAAKE-NK-22 para el control de la temperatura. Se midió directamente la temperatura en la celda con un termómetro digital (Tegam modelo 872). La concentración de la enzima empleada fue de 0.711 mg/ml a un pH final de 6.2.

Curvas de transición en el UV cercano

La desnaturalización térmica se siguió por el cambio en la elipticidad a 289 nm. El cambio de temperatura en la muestra de 15°C a 70°C, se realizó a velocidad de calentamiento constante, ésta se seleccionó a un 1.0 °C/min (con una precisión de ± 0.02 °C/min), las elipticidades observadas fueron transformadas a fracción aparente de proteína desnaturalizada $f_{D, ap}$, usando la ecuación 4.

Curvas de calentamiento-enfriamiento en el UV cercano

La curva de calentamiento-enfriamiento se siguió por el cambio en la elipticidad a 289 nm. Para esto se hizo un calentamiento a velocidad controlada hasta una temperatura T' e inmediatamente se enfrió súbitamente (aprox. 10°C/min) hasta 25°C . Las elipticidades observadas fueron transformadas a fracción aparente de proteína desnaturalizada $f_{D, ap}$, usando la ecuación 4 y se calculó la constante de equilibrio usando la ecuación 5.

Capítulo 4

Resultados y Discusión

Resultados y Discusión

Purificación de la Pepsina

Cromatografía de filtración en gel

En la figura 3 se muestra el perfil de elución para la filtración en gel de la pepsina en regulador de fosfatos a pH 6.0. Graficando la absorbencia a 280 nm en función de la fracción, se observaron tres picos. Solamente el pico No. 1 presentó actividad proteolítica frente a hemoglobina. Las fracciones de la 8 a 13 fueron colectadas en una sola fracción llamada extracto crudo, para su posterior purificación.

Cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

La purificación del extracto crudo se realizó por intercambio iónico en cromatografía líquida de alta presión (HPLC), en la figura 4 se muestra el patrón de elución de la pepsina en regulador de fosfatos a pH 6.0, utilizando un gradiente salino de KCl 1M, en la cual se observó que el pico de máxima absorbencia corresponde a la pepsina y se colectó éste con una concentración final de 0.85 mg/ml.

Inhibición de la enzima

La muestra colectada del HPLC fue desalinizada en una columna PD-10 e inmediatamente la enzima fue inhibida con etanol en proporción del 10% (m/V), la disolución resultante tuvo un pH de 6.2.

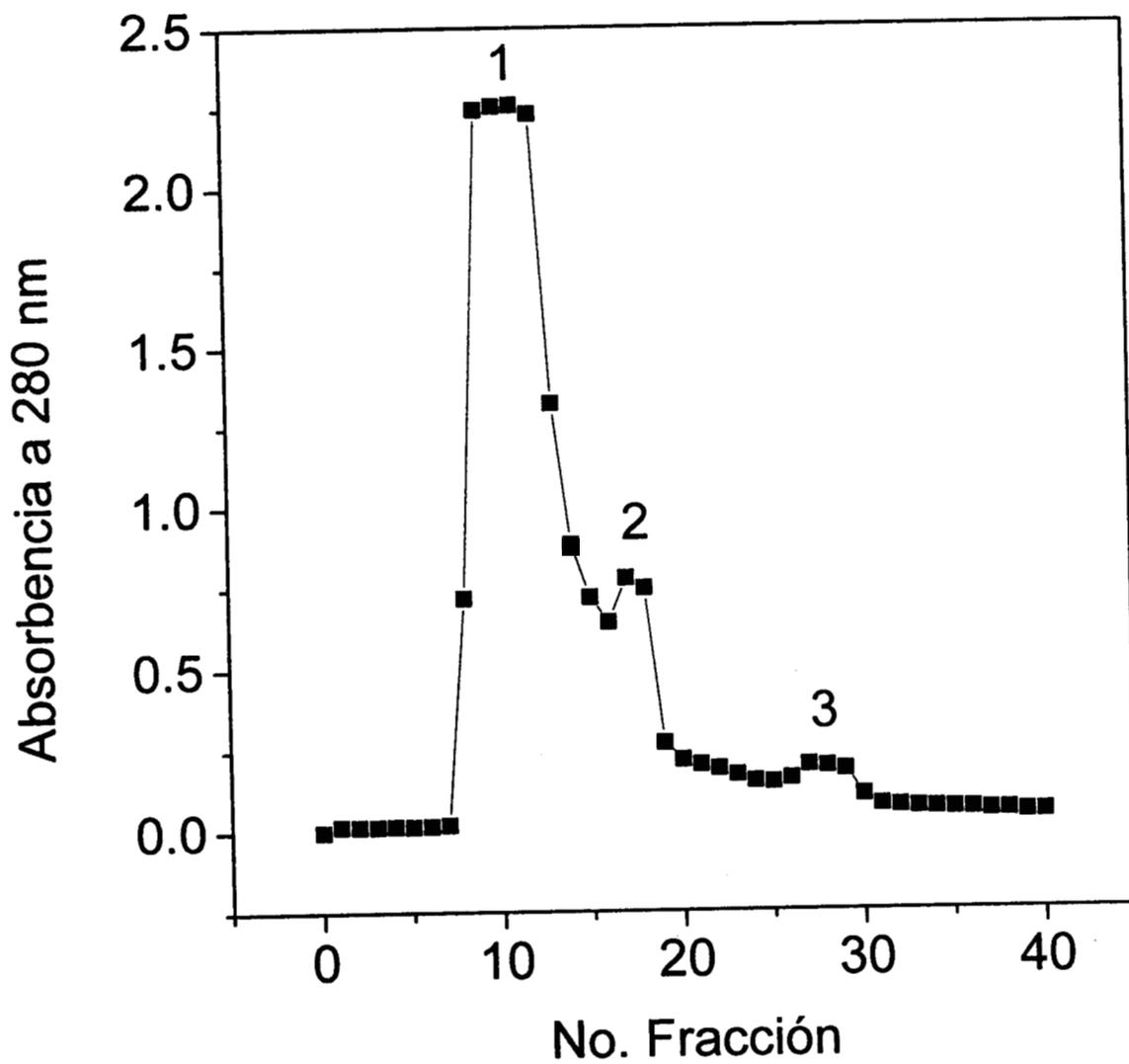


Figura 3
 Patrón de elución de la cromatografía de filtración en gel para la pepsina de cerdo.

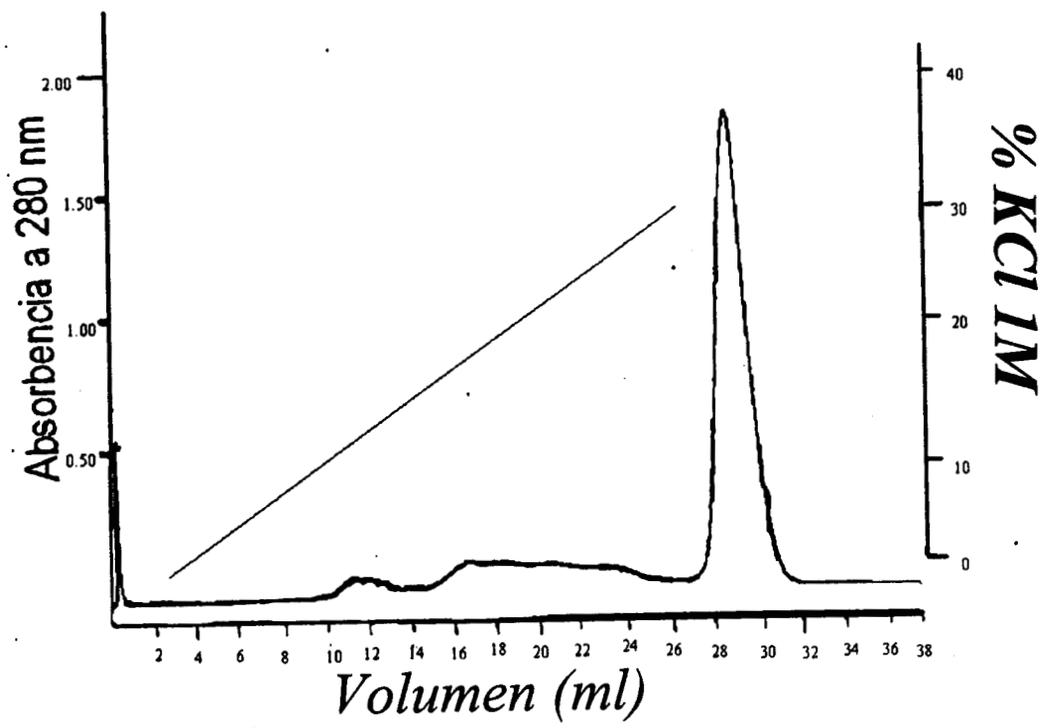


Figura 4
Cromatografía de intercambio iónico para la pepsina de cerdo en HPLC.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Posteriormente se realizó una prueba de electroforesis a la proteína purificada tanto en presencia como en ausencia de dodecilsulfato de sodio (SDS), en ambos casos se observó una sola banda, por lo que podemos decir que la enzima fue purificada a homogeneidad (figuras 5 y 6).

Dicroísmo Circular

Estudio del cambio en la estructura secundaria

Se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en función de la temperatura, usando una concentración de 0.711 mg/ml de la proteína, en el intervalo de 190 a 240 nm. (figura 7). Esta región espectral es el reflejo de la estructura secundaria de las proteínas^{67,68}. Se observó un mínimo a 215 nm característico de las proteasas ácidas, las cuales presentan un alto contenido de hojas- β ⁵⁶. Al aumentar la temperatura se observó un cambio en las magnitudes espectrales, lo que implica la aparición de estructura desordenada en la cadena polipeptídica. Así mismo, las muestras fueron calentadas a temperaturas superiores a 75°C no mostrando reversibilidad en la señal de dicroísmo circular cuando fueron enfriadas a 25°C.

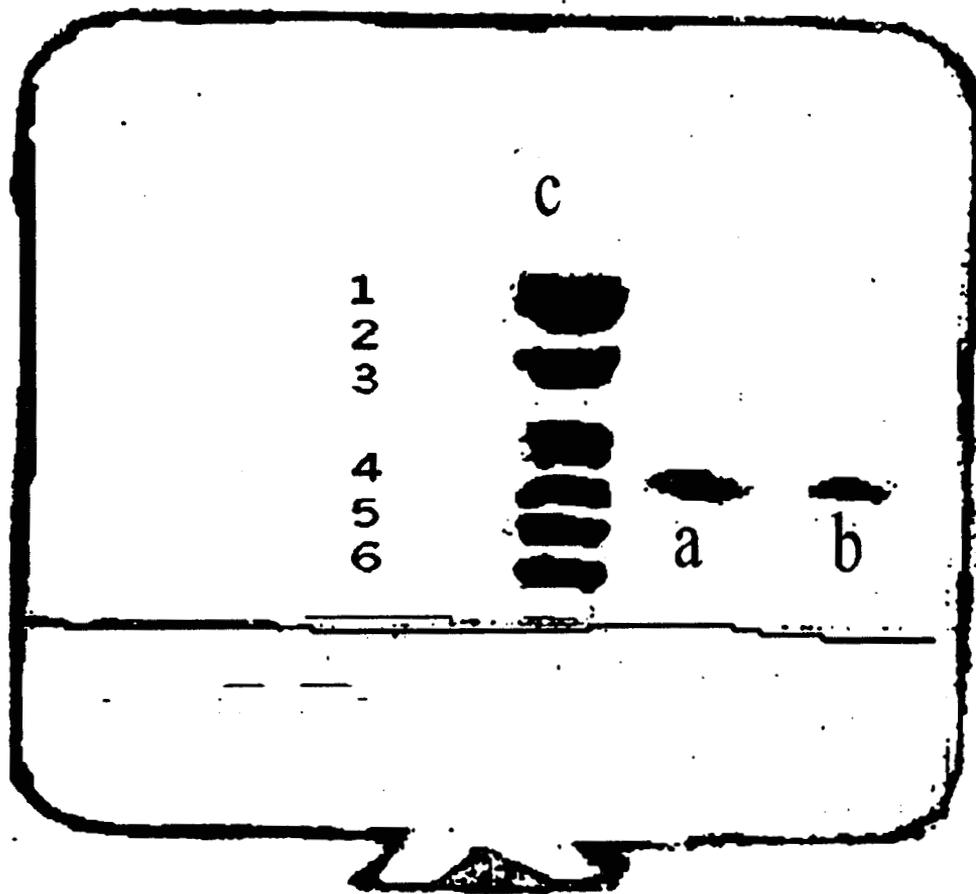


Figura 5

Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato de sodio (SDS) para la pepsina de cerdo. Carril c proteínas patrón: 1) fosforilasa b, 94 kDa, 2) albúmina, 67 kDa, 3) ovoalbúmina, 43 kDa, 4) anhidrasa carbónica, 30 kDa, 5) inhibidor de tripsina, 20 kDa, 6) α -lactoalbúmina, 14.4 kDa. Carril a proteína nativa (0.711 mg/ml). Carril b proteína desnaturalizada (0.711 mg/ml).

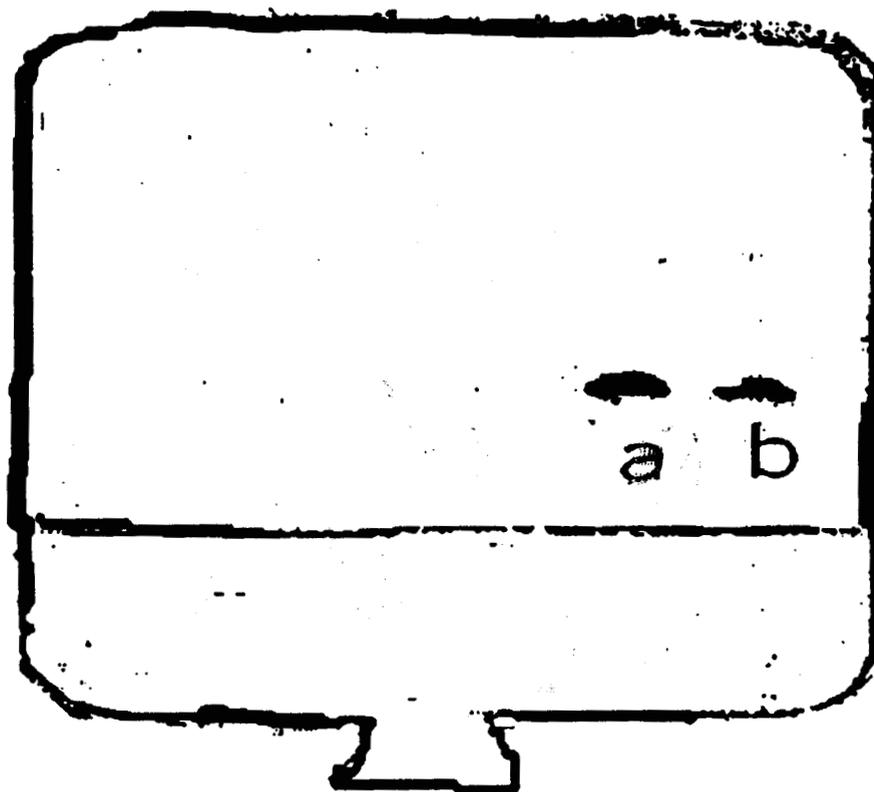


Figura 6
Electroforesis en gel de poliacrilamida de la pepsina-etanol 10 %.
Carril a proteína nativa, carril b proteína desnaturalizada

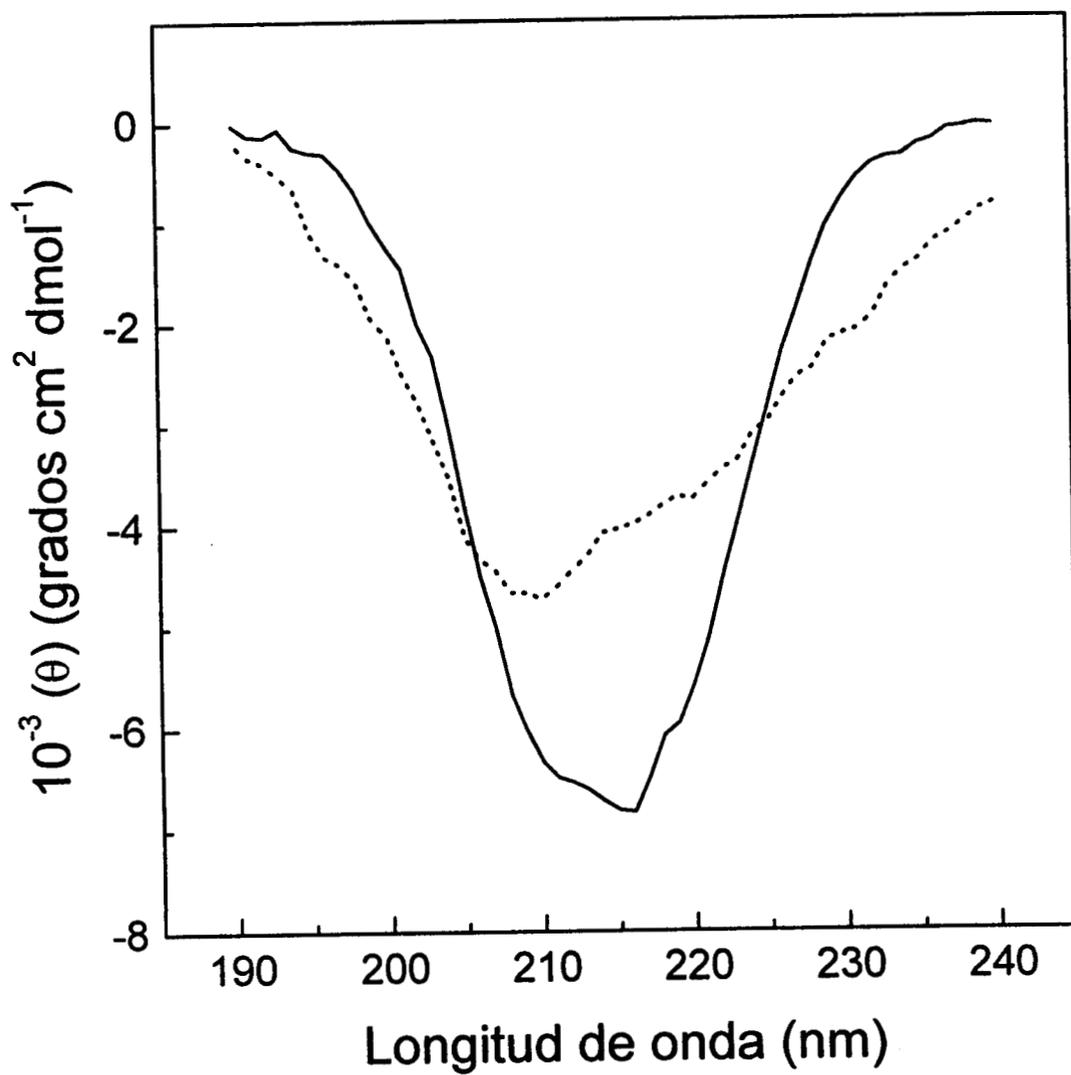


Figura 7

Espectro de dicroísmo circular de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v) en la región del ultravioleta lejano a 25 °C (—) y 72 °C (...).

Efecto de la velocidad de calentamiento en la desnaturalización térmica

En la figura 8 se presentan las curvas de transición seguidas por el cambio en la elipticidad a 230 nm a diferentes velocidades de calentamiento. Se observa una curva monofásica que es dependiente de la velocidades calentamiento, lo que implica que el proceso se encuentra bajo control cinético, debido a la presencia de una reacción irreversible⁶⁹. Después de realizar cada curva de transición y enfriar a 25°C en las muestras se apreció turbidez. Esto nos sugiere que la irreversibilidad puede estar asociada con la agregación de la proteína. Desde el punto de vista del carácter irreversible de la desnaturalización térmica de la pepsina, se analizaron las curvas de transición en términos de un modelo irreversible de dos estados.



Donde N representa el estado nativo, D el estado desnaturalizado y k_{ap} la constante de velocidad aparente de primer orden que cambia con la temperatura, según la ecuación de Arrhenius.

Por lo que, utilizando la ecuación 9 y haciendo un gráfico del doble logaritmo del inverso de la fracción nativa ($\ln[\ln\{1/f_N\}]$) contra el inverso de la temperatura ($1/T$), a partir de las curvas de transición (figura 8) se obtiene una línea recta (para cada velocidad de barrido) con una pendiente igual a $-E/R$ (figura 9). En la tabla I se reportan las energías de activación, las temperaturas medias de la transición (T_m) y el factor de correlación calculados a partir de la ecuación 9 y la figura 8. Se obtuvo una energía de activación promedio para el proceso de 229 ± 12 kJ/mol.

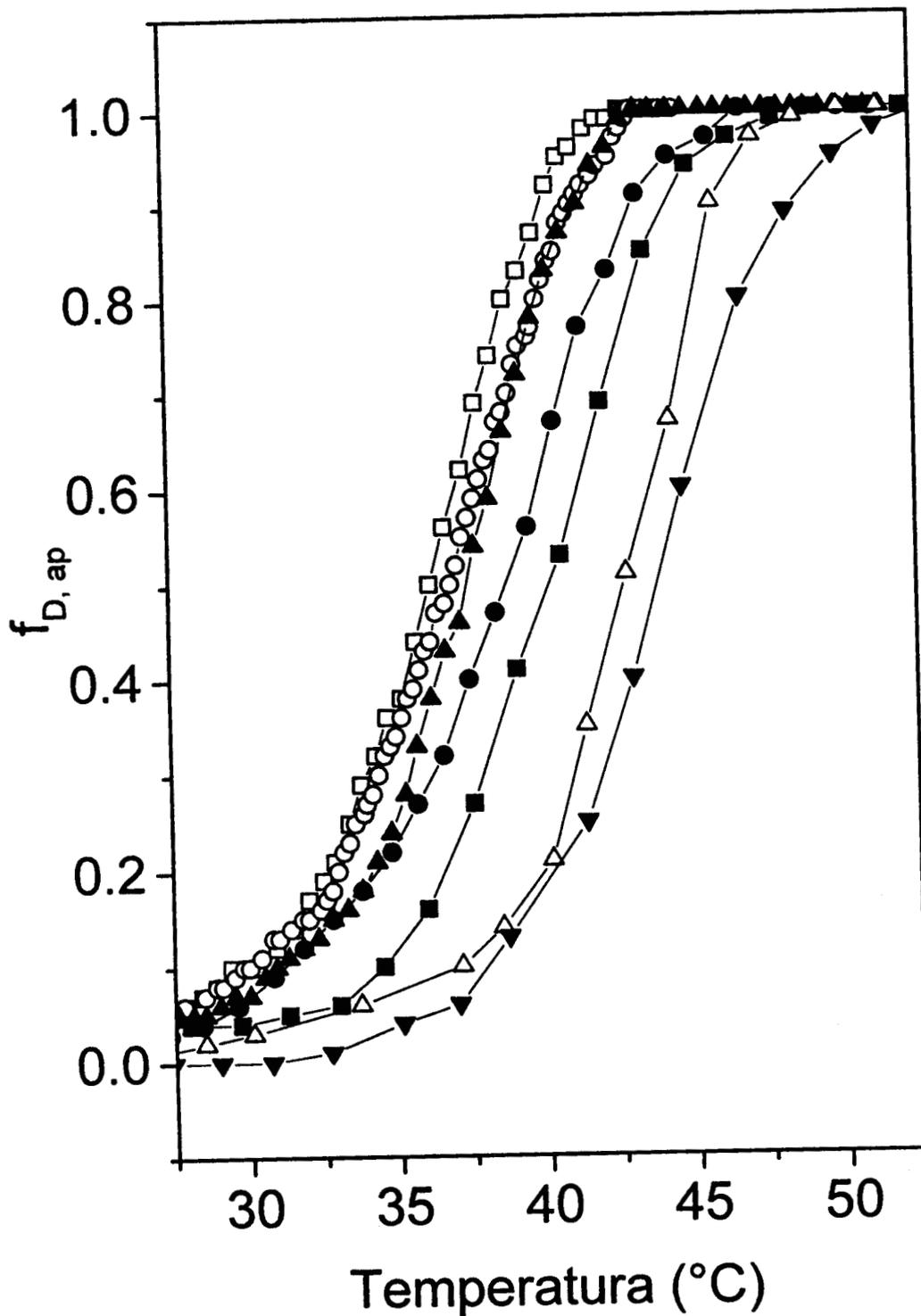


Figura 8

Curvas de desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v) en función de la temperatura seguidas por monitoreo de la elipticidad a 230 nm y a diferentes velocidades de barrido: 0.1 (□), 0.2 (○), 0.5 (▲), 1.0 (●), 1.3 (■), 1.4 (△) y 1.5 (▼) °C/min.

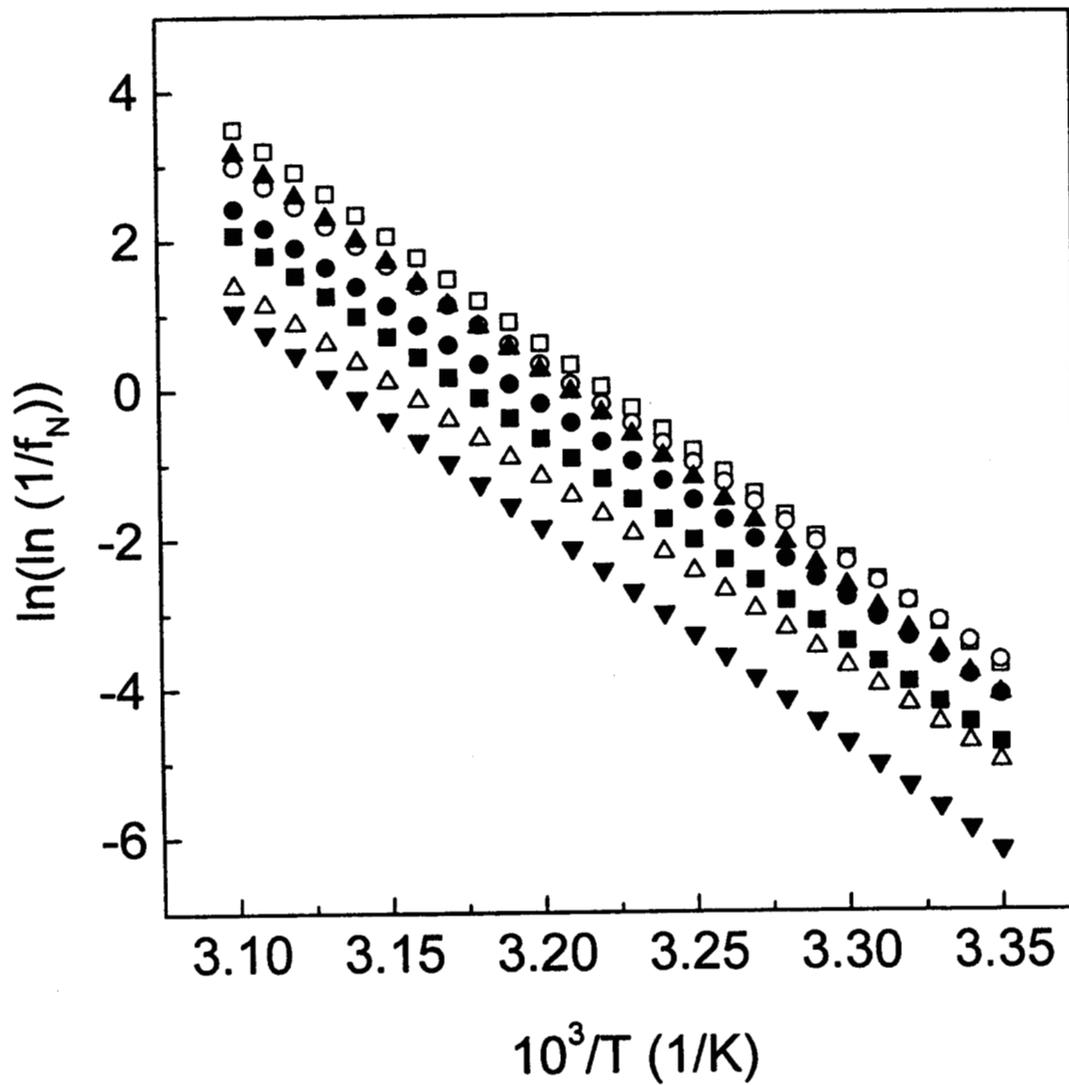


Figura 9

Gráfico de $\ln(\ln(1/f_N))$ vs $1/T$ para cada velocidad de barrido de las curvas de transición de la figura 8: 0.1 (\square), 0.2 (\circ), 0.5 (\triangle), 1.0 (\bullet), 1.3 (\blacksquare), 1.4 (\triangle) y 1.5 (\blacktriangledown) $^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

Tabla I				
v (°C/min)	T_m (K)	T_m (°C)	Corr.	E (kJ/mol)
0.1	310.5	37.3	0.997	240
0.2	311.3	38.1	0.998	221
0.5	311.6	38.5	0.994	242
1.0	313.2	40.0	0.992	218
1.3	314.9	41.7	0.991	227
1.4	317.0	43.9	0.970	213
1.5	318.8	45.7	0.991	241

Tabla I.

Energía de activación determinada variando la velocidad de calentamiento.

Se incluyen los valores obtenidos de las energías de activación, los valores de la T_m y el factor de correlación para la regresión lineal. Calculados a partir de la ecuación 9 y de la figura 8.

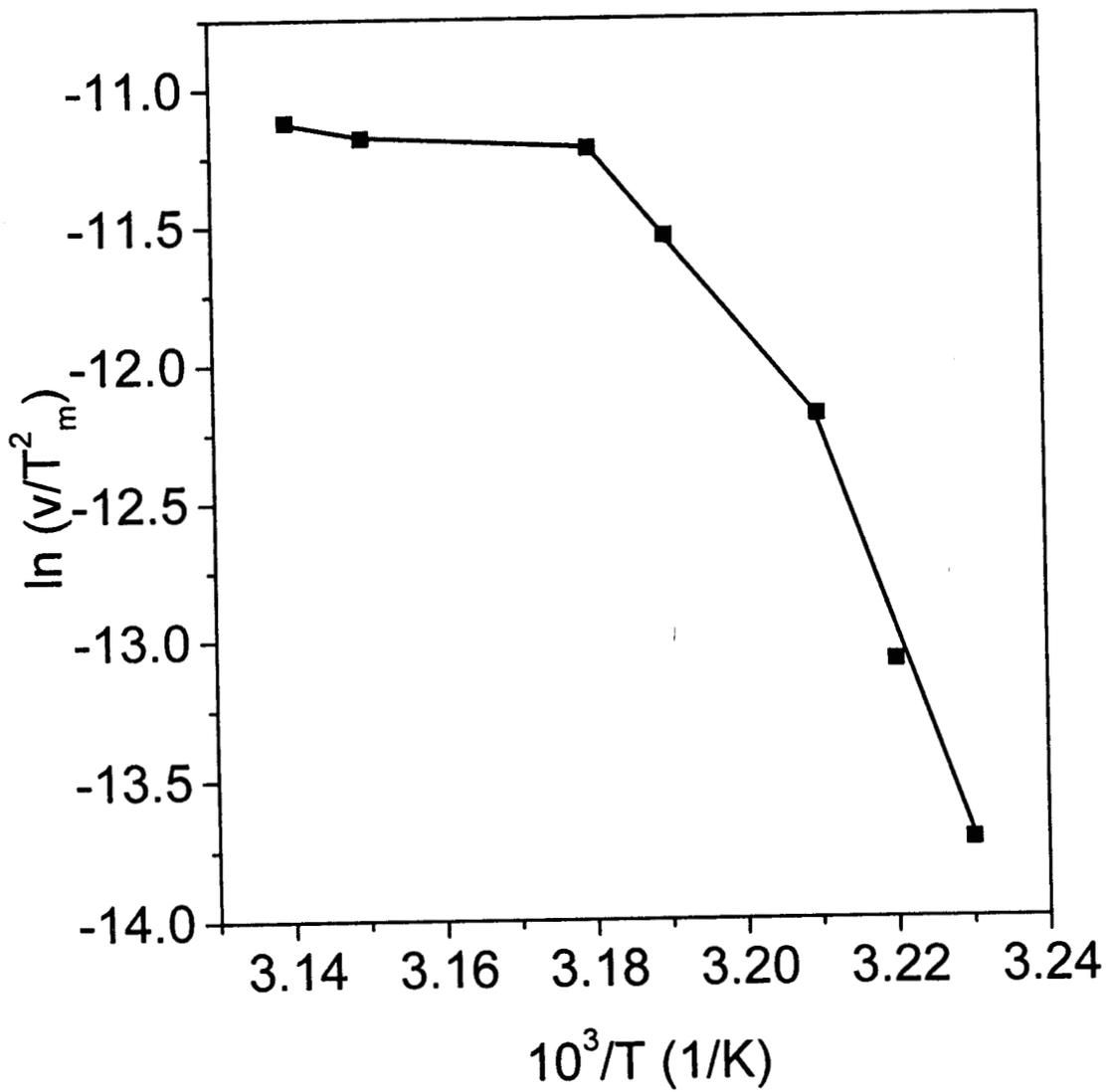


Figura 10

Gráfico de $\ln(v/T_m^2)$ versus $1/T_m$. Cada punto corresponde a cada una de las curvas de transición de la figura 8.

En contrapunto, utilizando el segundo método, ecuación 10 para calcular la energía de activación y haciendo un gráfico del logaritmo de la velocidad de barrido entre la temperatura media de la transición al cuadrado ($\ln v / T_m^2$) frente el inverso de la temperatura media de la transición ($1 / T_m$) se observó una apreciable curvatura (figura 10) lo que sugiere que la k_{ap} no es constante de velocidad de una reacción elemental.

Por lo tanto, se observó una discrepancia en los resultados de los diagramas para el cálculo de la energía de activación; el primer método, figura 9, indica que la desnaturalización térmica de la pepsina cumple con un modelo irreversible de dos estados, mientras que el segundo método, figura 10, no permite explicar la desnaturalización por dicho modelo.

Para explicar el comportamiento observado se considera que la desnaturalización térmica de la pepsina sigue un mecanismo de Lumry-Eyring (modelo III).



Donde K es la constante de equilibrio para la transición del estado nativo (N) al estado desdoblado (U), k es la constante de velocidad de primer orden, para la reacción del estado desdoblado (U) al estado desdoblado irreversiblemente (D), que varía con la temperatura según la ecuación de Arrhenius.

Estimación de la entalpía de van't Hoff aparente

Considerando un modelo irreversible de dos estados es posible calcular la entalpía de van't Hoff aparente ($\Delta H_{vH, ap}$) a partir de los datos de las curvas de transición a 230 nm. de la figura 8 y utilizando las ecuaciones 11 y 12. En la tabla II se reportan los valores obtenidos

de la entalpía de van't Hoff aparente a diferentes velocidades de calentamiento . Se obtiene un $\Delta H_{vH,ap}$ promedio de 344 ± 16 kJ/mol, el cual es del mismo orden que para otras proteasas ácidas⁵⁶.

Tabla II			
Entalpía de van `t Hoff aparente			
v (°C/min)	T_m (K)	T_m (°C)	$\Delta H_{vH, ap}$ (kJ/mol)
0.1	310.5	37.3	345
0.2	311.3	38.1	334
0.5	311.6	38.5	324
1.3	314.9	41.7	370
1.4	317.0	43.9	338
1.5	318.8	45.7	354

Tabla II

Se muestran los valores obtenidos de $\Delta H_{vH, ap}$ y las T_m para cada una de las distintas velocidades de calentamiento calculadas a partir de la ecuación 12 y la figura 8.

Estimación directa de la entalpía de van't Hoff (ΔH_{vH})

El análisis de los datos mostrados se basa en la suposición de que la desnaturalización térmica de la pepsina sigue un mecanismo de Lumry-Eyring. Además para poder sustentar todo lo anterior, se pudo demostrar experimentalmente la presencia de un estado desdoblado (U), el cual está en equilibrio con el estado nativo (N). Se observó que cuando la enzima se calentaba (a 1.0 °C/min) hasta una temperatura T' y se enfriaba súbitamente (aprox. 10 °C/min) hasta 25°C, la alteración en la señal de dicroísmo circular (elipticidad a 230 nm) es considerablemente reversible (figura 11). Además si los cambios de elipticidad son expresados como $f_{D,ap}$ y bajo la suposición que el estado N y el estado D muestran la misma elipticidad⁵⁵. Tenemos que $f_{D,ap} = f_D + f_U$ (f_U es la fracción de la proteína en el estado desdoblado U y f_D la fracción de proteína en el estado desnaturalizado irreversiblemente D). Por lo tanto, cuando se enfría la proteína desde una temperatura T' hasta 25°C la amplitud de la reversibilidad de la señal en f_D dará una estimación del valor de f_U a la temperatura T' .

La constante de equilibrio para la reacción reversible puede ser calculada a partir de:

$$K = \frac{f_U}{f_N} = \frac{f_U}{(1 - f_{D,ap})} \quad (14)$$

Para una serie de experimentos de enfriamiento rápido desde diferentes T' , en la región de la temperatura de transición, se determinaron los valores correspondientes de f_U . Entonces se calcularon las constantes de equilibrio a diferentes temperaturas (Tabla III) y se construyó un diagrama de van't Hoff (figura 12).

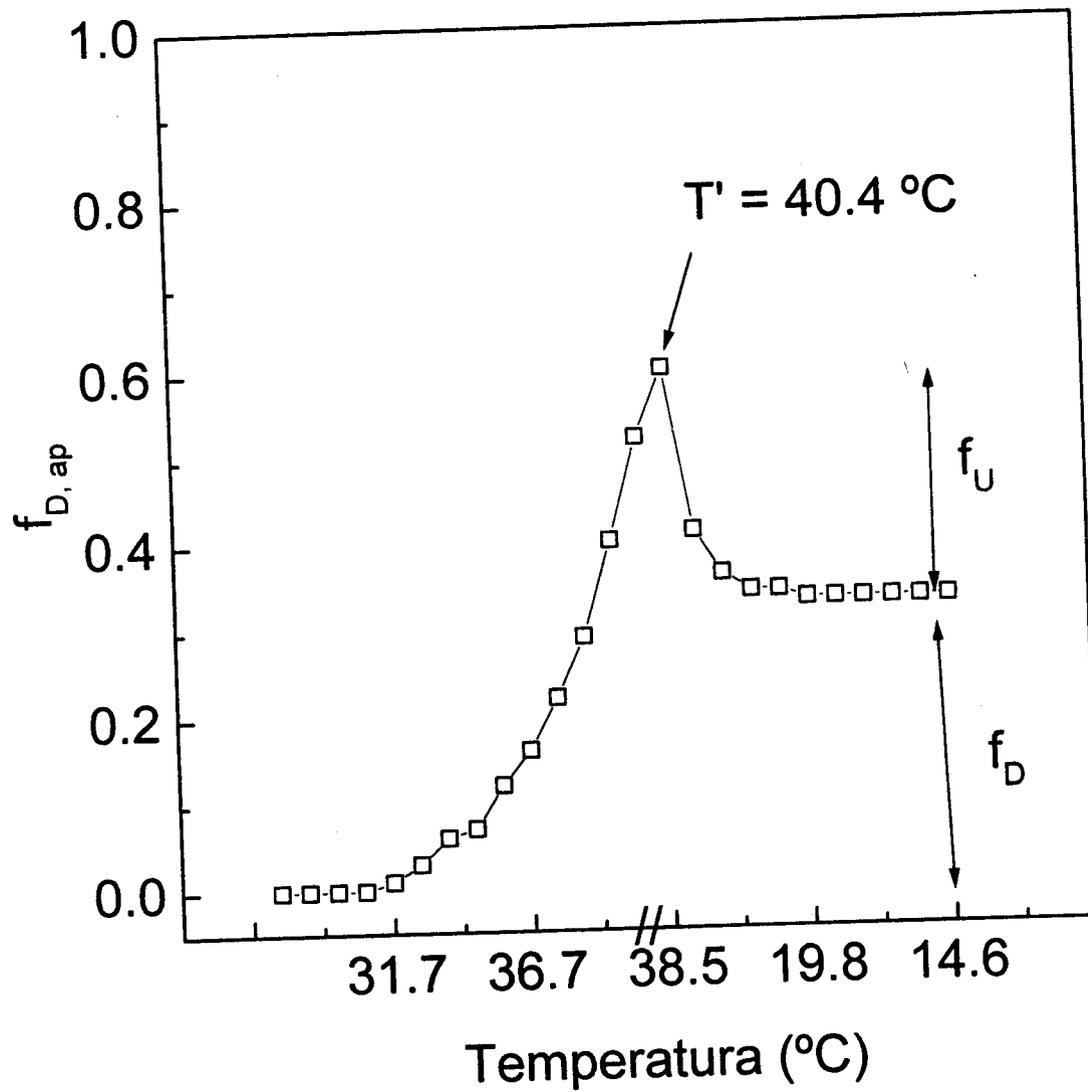


Figura 11

Reversibilidad parcial en la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v). El proceso fue monitoreado por el cambio en la elipticidad en la región del ultravioleta lejano a 230 nm. La velocidad de barrido fue de 1.0 °C/min. La velocidad de enfriamiento fue de 10 °C/min.

Tabla III		
Constantes de equilibrio para la reacción reversible.		
T(°C)	T (K)	K
35.6	308.75	0.259
37.3	310.45	0.523
39.2	312.35	0.903
40.4	313.55	1.130
42.2	315.35	3.750

Tabla III

Se muestran las constantes de equilibrio para la reacción reversible del modelo de Lumry-Eyring. Cada constante se calcula a partir de la ecuación 15 y experimentos como el mostrado en la figura 11.

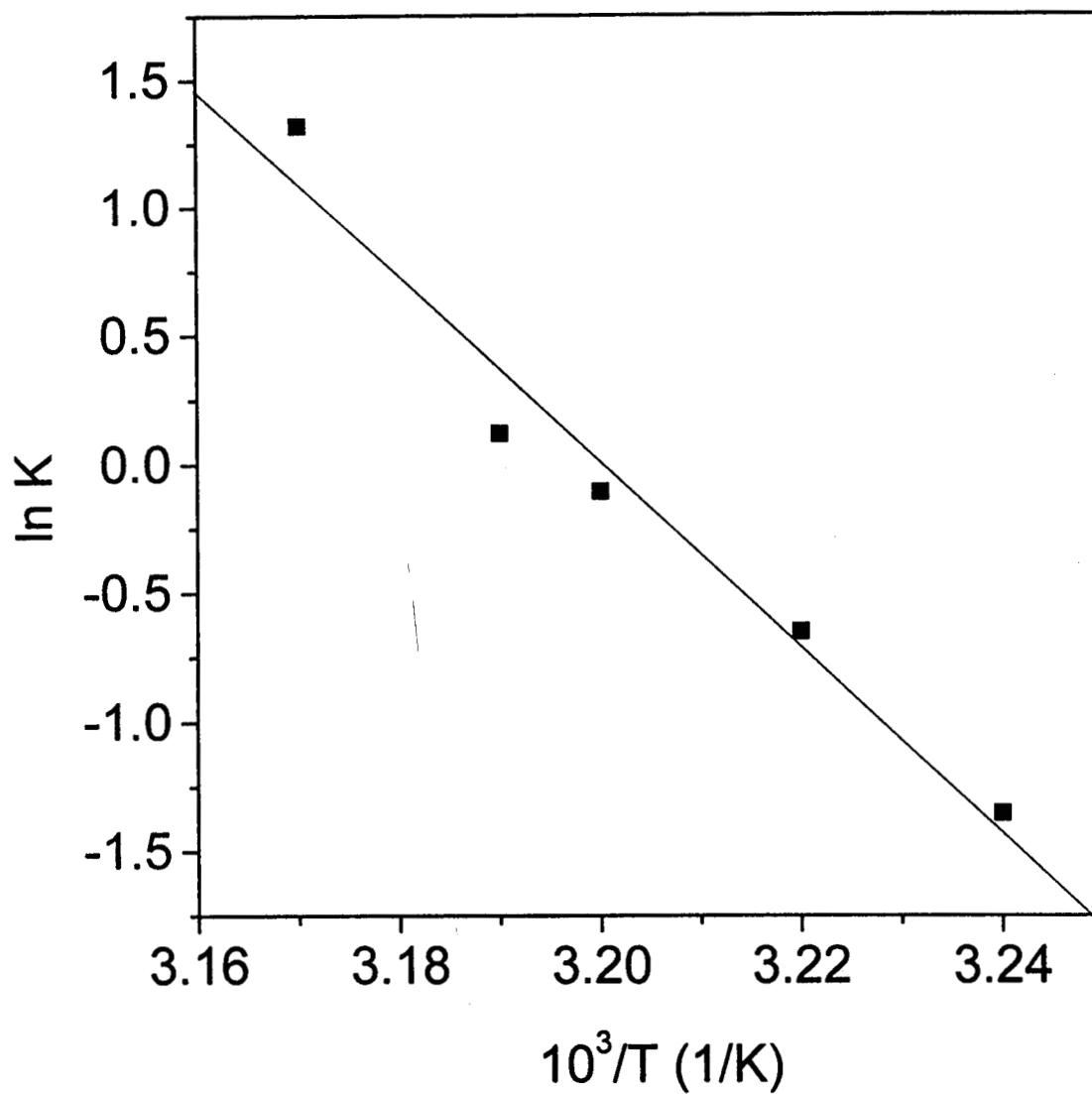


Figura 12
Gráfico de van't Hoff para el equilibrio $N \rightleftharpoons U$

De la cual se observó una línea recta con pendiente igual a $-\Delta H_{vH}/R$. La entalpía de van't Hoff para el equilibrio es de 304 kJ/mol que es del mismo orden que la obtenida por Makarov *et al.*⁵³ a pH 6.5 con 20 % de etanol de 309 kJ/mol (a partir de datos calorimétricos).

Curvas de transición a 220 nm:

Adicionalmente se realizaron curvas de transición seguidas, por el cambio en la elipticidad a 220 nm, se observó un cambio en el comportamiento de la curva con respecto a las curvas a 230 nm, ahora las curvas fueron bifásicas: la fase 1 de 20 a 45°C, lo que sugiere la presencia de un intermediario y la fase 2 de 45 a 60 °C (figura 13).

Para poder explicar la presencia de un intermediario de estos resultados se realizaron las curvas de calentamiento- enfriamiento seguidas por el cambio en la elipticidad a una longitud de onda de 220 nm (no se muestra la figura) se observó reversibilidad parcial en la fase 1, por lo que se propone la existencia de un intermediario estable entre 20 y 45°C. En la etapa 2, 45 a 60°C no se observó reversibilidad parcial.

Estudio del cambio en la estructura terciaria

También se estudió el cambio en la estructura terciaria en la región del ultravioleta cercano (250-330 nm), para esto se obtuvieron los espectros de dicroísmo circular en función de la temperatura usando una concentración de 0.711mg/ml de la proteína a pH de 6.2 (figura 14). Se observó pérdida de estructura terciaria a 75°C. Además no se observó reversibilidad en la señal de dicroísmo circular después de calentar a 75°C y enfriar a 25°C.

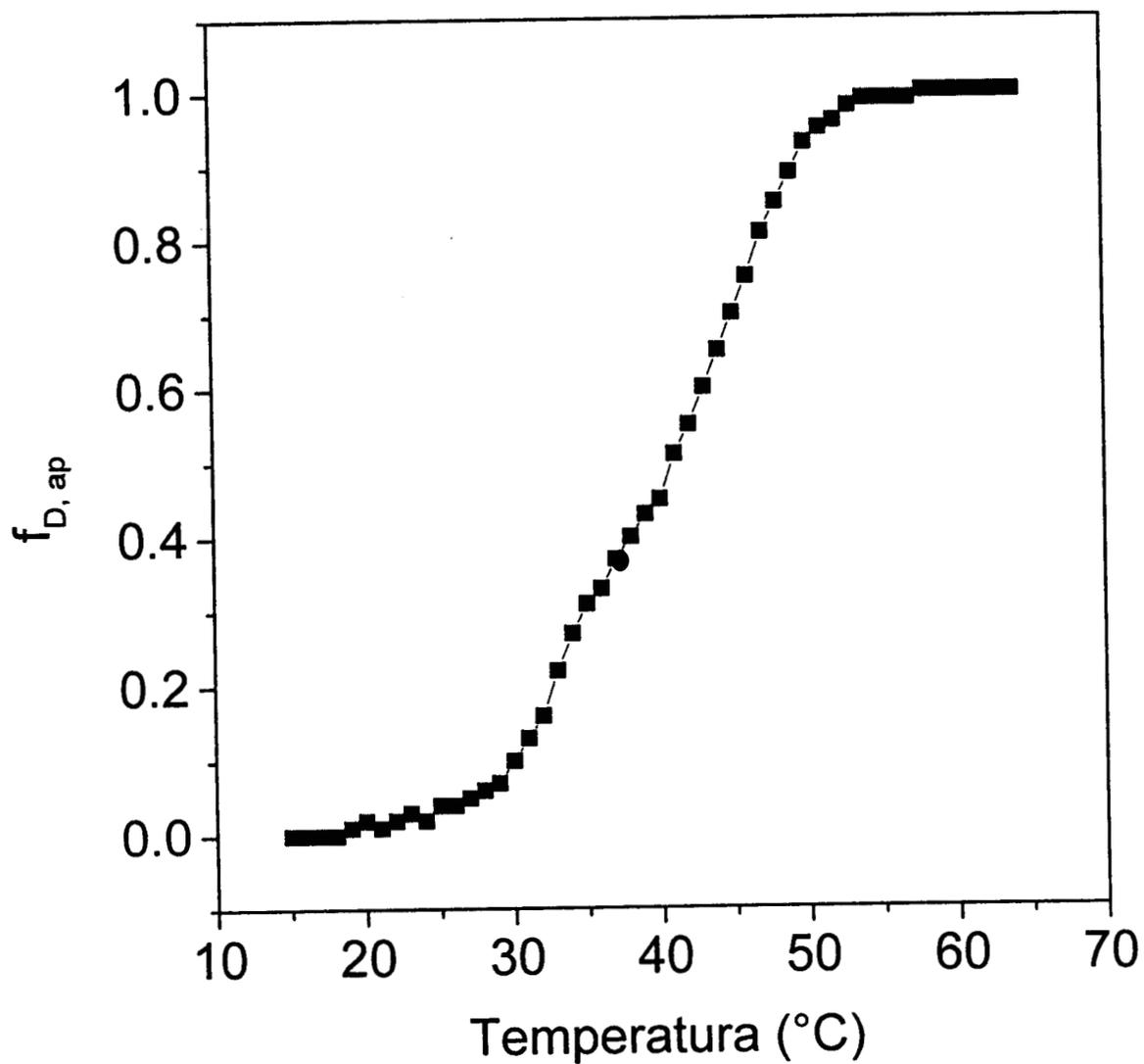


Figura 13

Curva de desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v) en función de la temperatura seguidas por monitoreo de la elipticidad a 220 nm y a una velocidad de barrido de 1.0 °C/min

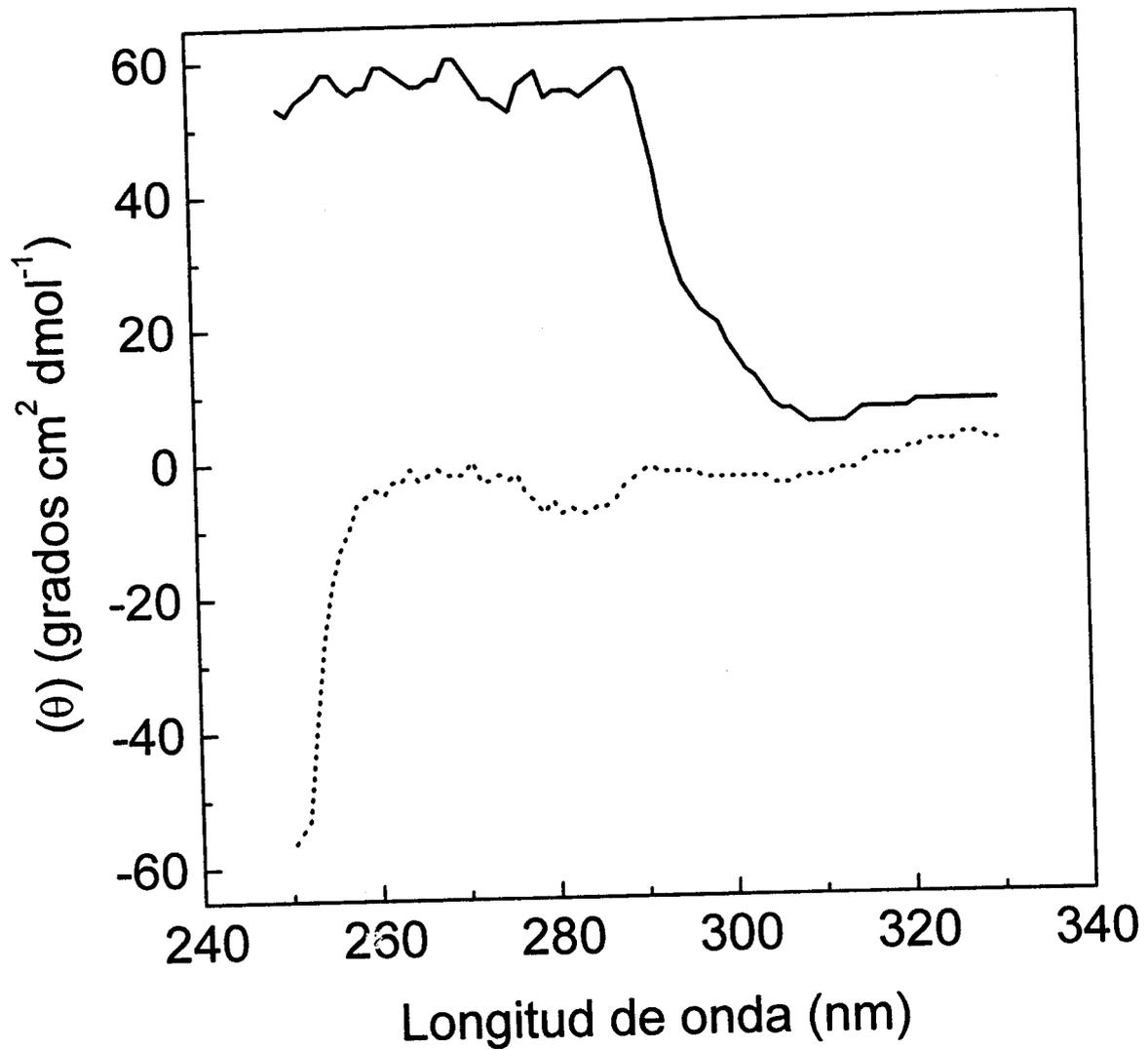


Figura 14

Espectro de dicroísmo circular de la pepsina de cerdo-etanol (10% m/v) en la región del ultravioleta cercano a 25 °C (—) y 72 °C (.....).

Curva de transición a 289 nm

Se estudió el cambio en la estructura terciaria monitoreando la elipticidad a 289 nm. Se observó nuevamente que la curva es bifásica: se tiene una primera etapa entre 20 y 45°C y una segunda etapa de 45°C a 75°C (figura 15).

En los estudios de calentamiento- enfriamiento a 289 nm se observó reversibilidad parcial en el intervalo de temperatura correspondiente a la etapa 1 de 20 a 45°C (figura 16). Mientras que en la etapa 2, de 45 a 70°C, no se observó reversibilidad parcial (figura 17). Además en la segunda etapa se observó agregación de la proteína.

A partir de las curvas de calentamiento-enfriamiento seguidas por el cambio en la elipticidad a diferentes longitudes de onda (230 nm, 220 nm y 289 nm), se concluye la presencia de un intermediario estable reversible (U) en la primera etapa de la desnaturalización térmica (20-45°C). Correspondiendo la segunda etapa a la desnaturalización irreversible del intermediario. Por lo tanto, la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo, una proteasa aspártica, cumple con un modelo de Lumry-Eyring. Este mecanismo ha sido observado por Tello-Solís *et al.* en la proteasa ácida de *Aspergillus Sato*⁵⁶.

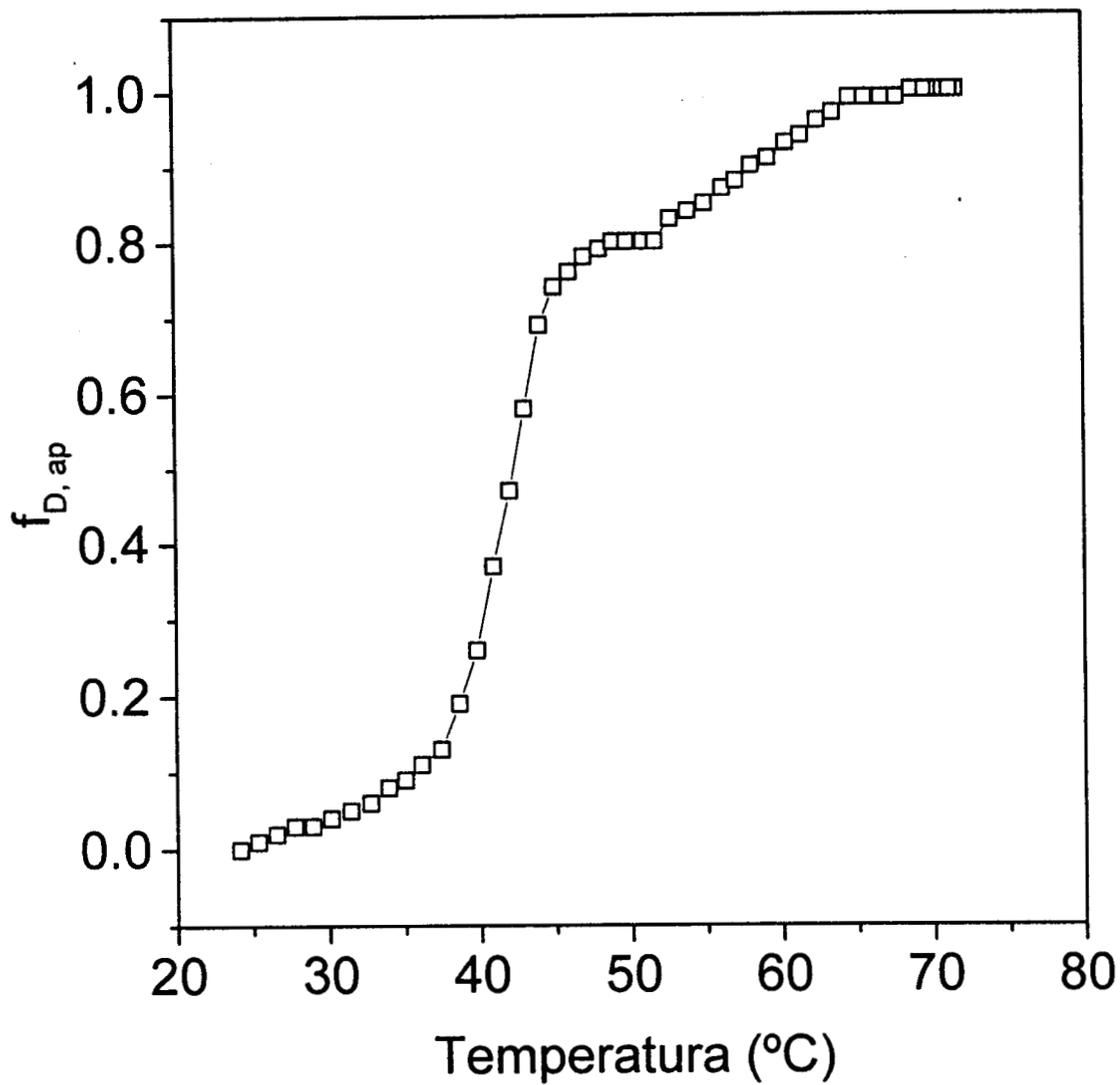


Figura 15

Curva de desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol 10%(m/V) seguidas por monitoreo de la elipticidad a 289 nm a una velocidad de barrido de 1.0°C/min.

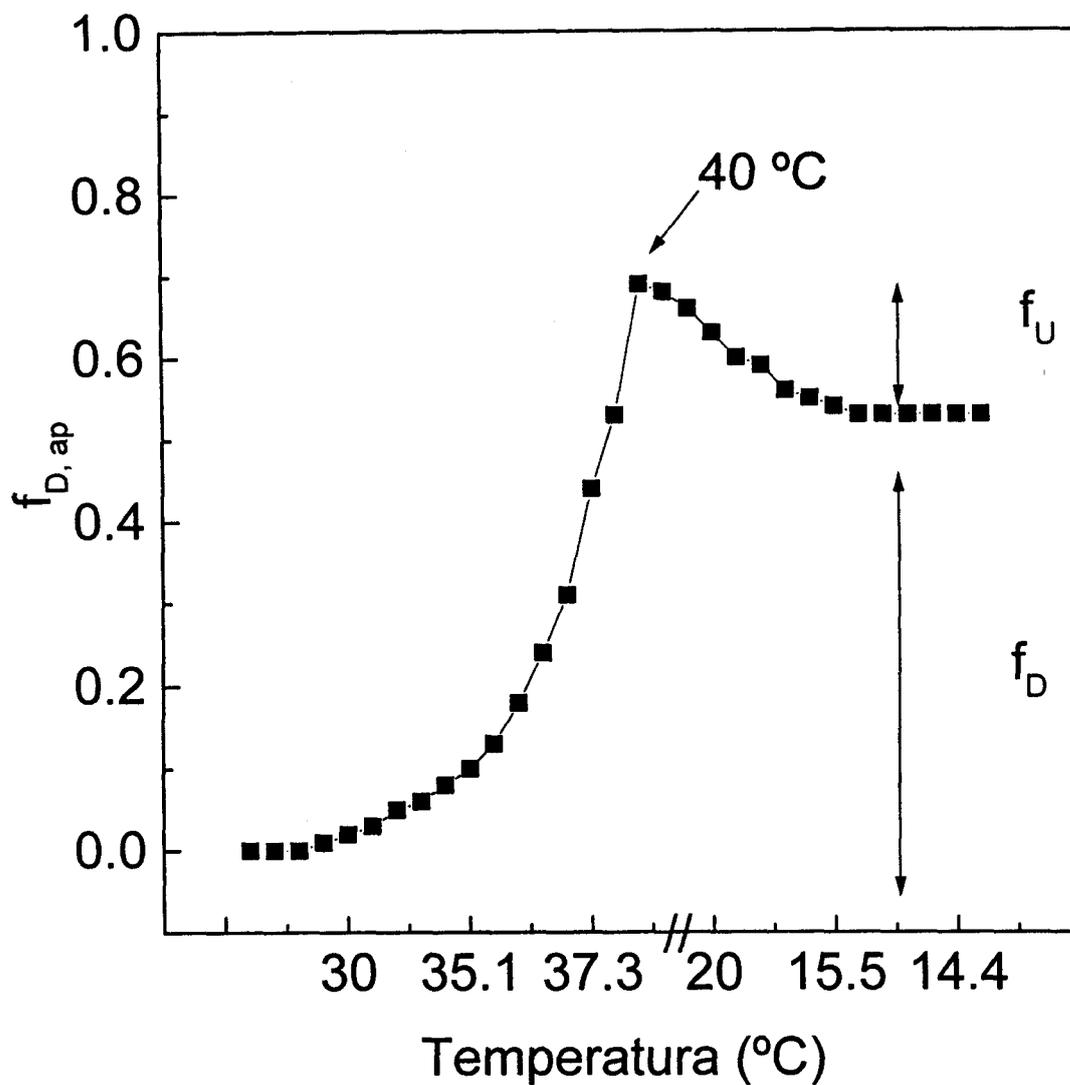


Figura 16
 Reversibilidad parcial en la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v). El proceso fue monitoreado por el cambio en la elipticidad en la región del ultravioleta lejano a 289 nm. La velocidad de barrido fue de 1.0 °C/min. La velocidad de enfriamiento fue de 10 °C/min.

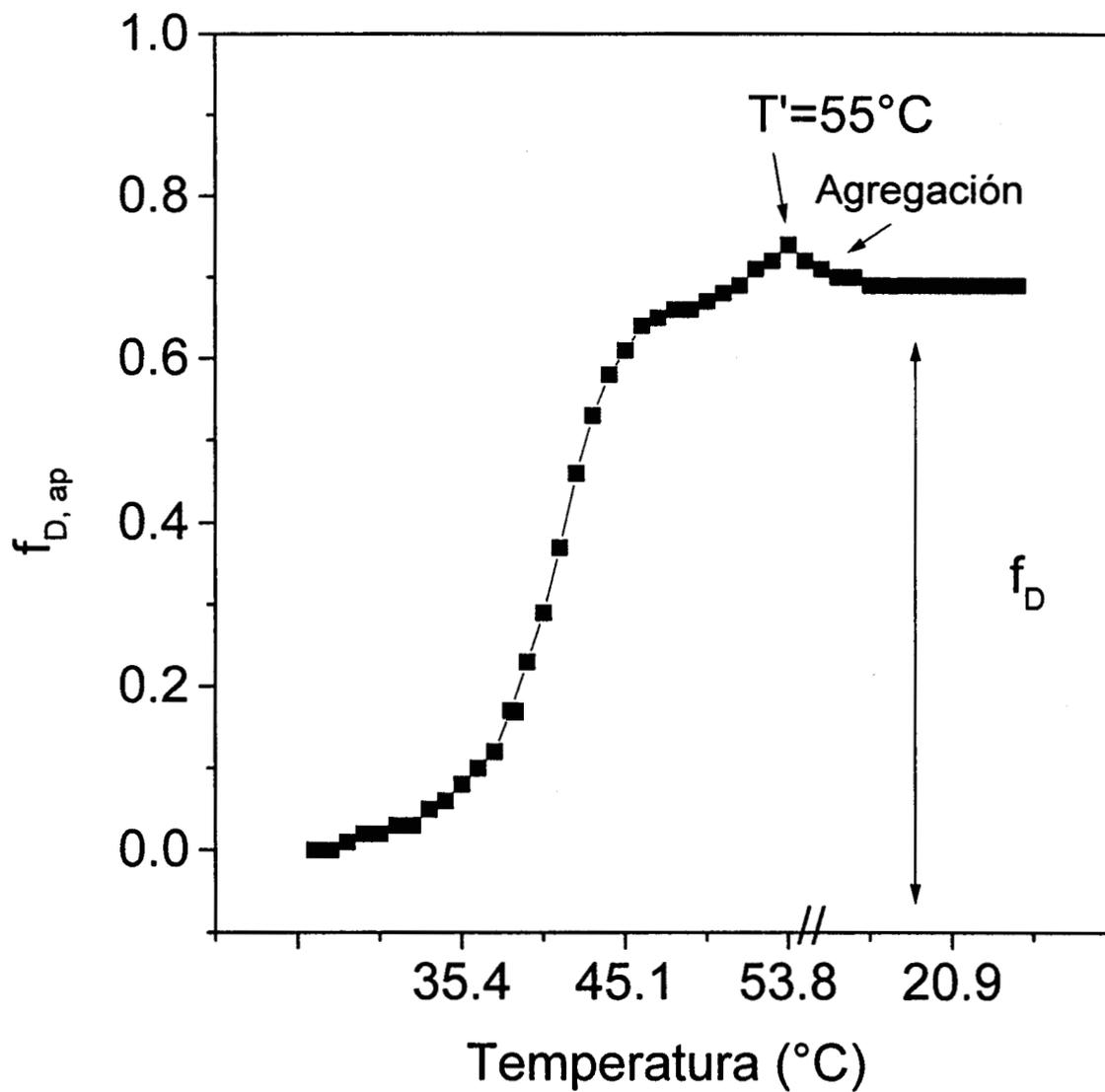


Figura 17

Fase irreversible de la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo-etanol (10 % m/v). El proceso fue monitoreado por el cambio en la elipticidad en la región del ultravioleta lejano a 289 nm. La velocidad de barrido es de 1.0 °C/min, en la cual se observó agregación de la proteína.

Capítulo 5

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones y perspectivas

- El proceso de la desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo cumple con un modelo irreversible de dos estados.
- Se detectó la presencia de un intermediario reversible estable (U) en la primera etapa (20-45°C). De la cual se pudo determinar la entalpía de van't Hoff para el equilibrio entre el estado nativo N y el estado desdoblado U.
- La desnaturalización térmica de la pepsina de cerdo cumple con un un modelo de Lumry- Eyring.
- Es necesario el estudio por separado de cada uno de los dominios estructurales de la pepsina para poder elucidar si el intermediario reversible detectado en este trabajo, corresponde al desplegamiento particular de alguno de dichos dominios.
- En investigaciones futuras es necesario realizar estudios cinéticos a la proteína para determinar que tan rápido se establece la reacción de equilibrio con respecto a la reacción irreversible.

Capítulo 6

Referencias y apéndices

Referencias

1. Lehninger, A., Nelson, D.L. y Cox, M.M., "*Principios de Bioquímica*", 2 ed., Ediciones Omega, España (1993)
2. Bohinski, R.C., "*Bioquímica*", Fondo Educativo Interamericano, México. (1978)
3. Whitaker, J.R., (1974) *Adv. Chemistry Series*, **136**, 186-201
4. Liener, I.E., (1974) *Adv. Chemistry Series* **136**, 202-219
5. Hofmann, T., (1974) *Adv. Chemistry Series* **136**, 146-185
6. Bernal, J. D., Clowfoot, D. C., (1934) *Nature (London)* **133**, 794
7. Sielecki, A.R., Fedorov, A.A., Boodhoo, A., Andreeva, N.S. y James, M.N.G. (1990) *J. Mol. Biol.* **214**, 143-170
8. Fruton, J. S., (1976) *Adv. Enzymol.* **44**, 1-36
9. Hartsuck, J. A. y Tang, J., (1972) *J. Biol.Chem.* **247**, 2575-2580
10. Rajagopalan, T.G., Stein, W.H. y Moore, S. J., (1966) *J. Biol Chem.* **241**, 4295-4297
11. Tang, J., (1973) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **70**, 3437-3439
12. Tang, J., (1976) *Trends Biochem. Sci.* **1**, 205-208
13. Umezawa, H. *et al.*, (1970) *J. Antibiotics*, **23**,259-262
14. Foltmann, B., Pedersen, V.B., Jacobsen, H., Kauffman, D. y Wybrandt G., (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **74**,2321-2324
15. Cunningham, A. *et al.*, (1976) *Can. J. Biochem.* **54**, 902-914
16. Gripon, J. C. , Rhee, S. H. y Hofmann, T., (1977) *Can. J. Biochem.* **55**, 504-506

17. Sepulveda, P., Jackson, K. W. y Tang, J., (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 1106-1112
18. Hsu, I.-N. , Delbaere, L.T.J. , James, M. N. G. y Hofmann, T., (1977) *Nature*, **266**, 140-145
19. Mains, G., Burchell, R. H. y Hofmann, T., (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **54**, 275-281
20. James, M. N. G. y Williams, G. J. B., (1974) *Acta Cryst.* B30, 1249-1257
21. Voynick, I. M. y Fruton, J. S., (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 257-259
22. Sampath-Kumar, P.S. y Fruton, J.S., (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **71**, 1070-1072
23. Subremanian, E., Swan, I.D.A. y Davies, D.R., (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **68**, 875-881
24. Bott, R., Subremanian, E. y Davies, D.R., (1982) *Biochemistry*, **21**, 6956-6962
25. Subramanian, E., (1978) *Trens Biochem. Sci.* **1**, 1-3.
26. Fuginaga, M., Chernaia, M.M., Tarasova, N.I., Mosimann, S.C., James, M.N.G., (1995) *Protein Science*, **4**, 960-972
27. Campbell, N. A., *Biology*, 4ª ed. , Benjamin Cummings Publishers (1996)
28. Boyer, P.D. (Ed.), *The Enzymes*, Vol. III, Academic Press, N.Y. 119-164p (1971)
29. Andreeva, N.S., Zdanor, A.S., Gustachina, A.E. y Fedorov, A.A., (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 11353-11365
30. Lehninger, A.L., "*Bioquímica*", 2ed., Ed. Omega, España (1985)
31. *Enzyme Handbook*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg , 1-7 (1991)
32. Michaelis, L. y Davidson, H., (1910) *Biochem. Z.*, **28**, 1-6

33. Agren, G. y Hammarsten, E., (1937) *Enzymologia*, **4**, 49-50
34. Edelhoch, H., (1957) *J. Am. Chem Soc.*, **79**, 6100
35. Perlmann, G.E., (1959) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **45**, 915
36. Perlmann, G.E., (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 153-157.
37. Tang, J., The 18th Linderstron-lang Conference on Aspartic Proteinases, P62, Elsinore, Denmark
38. Antonov, V.K., Ginodman, L.M., Rumsh, Y.V., Kapitannikov, Y.N., Yavashev, L.P., Gurova, A.G. y Volkova, L.I., (1981) *Eur. J. Biochem.* **117**, 195-200
39. Andreeva, N.S., (1975) *Biophys. Acta* **391**, 415-421
40. Andreeva, N.S., (1995) *Mol. Biol.*, **28** [6], 869-873
41. Subramanian, E., (1978) *Trens in Biochemical Sciences*, Jan 1-3.
42. Privalov, P.L., (1982) *Adv. Protein Chem.* **35**, 1-104
43. Creighton, T. E. *Proteins Structures and molecular properties*, 2 ed., Freeman and Company, New York., 287p. (1993)
44. Shirley, B.A., *Stability of protein pharmaceuticals*, part A. Tim J. Ahern y Mark C. Manning editores 167-194 (1992)
45. Privalov, P.L., (1979) *Adv. Protein Chem.* **33**, 197-241
46. Labhardt, A.M., (1982) *J. Mol.Biol.* **157**, 331-335
47. Pace, C. N. , (1990) *Trens in Biochem. Sci.* **15**, 14-17
48. Tanford, C., (1968) *Adv. Protein Chem.* **23**, 121-282
49. Hernández-Arana, A. y Soriano- García, M., (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **954**, 170-175
50. Edge, V., Allewel, N.M. y Sturtevant, J.M., (1985) *Biochemistry* **24**, 5899-5906

51. Boyer, F.A. (Ed), *The Enzymes*, IV, 2ed., Academic Press, 63-92 (1960)
52. Privalov, P.L. , Mateo, P.L. y Khechinasvili, N.N., (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 445-464
53. Makarov, A.A., Protasevich, I.I., Frank, E.G., Grishina, I.B., Bolotina, I.A. y Espova, N.G., (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1078**, 283-288
54. Nakatani, H., Hiromi, K., Satoi, S., Oda, K., Murao, S. e Ichishima, E., (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 415-421
55. Sánchez-Ruiz, J. M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y Mateo, L.P., (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652
56. Tello-Solís, S.R. y Hernández-Arana, A., (1995) *Biochemistry, J.* **311**, 969-974
57. Cantor, C.R. y Shimmel, P.R., *Biophysical Chemistry*, W.H freeman & Co. 3vol., 1084p (1980)
58. Lumry, R., Eyring, H., (1954) *J. Phys. Chem.* **58**, 110-120
59. Fasman, G.D. *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, Inc. 301-2 (1989)
60. Phast System, Separation Technique File No. 111 (1991) Pharmacia LKB Biotechnology
61. Phast System, Separation Technique File No. 121 (1991) Pharmacia LKB Biotechnology
62. Phast System, Development Technique file No. 200, (1991) Pharmacia LKB Biotechnology.
63. Northrop, J.H., (1946) *J. Gen. Physiol.*, **30**, 117-185
64. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C., (1982) *Anal. Biochem.* **125**, 177-188
65. Japan Spectroscopic Co., LTD. *Instruction manual* (1985), Tokyo, Japan.

66. Creighton, T.E., *Protein Structure*, I.R.L. Press, 282p. (1990)
67. Manavalan, P. y Johnson, C., (1983) *Nature*, **305**, 831-832
68. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C., (1981) *Biochemistry*, **20**, 1085-1094
69. Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L. y Sánchez-Ruiz, J., (1990) *Eur. J. Biochem.*, **188**, 181-185

Apendice A.

Método para calcular las constantes de equilibrio de la reacción reversible del mecanismo de Lumry-Eyring, a partir del cambio en la elipticidad en función de la temperatura.

Considerando un mecanismo del tipo Lumry-Eyring.



Para determinar la constante de equilibrio de la reacción reversible entre el estado nativo (N) y el estado desdoblado (U), se emplean las siguientes ecuaciones:

$$f_N + f_D + f_U = 1 \quad (A2)$$

$$f_{D, ap} = f_D + f_U \quad (A3)$$

$$f_N = 1 - f_{D, ap} \quad (A4)$$

$$K = \frac{f_U}{f_N} = \frac{f_U}{(1 - f_{D, ap})} \quad (A5)$$

A partir de los datos de las curvas de calentamiento-enfriamiento seguidas por dicroísmo circular podemos obtener los siguientes parámetros (Figura A).

1. $\Delta_{D, ap} = \theta_{D, ap} - \theta_N$ a una temperatura de 25 °C.
2. $\Delta_{T'} = \theta_{T'} - \theta_N$ a una temperatura T'
3. $\Delta_{D, final} = \theta_{D, final} - \theta_N$ a una temperatura de 25 °C.

Donde:

$\theta_{D, ap}$ = elipticidad de la proteína desnaturalizada aparente.

θ_N = elipticidad de la proteína nativa.

θ_T = elipticidad de la proteína a la temperatura T'

$\theta_{D, \text{final}}$ = elipticidad de la proteína desnaturalizada final.

Para obtener las fracciones de la proteína desnaturalizada aparente ($f_{D, \text{ap}}$), desdoblada (f_U) y desnaturalizada (f_D), utilizamos las siguientes relaciones:

$$f_{D, \text{ap}} = \frac{\Delta T'}{\Delta D, \text{ap}} \quad (\text{A6})$$

$$f_D = \frac{\Delta D, \text{final}}{\Delta D, \text{ap}} \quad (\text{A7})$$

y

$$f_U = f_{D, \text{ap}} - f_D \quad (\text{A8})$$

Sustituyendo los valores obtenidos de las ecuaciones A6, A7 y A8 en la ecuación A5 tenemos el valor de la constante de equilibrio a la temperatura T'.

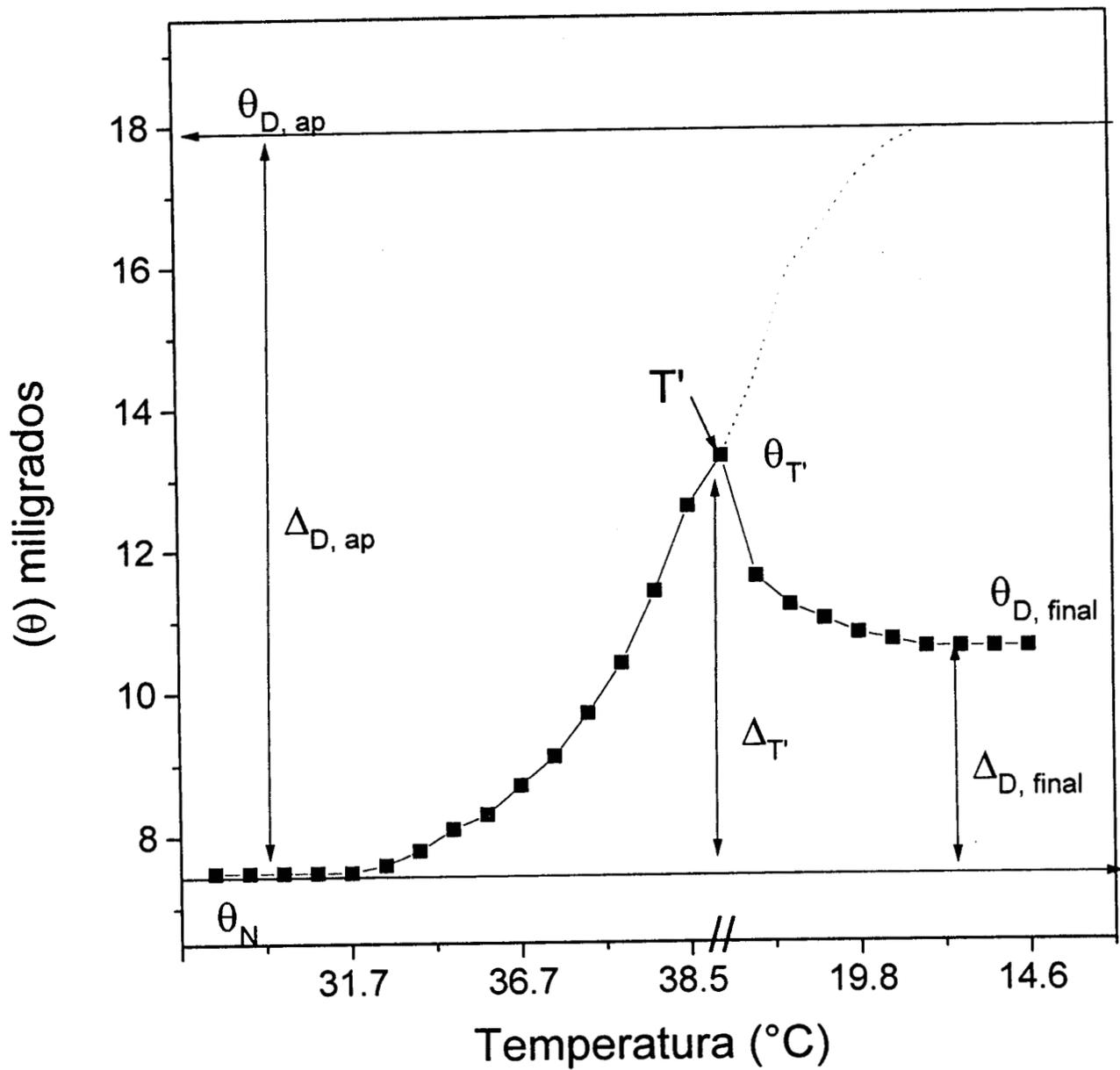


Figura A
 Curva de calentamiento-enfriamiento a T' , graficando elipticidad (θ) en función de la temperatura (T).