

RELACION ENTRE LA ESTABILIDAD TERMODINAMICA Y  
LA ESTRUCTURA DE LOS DOMINIOS DE LA PAPAINA

Tesis que presenta

ANDRES HERNANDEZ ARANA

Para la obtención del grado de Doctor en Ciencias

Junio de 1988.

**U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECAS**

DIVISION DE CIENCIAS BASICAS E INGENIERIA

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA - IZTAPALAPA

RELACION ENTRE LA ESTABILIDAD TERMODINAMICA  
Y LA ESTRUCTURA DE LOS DOMINIOS DE LA  
PAPAINA

ANDRES HERNANDEZ ARANA

JUNIO DE 1988

Esta tesis se realizó bajo la asesoría de los doctores Antonio Campero Celis, del Departamento de Química de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, y Manuel Soriano García, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

091019

## CONTENIDO

### CAPITULO 1

#### INTRODUCCION

|                                                 |   |
|-------------------------------------------------|---|
| 1.1 El fenómeno de plegamiento de las proteínas | 1 |
| 1.2 Características estructurales de la papaína | 6 |
| 1.3 Contribución de esta tesis                  | 8 |

### CAPITULO 2

#### PARTE EXPERIMENTAL

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| 2.1 Materiales                                         | 10 |
| 2.2 Hidrólisis de la papaína con enzimas proteolíticas | 11 |
| 2.3 Desnaturalización térmica de la papaína            | 12 |

### CAPITULO 3

#### RESULTADOS

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 Hidrólisis de la papaína por enzimas proteolíticas             | 17 |
| 3.2 Desnaturalización térmica de la papaína                        | 19 |
| 3.3 Parámetros termodinámicos de las transiciones<br>N — I e I — D | 39 |
| 3.4 Cálculo de la estabilidad termodinámica de los                 |    |

|                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| dominios de la papaina en base a las característi-<br>cas estructurales de esta proteína | 45 |
| 3.5 Transición térmica de la papaina en mezclas<br>agua-etanol                           | 56 |
| <br><b>CAPITULO 4</b>                                                                    |    |
| <b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>                                                          | 64 |
| <b>REFERENCIAS</b>                                                                       | 69 |

## CAPITULO 1

## INTRODUCCION

## 1.1 El fenómeno de plegamiento de las proteínas.

Dentro del complejo proceso que es la biosíntesis de una proteína, los últimos eventos de éste son, quizá, aquellos que se conocen con menos profundidad. Estos eventos finales, llamados postranslacionales, conducen a la formación de una estructura molecular muy especial, la cual es capaz de manifestar una actividad biológica particular. El material de partida en los cambios postranslacionales es una cadena polipeptídica, o un segmento de la misma, la cual adquiere una conformación especial (nativa) a través de un proceso que puede llamarse plegamiento o doblado de la proteína ("protein folding"). Actualmente se acepta que este proceso es espontáneo, al menos bajo ciertas condiciones de temperatura, pH, concentración, etc. [1]; esto implica que en tales condiciones el estado nativo de la proteína es más estable que el estado aleatorio o desplegado. Las interacciones o "fuerzas" no-covalentes que contribuyen a la estabilidad de la estructura nativa son [2]: los puentes de hidrógeno; el fenómeno conocido como efecto hidrofóbico; las interacciones electrostáticas; las

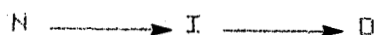
fuerzas de dispersión. Las dos primeras de estas clases han sido señaladas como las que contribuyen en mayor grado a la estabilidad de la estructura nativa [3,4]. Es importante mencionar que el disolvente juega un papel relevante ya que determina la magnitud de las fuerzas no-covalentes, especialmente en el efecto hidrofóbico que es un fenómeno debido primordialmente a factores entrópicos en el medio acuoso [2].

Cuando se alteran las condiciones en las cuales el estado nativo de una proteína es estable, se produce el fenómeno de desnaturalización de la macromolécula. Esto puede lograrse cambiando la temperatura o el pH del medio, o bien variando las propiedades del disolvente acuoso mediante la adición de algunos solutos orgánicos e inorgánicos. El proceso de desnaturalización puede estudiarse observando los cambios que ocurren en diversas propiedades de la proteína, por ejemplo: actividad biológica, características espectroscópicas, viscosidad, etc. [5]. En los casos de varias proteínas globulares de bajo peso molecular ( $< 25\ 000$ ) la desnaturalización inducida por aumento de la temperatura o por concentraciones crecientes de guanidina, ha sido caracterizada como un proceso de dos estados [6]; es decir, en condiciones de equilibrio solamente existen en concentración apreciable el estado nativo (N) y el desnaturalizado (D):



En tal situación, la curva de transición obtenida al seguir el cambio de alguna propiedad de la proteína es de tipo sigmoidal, y monofásica, es decir, sin escalones o mesetas entre el valor inicial y el valor final del parámetro observado; además, las curvas correspondientes a distintas propiedades son coincidentes. Estos dos criterios son esenciales para postular un mecanismo de dos estados [7]. Si la desnaturalización se produce térmicamente, existe una prueba calorimétrica que se considera definitiva para descartar la presencia de estados intermedarios en la transición; dicha prueba consiste en: comparar el cambio de entalpía que acompaña a la desnaturalización ( $\Delta H^0$ ), medido directamente por calorimetría diferencial de barrido, con el valor calculado a partir de la curva de transición de alguna propiedad de la proteína [8]. Si estos dos valores son iguales, dentro del error experimental, la transición involucra únicamente dos estados estables [3,8]. Algunas proteínas que han sido ampliamente estudiadas y que se apegan a un mecanismo de desnaturalización de dos estados son las siguientes: lisozima [9,10],  $\alpha$ -quimotripsina y su zimógeno [11,12], ribonucleasa [13,14], mioglobina [11], y citocromo c [11].

Por otra parte, algunas proteínas siguen un modelo de desnaturalización en el que se presenta al menos un intermedario estable (I):



( 1.2 )

Por ejemplo, en la desnaturalización por guanidina de la anhidrasa carbónica [15], la  $\alpha$ -lactalbúmina [16], y la penicilínasa [17], se ha encontrado un estado intermedio con estructura secundaria semejante a la de la forma nativa, pero cuya estructura terciaria está prácticamente destruida. Kim y Baldwin [6] han llamado a éste el modelo de armazón ("framework"), y han sugerido que se presenta en proteínas cuya estructura terciaria es poco estable. Es conveniente señalar en este punto que aunque un intermedio exista en condiciones de equilibrio, su participación como una etapa obligatoria del proceso de plegamiento de la molécula debe ser demostrada mediante estudios cinéticos del fenómeno. Análogamente, la ausencia de intermediarios en condiciones de equilibrio no implica que no existan éstos en el proceso cinético.

Un comportamiento diferente ha sido detectado en otras proteínas como la subunidad  $\alpha$  de la triptofano sintasa [18], la fosforilasa b [19], y el ovomucoide [20]; en estos casos, partes diferentes de la proteína parecen seguir reacciones de desnaturalización independientes y secuenciales, esto es, los cambios en la estructura secundaria dan lugar a una curva bifásica. Ya que las tres proteínas mencionadas están formadas por dominios estructurales diferentes, el comportamiento observado en la desnaturalización indica que los "módulos independientes" muy probablemente corresponden a los dominios

de las proteínas [6]. Sin embargo, otras proteínas como la elastasa y la quimotripsina, cuya estructura molecular muestra dos dominios, presentan curvas que se adaptan a un modelo de dos estados, con ausencia de intermediarios bajo condiciones de equilibrio [11,21].

El que un dominio estructural es una entidad capaz de doblarse y desdoblarse en forma independiente del resto de la molécula, es un hecho que ha sido demostrado fehacientemente en estudios realizados con la termolisina. Vita y colaboradores [22] han aislado el segundo dominio de esta enzima, demostrando que es capaz de renaturalizarse para adquirir una estructura muy semejante a la que tiene cuando forma parte de la molécula intacta. Observaciones similares han sido descritas para el fragmento terminal (residuos 109-214) de la cadena ligera de una inmunoglobulina [23], y también para los dominios de la elastasa [24].

Una cuestión que no ha sido resuelta hasta la fecha es la relacionada con la existencia de fragmentos, de tamaño inferior al de un dominio (menos de 100 residuos), que puedan formar estructuras estables al encontrarse aisladas del resto de la proteína [25]. Este aspecto tiene un interés especial ya que tales fragmentos podrían servir como centros de nucleación en el proceso de doblado de una cadena polipeptídica [26]. Kim y Baldwin [6], basándose en la evidencia experimental de proteínas que siguen un modelo de armazón, así como en los resultados de varios estudios cinéticos, han propuesto que

ciertas formas de estructura secundaria ( hélices u hojas  $\beta$  ) pueden ser las iniciadoras de dicho proceso. Por otra parte, se ha sugerido que en las proteínas desnaturalizadas térmicamente existen estructuras residuales, aún no caracterizadas, que posiblemente cumplan la misma función [26].

Es previsible que las investigaciones realizadas dentro del campo de la estabilidad y de los mecanismos de plegamiento de las proteínas, junto con los avances en el aspecto de la predicción estructural de estas macromoléculas, tendrán una gran importancia en la elucidación del llamado "código de plegamiento", por medio del cual la secuencia de aminoácidos especifica la estructura tridimensional de una proteína.

## 1.2 Características estructurales de la papaína.

El presente trabajo fue realizado como una contribución al conocimiento del fenómeno de doblado de las proteínas, a través del estudio de la desnaturalización y la estabilidad de la papaína. Esta enzima es una proteasa cisteínica que se encuentra en el látex del fruto de la papaya ( Carica papaya ) [27]. Su estructura molecular ( figura 1.1 ), que ha sido determinada por difracción de rayos X, muestra dos dominios de un poco más de 100 residuos cada uno, plegados sobre núcleos hidrofóbicos independientes [28-30]. Los dominios se encuentran separados por una hendidura en la que se sitúan los residuos responsables tanto de la actividad catalítica como de la unión con el sustrato. El primer dominio, formado por los residuos

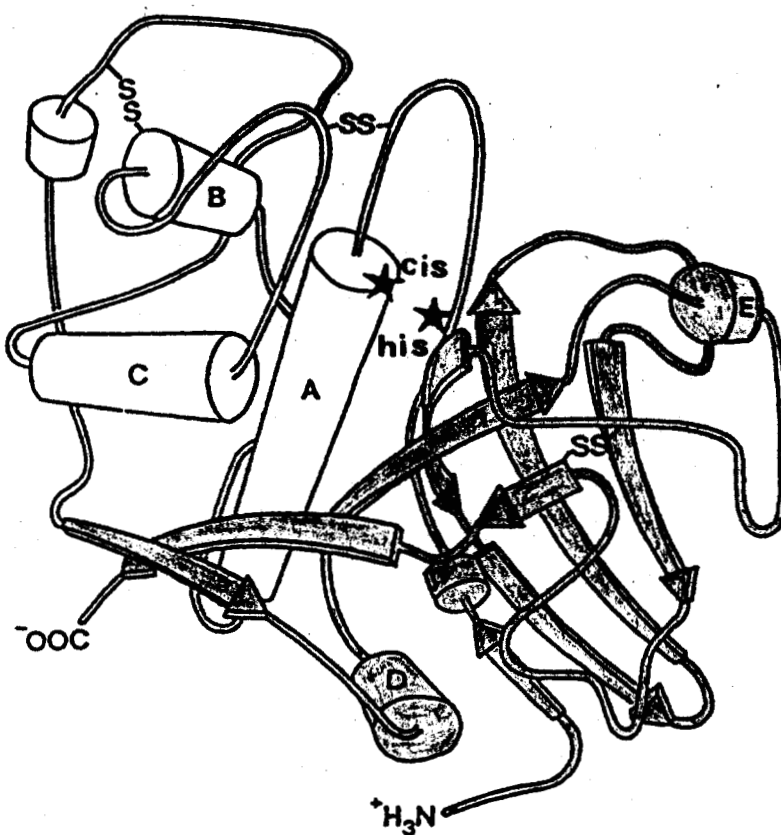


Figura 1.1. Diagrama esquemático de la estructura de la papaina ( tomado de la referencia [30] ). Los cilindros y las flechas representan hélices y hojas  $\beta$ , respectivamente. La parte sombreada corresponde al segundo dominio de la molécula. Las estrellas señalan las posiciones de los residuos de cisteína e histidina que forman el sitio catalítico.

10-111 y 208-212, contiene varios segmentos de hélice  $\alpha$ , pero ningún tipo de hoja  $\beta$ . En contraste, el segundo dominio (residuos 1-9 y 112-207) muestra un extenso patrón de hoja  $\beta$  antiparalela y únicamente dos pequeños fragmentos helicoidales.

Tiktopulo y Privalov [31] han estudiado la desnaturalización térmica de la papaína por medio de la calorimetría diferencial de barrido. Estos autores determinaron el cociente del cambio de entalpía calorimétrica entre el cambio de entalpía calculado bajo la suposición de un proceso de dos estados. El valor que obtuvieron, muy cercano a dos, indica que el desdoblamiento de la proteína consta de dos etapas. Aún más, los autores del trabajo han sugerido que cada etapa corresponde al desdoblamiento de un dominio de la molécula. Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia de que la curva de desnaturalización de la papaína sea bifásica, como sería de esperarse; de hecho, en el único trabajo al respecto, Hill et al. [32] encontraron un comportamiento de tipo monofásico al seguir los cambios en la rotación óptica inducidos por concentraciones crecientes de guanidina.

### 1.3 Contribución de esta tesis.

Con el fin de estudiar la capacidad de plegamiento independiente y la estabilidad de los dos dominios de la papaína, se plantearon dos estrategias a seguir. En primer lugar, se trató de separar los dominios mediante el uso de enzimas proteolíticas. Desafortunadamente, los intentos de

obtener en forma aislada estas dos partes de la proteína fueron infructuosos, ya que el fragmento de mayor tamaño producido por hidrólisis enzimática tuvo un peso molecular de 8000. En segundo término, estudiamos la desnaturalización térmica de la papaína por medio de diferentes técnicas: dicroísmo circular, espectroscopia de absorción diferencial, pérdida de la actividad enzimática, y susceptibilidad a la hidrólisis por la pepsina. Los resultados de estos estudios indican que en el proceso de desnaturalización se forma un intermediario con estructura estable, globular, y compacta. La estructura secundaria del intermediario es muy semejante a la del segundo dominio en la proteína nativa, lo cual sugiere que esta parte de la molécula es más estable que el primer dominio. Bajo la suposición de procesos independientes para el desdoblamiento de los dos dominios, se calculó la estabilidad termodinámica de los mismos ( cambio en la energía libre de Gibbs para el proceso  $N \longrightarrow D$  ); estos valores experimentales se compararon con aquellos calculados a partir de las características estructurales de la papaína.

## CAPITULO 2

### PARTE EXPERIMENTAL

#### 2.1 Materiales.

La papaína usada en este trabajo fue una preparación doblemente cristalizada, obtenida de la compañía Sigma Chemical, San Luis Mo., E.U.A. La homogeneidad e integridad de esta muestra se probaron utilizando las técnicas de electroforesis y filtración en gel en condiciones desnaturalizantes. En la electroforesis en gel de poliacrilamida al 10 % se observó una sola banda de material proteico. Un resultado igual se obtuvo al examinar el comportamiento electroforético de la papaína en presencia de dodecil sulfato de sodio [33]; el peso molecular calculado a partir de este experimento fue de 24000. La filtración en gel se llevó a cabo en presencia de guanidina 6M, de acuerdo al método descrito por Fish et al. [34]. El perfil de elución de la papaína, determinado por absorción de luz de 280 nm, mostró un solo pico correspondiente a un peso molecular de 22800. En ambas determinaciones se usó una muestra de papaína cuyo grupo tiol del sitio activo había sido bloqueado previamente con iodoacetamida [27]. Los dos valores de peso molecular que

encontramos para la preparación de papaína concuerdan bien con el valor aceptado que es 23350 [28].

En todos los experimentos realizados la concentración de la papaína se determinó espectrofotométricamente, usando para ello un valor de 25 para el coeficiente de absorción específica (  $A_{1\text{ cm}, 1\%}$  ) a 278 nm [35].

Todas las sustancias químicas utilizadas fueron grado analítico, y se obtuvieron de Sigma Chemical o de Merck, México. El agua empleada fue primeramente destilada y después desionizada en un sistema Milli-Q de Millipore Co.

## 2.2 Hidrólisis de la papaína con enzimas proteolíticas.

Se hicieron pruebas de proteólisis con la tripsina y la pepsina. Se probaron concentraciones molares relativas papaína:enzima entre los límites 50:1 y 200:1. Los experimentos con tripsina se efectuaron en regulador de TRIS (2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol) 0.1 M, pH 8.0. En el caso de la pepsina se usó un regulador de glicina 0.1 M, pH 2.6. En ambos casos se ensayaron diferentes temperaturas y tiempos de reacción.

El análisis de los productos de la proteólisis se llevó a cabo usando una columna de filtración en gel TSK-2000 SW, instalada en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Varian 5020 B. A las muestras por analizar se les añadió guanidina en cantidad suficiente para alcanzar una concentración 6 M. Diez microlitros de muestra ( concentración aproximada de proteína de 1 mg/ml ) se inyectaron en la columna y fueron

eluidos con una solución acuosa de guanidina 6 M a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min. El material proteínico presente en el efluente se detectó midiendo la absorbancia a 280 nm. Bajo las condiciones empleadas en la cromatografía, se comprobó que los límites de fraccionamiento de la columna, para cadenas polipeptídicas aleatorias, iban más allá del intervalo comprendido entre los 6000 y los 30000 daltones.

### 2.3 Desnaturalización térmica de la papaína.

Preparación de las muestras. A fin de evitar la posibilidad de autohidrólisis, los estudios se llevaron a cabo en un pH de 2.6 ya que se sabe que la papaína es inactiva en valores de pH inferiores a 3 [36]. Las muestras se prepararon disolviendo esta proteína en regulador de glicina 0.03 M, pH 2.60, y posteriormente se dializaron contra el mismo regulador durante 24 horas a 4 °C. Después de la diálisis las muestras se diluyeron para alcanzar la concentración deseada según el tipo de estudio; se comprobó en todos los casos que el valor de pH no se desviara más de 3 centésimas de unidad del valor inicial del regulador. En aquellos experimentos en los que se usó etanol, el pH aparente de la solución final se ajustó a 2.60 mediante la adición de HCl (0.1 o 1.0 N ).

Dicroísmo circular (DC) . Estos estudios se hicieron en un espectropolarímetro JASCO modelo J-500 A, calibrado con una solución acuosa del ácido (+)-10-canforsulfónico [37]; la

calibración se corroboró usando la sal de amonio de dicho ácido, según las especificaciones del fabricante del equipo. En la región del ultravioleta lejano (longitud de onda menor de 250 nm) se usaron soluciones de papaina con concentración entre 0.03 y 0.10 mg/ml, y celdas de 0.1 o de 1.0 cm de recorrido luminoso. En la región del ultravioleta cercano ( 250-320 nm ) se empleó la celda de 1.0 cm con una solución de 0.55 mg/ml de la proteína. Un portaceldas con chaqueta para circulación de agua y un baño de circulación externa Haake A-80 fueron usados para controlar la temperatura de la celda a  $\pm 0.2$  °C del valor deseado. La temperatura real dentro de la celda se midió con un termistor conectado a un termómetro digital. A cada temperatura seleccionada para estos estudios, la muestra se incubó durante 30 min; después de este tiempo no se observaron ya cambios en la señal de DC y se registró entonces el espectro de la muestra. La velocidad de calentamiento de la muestra fue aproximadamente de 0.5 °C/min. Todos los espectros se obtuvieron usando una anchura de banda espectral de 1 nm.

Debido a la gran absorbancia del grupo carboxilo de la glicina no fue posible obtener datos a longitudes de onda inferiores a 197 nm; en todos los barridos espectrales el voltaje dinódico del fotomultiplicador no excedió nunca los 900 voltios.

Los grados de elipticidad,  $\theta$ , obtenidos del aparato se transformaron a elipticidad por residuo medio,  $[\theta]$ , de acuerdo a la relación siguiente [38]:

$$[\theta] = \frac{(\theta)(M_r)(100)}{(l)(c)}$$

donde  $M_r$  es el peso molecular promedio por residuo de aminoácido, que para la papaína es igual a 110 [28];  $l$  es la longitud de recorrido luminoso en la muestra, expresada en cm, y  $c$  es la concentración de proteína en g/l. Las unidades resultantes para  $[\theta]$  son grados  $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ .

Espectroscopia de absorción diferencial. Se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Varian DMS-80, equipado con un registrador cuya escala completa era igual a 0.02 unidades de absorbancia. Volúmenes iguales de una solución de papaína ( 0.06 mg/ml ) se colocaron en dos celdas igualadas de 1 cm de recorrido luminoso. La celda de referencia se mantuvo constantemente a una temperatura de 11 °C mediante circulación de agua a través del portaceldas correspondiente; por otra parte, la temperatura de la celda de muestra se incrementó gradualmente hasta alcanzar valores previamente seleccionados. El calentamiento y la incubación de la muestra se hicieron de la misma manera descrita en la sección anterior. La señal detectada en el registrador fue entonces igual a la absorbancia de la solución de papaína a una temperatura dada, menos la absorbancia de la misma solución a 11 °C. Los espectros así obtenidos son expresados como absorción molar diferencial,  $\Delta\epsilon$ , en unidades  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

Actividad proteolítica residual. Muestras de papaína ( 0.25 mg/ml, en regulador de glicina 0.03 M, pH 2.6 ) se incubaron

durante 30 min a diferentes temperaturas. Después de este tiempo, 0.2 ml de la solución de papaína fueron añadidos a 0.7 ml de regulador de fosfatos 0.15 M, pH 7.5, conteniendo cisteína 0.1 M y EDTA 1 mM; la activación de la papaína se dejó proceder durante 10 min a 35 °C. Se agregó entonces 1.0 ml de caseína al 1 % ( p/v ) disuelta en el mismo regulador de fosfatos, y se dejó actuar a la papaína durante 10 min a 35 °C. La reacción fue detenida añadiendo 3 ml de ácido tricloroacético al 5 % (p/v). La mezcla de reacción se centrifugó a 2000 g durante 20 min, y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 280 nm usando como blanco un experimento testigo preparado sin la enzima. El valor de absorbancia así determinado es proporcional a la cantidad de aminoácidos aromáticos liberados durante la hidrólisis del sustrato, y proporciona una medida de la actividad proteolítica de la enzima; se define una unidad de actividad como el incremento de una unidad de absorbancia por minuto, bajo las condiciones de ensayo antes mencionadas [39].

Susceptibilidad a la hidrólisis por pepsina. La reacción de hidrólisis de la papaína, catalizada por la pepsina, se llevó a cabo a varias temperaturas, en un medio regulado por glicina 0.1 M, pH 2.6. A 0.35 ml de una solución de papaína ( 0.75 mg/ml ), previamente incubada a la temperatura seleccionada durante 25 min, se les añadieron 0.025 ml de una solución de pepsina ( 0.6 mg/ml ). Después de un tiempo determinado, la reacción fue detenida agregando 1 ml de ácido tricloroacético al 5 % ( p/v ).

La mezcla anterior se centrifugó a 2000 g y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 278 nm, con un blanco preparado sin pepsina. Se realizaron experimentos a diferentes tiempos de reacción, entre 15 s y 2 min, para calcular la velocidad inicial a cada temperatura. Las velocidades se expresan como el cambio de absorbancia por segundo.

Por otra parte, empleamos también el método anterior para determinar la dependencia de la actividad de la pepsina con la temperatura. En este caso el sustrato usado fue hemoglobina irreversiblemente desnaturalizada, la cual se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Anson [40].

## CAPITULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Hidrólisis de la papaina por enzimas proteolíticas.

La figura 3.1 muestra el perfil de elución de los productos de hidrólisis originados por la acción de la pepsina sobre la papaina. Estos resultados corresponden a diferentes temperaturas de reacción, pero en todos los casos se usó una proporción molar papaina:pepsina de 100:1 y el tiempo de reacción fue de 1.5 horas. En el cromatograma correspondiente a 30 °C es evidente la presencia de papaina intacta ( señalada con una flecha vertical), así como la de dos fragmentos con pesos moleculares aproximados de 8000 y 5500, y otros de tamaño aún menor. A temperaturas de hidrólisis más elevadas la proteína intacta disminuyó notablemente, produciéndose en cambio una acumulación de los péptidos más pequeños. Aunque ninguno de los fragmentos obtenidos a 30 °C tuvo un tamaño correspondiente al de un dominio de la papaina, se trató de encontrar condiciones en las que hubiera mayor acumulación del fragmento más grande. Probamos una temperatura menor de hidrólisis ( 20 °C ), mayores tiempos de reacción ( 3 horas ), y una relación sustrato:enzima de 50:1. Sin embargo, en ninguno de estos casos se logró obtener una mayor proporción del

Absorbancia a 280 nm

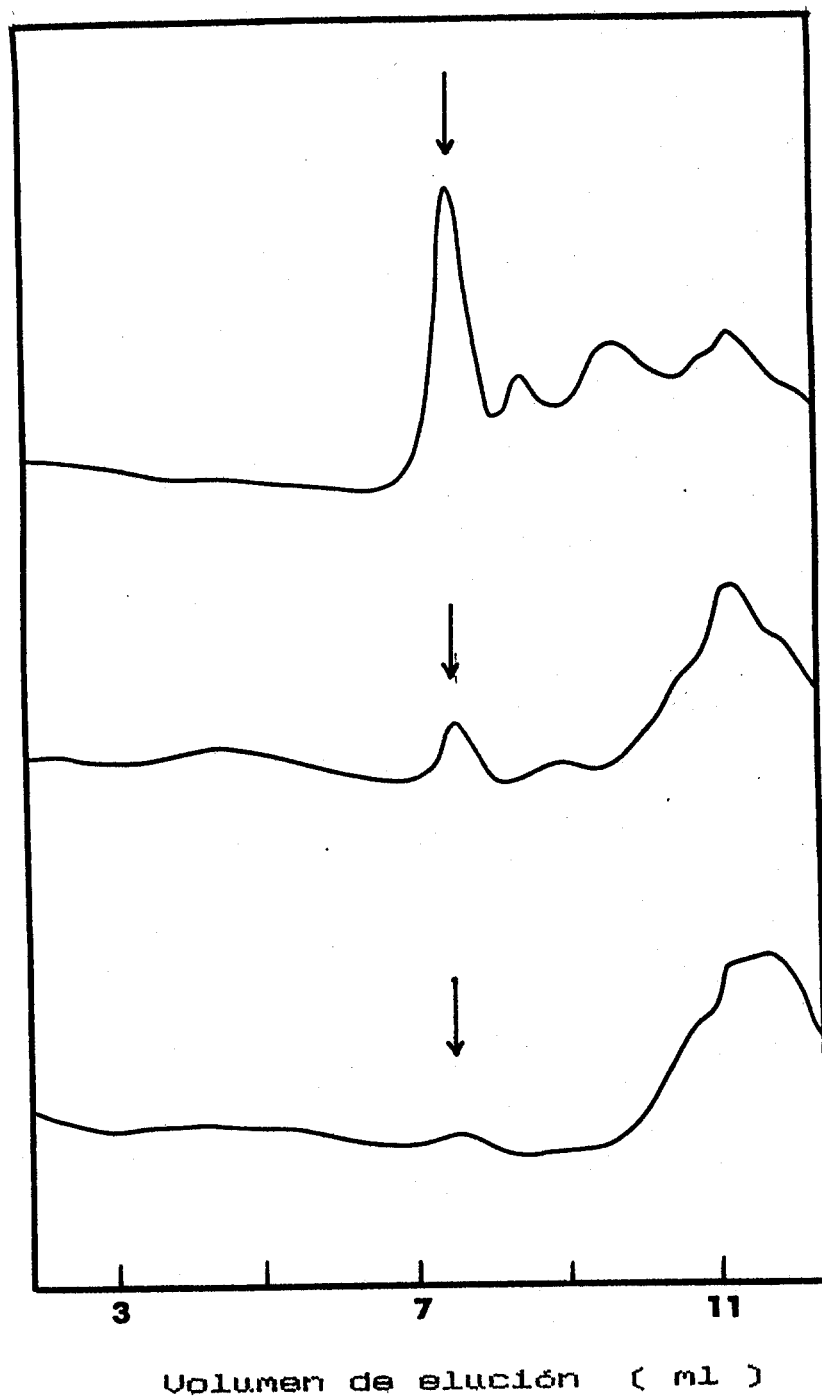


Figura 3.1. Elución de los productos de hidrólisis de la papaina en la columna TSK-2000 SW. Los cromatogramas corresponden, en orden descendente, a temperaturas de reacción de 30, 40 y 50 °C. Las flechas señalan el volumen de elución de la papaina intacta.

fragmento de 8000 daltones.

Quando se usó la tripsina para llevar a cabo la hidrólisis, los resultados fueron todavía menos promisorios. A temperaturas de reacción entre 20 y 40 °C el análisis de los productos mostró únicamente la presencia de la papaina intacta y de fragmentos con peso molecular menor de 6000.

### 3.2 Desnaturalización térmica de la papaina.

Dicroísmo circular. La figura 3.2 muestra los espectros de DC de la papaina, a pH 2.60, obtenidos a tres temperaturas diferentes. En la zona del UV-lejano (198-250 nm) los cambios espectrales que se observan son debidos fundamentalmente a alteraciones en la estructura secundaria de la molécula [41-43]; por otra parte, la región del UV-cercano (250-310 nm) refleja las modificaciones en el entorno asimétrico de residuos aromáticos (triptofano y tirosina principalmente) que ocurren al cambiar la temperatura [44,45].

Las curvas de transición seguidas por el cambio de elipticidad a 208 y 220 nm se presentan en la figura 3.3. Ambas curvas son claramente bifásicas, esto es, muestran una meseta a temperaturas intermedias. Este hecho indica que existe un estado intermediario (I) en el proceso de desdoblamiento de la molécula, además de los estados nativo (N) y desdoblado (D). El intermediario es pues una especie con estructura secundaria estable dentro de los 40 a los 48 °C. En experimentos de renaturalización (símbolos vacíos en la figura 3.3) observamos

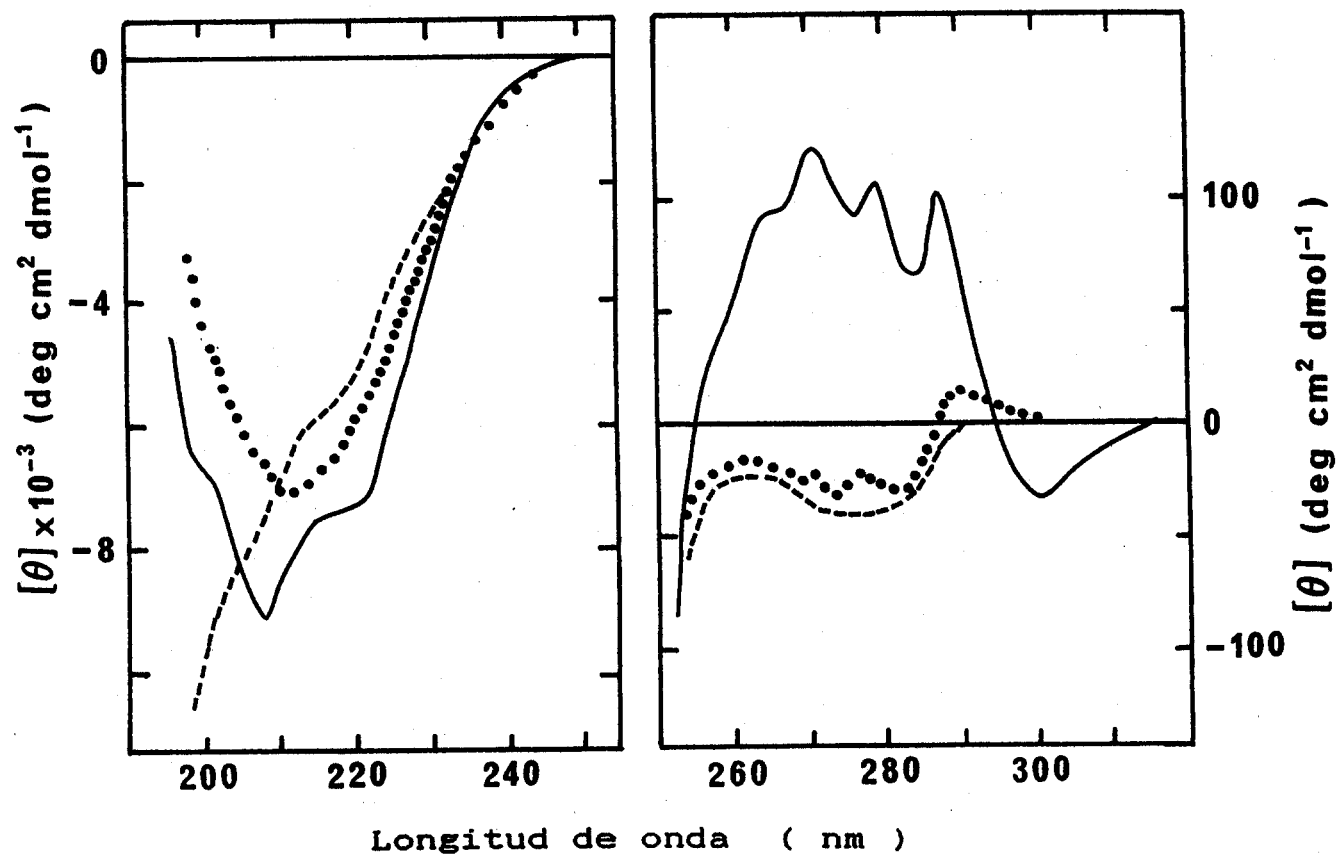


Figura 3.2. Espectros de dicroísmo circular de la papaina a tres temperaturas diferentes: 16 ( — ), 45 ( ..... ) y 70 °C ( ---- )

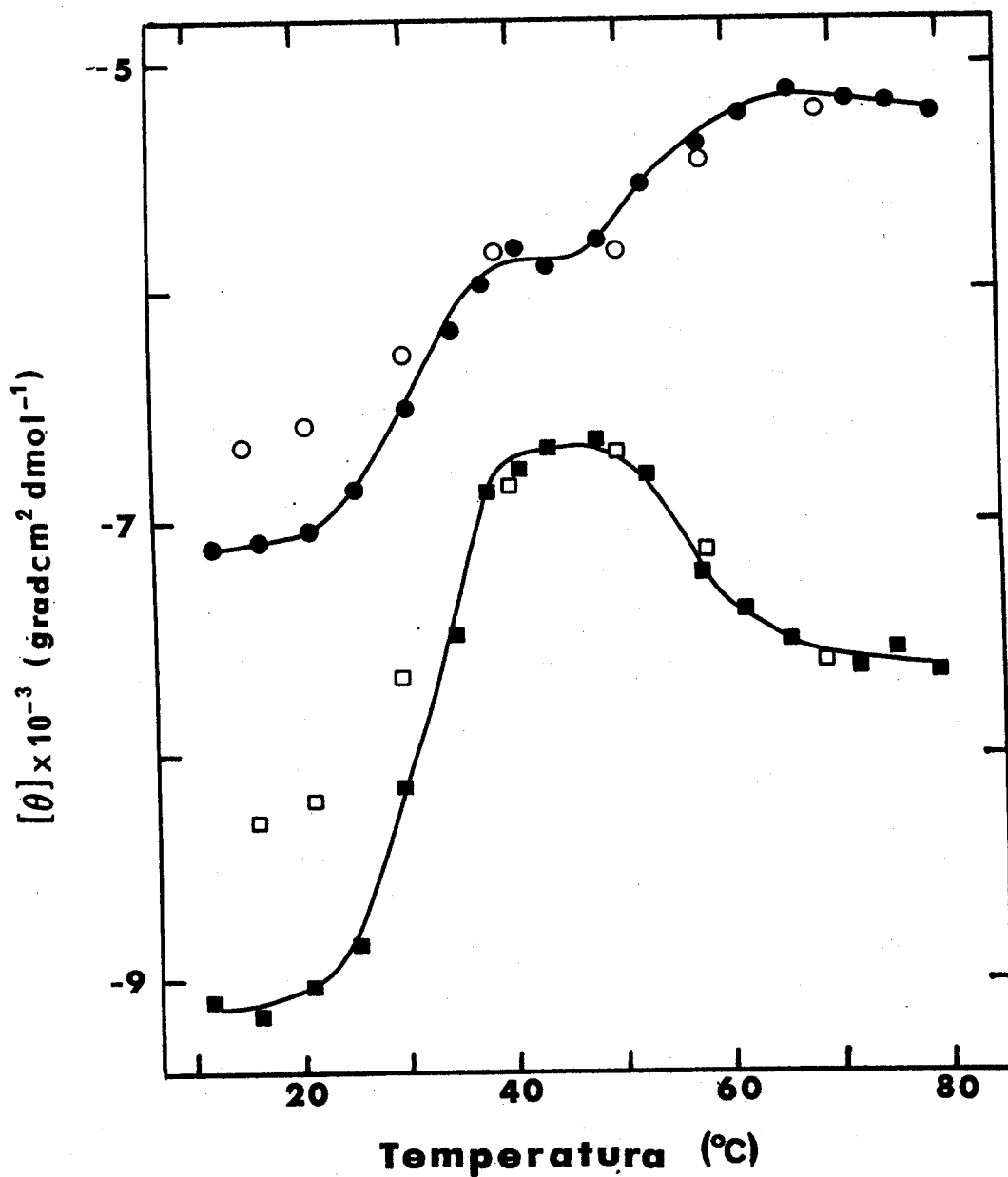


Figura 3.3. Desnaturalización térmica de la papaina seguida por dicroísmo circular a 220 ( círculos ) y 208 nm ( cuadros ). Los resultados de la renaturalización se muestran con símbolos vacíos

que la transición de D a I era completamente reversible, mientras que la correspondiente al proceso N a I fue reversible solamente en forma parcial. El grado de renaturalización fue dependiente de la concentración de proteína; la mayor recuperación de la estructura nativa se alcanzó con un valor de 0.03 mg/ml, y con una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2 °C/hora. En estas condiciones alrededor de un 60 % de los cambios en elipticidad observados al aumentar la temperatura, fueron revertidos al enfriar la solución de proteína.

Aunque se sabe que la papaina es inactiva en valores de pH inferiores a 3, decidimos investigar si la irreversibilidad parcial en la transición térmica pudiera ser debida a cierta autólisis, producto de una pequeña actividad residual a pH 2.60. Para esto se usó una muestra de papaina con el grupo tiol del sitio activo bloqueado con iodoacetamida. Los perfiles de desdoblamiento térmico de este derivado fueron muy similares a los de la proteína nativa; en estos estudios la transición de N a I fue también reversible solo parcialmente. Estos resultados descartan definitivamente que la autólisis sea la causa de la reversibilidad observada; es muy posible que el origen de este último fenómeno se encuentre en la formación de agregados moleculares, en competencia con el proceso de renaturalización, tal como sucede en los casos de algunas otras proteínas [46], o algún otro fenómeno no descrito en la literatura.

La dependencia con la temperatura de la señal de DC en la zona de absorción aromática se muestra en la figura 3.4. Es

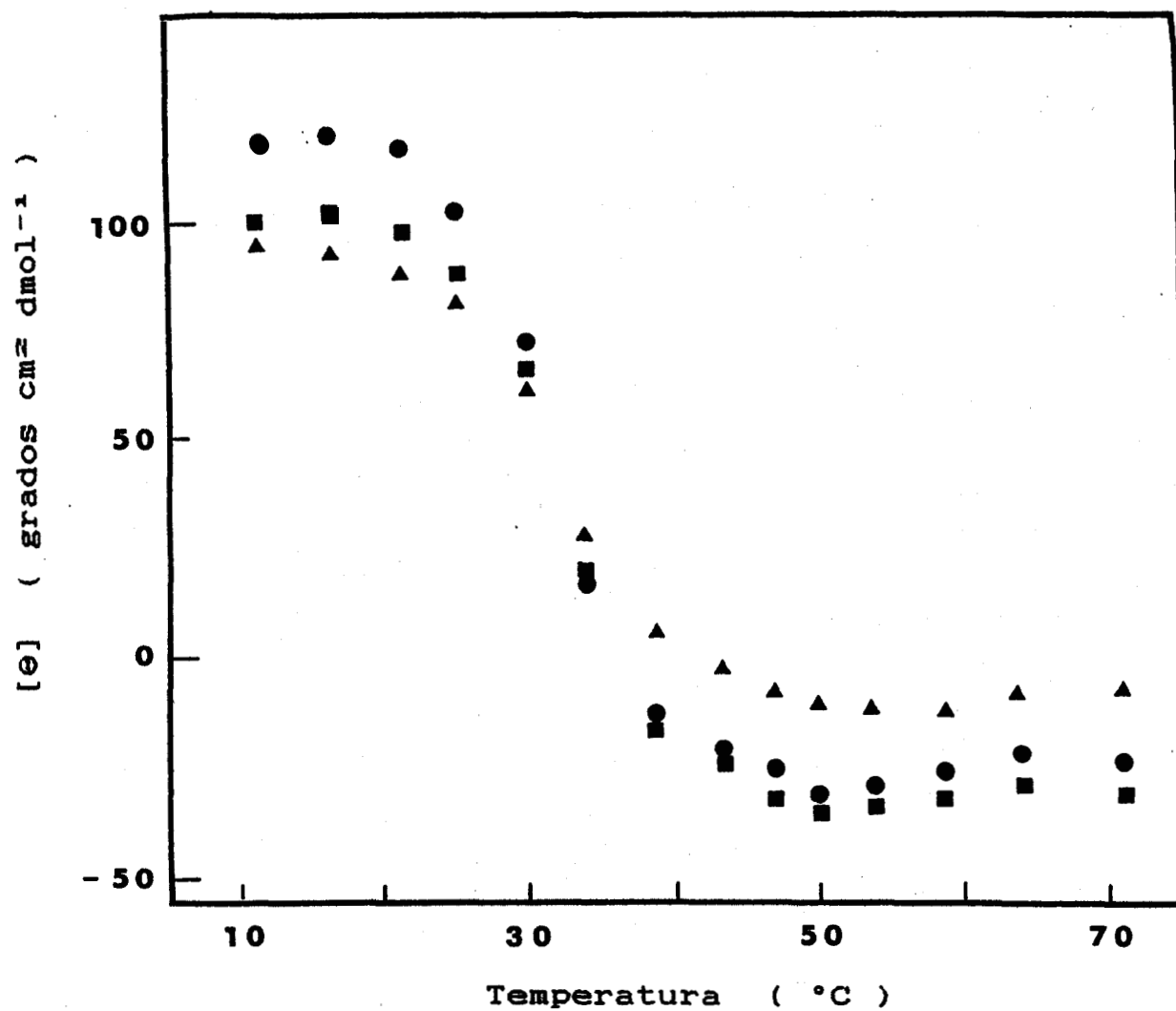


Figura 3.4. Dependencia de la temperatura de la señal de dicroísmo circular a 270 (círculos), 278 (cuadros) y 287 nm (triángulos)

evidente que los cambios en  $[\theta]$  a tres longitudes de onda diferentes siguen todos una misma transición sencilla ( monofásica ). Esta transición fue esencialmente irreversible, lo cual apoya la idea anterior sobre un fenómeno de agregación ya que estos experimentos se hicieron con una concentración de proteína mucho mayor que la empleada en la zona del UV-lejano. Como puede verse en la figura 3.5, la transición seguida a 279 nm alcanza más del 90 % de su valor final en la zona de estabilidad del estado intermedio. Lo anterior indica que la mayor parte de las interacciones asimétricas de los residuos aromáticos se pierde durante el proceso  $N \rightarrow I$ .

Espectroscopía de absorción diferencial. Los espectros de absorción diferencial generados por elevación de la temperatura a 25, 42 y 75 °C se ilustran en la figura 3.6. Los hombros situados en 289 y 283 nm, así como el mínimo alrededor de 280 nm, son ocasionados por cambios en la polaridad del medio en el que se encuentran los residuos de tirosina y triptofano [47]. Tales cambios se producen cuando se desnaturaliza una proteína y las cadenas laterales de algunos aminoácidos pasan de un entorno hidrofóbico a un ambiente más polar en el solvente acuoso [48].

La variación de la absorción diferencial con la temperatura fue muy similar para las mediciones hechas a cualquiera de las tres longitudes de onda mencionadas arriba; en la figura 3.5 se presenta la curva obtenida con los datos correspondientes a 280 nm. Esta curva se asemeja a una transición monofásica, pero

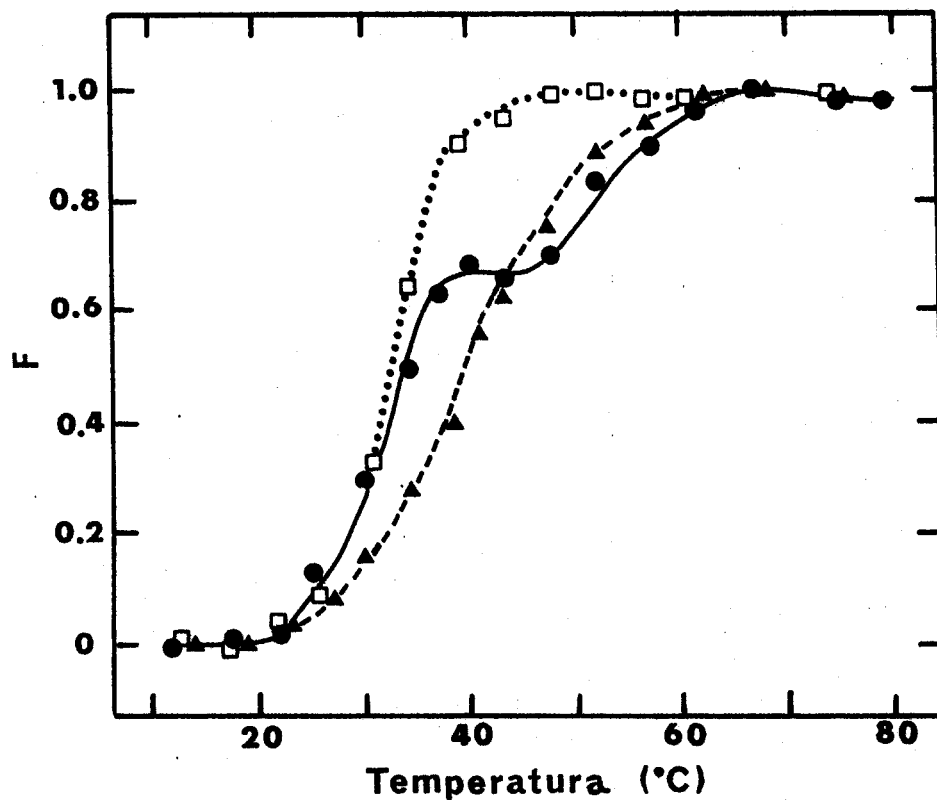


Figura 3.5. Desnaturalización térmica de la papaína seguida por dicroísmo circular a 220 (círculos) y 278 nm (cuadros), y por absorción diferencial a 280 nm (triángulos). En las ordenadas, F representa la fracción del cambio máximo observado.

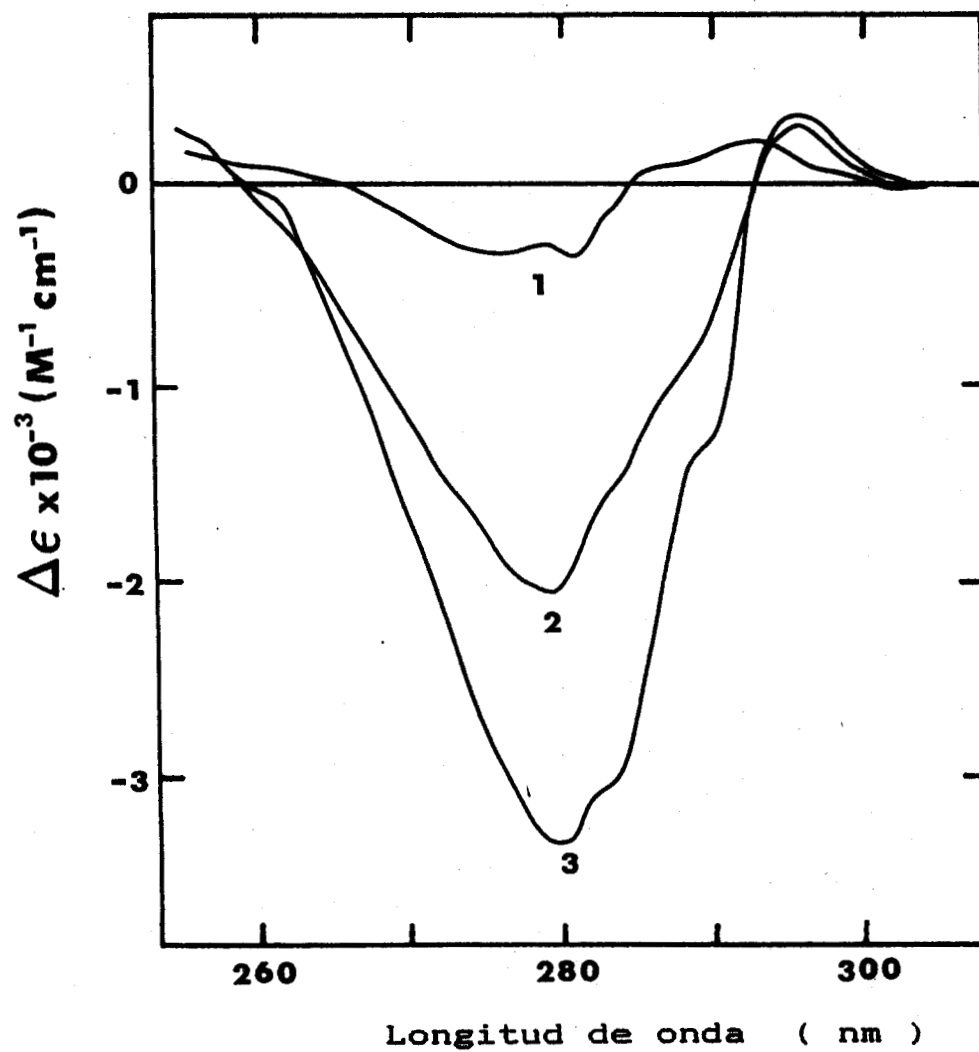


Figura 3.6. Espectros de absorción diferencial de la papaina a 25 (curva 1), 42 (curva 2) y 75 °C (curva 3).

ocurre en un intervalo de temperatura muy amplio en comparación con las transiciones seguidas por DC; de hecho, la zona de cambio de absorción diferencial abarca virtualmente las dos fases de la curva de elipticidad a 220 nm. Este resultado es indicativo de que las etapas  $N \longrightarrow I$  e  $I \longrightarrow D$ , ambas se acompañan de un aumento en la exposición de residuos de tirosina y de triptofano al solvente acuoso. Finalmente, cabe mencionar que los cambios en la absorción diferencial producidos por aumento de la temperatura fueron reversibles en un 90 %.

Actividad proteolítica residual. Estos estudios demostraron que la actividad de la papaina se pierde completamente al incubar la enzima a temperaturas superiores a los 40 °C. La curva de actividad residual ( figura 3.7 ) coincide aproximadamente con la primera transición medida por  $[\theta]$  a 220 nm. La drástica pérdida de actividad era de esperarse ya que la función catalítica de una enzima depende estrechamente de la geometría de los grupos que forman el sitio activo, geometría que a su vez es especialmente sensible a los cambios conformacionales de la molécula [49]. Es importante señalar que la actividad específica de la muestra incubada a 10 °C fue 2.2 unidades por miligramo, valor muy parecido a 2.9 que es el dato reportado en la bibliografía para la papaina [39]. De aquí se desprende que, a bajas temperaturas, la incubación de esta proteína a pH 2.60 no tiene un efecto estructural importante sobre la molécula, pudiéndose atribuir la ausencia de actividad en medio ácido a cambios de protonación en

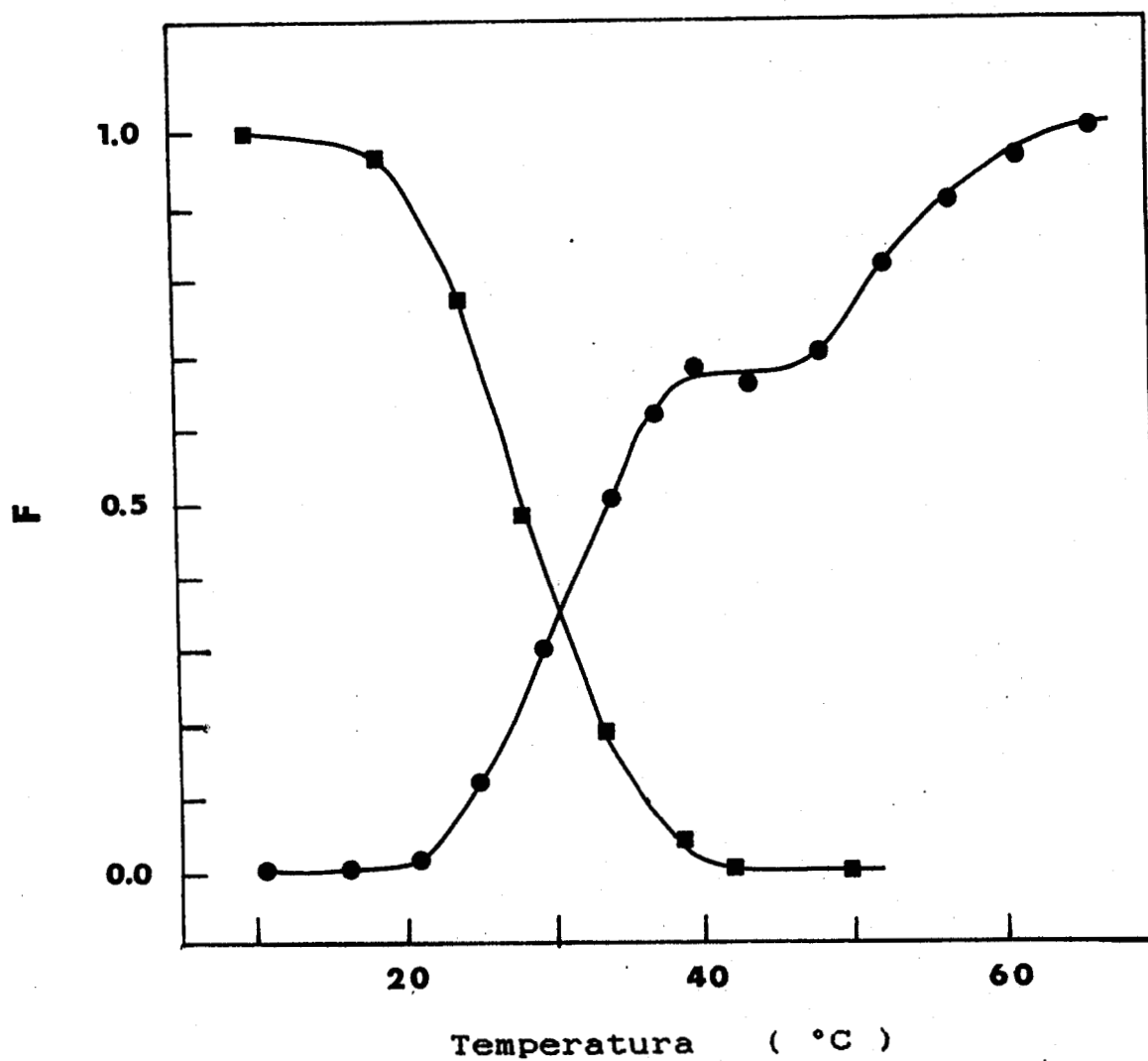


Figura 3.7. Actividad residual de la papaína en función de la temperatura. Con cuadros se indica la fracción de actividad remanente. Los círculos corresponden a los cambios de elipticidad a 220 nm, como se indica en la figura 3.5.

los grupos del sitio activo.

Susceptibilidad a la hidrólisis por pepsina. La hidrólisis de la papaina, catalizada por la pepsina, presentó dos etapas distintas en función de la temperatura de reacción ( figura 3.8 ). A temperaturas inferiores a los 44 °C la velocidad de reacción fue pequeña, incrementándose notablemente a temperaturas más elevadas. El aumento de la velocidad de una reacción enzimática es debido a la energía de activación del paso limitante en el mecanismo catalítico [50]; sin embargo, es de esperarse que la curva resultante sea monotónica, como la que corresponde a la hidrólisis de la hemoglobina desnaturalizada en la figura 3.8. Ahora bien, cuando el sustrato es una proteína nativa los cambios estructurales de ésta, provocados por el aumento en la temperatura, conducen a que haya un aumento en el número de sitios susceptibles al ataque de la proteasa [51,52]. Este último efecto es el que nos interesa estudiar en nuestro caso. Para eliminar, si bien en una forma aproximada, el efecto de la energía de activación, se ha propuesto tomar el cociente de las velocidades de reacción para la proteína bajo estudio y para una proteína desnaturalizada [53]. En nuestro caso se calculó tal cociente (  $Q$  ) usando los datos experimentales de la papaina y de la hemoglobina desnaturalizada; la variación de  $Q$  con la temperatura se muestra en la figura 3.9. Puede observarse que a temperaturas elevadas, en las cuales predomina la forma desdoblada de la papaina, los valores de  $Q$  son de cuatro a cinco

091019

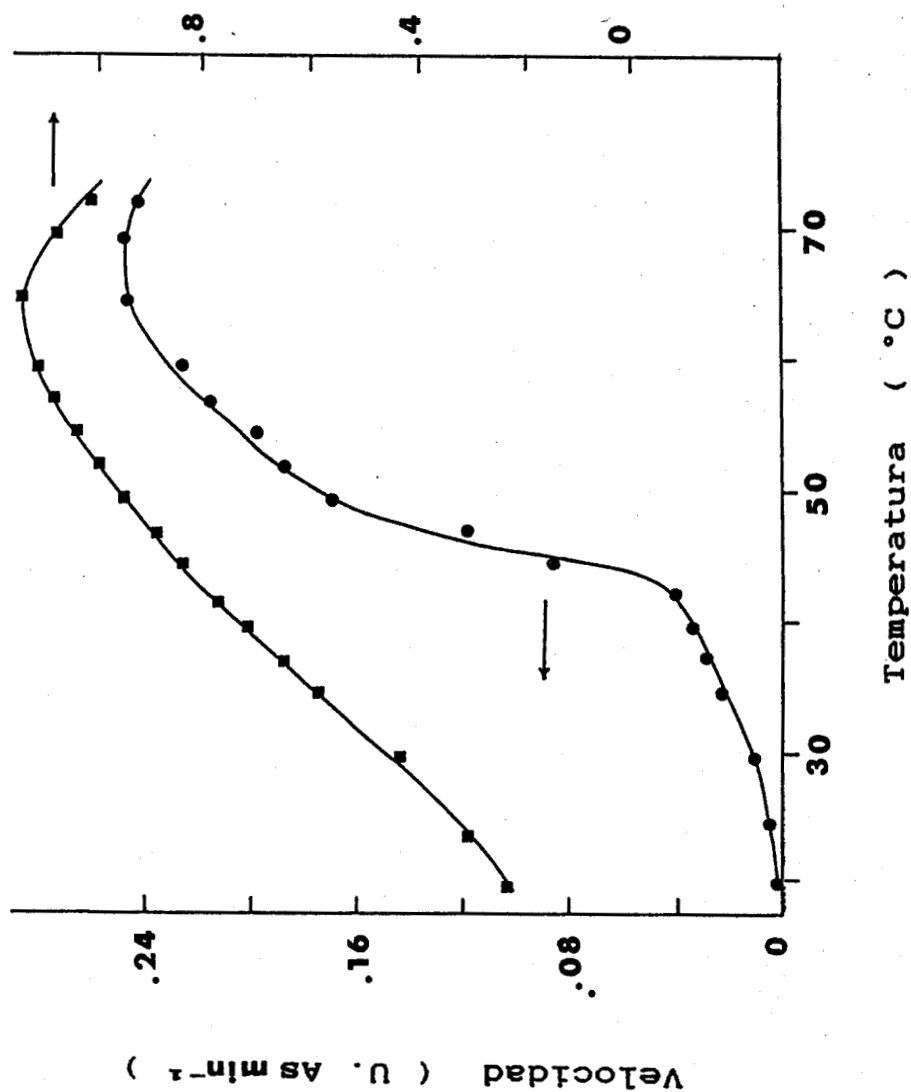


Figura 3.8. Velocidades iniciales de las reacciones de hidrólisis de la papaína (círculos) y de la hemoglobina desnaturalizada (cuadros), catalizadas por la pepsina.

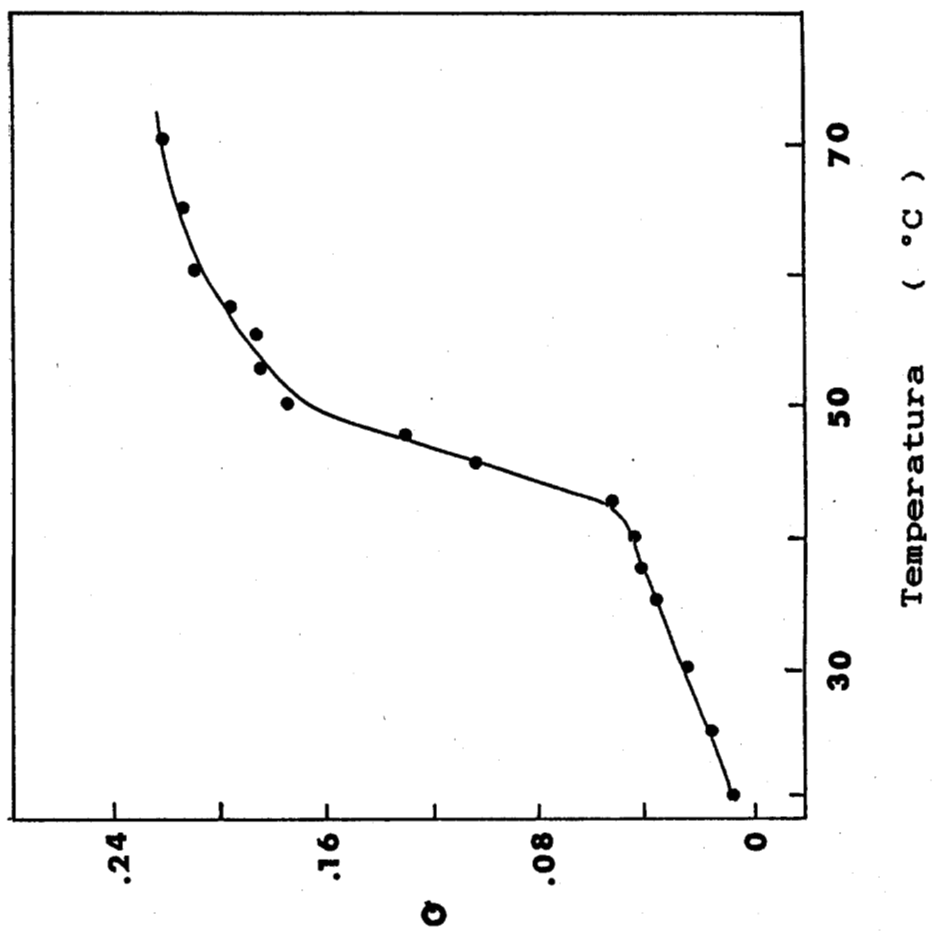


Figura 3.9. Variación del cociente  $Q$  con la temperatura.

veces mayores que a 44 °C

Características estructurales de los estados nativo, desdoblado e intermedio. En todo estudio de desnaturalización de proteínas es importante caracterizar, en primer lugar, los estados inicial y final del proceso. En este trabajo hemos obtenido evidencia suficiente para decir que la papaína conserva su estructura nativa en pH 2.6, siempre que la temperatura se mantenga por debajo de los 20 °C; primeramente, el espectro de DC ( figura 3.2 ) tanto en la zona de estructuras secundarias como en la región de cromóforos aromáticos es muy similar al reportado para la papaína en valores de pH cercanos a la neutralidad [42,54]; además, ya ha sido mencionado que la incubación de esta enzima en pH 2.60 y 10 °C no tiene efectos irreversibles sobre la geometría del sitio activo.

Mucho se ha discutido sobre si el estado de una proteína desdoblada térmicamente se asemeja a una cadena aleatoria, como la que existe en altas concentraciones de guanidina, o bien si persisten en él algunas formas de estructura secundaria [26]. Privalov y su grupo [3,11], basándose en estudios calorimétricos, apoyan la idea de que las formas desnaturalizadas por aumento de la temperatura o de la concentración de guanidina son muy semejantes. Una postura opuesta ha sido adoptada por otros autores, quienes hacen resaltar las diferencias espectroscópicas entre los dos tipos de estado desdoblado [26,55]. En particular, se ha mencionado que la elipticidad alrededor de los 220 nm tiene

una magnitud considerable en el estado final térmico, mientras que su valor es cercano a cero cuando el desdoblamiento es inducido por la guanidina. Aunque tal controversia está todavía lejos de ser resuelta, es importante señalar que en la literatura encontramos los espectros de DC de cuatro proteínas desnaturalizadas térmicamente: la termolisina [56], el fragmento constante de la cadena ligera de una inmunoglobulina [23], la glicoproteína humana  $\alpha$ -1 [57], y la ribonucleasa S [58]. Todos estos espectros son muy semejantes, tanto en forma como en magnitud, al de la papaina a 73 °C ( figura 3.2 ); este hecho nos lleva a pensar que de existir estructuras residuales a altas temperaturas, éstas deberían ser de un mismo tipo en todos los casos. La posibilidad de que tal cosa ocurra dentro de un grupo de proteínas con estructuras tridimensionales muy distintas entre sí parecería ser bastante remota. Una explicación alternativa podría buscarse en alguna característica común del estado desdoblado térmicamente, como por ejemplo la menor expansión de la cadena polipeptídica en comparación con la cadena aleatoria que existe en altas concentraciones de guanidina [5,55]. Esta menor expansión da lugar a una distancia menor y, tal vez, a una mayor correlación espacial entre los grupos de amida del polipéptido; esto último podría traducirse a su vez en una señal más intensa de DC, debido a un mayor acoplamiento de los momentos dipolares de las transiciones electrónicas [59]. En cualquier caso, es claro que el estado desdoblado de la papaina es semejante al de otras proteínas desnaturalizadas por aumento de

la temperatura.

Por otra parte, cabe mencionar que las bandas características de la papaina nativa en la zona aromática se pierden completamente a altas temperaturas ( figura 3.2 ). En su lugar aparece una banda ancha, centrada aproximadamente en los 275 nm y de muy poca intensidad; en base a estas características, es muy probable que la señal de DC mencionada sea debida a los enlaces disulfuro de la proteína [44,60]. Es evidente entonces que el estado desdoblado carece de las interacciones típicas de la estructura terciaria de la proteína nativa.

En cuanto al estado intermedio, una característica importante es que posee una estructura secundaria estable y diferente del estado nativo, como puede deducirse de la comparación de los espectros de DC obtenidos a 43 y 16 °C ( figura 3.2 ). La papaina nativa muestra dos bandas negativas centradas alrededor de los 221 y de los 208 nm, las cuales indican la preponderancia de hélices sobre otros tipos de estructura repetitiva [41,43]. En contraste, el intermedio presenta un mínimo de elipticidad en los 211-212 nm que es característico de las hojas  $\beta$  [41,43]. Con el fin de estimar cuantitativamente las diferencias estructurales entre el intermedio y la forma nativa, hicimos un análisis de los espectros de DC (198-250 nm) correspondientes; se realizó una regresión lineal múltiple por cuadrados mínimos [61], usando los espectros de base reportados por Hennessey y Johnson [42]. No se introdujeron restricciones de ninguna especie en el análisis, de

manera que la obtención de coeficientes negativos para alguna o algunas estructuras indicaría un análisis pobre o poco adecuado; en forma similar, una suma de estructuras muy diferente al 100 % sería indicio de un análisis poco satisfactorio [37]. Los resultados de este análisis se encuentran en la Tabla 3.1; con fines comparativos se presentan también los contenidos estructurales de la papaina y de cada uno de sus dominios, calculados de la estructura de la enzima determinada por difracción de rayos X [28,29]. Para el estado nativo los porcentajes estructurales estimados estuvieron en concordancia con los valores de rayos X; además, la suma de estructuras resultó cercana al 100 %. Estos resultados señalan que el análisis fue satisfactorio, y apoyan la conclusión previa sobre la conservación de la estructura nativa de la papaina a pH 2.6. En el caso del estado intermedio, la suma de estructuras igual al 117 % nos obliga a tener cierta cautela en la interpretación de los valores absolutos para los contenidos estructurales. Sin embargo, de acuerdo con Hennessey y Johnson [42], es muy probable que la mayor sobreestimación estructural ocurra en la categoría de estructuras irregulares. De cualquier manera, queda claro que el estado I tiene un mayor contenido porcentual de hojas  $\beta$  (principalmente antiparalelas) que el estado nativo; aún más, en comparación con las estructuras de los dominios, la estructura secundaria del intermedio parece corresponder precisamente a la del segundo dominio de la molécula.

Otra característica importante del estado intermedio es

Tabla 3.1

CONTENIDOS PORCENTUALES DE ESTRUCTURAS SECUNDARIAS EN LOS ESTADOS  
NATIVO E INTERMEDIARIO DE LA PAPAINA.

| ESTADO        | HELICES | HOJA $\beta$<br>ANTIPARALELA | HOJA $\beta$<br>PARALELA | GIROS | IRREGULARES | TOTAL |
|---------------|---------|------------------------------|--------------------------|-------|-------------|-------|
| NATIVO        | 24      | 17                           | 1                        | 20    | 47          | 109   |
| INTERMEDIARIO | 19      | 26                           | 06                       | 22    | 44          | 117   |
| NATIVO*       | 28      | 14                           | 0                        | 20    | 41          | 100   |
| DOMINIO 1*    | 37      | 0                            | 0                        | 20    | 43          | 100   |
| DOMINIO 2*    | 19      | 29                           | 0                        | 20    | 32          | 100   |

\*Valores calculados de la estructura tridimensional de la papaina, determinada por difracción de rayos-X [28,64].

que éste contiene un núcleo hidrofóbico formado por residuos de aminoácidos protegidos del solvente acuoso. Esto se deduce de que la transición del estado I al D se acompaña de un 40% del cambio total observado en la absorción diferencial ( figura 3.5 ). Refiriéndonos a la Tabla 3.4, la cual muestra los residuos ocultos y semiocultos en cada dominio de la papaina, vemos que hay un total de 9 residuos aromáticos ( considerando tirosina y triptofano únicamente ) en el dominio 1, y 10 en el dominio 2 que contribuyen a las bandas de absorción diferencial; sería entonces de esperarse que al desdoblamiento de cada mitad de la molécula produjera aproximadamente un 50 % del cambio total observado. De acuerdo con lo que se expuesto hasta este punto, podemos decir que nuestros resultados son consistentes con un mecanismo de desnaturalización que involucra el desdoblamiento secuencial y prácticamente independiente de los dominios moleculares. A esta misma conclusión han llegado Tiktopulo y Privalov [31], basándose en los resultados de su estudio calorimétrico de la papaina; sin embargo, nuestros resultados del análisis conformacional nos permiten ir más lejos y sugerir que la porción más estable de esta proteína es su segundo dominio.

Los estudios de susceptibilidad a la hidrólisis por pepsina proporcionan más evidencia en favor del mecanismo secuencial de desdoblamiento. La curva de la figura 3.9 indica que hay un factor de 4 o más en el aumento del número de sitios de hidrólisis al pasar del estado I al D. Observando la secuencia de aminoácidos de la papaina [28], y tomando en cuenta que la

especificidad de la pepsina es primordialmente hacia residuos de triptofano, tirosina, fenilalanina, leucina, y metionina [62], puede verse que hay 17 y 22 sitios posibles de ataque enzimático en el primero y el segundo dominios, respectivamente. Si el estado I está constituido por el primer dominio desdoblado y el segundo aún conserva su estructura, entonces al pasar al estado D se esperaría un aumento de 2.3 veces (39/17) en el número de sitios de hidrólisis; intercambiando el papel de los dominios en la secuencia  $N \rightarrow I \rightarrow D$ , el aumento sería de solo 1.8 (39/22). Aunque la primera posibilidad se acerca más a los resultados experimentales, es evidente que hay otros factores que deben tomarse en cuenta, aparte del error en los datos y las suposiciones tomadas para el manejo de los mismos; por ejemplo, puede ocurrir que al desdoblarse una parte de la molécula algunos sitios de hidrólisis queden bloqueados por su cercanía a la otra parte de la molécula que aún conserve su estructura nativa.

Finalmente, el estado intermediario es inactivo catalíticamente y, a juzgar por su espectro de DC en la región aromática (figura 3.2), posee muy poca de la estructura terciaria característica de la papaína nativa. En vista del modelo secuencial de desnaturalización, la ausencia de actividad enzimática es una característica esperada si se recuerda que los aminoácidos responsables de aquella se encuentran unos en el primer dominio y otros en el segundo [28]. En contraste, la carencia casi total de estructura terciaria en el intermediario parecería contraponerse al mecanismo de desdoblamiento ya

mencionado; sin embargo, la señal de DC de un grupo aromático no depende exclusivamente de las interacciones con grupos vecinos, sino también del grado en que se encuentren restringidos los movimientos de rotación del cromóforo [44]; de tal suerte, un pequeño cambio en las dimensiones de una proteína puede incrementar grandemente el movimiento interno de algunos residuos, sin que esto lleve a la pérdida de la conformación global de la macromolécula [55].

### 3.3 Parámetros termodinámicos de las transiciones $N \longrightarrow I$ e $I \longrightarrow D$ .

Como se señaló en el apartado anterior, nuestros resultados indican que cada una de las transiciones térmicas de la papaína representa el desdoblamiento de un dominio en particular. Si se considera que estas etapas constituyen transiciones sencillas e independientes, esto es, sin intermediarios, es posible calcular las funciones termodinámicas que las caracterizan. En primer lugar, las constantes de equilibrio para dichos procesos son:

$$\begin{aligned}
 K_1 &= \frac{[I]}{[N]} \\
 K_2 &= \frac{[D]}{[I]}
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

Los valores de estas constantes se calcularon usando los

datos de elipticidad tanto a 220 como a 208 nm ( figura 3.3 ), de acuerdo al modelo de dos estados [8],

$$K_1(T) = \frac{\theta(T) - \theta_N(T)}{\theta_I(T) - \theta_N(T)} \quad (3.2)$$

$$K_2(T) = \frac{\theta(T) - \theta_I(T)}{\theta_D(T) - \theta_I(T)}$$

donde  $\theta(T)$  es la elipticidad observada a una longitud de onda dada y una temperatura  $T$ . Los subíndices N, I, y D se refieren a los estados descritos anteriormente. Los parámetros termodinámicos correspondientes a los cambios en energía libre ( $\Delta G$ ), entalpía ( $\Delta H$ ) y entropía ( $\Delta S$ ) están relacionados con la constante de equilibrio de acuerdo a las conocidas ecuaciones:

$$\Delta G = - RT \ln K \quad (3.3)$$

$$\Delta H = - R [d (\ln K) / d (1/T)]_p \quad (3.4)$$

$$\Delta S = (\Delta H - \Delta G) / T \quad (3.5)$$

La ecuación (3.4) se usa comunmente para calcular el valor de  $\Delta H$ , a través de la llamada gráfica de vant' Hoff ( $\ln K$  vs.  $1/T$ ). En la figura 3.10 se ilustran las gráficas correspondientes a las dos transiciones de la papaína; los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta G$  calculados a la temperatura en la cual  $K = 1$  ( $T_m$ ) se encuentran en la Tabla 3.2.

Para el fenómeno de desnaturalización de las proteínas los

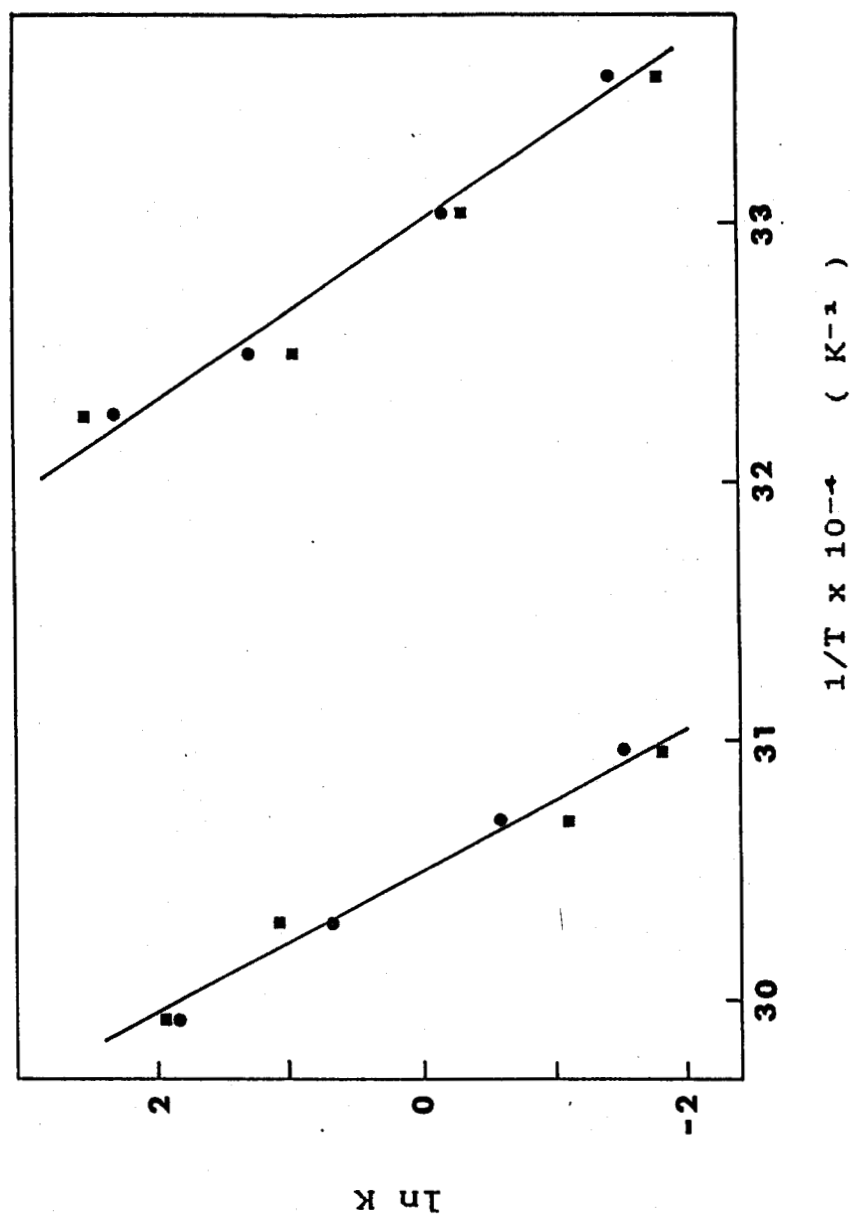


Figura 3.10. Gráficas de van't Hoff para el desdoblamiento de los dos dominios de la papaina.

Tabla 3.2

PARAMETROS TERMODINAMICOS PARA LA DESNATURALIZACION  
DE LOS DOMINIOS DE LA PAPAINA

| Dominio | $\Delta H_m$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta S_m$<br>(cal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ) | $T_m$<br>(°C) | $\Delta G^*$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | $T^*$<br>(°C) | $\Delta G$ (25°C)<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|---------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------|---------------|------------------------------------------------|
| 1       | + 57.2                                    | + 189                                                    | 30.0          | + 3.5                                     |               | + 0.8                                          |
| 2       | + 71.5                                    | + 218                                                    | 54.7          | + 5.1                                     | 10            | + 4.5                                          |

El subíndice "m" indica que el parámetro se evaluó a la temperatura a la cual la constante de equilibrio es igual a la unidad.

$\Delta G^*$  y  $T^*$  corresponden a las condiciones de máxima estabilidad.

parámetros  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$  dependen de la temperatura debido a que el cambio en la capacidad calorífica a presión constante,  $\Delta C_p$ , tiene un valor considerable. Los trabajos de Privalov [3] han demostrado que  $\Delta C_p$  puede considerarse constante dentro de intervalos de hasta 80 o 100 °C. De acuerdo a esta información, y sabiendo que

$$\Delta C_p = [d(\Delta H)/dT]_p = T [d(\Delta S)/dT]_p \quad ( 3.6 )$$

puede demostrarse [63] que la variación de  $\Delta G$  con la temperatura esta dada por la ecuación

$$\Delta G = \Delta H_m (1-T/T_m) - \Delta C_p [ T_m - T + T \ln(T/T_m) ] \quad ( 3.7 )$$

Usando la ecuación anterior se calculó  $\Delta G$  en función de la temperatura para cada uno de los dominios, según se ilustra en la figura 3.11. El valor de  $\Delta C_p$  usado fue el de la papaina ( 2.92 Kcal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup> ), determinado por Tiktopulo y Privalov [31], dividido entre dos; esto supone que cada dominio contribuye de igual forma al valor total de  $\Delta C_p$  de la molécula entera.

Es importante resaltar algunos de los resultados obtenidos en esta sección. En primer lugar, el cambio total de entalpía calculado para la desnaturalización completa de la papaina, 128.7 Kcal mol<sup>-1</sup>, es muy similar al valor de 122.6 Kcal mol<sup>-1</sup> determinado calorimétricamente por Tiktopulo y Privalov [31] en el mismo pH. Por otra parte, si las entalpías específicas de los

091019

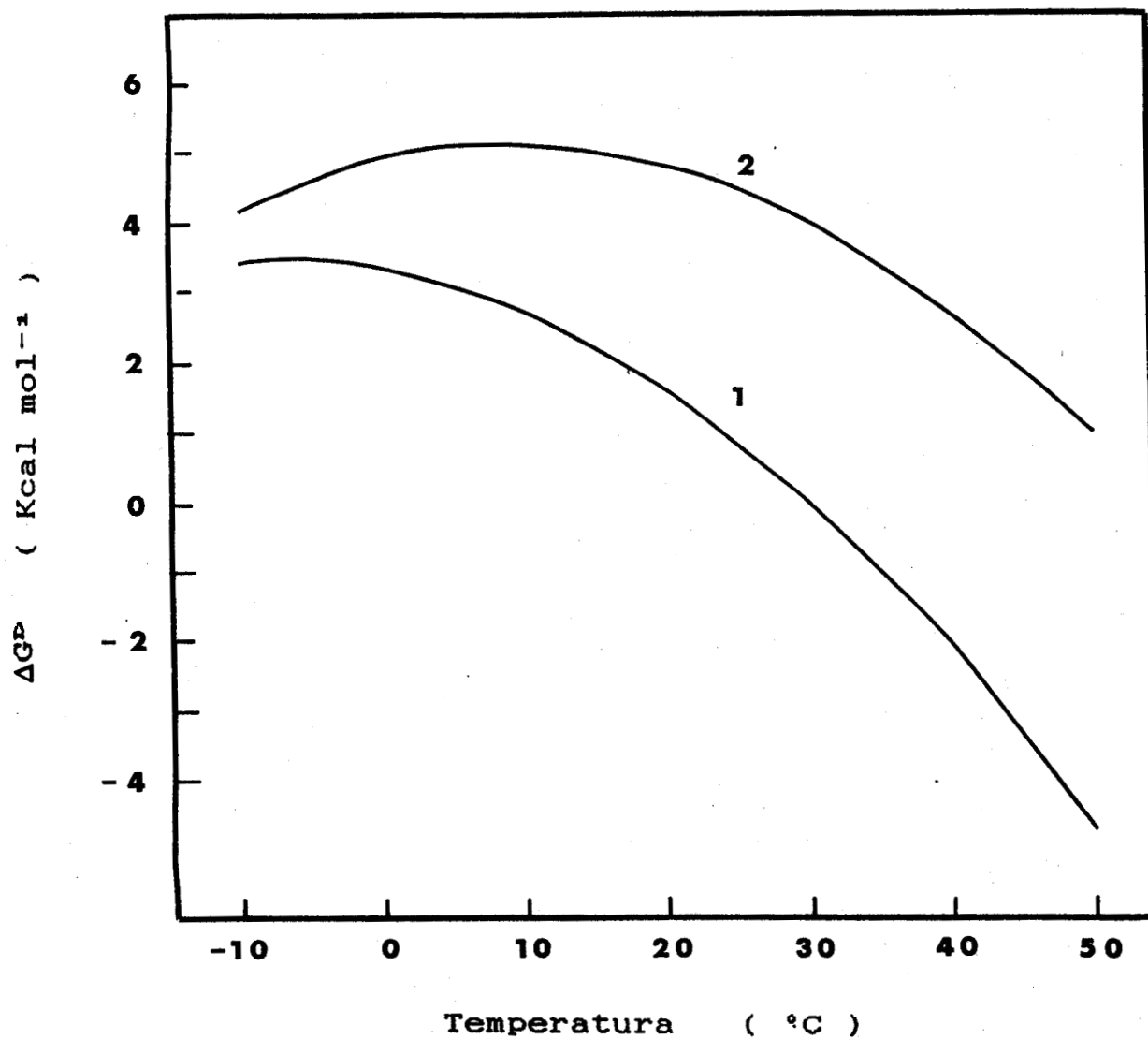


Figura 3.11. Estabilidad térmica de los dominios 1 (curva 1) y 2 (curva 2) de la papaína. La ordenada representa el cambio de energía libre que acompaña al desdoblamiento de cada una de estas partes de la proteína.

desdoblamiento de cada dominio se extrapolan a 110 °C, se obtienen valores de 14.8 y 13.3 cal g<sup>-1</sup> para el dominio 1 y el 2, respectivamente; como Privalov [3] ha hecho notar, la mayoría de las proteínas globulares muestran entalpías específicas cercanas a 13 cal g<sup>-1</sup> a 110 °C. La excepción la constituyen proteínas cuya estructura no es compacta o que presenta zonas no estructuradas; en estos casos la entalpía de desnaturalización tiene valores menores ( 7-10 cal g<sup>-1</sup> ), a la temperatura referida. Finalmente, la Tabla 3.2 muestra que la estabilidad máxima de ambos dominios es solamente de unas cuantas kilocalorías por mol. Esta situación es característica de las proteínas ya que en general los máximos de  $\Delta G$ , en el pH de mayor estabilidad, alcanzan entre 7 y 17 Kcal mol<sup>-1</sup> [3]; como regla común, en medios ácidos la estabilidad disminuye notablemente.

#### 3.4 Cálculo de la estabilidad termodinámica de los dominios de la papaína, en base a las características estructurales de esta proteína.

Como se mencionó en el capítulo 1, es comúnmente aceptado que los factores principales que contribuyen a la estabilidad de las proteínas son los puentes de hidrógeno y el efecto hidrofóbico; ambos factores contrarrestan el cambio entrópico que favorece el desdoblamiento de la macromolécula. Según lo anterior, el cambio en la energía libre para el fenómeno de desna-

turalización,  $\Delta G^0$ , puede aproximarse por la siguiente ecuación:

$$\Delta G^0 = n \Delta G^h + \sum_i n_i \Delta G_i^t - N (T \Delta S^r) \quad (3.8)$$

donde  $n$  es el número de puentes de hidrógeno en la molécula, y  $\Delta G^h$  es el cambio energético producido al romperse uno de estos enlaces;  $n_i$  y  $\Delta G_i^t$  representan, respectivamente, el número de residuos hidrofóbicos del tipo "i" ocultos en el interior de la proteína, y el cambio en la energía libre que acompaña la transferencia de un residuo de esta clase desde el interior de la molécula hasta el solvente acuoso.  $\Delta S^r$  es el cambio de entropía por residuo, que ocurre al desdoblarse la macromolécula, y  $N$  es el número total de residuos en esta última.

Con el fin de comparar los resultados experimentales de la sección anterior, se hizo el cálculo de  $\Delta G^0$  para cada dominio de la papaína de acuerdo a la ecuación (3.8). Por una parte nos basamos en la descripción sumamente detallada de la estructura de esta proteína determinada por difracción de rayos-X [29,64]. De esta descripción se obtuvo el número de enlaces de hidrógeno presentes en cada dominio de la molécula, según se resume en la Tabla 3.3; también se determinó el número de residuos hidrofóbicos, ocultos y semiocultos, de cada una de las diferentes clases (Tabla 3.4). Por otra parte, los valores de  $\Delta G^h$ ,  $\Delta G_i^t$  y  $\Delta S^r$  se tomaron de datos existentes en la literatura. Para los puentes de hidrógeno, los resultados de estudios con compuestos modelo y polipéptidos sintéticos [65,66], así como los datos de estudios

Tabla 3.3  
PUENTES DE HIDROGENO EN LOS DOMINIOS  
DE LA PAPAINA\*

| Tipo de enlace                                                                  | Dominio 1 | Dominio 2 |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------|
| Entre átomos del esqueleto<br>polipeptídico:                                    |           |           |
| hélices                                                                         | 30        | 10        |
| hojas- $\beta$                                                                  | 4         | 27        |
| otros                                                                           | 9         | 4         |
| Entre cadenas laterales y<br>otras cadenas laterales o<br>átomos del esqueleto: | 28        | 23        |
| TOTAL                                                                           | 71        | 64        |

\* REFERENCIA [64]

Tabla 3.4

CADENAS LATERALES QUE CONTRIBUYEN  
AL EFECTO HIDROFOBICO\*

| Residuo | Dominio 1 | Dominio 2 |
|---------|-----------|-----------|
| Trp     | 1,1 (S)   | 3         |
| Tir     | 5,2 (S)   | 5, 2(S)   |
| Fen     | -         | 3         |
| Val     | 4         | 4         |
| Ile     | 3         | 5         |
| Len     | 3         | 3         |
| Pro     | 1         | -         |
| Treo    | 1         | -         |
| Ala     | 3         | 2         |

\*Con (S) se indican residuos "semiocultos", de acuerdo al área superficial accesible de los mismos [64].

calorimétricos [3], indican que el valor para  $\Delta G^0$  está comprendido entre 1 y 1.5 Kcal mol<sup>-1</sup>; en nuestro cálculo usamos el valor promedio de estos límites, 1.25 Kcal mol<sup>-1</sup>. Los valores de  $\Delta G^0$  han sido calculados a partir de estudios de solubilidad en algunos solventes orgánicos (principalmente etanol y dioxano) que se mejoren el ambiente interior de una proteína. En el caso que nos ocupa empleamos el promedio de dos juegos de estos parámetros (Tabla 3.5), reportados por Brandts [12,13] y por Tanford y colaboradores [67]. Finalmente, el valor utilizado para el cambio entrópico por residuo,  $\Delta S_r$ , fue 4.2 cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>; en este caso existe coincidencia en los resultados obtenidos de estudios calorimétricos [3] y de aquellos realizados con polipéptidos sintéticos [65].

Los resultados del cálculo de la estabilidad de cada uno de los dominios de la papaina se resumen en la Tabla 3.6. Teniendo en cuenta que estos resultados provienen de un cálculo aproximado, se puede decir que son satisfactorios si se los compara con los resultados experimentales de la sección anterior (Tabla 3.2). Aunque existen diferencias considerables, sobre todo para el primer dominio, entre los valores de  $\Delta G^0$  calculados en forma experimental, por un lado, y los derivados de consideraciones estructurales por el otro, es notable que existe coincidencia en cuanto a la mayor estabilidad del dominio 2 de la molécula, a 25 °C. Esta mayor estabilidad se debe, de acuerdo a los datos de la Tabla 3.6, a un efecto hidrofóbico más grande que inclusive compensa la menor saturación de puentes de hidrógeno que presenta la

Tabla 3.5

$\Delta G^t$  (SOLVENTE ORGANICO  $\rightarrow$  AGUA) PARA LAS CADENAS  
LATERALES DE AMINOACIDOS HIDROFOBOS.

Los valores se expresan en Kcal mol<sup>-1</sup>.

| A.A. | Brandts. <sup>1</sup> | Tanford. <sup>2</sup> | Promedio |
|------|-----------------------|-----------------------|----------|
| Trp  | + 2.5                 | + 3.4                 | + 2.95   |
| Fen  | + 2.5                 | + 2.5                 | + 2.5    |
| Tir  | + 2.5                 | + 2.3                 | + 2.4    |
| Pro  | + 2.5                 | - -                   | + 2.5    |
| Leu  | + 2.5                 | + 1.8                 | + 2.15   |
| Ile  | + 2.5                 | - -                   | + 2.15*  |
| Val  | + 1.5                 | + 1.5                 | + 1.5    |
| Ala  | + 0.6                 | + 0.5                 | + 0.55   |
| Treo | 0                     | + 0.4                 | + 0.2    |

<sup>1</sup>Referencia [12]

<sup>2</sup>Referencia [67]

segunda mitad de la molécula.

De acuerdo a las ideas comunmente aceptadas, el efecto hidrofóbico tiene una contribución importante en la estabilidad de las proteínas. Sin embargo, Privalov [68], en una revisión reciente sobre este tema, ha mencionado que en la estabilidad termodinámica de estas macromoléculas sería mayor sin la contribución hidrofóbica. Debido a esta conclusión más bien sorprendente, decidimos investigar en nuestro trabajo la posibilidad de estimar la magnitud del efecto hidrofóbico, partiendo de datos experimentales. Para tal fin, es conveniente reescribir la ecuación ( 3.8 ) como sigue:

$$\Delta G^0 = \Delta H^h + \Delta H^t - T ( \Delta S^c + \Delta S^t ) \quad ( 3.9 )$$

donde  $\Delta G^t = \Delta H^t - T \Delta S^t$ ; esto es, el efecto hidrofóbico se descompone en sus contribuciones entálpica y entrópica. Además, la estabilidad por los puentes de hidrógeno se considera únicamente entálpica ( $\Delta H^h$ ), y prácticamente constante, como es usual, [1]. Por otro lado,  $\Delta G^0$  es el valor experimental del cambio en la energía libre para el desdoblamiento una proteína, y está dado por:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0 \quad ( 3.10 )$$

Iguando las ecuaciones ( 3.9 ) y ( 3.10 ), obtenemos

$$\Delta H^c = \Delta H^D - \Delta H^D$$

$$T \Delta S^c = T ( \Delta S^D - \Delta S^c )$$

y por lo tanto,

$$\Delta G^c = \Delta H^D - \Delta H^h - T ( \Delta S^D - \Delta S^c ) \quad ( 3.11 )$$

Desde luego,  $\Delta H^D$  y  $\Delta S^D$  son funciones de la temperatura; usando las ecuaciones ( 3.4 ) y ( 3.5 ) podemos hacer explícita esta dependencia de T, a través de  $\Delta C_p$ ,

$$\Delta G_T = \Delta H_{Tr} - \Delta H^h + \Delta C_p ( T - T_r ) - T ( \Delta S_{Tr} - \Delta S^c + \Delta C_p \ln T/T_r ) \quad ( 3.12 )$$

donde  $\Delta H_{Tr}$  y  $\Delta S_{Tr}$  son constantes evaluadas a una temperatura de referencia,  $T_r$ . En este punto, debemos mencionar una de las conclusiones principales en el trabajo de Privalov y colaboradores [3], referente a la elección de  $T_r$ . Estos investigadores han encontrado que a 110 °C las entalpías específicas de desnaturalización,  $\Delta H^D$ , alcanzan para proteínas globulares "compactas" alcanzan un valor de aproximadamente 13 cal g<sup>-1</sup>. Esta constante termodinámica sugiere la existencia de alguna propiedad estructural muy semejante en todo el grupo de proteínas estudiadas; Privalov encontró que mientras que el número de contactos hidrofóbicos por gramo variaba de proteína a proteína, el número de puentes de hidrógeno por gramo podía considerarse como constante. La con-

clusión de este autor fue que, a 110 °C (383 K), el efecto hidrofóbico se hace nulo y la entalpía de desnaturalización es atribuible únicamente a los enlaces de hidrógeno, esto es,

$\Delta H_{383} = \Delta H^h$ . Resultados análogos fueron obtenidos para la entropía específica, lo cual llevó a proponer que  $\Delta S_{383} = \Delta S^c$ .

Con esto, la ecuación ( 3.12 ) se reduce a

$$\Delta G_T = \Delta C_p ( T - T_r ) - T ( \Delta C_p \ln T/T_r ) \quad ( 3.13 )$$

donde  $T_r = 383$  K. El primer término del lado derecho de esta ecuación representa  $\Delta H^t$ , y el segundo es igual a  $\Delta S^t$ . Es evidente que cuando  $T = T_r$ ,  $\Delta H^t = \Delta S^t = 0$ ; debido a que el valor máximo de  $\Delta G$  para una reacción con  $\Delta C_p$  constante se obtiene cuando  $\Delta S = 0$  [3], la ecuación ( 3.13 ) nos dice que el máximo de estabilidad por el efecto hidrofóbico,  $\Delta G^t$ , es igual a cero. En otras palabras, sería de esperarse que tal efecto contribuyera a desestabilizar la forma nativa de una proteína. Como esta conclusión se deriva de la proposición de que  $\Delta H^t$  y  $\Delta S^t$  tienen un valor igual a cero a una misma temperatura (110 °C), decidimos probar la validez de la misma. Como ya se mencionó; Privalov aduce que a 110 °C  $\Delta H^D = \Delta H^h$ ; si esto es cierto, se esperaría que el valor de  $H^D$  para una proteína dada fuera proporcional al número de puentes de hidrógeno presentes en la misma. Usando los datos reportados por Privalov [3], hicimos las gráficas que relacionan  $\Delta H^D$  y el número de puentes de hidrógeno,  $n^h$ , para varias proteínas (inhibidor pancreático de tripsina,  $n^h=28$ ; citocromo c,

Tabla 3.6

FACTORES QUE DETERMINAN LA ESTABILIDAD DE LOS  
DOMINIOS DE LA PAPAINA, A 25°C

|           | $\Delta G^H$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta G^t$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | $-T\Delta S$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) | $\Delta G^D$<br>(Kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|-----------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Dominio 1 | + 88.8                                    | + 42.1                                    | - 133.9                                   | - 3                                       |
| Dominio 2 | + 80.0                                    | + 55.1                                    | - 131.4                                   | + 3.7                                     |

6710164

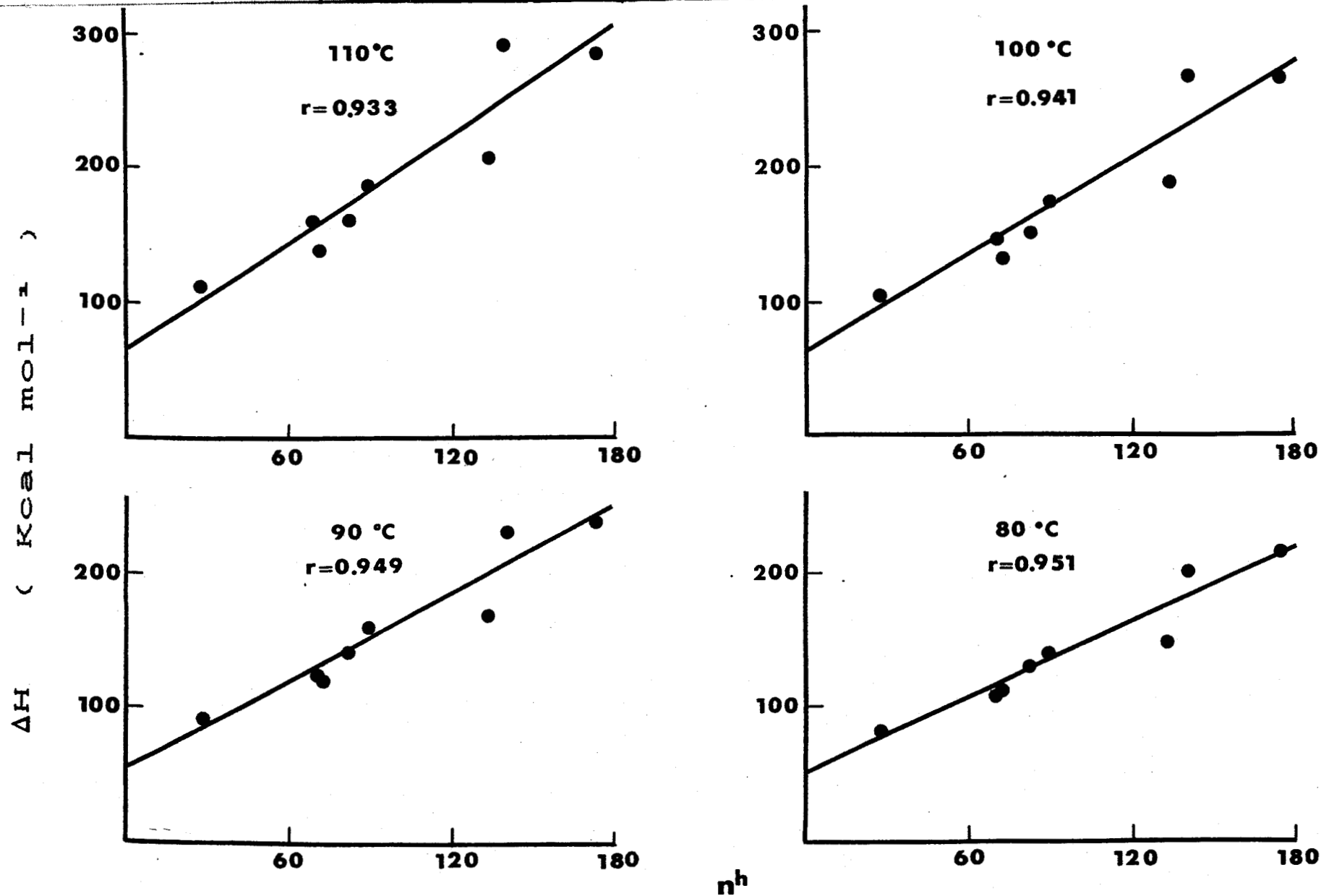


Figura 3.12. Relación entre el cambio de entalpía molar de desnaturalización,  $H$ , y el número de enlaces de hidrógeno,  $n^h$ , para ocho proteínas diferentes.

$n^h=70$ ; parvalbúmina,  $n^h=71$ ; ribonucleasa,  $n^h=81$ ; lisozima,  $n^h=89$ ; mioglobina,  $n^h=133$ ; papaina,  $n^h=139$ ;  $\alpha$ -quimotripsina,  $n^h=173$ ), y a diferentes temperaturas entre los 60 y los 110 °C. Las figuras 3.12 y 3.13 muestran las gráficas resultantes, pudiéndose observar que aunque existe una buena correlación en todas las temperaturas, ésta es mayor a 80 °C. Así, es muy posible que la temperatura a la cual  $\Delta H^0 = \Delta H^h$  no sea 110 °C, sino más bien alrededor de los 80 °C. De acuerdo a lo anterior, la ecuación ( 3.12 ) se transformaría en

$$\Delta G^T = \Delta C_p ( T - 353 ) - T ( \Delta C_p \ln T/383 ) \quad ( 3.14 )$$

De acuerdo a esta última ecuación, en el caso de la papaina (  $\Delta C_p = 2.92 \text{ Kcal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  ) la estabilidad proporcionada por el efecto hidrofóbico,  $\Delta G_T$ , sería de +57.8 Kcal mol<sup>-1</sup> a 25 °C (298 K). Este valor es ya considerable pero apenas alcanza un 60% del valor estimado en base a la estructura de la proteína (Tabla 3.6). Los resultados anteriores nos indican que es necesario contar con más información experimental antes de que sea posible calcular con precisión las magnitudes de los distintos factores que contribuyen a la estabilidad de una proteína.

### 3.6 Transición térmica de la papaina en mezclas agua-etanol.

Con el fin de determinar la importancia del efecto hidrofóbico en la estabilidad de las proteínas, algunos autores han estudiado la desnaturalización de estas macromoléculas en mez-

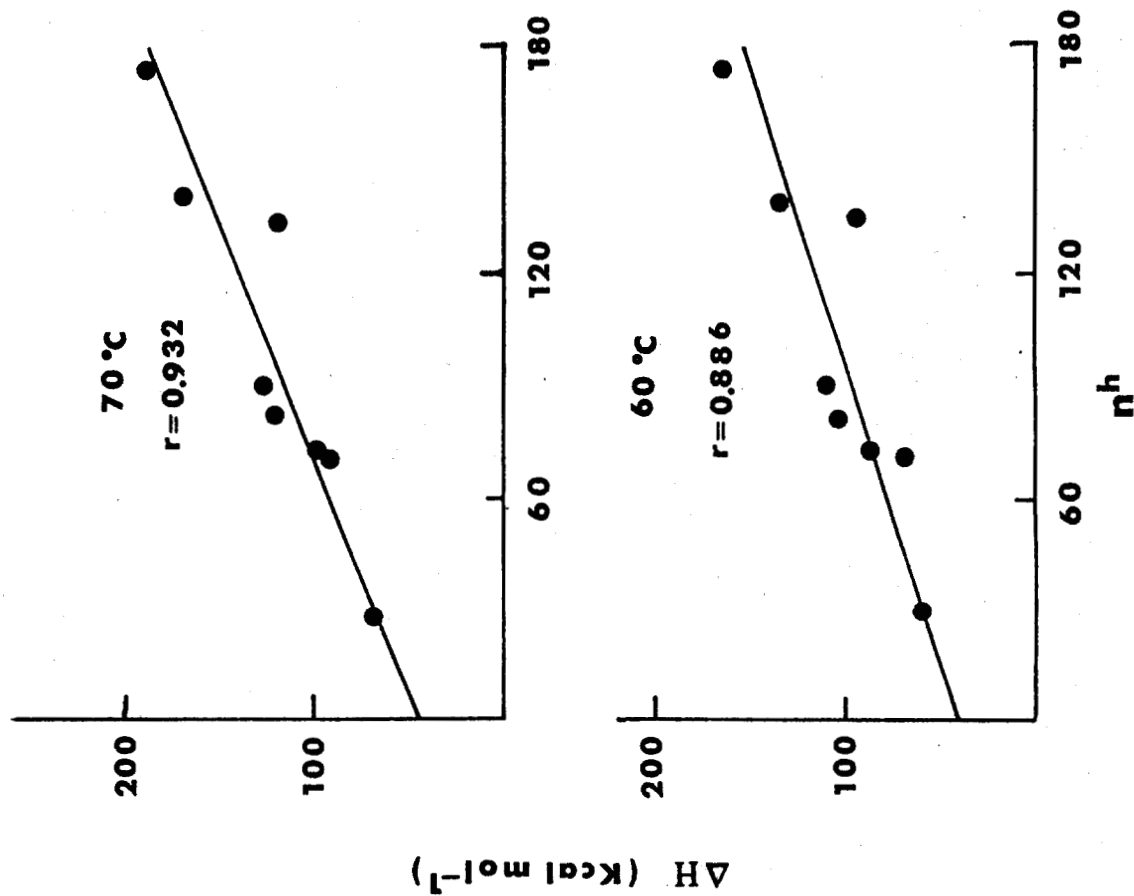


Figura 3.13. Relación entre el cambio de entalpía molar de desnaturalización,  $\Delta H$ , y el número de enlaces de hidrógeno,  $n^h$ , para ocho proteínas diferentes.

clas alcohol-agua [69]. Aunque los trabajos de este tipo no son numerosos, algunas conclusiones generales han surgido de los mismos. Por ejemplo, el efecto principal de alcoholes como el metanol, el etanol, y el propanol, es disminuir la estabilidad de las proteínas en la desnaturalización térmica [13,69,70]; se cree que esto ocurre como consecuencia de una solvatación preferencial por el solvente orgánico, de los grupos hidrofóbicos de la macromolécula; esto quiere decir que la formación de estructuras acuosas ordenadas ("clatratos" o "icebergs") alrededor de dichos grupos es grandemente abatida por la presencia del alcohol [13,69]. Sin embargo, al menos para los casos del metanol y del etanol, se ha reportado que ocurre una estabilización de la forma nativa de las proteínas a bajas concentraciones del alcohol y temperaturas inferiores a los 30 °C [13,69]. Para la lisozima y la ribonucleasa este aumento en  $\Delta G^\circ$  es del orden de 2 Kcal mol<sup>-1</sup>.

En esta tesis se estudió el efecto del etanol sobre la transición térmica de la papaína. La figura 3.14 muestra los espectros de DC ( 198-250 nm ) de esta proteína en etanol al 5 % ( v/v ), correspondientes a tres temperaturas; es evidente que existe un punto isodicroico alrededor de los 206 nm, lo cual señala la existencia de únicamente dos estados conformacionales diferentes. En concordancia con lo anterior, las curvas de desnaturalización construidas de los datos de elipticidad a 220 y 208 nm ( figura 3.15 ) muestran una sola transición, en ambos casos sin intermediario alguno. Esta transición tiene lugar entre los 35 y los 60 °C aproximadamente, con una  $T_m$  de 46-47 °C. A

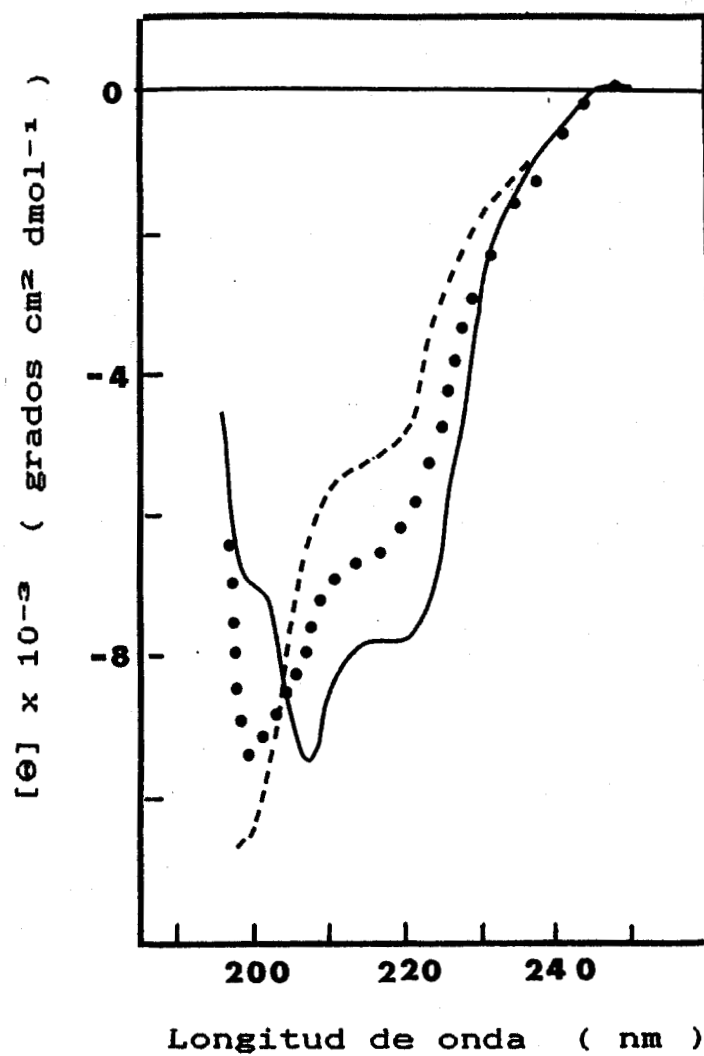


Figura 3.14. Espectros de dicroísmo circular de la papaina, en presencia de etanol al 5 %, a tres temperaturas diferentes: 10 ( — ), 45 ( ..... ) y 72 °C ( ---- ).

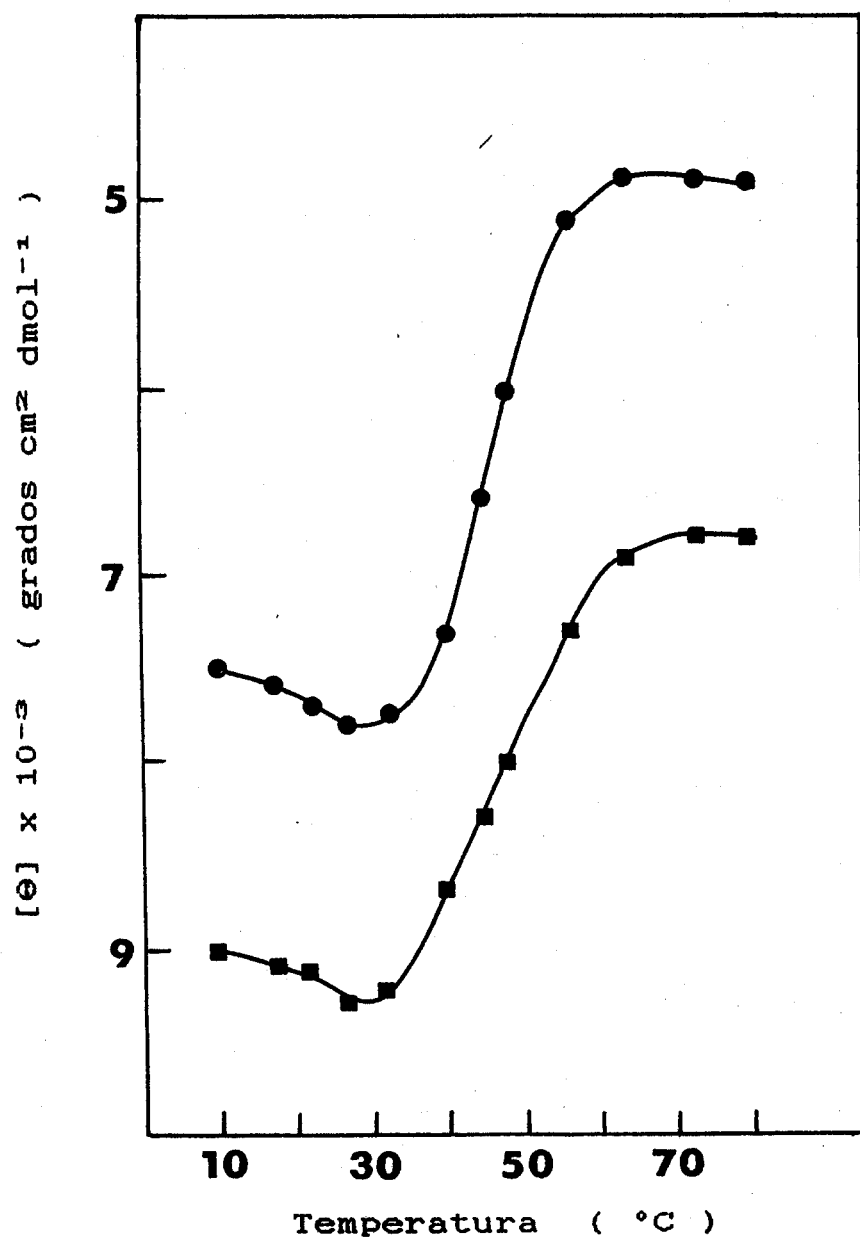


Figura 3.15. Transición térmica de la papaina, en etanol al 5 %, seguida por cambios de elipticidad a 220 (círculos) y 208 nm (cuadros).

partir de la temperatura más baja ( 10 °C ) puede apreciarse un aumento gradual y pequeño en la magnitud de la elipticidad, continuando este comportamiento hasta los 30 °C.

Es conveniente señalar que las formas nativa y desdoblada de la proteína parecen ser las mismas con y sin la presencia del alcohol, ya que los espectros correspondientes son muy similares ( ver figuras 3.2 y 3.14 ). Además, la actividad específica de la papaína, después de incubarla durante 30 min en 5 % de etanol y a 10 °C, fue idéntica a la de la enzima incubada sin el alcohol.

Resulta claro que la presencia de una pequeña cantidad de etanol tiene un efecto notable sobre la estabilidad de los dominios de la papaína; las transiciones térmicas de estas entidades, que son secuenciales en ausencia del alcohol, tienden a fundirse en una sola transición cuando el solvente orgánico se haya en el medio. Una explicación para este comportamiento sería que el etanol estabiliza la estructura del primer dominio desplazando la  $T_m$  de su transición hacia temperaturas mayores, mientras que a temperaturas más elevadas provoca una desestabilización del segundo dominio. Esta interpretación estaría en concordancia con los efectos de los alcoholes en la estabilidad de las proteínas, según se describió antes. Otra explicación posible estaría basada en un cambio conformacional previo al desdoblamiento de la molécula, como por ejemplo el que ocurre de los 10 a los 30 °C. Sin embargo, de acuerdo a lo pequeño de los cambios en la elipticidad en esta zona, es difícil que haya una alteración significativa de la forma nativa previa al

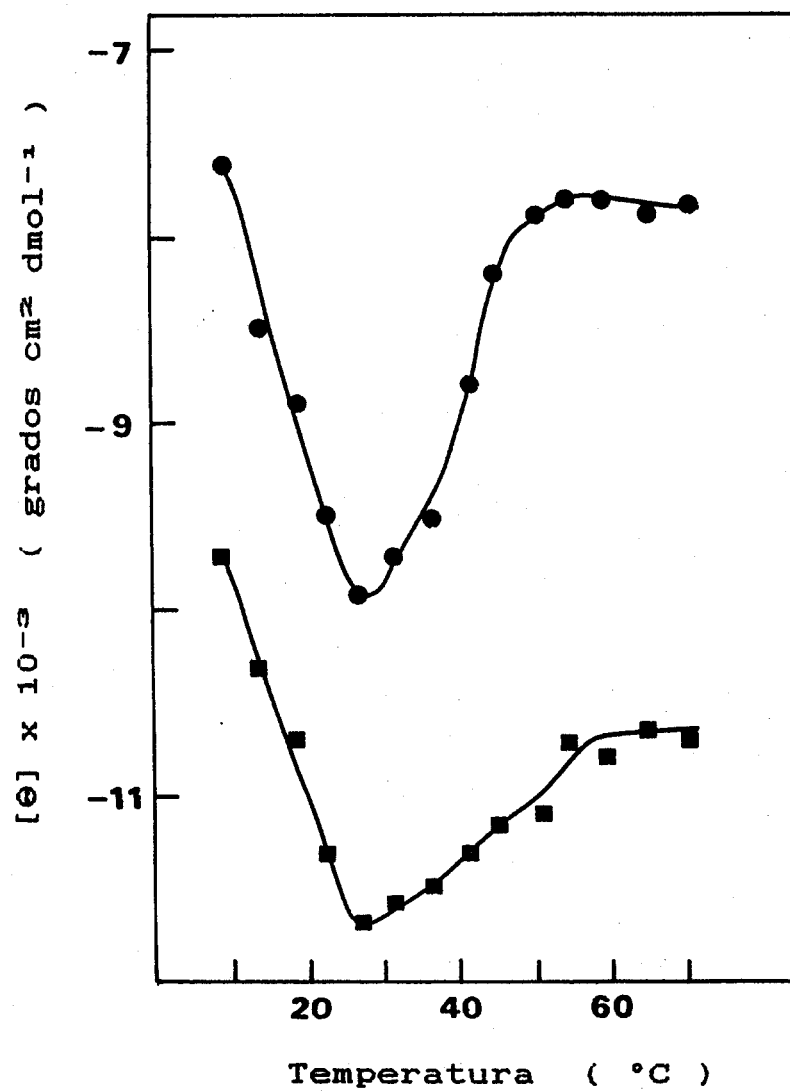


Figura 3.16. Desnaturalización térmica de la papaina, en etanol al 20 %, seguida por cambios de elipticidad a 220 (círculos) y 208 nm (cuadros).

desdoblamiento.

Otra cosa muy diferente ocurre cuando la concentración de etanol se eleva al 20 % ( v/v ). Como puede verse en la figura 3.16, en este caso los cambios en las señales de DC son más drásticos a bajas temperaturas; en particular, el aumento de la magnitud de  $[\theta]$  a 220 y 208 nm indica la formación de estructuras helicoidales [42,43] adicionales a las ya presentes en el estado nativo. Este efecto ya ha sido observado con anterioridad en algunas otras proteínas [5,70]. Se debe hacer resaltar que la papaina incubada en 20 % de etanol y a 10 °C únicamente recupera un 30 % de su actividad específica.

No solamente el estado nativo de la proteína se ve alterado por la presencia de etanol al 20 %, sino también el estado desnaturalizado parece diferir de aquel que se produce en ausencia del solvente orgánico; esto puede apreciarse de los diferentes valores de elipticidad que se registran en ambos casos a temperaturas elevadas ( figuras 3.3 y 3.16 ). Por lo tanto, es evidente que al aumentar la concentración de etanol de 5 a 20 % se produce una modificación drástica en la naturaleza de los cambios conformacionales inducidos por un aumento en la temperatura.

## CAPITULO 4

### DISCUSION Y CONCLUSIONES

Los resultados del presente trabajo demuestran que la desnaturalización térmica de la papaina no es un proceso de dos estados, ya que se observa la presencia de un intermediario ( I ) estable. Las transiciones del estado nativo ( N ) al estado I, y de éste al estado desdoblado ( D ) conllevan cambios característicos en la estructura secundaria de la proteína. Por otra parte, el grado de exposición al solvente de residuos aromáticos y el número de sitios susceptibles al ataque enzimático, indican que el estado I tiene una estructura globular compacta. En vista de lo anterior, y teniendo en cuenta que la molécula de la papaina está formada por dos dominios [28], la conclusión más probable es que cada transición térmica (  $N \rightarrow I$  e  $I \rightarrow D$  ) corresponde al desdoblamiento independiente de uno de los dominios. Ya que el sitio activo de esta enzima está formado por residuos de ambos dominios, sería de esperarse que la actividad enzimática se perdiera necesariamente durante la primera transición, tal como lo observamos en este trabajo. Tiktopulo y Privalov [31] por medio de un estudio calorimétrico han llegado a una conclusión igual con respecto al desdoblamiento secuencial de los dominios

de esta proteína.

El análisis de la estructura secundaria en el estado intermediario mostró que éste es muy similar al segundo dominio de la molécula. Estos resultados nos permiten postular que en el mecanismo de desnaturalización la primera etapa involucra principalmente el desdoblamiento del primer dominio. Existe cierta evidencia previa, aunque indirecta, en favor de esta proposición. Shapira y Arnon [71] han informado sobre la reducción selectiva de uno de los tres enlaces disulfuro de la papaina; estos autores encontraron que en presencia de urea 6 M y a 37 °C, el enlace disulfuro entre los residuos de cisteína números 56 y 95 es reducido por 2-mercaptoetanol, mientras que los otros dos disulfuros ( 22-63 y 153-200 ) permanecen intactos. En condiciones más fuertemente desnaturalizantes (guanidina 6 M) los tres disulfuros de la proteína son reducidos completamente. Esto indica que una parte del dominio 1 es la más inestable frente a la desnaturalización inducida por solutos orgánicos.

Suponiendo que los fenómenos de desdoblamiento de los dominios son procesos independientes, lo cual parece ser válido al menos como una aproximación, calculamos los parámetros termodinámicos correspondientes a esos procesos (Tabla 3.2). La validez de este cálculo parece ser avalada por la suma de entalpías obtenida ( $128.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$ ), que es cercana al valor de  $122.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$  determinado calorimétricamente [31]. La estabilidad termodinámica de ambos dominios es muy similar a 20 °C; los valores de  $\Delta G^\circ$  difieren entre sí únicamente unas  $4 \text{ Kcal mol}^{-1}$

siendo mayor este parámetro para el dominio 2.

Ya que la estructura molecular de la papaína es conocida, en este trabajo tratamos de determinar que tipo de interacciones dan lugar a las diferencias de estabilidad entre las dos mitades de la proteína. Considerando que las fuerzas más importantes que contribuyen a la estabilidad de una proteína son los enlaces de hidrógeno y el efecto hidrofóbico, calculamos  $\Delta G^0$  para los dos dominios. Para este fin usamos valores promedio de las energías del enlace de hidrógeno y de  $\Delta G$  para la transferencia de grupos hidrofóbicos hacia un medio acuoso. A pesar de las muchas limitaciones involucradas en este cálculo, los resultados (Tabla 3.6) son alentadores ya que predicen una mayor estabilidad del dominio 2 que del dominio 1, del orden de 7 Kcal mol<sup>-1</sup>; en comparación con las 4 Kcal mol<sup>-1</sup> encontradas experimentalmente, el resultado parece bastante satisfactorio. En consecuencia, la magnitud de los factores que determinan la estabilidad de los dominios, según la Tabla 3.6, indica que el efecto hidrofóbico juega un papel muy importante en la mayor estabilidad de la segunda parte de la molécula. En relación con este punto, se observó que el etanol tiene un efecto muy importante sobre la naturaleza de la transición térmica de la papaína; sin embargo, la información existente respecto a la influencia de los alcoholes sobre la estabilidad de las proteínas es tan escasa que no permite una interpretación cuantitativa de los resultados.

Llendo más lejos todavía, sería importante dilucidar si la diferente estabilidad de los dominios de la papaína tiene alguna

implicación en la función biológica o en el proceso de plegamiento in vivo de la proteína. Aunque en este punto cualquier proposición sería necesariamente especulativa, es conveniente hacer algunos comentarios al respecto que puedan señalar las tendencias a seguir en trabajos futuros.

En primer lugar, se ha sugerido que la estabilidad marginal de las proteínas globulares tiene una gran importancia para el desempeño eficiente de la actividad biológica, ya que permite fluctuaciones estructurales en estas macromoléculas [3,6]; estos procesos dinámicos son necesarios para que, por ejemplo, una enzima pueda unirse a su sustrato y produzca una acción catalítica sobre el mismo. En el caso de la papaina se sabe que ambos dominios contribuyen tanto a la actividad catalítica como a la unión del sustrato [27]; por lo tanto, podría pensarse que para la actividad enzimática son más importantes las fluctuaciones locales en la interfase de los dominios que la estabilidad de éstos como un todo.

Por otro lado, el proceso de plegamiento o doblado de una proteína probablemente se inicia desde el momento mismo de la biosíntesis, es decir, desde que un fragmento de la cadena polipéptidica naciente adquiere el tamaño necesario para estabilizarse a través de las interacciones ya mencionadas anteriormente. En otras palabras, este proceso se inicia por el extremo amino terminal de la cadena. En una proteína como la papaina, formada por dos dominios, el primero de ellos inicia, quizá, el doblado en forma independiente para adquirir una

estructura globular típica; después del plegamiento del segundo dominio el proceso debe continuar con un rearreglo final que involucre interacciones entre ambas partes de la molécula. En la papaína los primeros nueve aminoácidos a partir del extremo amino terminal forman parte del sistema de hoja  $\beta$  antiparalela del segundo dominio ( figura 1.1 ); es probable entonces que estos nueve residuos sufran un rearreglo considerable durante la etapa final de ajuste inter-dominio, rearreglo que sería facilitado por la escasa estabilidad estructural del primer dominio molecular.

## REFERENCIAS

1. Ghéllis, C. y Yon, J. (1982) Protein Folding, pp. 223-243, Academic Press, Nueva York.
2. Schulz, G.E. y Schirmer, R.H. (1979) Principles of Protein Structure, pp. 27-44, Springer-Verlag, Nueva York.
3. Privalov, P.L. (1979) Adv. Protein Chem. **33**, 167-241.
4. Chothia, C. (1984) Annu. Rev. Biochem. **53**, 537-572.
5. Tanford, C. (1968) Adv. Protein Chem. **23**, 121-282.
6. Kim, P.S. y Baldwin, R.L. (1982) Annu. Rev. Biochem. **51**, 459-489.
7. Ghéllis, C. y Yon, J. *op. cit.*, pp. 307-312.
8. Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry, parte III, pp. 1084-1088, W.H. Freeman, San Francisco.
9. Pace, C.N. (1975) CRC Crit. Rev. Biochem. **3**, 1-43.
10. Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1974) J. Mol. Biol. **86**, 665-684.
11. Lumry, R., Biltonen, R. y Brandts, J.F. (1966) Biopolymers **4**, 917-944.
12. Brandts, J.F. (1964) J. Am. Chem. Soc. **86**, 4291-4301.
13. Brandts, J.F. y Hunt, L. (1967) J. Am. Chem. Soc. **89**, 4826-4838.
14. Tiktopulo, E.I. y Privalov, P.L. (1974) Biophys. Chem. **1**, 349-

357.

15. Wong, K.P. y Tanford, C. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 8518-8523.
16. Kuwajima, K., Nitta, K., Yoneyama, M. y Sugai, S. (1976) *J. Mol. Biol.* **106**, 359-373.
17. Robson, B. y Pain, R.H. (1976) *Biochem. J.* **155**, 331-344.
18. Wilson Miles, E., Yutani, K. y Ogasahara, K. (1982) *Biochemistry* **21**, 2586-2592.
19. Chignell, D.A., Azhir, A. y Gratzer, W. (1972) *Eur. J. Biochem.* **26**, 37-42.
20. Baig, M.A. y Salahuddin, A. (1978) *Biochem. J.* **171**, 89-97.
21. Ghélis, C., Tempête, M. y Yon, J. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **84**, 31-36.
22. Vita, C. y Fontana, A. (1982) *Biochemistry* **21**, 5196-5202.
23. Boto, Y. y Hamaguchi, K. (1987) *Biochemistry* **26**, 1879-1884.
24. Yon, J. (1978) *Biochimie* **60**, 581-591.
25. Wetlauffer, D.B. (1981) *Adv. Protein. Chem.* **34**, 61-92.
26. Baldwin, R.L. (1986) *Trends Biochem. Sci.* **11**, 6-9.
27. Glazer, A.N. y Smith, E.L. (1971) en *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) vol. 3, pp. 501-545, Academic Press, Nueva York.
28. Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R. y Wolthers, B.G. (1971) en *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.) vol. 3, pp. 485-499, Academic Press, Nueva York.
29. Kamphuis, I.G., Kalk, K.H., Swarte, M.B.A. y Drenth, J. (1984) *J. Mol. Biol.* **179**, 233-256.
30. Baker, E.N. y Drenth, J. (1987) en *Biological Macromolecules and Assemblies* (Jurnak, F.A. y McPherson, A., eds.) vol. 3, pp.

- 313-367, John Wiley & Sons, Nueva York.
31. Tiktopulo, E.I. y Privalov, P.L. (1978) FEBS Lett. **91**, 57-58.
  32. Hill, R.L., Schwartz, C. y Smith, E.L. (1959) J. Biol. Chem. **234**, 572-576.
  33. Weber, K. y Osborn, M. (1975) en The Proteins (Neurath, H. y Hill, R.L., eds.) vol. 1, pp. 200-201, Academic Press, Nueva York.
  34. Fish, W.W., Mann, K.G. y Tanford, C. (1969) J. Biol. Chem. **244**, 4989-4994.
  35. Glazer, A.N. y Smith, E.L. (1961) J. Biol. Chem. **236**, 2948-2951.
  36. Smith, E.L. y Parker, M.J. (1958) J. Biol. Chem. **233**, 1387-1391.
  37. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C., Jr. (1982) Anal. Biochem. **125**, 177-188.
  38. Cantor, C.R. y Schimmel, P.R. (1980) Biophysical Chemistry, parte II, pp. 412-413, W.H. Freeman, San Francisco.
  39. Robinson, G.W. (1975) Biochemistry **14**, 3695-3700.
  40. Anson, M.L. (1939) J. Gen. Physiol. **22**, 79-85.
  41. Bolotina, I.A., Chekhov, V.D. y Lugauskas, V.Y. (1979) Int. J. Quantum Chem. **16**, 819-824.
  42. Hennessey, J.P. y Johnson, W.C., Jr. (1981) Biochemistry **20**, 1085-1094.
  43. Chang, C.T., Wu, C.S.C. y Yang, J.T. (1978) Anal. Biochem. **91**, 13-31.
  44. Strickland, E.H. (1974) CRC Crit. Rev. Biochem. **2**, 113-175.

45. Strickland, E.H., Horwitz, J. y Billups, C. (1969) *Biochemistry* **8**, 3205-3214.
46. Ghélis, C. y Yon, J. *op. cit.*, pp. 289-295.
47. Donovan, J.W. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 1961-1967.
48. Donovan, J.W. (1973) *Methods in Enzymology* **27**, 497-525.
49. Hammes, G.G. (1982) *Enzyme Catalysis and Regulation*, pp. 1-13, Academic Press, Nueva York.
50. Laidler, K.J. y Bunting, P.S. (1973) *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, pp. 196-232, Clarendon Press, Oxford.
51. Matthyssens, B.E., Simons, G. y Kanarek, L. (1972) *Eur. J. Biochem.* **26**, 449-454.
52. Imoto, T., Fukuda, K. y Yagishita, K. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* **336**, 264-269.
53. Burgess, A.W., Weinstein, L.I., Gabel, D. y Scheraga, H.A. (1975) *Biochemistry* **14**, 197-200.
54. Su, Y.Y.T. y Jirgensons, B. (1977) *Arch. Biochem. Biophys.* **181**, 137-146.
55. Ptitsyn, D.B. (1987) *J. Protein. Chem.* **6**, 273-293.
56. Vita, C., Fontana, A., Seeman, J.R. y Chaiken, I.M. (1979) *Biochemistry* **18**, 3023-3031.
57. Rojo Domínguez, A. (1988) *Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.*
58. Labhardt, A.M. (1982) *J. Mol. Biol.* **157**, 331-355.
59. Charney, E. (1979) *The Molecular Basis of Optical Activity*, pp. 246-294, John Wiley & Sons, Nueva York.
60. Beychok, S. (1966) *Science* **154**, 1288-1298.

61. Bevington, P.R. (1969) Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences, pp. 164-180, McGraw-Hill, Nueva York.
62. Light, A. (1974) Proteins, p. 85, Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
63. Elwell, M.L. y Schellman, J.A. (1977) Biochim. Biophys. Acta 494, 367-383.
64. Kamphuis, I.B. (1983) Tesis Doctoral, Universidad de Groningen, Holanda.
65. Scheraga, H.A. (1963) en The Proteins (Neurath, H., ed.) vol. 1, pp. 478-594, Academic Press, Nueva York.
66. Hill, D.J.T., Cardinaux, F. y Scheraga, H.A. (1977) Biopolymers 16, 2447-2467.
67. Nozaki, Y. y Tanford, C. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2211-2217.
68. Privalov, P.L. (1982) Adv. Protein Chem. 35, 1-104.
69. Velicelebi, B. y Sturtevant, J.M. (1979) Biochemistry 18, 1180-1186.
70. Parodi, R.M., Bianchi, E. y Ciferri, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4047-4051.
71. Shapira, E. y Arnon, R. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1026-1032.