

40
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE
COMBINACIONES DE ENZIMAS DE DIFERENTE
CLASE CATALITICA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA ELENA CHANEZ CARDENAS



**FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR**

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. VIRGINIA ABRIN BATULE
Jefe de la División de Estudios Profesionales
Facultad de Ciencias
Presente

Los abajo firmantes, comunicamos a Usted, que habiendo revisado el trabajo de Tesis que realiz(ó)ron la pasante(s) MARIA ELENA CHAVEZ CARDENAS

con número de cuenta 9052211-8 con el Título:
VARIACIONES EN LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE COMBINACIONES DE
ENZIMAS DE DIFERENTE CLASE CATALITICA

Otorgamos nuestro Voto Aprobatorio y consideramos que a la brevedad deberá presentar su Examen Profesional para obtener el título de BIOLOGO

GRADO	NOMBRE(S)	APellidos COMPLETOS	FIRMA
DR.	RUY	PEREZ MONTFORT	<i>Ruy Perez Montfort</i>
Director de Tesis			
M. en C.	LUISA	ALBA LOIS	<i>Luisa Alba Lois</i>
BIOLOGA	EMMA BERTA	GUTIERREZ CIRLOS MADRID	<i>Emma Berta Gutierrez</i>
DR.	JESUS MANUEL LEON	CAZARES	<i>Jesus Manuel Leon</i>
Suplente			
M. en I.B.B.	DANIEL	ALEJANDRO FERNANDEZ VELASCO	<i>Daniel Alejandro Fernandez Velasco</i>
Suplente			

Este trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. Ruy Pérez Montfort, en el Departamento de Microbiología del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**Agradezco al Dr. Ruy Pérez Montfort
M. en I.B.B. Alejandro Fernández
Dr. Jesús Manuel León Cázares
M. en C. Luisa AlbaLois
Bióloga Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid,
por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo, así como sus
valiosos comentarios.**

**La mente se resiste a olvidar las cosas hermosas,
se aferra a ellas y olvida todo lo doloroso,
mágicamente anonadada por la belleza.**

Gioconda Belli

A Roberto Ch3nez Quiroz, con amor y admiraci3n infinitos: Porque mientras m3s tiempo pasa m3s te extraño y necesito.

A Josefina C3rdenas Aguilar, por su valor, fortaleza e incomparable amor, sin los cuales, nada de esto hubiera sido posible.

A mis hermanos Roberto Eduardo y Germ3n por acompa1arme en esta vida, porque los quiero mucho.

A mis amigos, por estar siempre y llenarme la vida de experiencias maravillosas.

A Edgar V3zquez, por supuesto, con todo mi amor.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Ruy Pérez Montfort con toda mi admiración y cariño, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de trabajo, por su asesoría académica y su paciencia infinita. Y muy especialmente por lo importante que es el haber proporcionado siempre un magnífico y sano ambiente para trabajar.

A la Técnico Académico Nallely Cabrera, por su valiosísima ayuda y asesoría técnica para realizar este trabajo. Por pasar conmigo todos los percances, por preocuparse por mí, y sobre todo por su apoyo y su cariño.

A la bióloga Emma Saavedra y a la M. en I.B.B. Laila Gutiérrez Kobbe por su amistad, su apoyo y sus consejos, por preocuparse por mí, por haber resuelto todas mis dudas y dedicarme muchas veces su tiempo.

Al Técnico Académico Jorge Ramírez Salcedo con mi más grande admiración. Por sus enseñanzas y su asesoría en las mediciones fluorométricas, por su paciencia y por correr siempre a mis llamados de auxilio; la mayor parte de este trabajo no hubiera podido realizarse sin su ayuda.

Al M. en I.B.B. Alejandro Sosa Peinado por su valiosísima ayuda en el análisis de los resultados y por las innumerables clases de cinética enzimática y más aún, por alentarme y motivarme siempre.

A la M. en I.B.B. Elena Hilario Andrade, por las clases de Bioquímica más maravillosas, por mostrarme este camino y por su amistad.

Al Q.F.B. Fabián Arechavaleta, entre muchas otras cosas por la figura 4 y la tabla I y por haberme salvado de todos y cada uno de mis percances frente a la computadora.

A Martín Camacho Zavaleta, con infinito cariño, quien durante muchos años acompañó mis aventuras por esta vida, quien vió cuando todo esto apenas era un casi impensable proyecto y compartió conmigo todos los planes y locuras que apenas ahora empiezan a tomar forma. A quien debo la mayor parte de lo que pienso y soy. Por su amor, cariño, fuerza y apoyo incondicional. Por tratar de comprender lo incomprendible, por crecer conmigo y sobre todo, por siempre sentirse orgulloso de mí.

Quiero agradecer con infinito cariño a Martha Rocha, Francisco Alvarez, José Manuel Linares, Jorge Calderón, Manuel Aguilar, Daniel Navarro, Fidel Almendáriz y Rolando Bárcenas por tantos años de quererme, compartir mi amor por la Biología, la poesía, la música, la literatura y todas las cosas hermosas que nos gustan de esta vida. Por estar conmigo donde estén, por haber pasado conmigo los buenos y también los terribles momentos. Gracias infinitas.

INDICE

Tabla de abreviaturas

Capítulo I Introducción

- I.1 Características generales de las proteinasas y su nomenclatura
- I.2 Clases catalíticas de las proteinasas
 - I.2.1 Proteinasas de serina
 - I.2.1.1 Familia de la quimiotripsina
 - I.2.1.2 Familia de la subtilisina
 - I.2.2 Proteinasas de cisteína
 - I.2.2.1 Familia de la papaína
 - I.2.2.2 Familia de las calpaínas
 - I.2.3 Proteinasas de aspártico
 - I.2.4 Metaloproteinazas
- I.3 Familias evolutivas de las proteinasas
- I.4 Proteinasas de serina: Características generales y mecanismo de acción
 - I.4.1 Hidrólisis de enlaces peptídicos por las proteinasas de serina
 - I.4.2 Características generales
 - I.4.3 Aspectos evolutivos de las proteinasas de serina
- I.5 Características particulares de tres proteinasas de serina
 - I.5.1 Quimiotripsina
 - I.5.2 Tripsina
 - I.5.3 Elastasa
- I.6 Proteinasas de cisteína: características generales y mecanismo de acción
 - I.6.1 Mecanismo de acción de las proteinasas de cisteína
 - I.6.2 Características particulares de la papaína
- I.7 Métodos para medir proteólisis
- I.8 Las proteinasas en los organismos eucarióticos y la predominancia de ciertas clases catalíticas entre los diferentes grupos.

Objetivos

Capítulo II Materiales y Métodos

- II.1 Preparación de azocaseína
 - II.1.1 Determinación de la concentración de proteína
 - II.1.2 Determinación de unidades de azocaseína
- II.2 Ensayos de actividad proteolítica con azocaseína como sustrato
 - II.2.1 Ensayos de actividad proteolítica para tres proteinasas de serina: ensayos con una sola proteinasa de serina.
 - II.2.2 Ensayos de combinación de dos proteinasas de serina
 - II.2.3 Ensayos de combinación de tres proteinasas de serina

- II.2.4 Ensayos de actividad proteolítica para una proteínasa de cisteína**
- II.2.5 Ensayos de actividad proteolítica para la combinación de dos proteínas de diferente clase catalítica**
- II.3 Determinación de un amortiguador óptimo para dos proteínas de diferente clase catalítica.**
- II.4 Ensayos de actividad para tripsina y papaína con un sustrato fluorogénico.**
- II.5 Ensayos de actividad para tripsina y papaína con las condiciones óptimas y Bz-L-Arg-MCA**
- II.6 Tratamiento de los datos**

Capítulo III Resultados

- III.1 Actividad proteolítica de tres proteínas de serina: digestión de azocaseína por tripsina, quimiotripsina y elastasa.**
 - III.1.1 Digestión de azocaseína por tripsina-quimiotripsina, tripsina-elastasa y quimiotripsina-elastasa, separadas y en combinación.**
 - III.1.2 Digestión de azocaseína por tripsina-quimiotripsina-elastasa, separadas y en combinación.**
- III.2 Actividad proteolítica de una proteínasa de cisteína: Digestión de azocaseína por papaína.**
- III.3 Actividad proteolítica resultado de la combinación de dos proteínas de diferente clase catalítica.**
- III.4 Determinación de un amortiguador óptimo para dos proteínas de diferente clase catalítica**
- III.5 Ensayos de actividad para tripsina y papaína con Bz-L-Arg-MCA**
 - III.5.1 Ensayos de actividad para tripsina y papaína, separadas y en combinación, con el amortiguador óptimo y el sustrato Bz-L-Arg-MCA**

Capítulo IV Discusión

Conclusiones

Referencias

Tabla de Abreviaturas

Asp	ácido aspártico
Bz-L-Arg-MCA	benzoiL-L-arginil-7-amino-4-metilcumarina
Cys	cisteína
DMSO	dimetil sulfóxido
EDTA	ácido etilendiamintetraacético
Glu	ácido glutámico
Gly	glicina
His	histidina
Km	constante de Michaelis
Kcat	constante catalítica
Kcat/Km	constante de especificidad
Leu	leucina
Lys	lisina
Met	metionina
NMR	resonancia magnética nuclear
Phe	fenilalanina
Ser	serina
Thr	treonina
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
Val	valina
V _{máx}	velocidad máxima

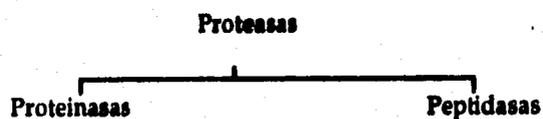
Capítulo I Introducción

I.1 Características generales de las proteinasas y su nomenclatura

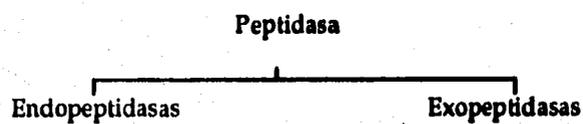
Las enzimas proteolíticas son aquellos catalizadores que realizan la degradación de proteínas a pequeños péptidos o hasta aminoácidos por hidrólisis de los enlaces peptídicos. Los términos de "proteasa", "peptidasa", "enzima proteolítica" y "proteínasa", generalmente se usan como sinónimos para denominar a este tipo de enzimas. Sin embargo, existen dos sistemas de nomenclatura propuestos para las proteinasas, ambos sistemas se han incorporado a la nomenclatura bioquímica moderna y se encuentran en la tabla I. El primer sistema fue propuesto en 1928 por Grassmann y Dyckerhoff, quienes reconocieron que dentro de las proteasas o enzimas proteolíticas existían dos grupos de enzimas: unas actuaban preferentemente sobre proteínas completas y otras lo hacían sobre péptidos pequeños. Por lo anterior, propusieron el término *proteínasa* para aquellas enzimas que mostraban una especificidad por proteínas intactas y las que actuaban sobre oligopéptidos se denominaron *peptidasas*. El segundo sistema de nomenclatura fue propuesto por Bergmann y Ross en 1936 en los Estados Unidos y en éste se reconoce a una *peptidasa* como una hidrolasa de enlaces peptídicos. Dentro de este grupo se encuentran a su vez hidrolasas, que requieren de la presencia de grupos amino y carboxilo terminales, y que actúan mejor en cadenas largas lejos de los grupos terminales; a las primeras se les denominó *exopeptidasas* y a las segundas *endopeptidasas*. Finalmente el esquema moderno considera sinónimos a los términos *peptidasa* o *hidrolasa de enlaces peptídicos* con el de *proteasa* o *enzima proteolítica*; las *proteinasas*, que es el término que se usa en el presente trabajo, son *endopeptidasas*, es decir, enzimas proteolíticas que degradan cadenas proteicas largas (Barret, 1977; Barret y Salvensen, 1986).

Tabla I. Diagrama de los tres esquemas de nomenclatura *

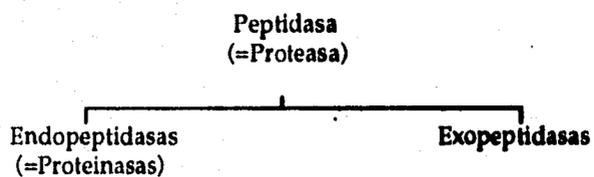
(a) Grassmann y Dyckerhoff (1928)



(b) Bergmann y Ross (1936)



(c) Esquema Moderno (Barret, A., 1986)



* Barret y Salvensen, 1986.

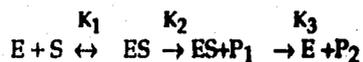
Las proteinasas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y realizan una gran variedad de funciones. Muchas de ellas existen como dominios en proteínas multifuncionales de gran tamaño, sin embargo, también se encuentran como pequeñas cadenas polipeptídicas. Las proteinasas son de vital importancia para el control de un gran número de procesos celulares, de manera general, funcionan tanto en la activación de moléculas biológicas como en una gran variedad de fenómenos de procesamiento de péptidos y proteínas. También participan en una multitud de procesos como son la reorganización de citoesqueleto, la fusión y diferenciación celular, la síntesis de proteínas, la activación e inactivación de hormonas, la fecundación, el crecimiento, la defensa inmunológica, la necrosis, la coagulación de la sangre, etc. Existen genes virales que codifican para proteinasas que hidrolizan los enlaces peptídicos de los precursores de las moléculas necesarias para producir la cápside; las bacterias producen una gran variedad de proteinasas extracelulares que degradan proteínas circundantes y los organismos superiores utilizan proteinasas para funciones tales como la digestión de los alimentos, corte de péptidos señal, control de la presión sanguínea y coagulación de la sangre (Branden y Tooze, 1991).

Históricamente, la proteólisis enzimática se ha asociado con la digestión de proteínas en animales y en el hombre, por lo que las enzimas digestivas de las secreciones pancreáticas y gástricas de los mamíferos son algunas de las mejor caracterizadas tanto en estructura como en función. Dentro de este grupo de enzimas se encuentran la tripsina, la quimiotripsina, la pepsina y las enzimas lisosomales catepsinas B y D. Recientemente, se ha prestado gran atención a aquellas proteinasas que tienen una función reguladora en una gran variedad de procesos fisiológicos que van, desde el procesamiento de cadenas polipeptídicas, proteínas hormonales y precursores enzimáticos, hasta el

desarrollo y fecundación, así como muchos otros procesos proteolíticos importantes para las funciones celulares. Las proteinasas son también una de las herramientas más importantes en el análisis de secuencias de proteínas, en la identificación y aislamiento de dominios de proteínas complejas y en la obtención de proteínas nativas a partir de tejidos (Neurath, 1984).

Otro de los aspectos relevantes de la acción de las proteinasas es que la proteólisis tiene un papel muy importante en la patogénesis de algunos microorganismos, ya que en la interacción entre el hospedero y el patógeno, las proteinasas se requieren para penetrar el tejido del hospedero, debilitar los mecanismos de defensa o para la nutrición durante la infección (McKerrow y col. 1993).

El mecanismo de acción de las proteinasas en general tiene la siguiente secuencia:



En esta secuencia se observa que el primer paso en una reacción enzimática es la formación de un complejo enzima-sustrato (E-S) con una constante de equilibrio K_1 . La formación de este complejo requiere de interacciones entre sitios específicos de la enzima y algunos aminoácidos que se encuentran en la cadena polipeptídica del sustrato. El siguiente paso en dicha reacción incluye un ataque a un enlace peptídico del sustrato por un grupo químico activado que se encuentra en el sitio catalítico de la enzima. Con esto se lleva a cabo la liberación del primer producto (P_1), la otra parte del sustrato permanece asociado con la enzima; la reacción se completa cuando se libera el segundo producto (P_2) y la enzima libre se regenera (E) (Polgár, 1989). En general, las proteinasas, como todas las enzimas tienen la función de incrementar la velocidad de una reacción

química al disminuir la energía de activación para la conversión del sustrato en producto.

Las maneras en que las enzimas disminuyen la energía de activación pueden ser:

- a) Por proveer de grupos catalíticamente competentes para el mecanismo específico de la reacción.
- b) Por unir algunos sustratos en una orientación apropiada para que la reacción sea catalizada.
- c) Por disminuir la energía de activación de la reacción, al poseer la habilidad de unir con mayor afinidad al sustrato en el estado de transición que es su estado normal. (Branden y Tooze 1991)

1.2 Clasificación de las proteinasas

Basándose en el análisis de las propiedades *in vitro* de las proteinasas, éstas pueden ser clasificadas por el intervalo de pH en el cual se encuentran, por su habilidad para hidrolizar proteínas específicas, o su similitud con proteinasas bien caracterizadas (North, 1982)a. Anteriormente las proteinasas fueron clasificadas de acuerdo al tamaño molecular, carga o especificidad por el sustrato (ésta es muy difícil de definir, por lo que este criterio no es muy aceptado para clasificar a las proteinasas).

Actualmente existe un sistema basado en la comparación de sitios activos, mecanismo de acción y estructura tridimensional, y, recientemente se ha propuesto una clasificación que considera las relaciones evolutivas de las proteinasas. Estas dos clasificaciones son explicadas en este texto. La primera de ellas se conoce como clasificación por clases catalíticas, y la segunda determina familias evolutivas de proteinasas.

1.2.1 Clases catalíticas de las proteinasas

En 1960, Hartley resuelve el problema que existía para elegir el criterio de clasificación de las proteinasas, mostrando que éstas actúan a través de cuatro distintos mecanismos de reacción. La International Union of Biochemistry reconoce actualmente a estos cuatro mecanismos de acción y dentro de dichas clases se agrupan 6 familias de proteinasas. Cada familia tiene una característica común que es el arreglo de los residuos de aminoácidos que forman el sitio activo. Aunque las proteinasas de una misma familia son diferentes en secuencia primaria y en estructura tridimensional, poseen en común una geometría del sitio activo y un mecanismo de acción muy semejantes.

Actualmente se conocen algunos cientos de proteinasas y todas catalizan la misma reacción: hidrólisis de enlaces peptídicos internos de los polipéptidos. A partir del conocimiento de la estructura de las proteinasas en los años 50s y 60s, surgió la clasificación de las mismas en base a sus mecanismos catalíticos y su origen evolutivo.

Se reconocen 4 distintos tipos de endopeptidasas de acuerdo con los grupos químicos que son responsables de su actividad catalítica: las proteinasas de serina, que presentan residuos de Ser e His en su sitio catalítico, las proteinasas de cisteína que presentan residuos de Cys e His, las proteinasas de aspártico que usan en su proceso catalítico dos residuos ácidos, y por último, las metaloproteiniasas que utilizan un ion metálico y un residuo de Glu en el mecanismo de acción (Polgár, 1989).

Cada uno de estos grupos de proteinasas formados con base en mecanismos catalíticos puede a su vez ser dividido en familias que incluyen enzimas

relacionadas evolutivamente, es decir, cada uno de los miembros de una familia de proteinasas se consideran como resultado de divergencia evolutiva a partir de un ancestro común (Barret y Rawlings, 1991). Los cuatro grupos forman a su vez dos grupos mayores: uno constituido por las proteinasas de serina y de cisteína, las cuales integran complejos enzimáticos covalentes; y otro formado por las de aspártico y las metaloproteinasa, las cuales no constituyen éste tipo de complejos.

1.2.2 Proteinasa de Serina

El mecanismo catalítico utilizado por las proteinasas de serina parece ser el más exitoso (en términos evolutivos), de los que han desarrollado estas enzimas, es por eso que esta clase catalítica constituye el grupo más diversificado y numeroso y tienen un gran interés ya que participan en un gran número de procesos biológicos.

El grupo de las proteinasas de serina muestra un pH óptimo de 7.5 a 8. Está formado por dos familias, cada una de ellas agrupa enzimas que tienen un ancestro común. Estas familias son la de la Quimiotripsina y la de la Subtilisina. Las proteinasas que forman parte de estas dos familias se encuentran tanto en organismos procarióticos como eucarióticos, (Barret y Rawlings, 1986).

1.2.2.1 Familia de la Quimiotripsina

Las proteinasas de la familia de la quimiotripsina presentan una notable conservación de la estructura del sitio catalítico. Los aminoácidos involucrados participan directamente en la actividad catalítica y son la His⁵⁷, Asp¹⁰² y Ser¹⁹⁵ según la numeración de la quimiotripsina. Estos residuos forman la "tríada catalítica" que se encuentra conservada en todas las proteinasas de esta familia. Por ejemplo, las enzimas de bacterias que son muy pequeñas (180

residuos), difieren muy poco de las enzimas del páncreas de los mamíferos o de los granulocitos.

1.2.2 Familia de la Subtilisina

Los miembros de esta familia presentan una secuencia conservada de aminoácidos en el sitio catalítico. Este está formado, igual que en la familia de la quimi tripsina, por una tríada catalítica compuesta por los residuos Asp³², His⁶⁴, y Ser²²¹ según la numeración de la subtilisina. Hasta hace pocos años se creía que las proteinasas de la familia de la subtilisina estaban restringidas a las bacterias, sin embargo, recientemente se ha encontrado que se encuentran ampliamente distribuidas en varios organismos, incluyendo tanto plantas como varios animales superiores.

La tríada catalítica de estas dos familias es semejante, y los aminoácidos se encuentran en una geometría muy similar en la estructura terciaria. Sin embargo, la secuencia polipeptídica y los patrones de plegamiento son muy diferentes. El mecanismo catalítico de las dos familias es el mismo, sin embargo, sus orígenes evolutivos son independientes, por lo que la existencia de sitios catalíticos similares es resultado de una convergencia evolutiva. (Branden y Tooze, 1991; Barret y Rawlings, 1991).

Existen otras proteinasas de serina que no pueden ser agrupadas dentro de las dos familias descritas anteriormente. Entre éstas se encuentra la prolil endopeptidasa que se halla tanto en bacterias como en mamíferos; el complejo multicatalítico, que es un complejo proteolítico de alto peso molecular y que se localiza en el hígado y otros tejidos de animales superiores; las endopeptidasas de adenovirus, las proteasas IV y VII etc. (Rivett, 1989). Todas ellas tienen funciones específicas y se encuentran en una gran variedad de organismos lo

cual da un ejemplo de que las proteinasas de serina tienen un mecanismo catalítico muy exitoso que ha permitido que se diversifiquen y distribuyan ampliamente. En la tabla II se muestran las proteinasas de serina con las dos familias que la forman así como aquellas que se encuentran dentro de este grupo pero que no pertenecen a ninguna de las dos familias definidas.

TABLA II*

Clase catalítica	FAMILIA (miembros representativos)
Serina	<p>QUIMIOTRIPSINA. Endopeptidasas A y B de <i>Streptomyces griseus</i>, endopeptidasa VB de <i>Staphylococcus</i>, endopeptidasa colagenolítica de <i>Uca</i>, tripsina, elastasa pancreática, proteasa E, quimasa, triptasa, catepsina G, elastasa de leucocitos, enzimas de coagulación, plasmina, activadores del plasminógeno, kalikreinas, trombina, hepsina, endopeptidasa de serina dependiente de calcio.</p> <p>SUBTILISINA. Termitasa, endopeptidasa K, endopeptidasa de <i>Vibrio</i>, endopeptidasa de <i>Yarrowia</i>, elastasa de <i>Bacillus</i>, endopeptidasa alcalina de <i>Aspergillus</i>, cucumisina, endopeptidasa B de levadura.</p> <p>FAMILIA NO DEFINIDA. Prolil endopeptidasa, complejo multicatalítico, endopeptidasas de adenovirus, proteinasa IV de <i>E.coli</i>, endopeptidasa Ti, endopeptidasa La.</p>

* Tomado de Barret y Rawlings, 1991.

1.2.3 Proteinasa de Cisteína

Las proteinasas de cisteína se encuentran en bacterias, microorganismos eucarióticos, plantas y animales. Son activas a un pH de 8 y requieren de la presencia de grupos reductores. Este grupo muestra una gran similitud con el de las proteinasas de serina, debido a que ambas forman un complejo enzimático covalente durante la proteólisis (Polgár, 1989). Existen dos familias de proteinasas de cisteína, una de ellas es la de la papaína y la otra es la de las calpainas; existe además un tercer grupo formado por otras enzimas que no han podido ser incluidas dentro de las dos familias mencionadas. La mayoría de las proteinasas de cisteína se encuentran formando parte de la familia de la papaína, la enzima representativa de este grupo es justamente la papaína que se obtiene de la especie *Carica papaya*.

1.2.3.1 Familia de la Papaína

La familia de la papaína incluye otras proteinasas de plantas, así como las catepsinas B, H, L y S de los lisosomas de los mamíferos. Muchos protoctistas tienen proteinasas de cisteína muy parecidas a la papaína y se ha sugerido que las primeras enzimas con una actividad muy semejante a la papaína se encontraban como enzimas digestivas de las vacuolas de los protoctistas. Las enzimas descendientes de dicha enzima ancestral se encuentran actualmente asociadas a las vacuolas de las células de los vegetales y los lisosomas de las células de los animales. La característica más notable de las proteinasas que forman esta familia es que conservan la estructura alrededor de los residuos que intervienen directamente en la catálisis enzimática, que son la Cys²⁵ y la His¹⁵⁹ según numeración de la papaína (Barret, 1991.).

Dentro de la familia de la papaína se encuentran también las catepsinas, que son proteinasas lisosomales que tienen un papel muy importante en la hidrólisis

de las proteínas intracelulares. Tres catepsinas lisosomales están muy bien caracterizadas y son las catepsinas B, H y L. Las secuencias de aminoácidos de las catepsinas B y H son altamente homólogas con la secuencia de la papaína, con lo que se deduce que las proteinasas de cisteína de las plantas y de los mamíferos han evolucionado a partir de un ancestro común.

1.2.3.2 Familia de las Calpaínas

Las calpaínas forman otra familia dentro de las proteinasas de cisteína y son enzimas intracelulares de alto peso molecular; se encuentran principalmente en la fracción citoplásmica, sin embargo, también existen asociadas a las membranas.

Las calpaínas son proteinasas de cisteína dependientes de calcio y están ampliamente distribuidas en las células de los animales tanto de vertebrados como de invertebrados. En las calpaínas, el segmento responsable de la actividad proteolítica de la molécula tiene residuos Cys e His y es muy similar al de la papaína.

Existen otras proteinasas de cisteína que se encuentran en bacterias pero que son muy diferentes de la papaína en estructura y aún no se tiene la seguridad de que tengan el mismo origen evolutivo. En la tabla III se pueden observar las proteinasas de cisteína de las dos familias mencionadas anteriormente, así como las proteinasas de cisteína que no pertenecen a dichas familias.

1.2.4 Proteinimasas de Aspártico

Las proteinimasas de aspártico son endopeptidasas que tienen un pH ácido como óptimo ya que su actividad catalítica depende de la existencia en la molécula de dos grupos carboxilo. Estos grupos son, en los organismos superiores, un par de residuos de ácido aspártico, Asp³² y Asp²¹⁵ (en la numeración de la pepsina) que se encuentran en dos segmentos polipéptidicos muy similares. Los dos

grupos carboxilo están lo suficientemente cercanos el uno del otro como para compartir un puente de hidrógeno entre dos de sus oxígenos. Las proteinasas de aspártico al igual que las metaloproteinasa, no forman un intermediario covalente entre la enzima y el sustrato y actúan eficientemente en los enlaces peptídicos que se forman entre dos aminoácidos hidrofóbicos voluminosos como es el caso de Leu-Tyr, Tyr-Leu, Phe-Phe, y Phe-Tyr (Barret,1986). Estas proteinasas se encuentran en todos los grupos de organismos eucarióticos pero son escasas en las bacterias. Originalmente se pensaba que este grupo estaba restringido a los organismos eucarióticos, sin embargo, *Scytalidium*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas* son ejemplos de bacterias en los que se han encontrado también estas enzimas.

De todas las proteinasas de aspártico la más estudiada ha sido la pepsina, que es una proteínasa que actúa en la digestión y se localiza en el estómago de los animales superiores. En general, estas proteinasas de aspártico son secretadas como precursores inactivos que posteriormente son convertidos a enzimas activas por proteólisis de una extensión N-terminal de la cadena polipeptídica (tabla IV).

TABLA III*

Clase catalítica	FAMILIA (Miembros representativos)
Cisteína	<p data-bbox="525 532 1143 677">PAPAINA. Papaína, actinidina, quimiopapaína, endopeptidasas III y IV de papaya, ficina, aleurina, calotropina, endopeptidasas de cisteína de tomate, frijol de soya, <i>Trypanosoma</i>, <i>Schistosoma</i>, <i>Dictyostelium</i> y catepsinas B, H, L y S.</p> <p data-bbox="525 707 1122 763">CALPAINA. Endopeptidasas de cisteína de <i>Streptococcus</i>, clostripaina.</p> <p data-bbox="525 793 1143 896">FAMILIA NO DEFINIDA. Endopeptidasas de picornavirus, endopeptidasas de virus de polio, de virus de la encefalomiocarditis, calcivirus de felinos y virus similares de plantas.</p>

TABLA IV*

Clase catalítica	FAMILIA (miembros representativos)
Aspártico	<p data-bbox="534 1180 1143 1268">PEPSINA: Gastricina, quimosina, renina, catepsinas D y E, penicilopepsina, rhizopuspepsina, endothiapepsina, aspergillopepsinas.</p> <p data-bbox="534 1298 1086 1437">FAMILIA NO DEFINIDA. Proteasa B <i>Scytalidium</i> Endopeptidasa del HIV, endopeptidasas del virus de la leucemia, endopeptidasa del virus del sarcoma de Rous, endopeptidasa del retrovirus de simio, termopsina.</p>

* Barret y Rawlings, 1991.

1.2.5 Metaloproteinasas

El grupo de las metaloproteinasas se considera muy antiguo desde el punto de vista evolutivo y está ampliamente distribuido en bacterias, estreptomicetes, hongos y organismos superiores. La metaloproteinasas mejor caracterizada es una termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*. Su sitio activo posee un átomo de zinc unido a dos cadenas laterales de His y una de un Glu. En general, las metaloproteinasas son enzimas hidrolíticas que al igual que las proteinasas de aspártico no forman un intermediario covalente. En su forma natural tienen como metal catalíticamente activo al zinc, aunque algunos otros metales de transición pueden sustituirlo; muestran una actividad máxima a pH 7 y algunas, como la termolisina, no son enzimas estrictamente selectivas, sin embargo, otras metaloproteinasas sí requieren un sustrato específico (tabla V).

TABLA V*

Clase catalítica	FAMILIA (miembros representativos)
Metaloproteinasas	<p>TERMOLISINA. Bacilolisina, elastasa de <i>Pseudomonas</i>, colagenasa intersticial, colagenasa de neutrófilos, gelatinasas A y B, metaloendopeptidasa de <i>Serratia</i>, proteasas A y B de <i>Erwinia</i>.</p> <p>FAMILIA NO DEFINIDA. Metaloendopeptidasas del veneno de serpiente, metaloendopeptidasa de membrana, proteasa D de levadura, metalopeptidasa IgA-específica, astacina, colagenasas microbianas, insulinasas, endopeptidasa Pi, metalopeptidasas β-Líticas.</p>

*Barret y Rawlings, 1991.

1.3 Familias Evolutivas de las Proteinases

Aunque la clasificación expuesta es la reconocida hasta ahora, es necesario mencionar que recientemente se propuso una nueva clasificación de las proteinasas que considera sus relaciones evolutivas a partir de las secuencias polipeptídicas (Rawlings, 1993.).

Debido a que se conoce la secuencia polipeptídica de más de 600 peptidasas, el análisis y comparación de las mismas ha permitido inferir sus relaciones evolutivas. En esta clasificación se reconocen clases o tipos de peptidasas que se distinguen por los grupos químicos responsables de la catálisis (lo cual recuerda la clasificación por clases catalíticas). Pero por otro lado, se reconocen dentro del término familia a aquellas proteínas que muestran relaciones evolutivas en el alineamiento y comparación de las secuencias, ya sea en toda la secuencia o por lo menos en la región responsable de la actividad catalítica. Aquellas familias con indicios de relaciones evolutivas pero que carecen de similitudes en la secuencia estadísticamente significativas, se colocan en grupos denominados clanes.

En la clasificación evolutiva se reconocen cinco clases de peptidasas: de serina, cisteína, aspártico, metalopeptidasas y aquellas con un mecanismo catalítico desconocido.

Dentro de las peptidasas de serina se han propuesto 22 familias (S1, S2, S3,..... S22). Solamente mencionaremos que la familia S1 es la familia de la quimi tripsina y la S8 es la de la subtilisina. La familia S1 incluye a tres proteinasas utilizadas en este trabajo: tripsina, quimi tripsina y elastasa pancreática. La principal característica de esta familia es que todos sus miembros presentan la tríada catalítica formada por His, Asp y Ser. Algunas familias de

esta clase catalítica presentan una estructura tridimensional muy semejante a la familia S1, por lo que se les ha agrupado en un clan.

Las peptidasas de cisteína agrupan 14 familias dentro de las que se encuentran la familia de la papaína (C1) y la de las calpaínas (C2). En C1 se encuentra otra proteinasa de importancia en este trabajo, la papaína. Las peptidasas de aspártico solo incluyen dos familias A1 y A2 y las metalopeptidasas incluyen 25 familias, ya que las estructuras de las metaloproteinasas son excepcionalmente diversas. Por otro lado, el grupo que incluye a las peptidasas de mecanismo catalítico desconocido está formado por 21 familias.

Este método de clasificación basado en relaciones estructurales y evolutivas de las peptidasas, aunque no es muy utilizado aún es muy preciso. Una característica muy importante es que, aunque hace una agrupación más exhaustiva de las peptidasas, es totalmente compatible con el sistema de clasificación por clases catalíticas por lo que debe ser tomado en cuenta para utilizarse como una extensión de esta clasificación.

I.4 Proteinasas de Serina: Características Generales y Mecanismo de Acción

Las proteinasas de serina han sido estudiadas desde el punto de vista cinético así como estructural y por medio de cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear y mutagénesis dirigida. A partir de estos análisis se ha podido dilucidar tanto su estructura tridimensional como su mecanismo de acción.

En la sección I.2.2 se menciona que existen dos familias de proteinasas de serina; en el presente trabajo se utilizaron tres proteinasas de serina que pertenecen a la familia de la quimiotripsina (Ver tabla II). Cada una posee características particulares que se tratarán posteriormente, sin embargo, todas ellas actúan con un mecanismo común y comparten características que se describirán a continuación.

I.4.1 Hidrólisis de enlaces peptídicos por las proteinasas de serina.

El mecanismo general por el cual las proteinasas de serina cortan los enlaces peptídicos dentro de un polipéptido y producen péptidos liberados se puede resumir en dos pasos:

- 1) Formación del complejo enzima-sustrato cuando un carbono del sustrato forma un enlace covalente con el grupo hidroxilo del residuo de Ser del sitio catalítico de la enzima. Se forma entonces un estado de transición intermedio donde los enlaces del carbono poseen una geometría tetrahédrica. Por medio de dicho estado de transición se forma un intermediario acilo. (Fig. 1). A este paso

se le conoce también como acilación y se libera un producto peptídico, el otro péptido se mantiene unido al intermediario acilo de la enzima.

2) El siguiente paso, también conocido como desacilación, consiste en que el intermediario acil-enzima es hidrolizado por una molécula de agua, de manera que se libera el segundo péptido con un extremo carboxilo y se regenera el grupo hidroxilo de la serina. El residuo His de la tríada catalítica es capaz de aceptar un protón durante la formación del estado de transición tetrahédrico. El residuo Asp de la misma tríada permanece cargado negativamente y estabiliza a la His cargada positivamente durante el estado de transición (Kraut, 1988)

1.4.2 Características Generales

Para poder llevar a cabo este mecanismo las proteinasas de serina tienen ciertas características estructurales en común que permiten que su mecanismo de acción catalítica sea lo más eficiente posible. Dentro de estas características comunes se encuentra la existencia de una tríada catalítica formada por los aminoácidos His, Asp y Ser. Estos tres residuos se encuentran alejados en la secuencia de aminoácidos de la cadena polipeptídica, sin embargo, en la estructura tridimensional de la molécula se encuentran muy cercanos y forman el sitio activo. La serina de la tríada catalítica integra, a través de su grupo hidroxilo, el complejo E-S por medio de un enlace covalente con un carbono, llamado C1 del sustrato. El residuo de His es capaz de aceptar un protón del grupo OH de la serina reactiva, de manera que la formación del estado de transición tetrahédrico se ve facilitado y el Asp que permanece con carga negativa estabiliza la forma protonada de la His. Otra estructura propia de estas proteinasas es la presencia de un compartimento o espacio llamado "agujero oxianión", en el cual se encuentran grupos que son capaces de formar

puentes de hidrógeno con el átomo de oxígeno unido al carbono en el estado de transición.

Poseen también una cadena principal que une al sustrato de una manera no específica, es decir, los átomos de la cadena principal de los sustratos polipeptídicos se unen a la enzima de una manera no específica formando puentes de hidrógeno con los átomos de la cadena principal de una región en asa

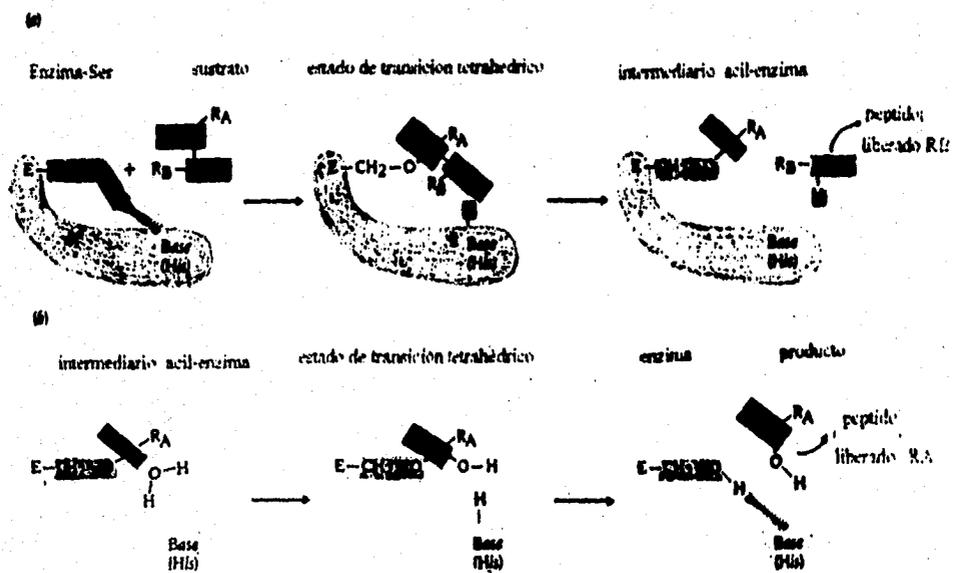


Figura 1 (a) Formación del intermediario acil-enzima que incluye un grupo OH de la Ser de la tríada catalítica. (b) desacylación del intermediario. El residuo His puede aceptar un protón durante la formación del estado de transición. (Tomado de Branden y Tooze, 1991).

de la enzima (Branden,1991). Esta unión no específica contribuye también a la estabilización del estado de transición (Kraut, 1988., Warshel,y col., 1989)

Dentro de la estructura tridimensional de la enzima existe un compartimento hidrofóbico en el que son orientadas las cadenas que hidroliza la enzima y que se conoce como "bolsa de especificidad", por lo que algunas de las proteinasas de serina muestran una gran especificidad por un sustrato determinado.

En la figura 2 se pueden observar las estructuras explicadas en esta sección.

1.4.3 Aspectos Evolutivos de las Proteinasas de Serina

Las proteinasas de serina presentan relaciones evolutivas muy interesantes como son los casos de convergencia y divergencia evolutiva que se pueden deducir a partir de la observación de cada una de ellas y sus respectivas características.

Los miembros de la familia de la Quimiotripsina poseen secuencias de aminoácidos similares, en especial la tripsina, la quimiotripsina y la elastasa pancreática. Estas tres enzimas son consideradas como un caso de divergencia evolutiva en el cual las características comunes provienen de una proteinasa ancestral a partir de la cual divergieron todas las proteinasas de serina de esta familia. Dentro del grupo de las proteinasas de serina se puede observar también un caso de convergencia evolutiva representado por la subtilisina y la quimiotripsina:

La subtilisina tiene, al igual que los miembros de la familia de la quimiotripsina, una secuencia de aminoácidos conservada en el sitio catalítico, de manera que existe una tríada catalítica formada por Asp³², His⁶⁴ y Ser²²¹, que aunque ocupan diferentes posiciones en relación a la quimiotripsina muestran una disposición en la estructura terciaria muy similar. Sin embargo, tanto la secuencia de aminoácidos de la molécula como la estructura tridimensional de la subtilisina son absolutamente diferentes a las proteinasas de la familia de la quimiotripsina.

La subtilisina no está relacionada evolutivamente con la familia de la quimiotripsina, sin embargo, a partir del análisis de la estructura tridimensional se sabe que los residuos que participan en la tríada catalítica de la subtilisina, el agujero oxianión y el sitio de unión a sustrato se encuentran en la misma posición que en la quimiotripsina. Es así, que a partir de ancestros no relacionados se puede observar que ambas enzimas tienen la misma relación

estructural para lograr el mismo mecanismo catalítico, con lo que se representa un caso muy claro de convergencia evolutiva a nivel molecular, ya que se obtuvo una misma solución por procesos evolutivos paralelos e independientes (Rawlings y Barret, 1993; Branden y Tooze, 1991; Neurath, 1984)

1.5 Características particulares de tres proteinasas de serina

En el presente trabajo se utilizaron tres proteinasas de serina: Tripsina, quimiotripsina y elastasa pancreática. Las tres pertenecen a la misma familia, por lo tanto tienen un ancestro común y comparten todas las características generales explicadas anteriormente.

Estas tres proteinasas son enzimas digestivas, cerca de un 40% de la secuencia de aminoácidos es idéntica y en los residuos que se encuentran localizados internamente en la molécula la identidad alcanza un 60 %. La estructura tridimensional es muy similar para las tres. Son secretadas por el páncreas como precursores inactivos que son activados por el corte de un enlace peptídico.

A pesar de esta similitud estructural y de mecanismo, estas tres enzimas difieren marcadamente en la especificidad por el sustrato, de tal manera que las características de cada una de ellas así como su especificidad serán explicadas a continuación.

1.5.1 QUIMIOTRIPSINA

La quimiotripsina se sintetiza como un precursor inactivo y de una sola cadena llamado quimiotripsinógeno en las células β del páncreas. La forma activa se obtiene por corte de un enlace peptídico del quimiotripsinógeno y ocurre en el intestino delgado. La quimiotripsina es una proteinasa con una masa molecular de 25 kDa que está formada por tres cadenas polipeptídicas unidas por dos puentes disulfuro intercadena (Barret y Mc Donald, 1980) Posee

algunas regiones β plegadas antiparalelas y una pequeña α -hélice, todos los grupos cargados se encuentran en la superficie de la molécula, excepto por los tres residuos que participan en la catálisis.

La función de la quimi tripsina es catalizar la hidrólisis de proteínas en el intestino delgado donde selecciona preferentemente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de las cadenas aromáticas como en Tyr, Trp y Phe, así como de residuos hidrofóbicos largos como la Met. Es por eso que la quimi tripsina tiene a los residuos Gly 216 y 226 así como la Ser 189 en el compartimento de especificidad (Fig.3)(Branden y Tooze, 1991; Blow,1976)

1.5.2 TRIPSINA

Al igual que la quimi tripsina, la tripsina se sintetiza como un precursor inactivo, el tripsinógeno, por las células β del páncreas de mamífero y se activa en el intestino delgado. Tiene una masa molecular de 23.5 kDa y posee una gran especificidad por cortar los enlaces Arg-X o Lys-X.

En el compartimento de especificidad la tripsina tiene un residuo de Asp en lugar de la Ser presente en la quimi tripsina, y posee también dos residuos de Gly. El Asp en dicho compartimento es capaz de formar un fuerte enlace electrostático con un extremo cargado positivamente como es el caso de la Lys o la Arg. (Barret y McDonald; 1980, Branden y Tooze, 1991)

1.5.3 ELASTASA

La elastasa pancreática se encuentra en el intestino delgado y se produce por la acción de la tripsina sobre la proelastasa, que es el precursor inactivo y que también es secretado por las células β del páncreas de mamífero. Es una sola cadena polipeptídica con una masa molecular de 25.9 kDa cuya función es solubilizar a la elastina e hidrolizar enlaces en cadenas polipeptídicas, así como

en ésteres y amidas sintéticos. En la elastasa, el compartimento de especificidad tiene características particulares, como es que los dos residuos de Gly, que se encuentran en la quimiotripsina y la tripsina, estén sustituidos en la elastasa por los residuos de Val y Thr que por ser muy voluminosos ocupan casi todo el compartimento con grupos hidrofóbicos. Consecuentemente, la elastasa no es capaz de cortar residuos adyacentes a cadenas largas o cargadas, pero puede cortar aquellos residuos unidos a cadenas pequeñas y no cargadas (Fig.3) (Barret y McDonald; 1980, Branden y Tooze, 1991)

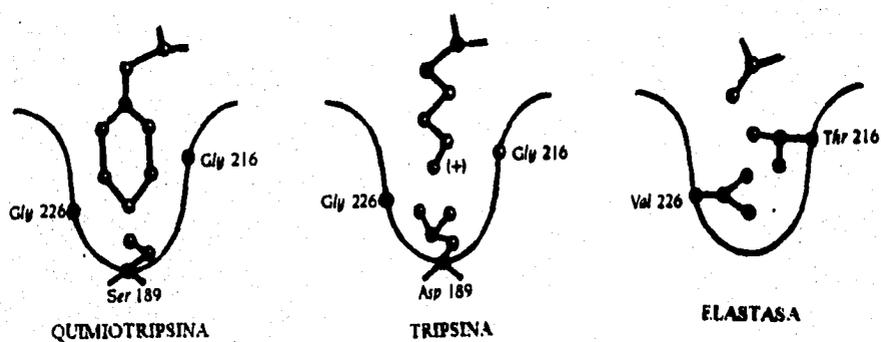


Figura 3 Esquemas de la bolsa de especificidad para quimi tripsina, tripsina y elastasa pancreática donde se muestra la especificidad por una cadena lateral en los sustratos polipeptídicos. La quimi tripsina prefiere cadenas aromáticas y la tripsina cadenas cargadas positivamente. En la elastasa, el compartimento está bloqueado por dos residuos voluminosos por lo que es específica para cadenas pequeñas y no cargadas.

I.6 Proteinasa de Cisteína: Características Generales y Mecanismo de Acción.

La caracterización de los sitios de unión, los sitios catalíticos y la geometría de los estados de transición de las proteinasas de cisteína se ha obtenido por resultados derivados del uso de inhibidores para estas proteinasas. De tal manera que los efectos producidos por dichos inhibidores sobre preparaciones celulares intactas o bien *in vivo* sugieren que las proteinasas de cisteína funcionan en una gran variedad de procesos biológicos que incluyen la diferenciación celular, la invasión celular así como el procesamiento post-ribosomal. También participan en la conversión de proteínas, enfermedades relacionadas con la incapacidad de dicho proceso, infecciones bacterianas y virales, así como distrofia muscular, entre otras (Polgár, 1989; Barret y Rawlings, 1991). Estas proteinasas se encuentran tanto en bacterias como en microorganismos eucarióticos, plantas y animales y en su mayoría se encuentran en la familia de la papaína. (Tabla III)

Las proteinasas de cisteína clasifican dentro de las proteinasas tioladas ya que se inactivan al usar reactivos bloqueadores de grupos tiol y se activan al usar reactivos que regeneran a este grupo. Como la Cys es el único aminoácido que tiene un grupo tiol se observó que este grupo es esencial para la actividad proteolítica de la papaína y que se encuentra en la Cys 25, por lo que por analogía con las proteinasas de Ser las enzimas se denominaron proteinasas de Cys.

La papaína, que es el representante principal de este grupo, tiene un sitio de especificidad muy extenso que a su vez posee 5 o 7 subsitios. El subsitio dominante es el S₂ que en realidad es un compartimento hidrofóbico que une eficientemente a la Phe (Barret, 1986). Otros miembros de la misma familia tienden a retener dichas características pero con algunas variaciones, por

ejemplo, la Catepsina B acepta el residuo Phe en S₂, sin embargo, es también capaz de unir un residuo Arg.

1.6.1 Mecanismo de acción de las proteinasas de cisteína

El sitio activo de las proteinasas de cisteína está formado por un grupo cisteín-sulfhidril catalíticamente activo en la Cys 25 (según numeración de la papaína) y un grupo histidin-imidazol en la His 159.

El mecanismo catalítico de las proteinasas de cisteína es muy semejante al de las proteinasas de serina, ya que en ambos se lleva a cabo la formación de un intermediario tetrahédrico, sólo que en las proteinasas de cisteína el ataque nucleofílico ocurre por parte del oxígeno del tiolato de la cisteína sobre un átomo de carbono del grupo carbonilo del sustrato. El residuo de His actúa como base formando un puente con el protón del grupo tiolato que está libre. Posteriormente el intermediario tetrahédrico se rompe por la transferencia del protón (capturado por el imidazol), al grupo amino del sustrato que se convierte al protonarse en un grupo saliente y la cisteína se acila. El siguiente paso, que es la desacilación, utiliza al agua y aumenta la nucleofilicidad con la ayuda del grupo imidazol. (Ostoa-Saloma, 1991.)

1.6.2 Características particulares de la Papaína

La papaína es una enzima proteolítica que se obtiene del látex de un árbol tropical, (*Carica papaya*). La molécula de papaína se encuentra formada por una cadena polipeptídica de 212 aminoácidos, posee tres puentes disulfuro entre las Cys 22-63, 56-95 y 23-350, así como un residuo Cys libre involucrado en la

catálisis. La masa molecular determinada para la molécula de papaína es de 23350 Da.

1.7 Métodos para medir proteólisis

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron mediciones de actividad proteolítica por dos métodos diferentes pero existe una gran diversidad de métodos y de sustratos para medir proteólisis.

Algunos ensayos para medir proteólisis son los que utilizan proteínas (preferentemente desnaturalizadas) como sustrato. Estas se incuban con enzimas bajo condiciones definidas y el ensayo consiste en medir los péptidos liberados (Ostoa-Saloma, 1991; Bond y Beynon, 1989). A partir de este tipo de ensayos se desarrollaron derivados cromogénicos de proteínas como la azocaseína o la azoalbúmina que poseen un grupo aromático unido por un puente diazo a la molécula proteica. De esta manera, los péptidos liberados por la proteólisis se pueden medir por la presencia de color con un colorímetro o espectrofotómetro. (Ostoa-Saloma, 1991). Otro tipo de sustratos para medir proteólisis son radioactivos y se utilizan cuando la concentración de enzima es muy baja y se requiere de una gran sensibilidad.

Por otro lado, en los métodos de fase sólida se inmoviliza el sustrato o la enzima. Dentro de este tipo de ensayos existen algunos en los que la actividad proteolítica se determina de manera directa en un gel de electroforesis. Otros ensayos de este tipo son los zimogramas, en los cuales se detecta actividad de una muestra separada previamente por electroforesis sobre otro gel que generalmente es de gelatina copolimerizada con acrilamida y que se utiliza como sustrato. El gel con gelatina es superpuesto con el gel donde se corrió la muestra

y se tiñe con azul de Coomassie y cuando se destiñe se observan zonas transparentes, que son las zonas de proteólisis.

Los métodos fluorométricos para medir proteólisis son también muy útiles, en ellos se utilizan sustratos sintéticos que contienen un enlace peptídico que generalmente es muy específico para alguna proteinasa. Por lo tanto es necesario conocer las características del sustrato así como las propiedades catalíticas de las enzimas que se van a ensayar. Uno de los fluoróforos muy comúnmente usados es la 7-amino-4-metilcumarina, que unida a otra molécula por medio de un enlace peptídico sirve para cuantificar proteólisis.

En este trabajo se utilizaron dos de los métodos descritos, el primero fue usando azocaseína como sustrato y el segundo fue un método fluorométrico en el que utilizó el sustrato $N\alpha$ -benzoyl-L-Arginin-7-amido-4-metilcumarina, con un enlace peptídico específico para tripsina y papaína. Al liberarse la 7-amino-4-metilcumarina por hidrólisis del enlace peptídico es posible medir la proteólisis por aumento de la fluorescencia (Fig. 4) (Kanaoka y col, 1977).

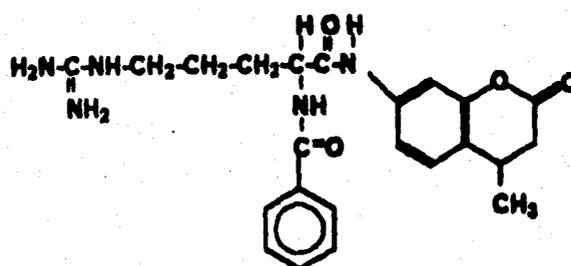


Figura 4. Estructura del sustrato fluorogénico N α -benzoi-L-Arginin-7-amido-4-metilcumarina. El corte de un enlace peptídico libera una molécula de 7-amino-4-metilcumarina que actúa como fluoróforo.

1.8 Las proteinasas en los organismos eucarióticos y la predominancia de ciertas clases catalíticas entre los diferentes grupos.

Uno de los aspectos más importantes en el estudio de las proteinasas es la comprensión de las funciones que realizan en los organismos eucarióticos. Existen varias razones que hacen relevante este aspecto, una de ellas es que muchas especies de microorganismos como *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* y *Tetrahymena pyriformis* entre otros se han utilizado como un modelo sencillo para llegar a comprender los fundamentos de los procesos fisiológicos y del desarrollo. El estudiar los procesos proteolíticos llevados a cabo por especies de este tipo permite conocer funciones celulares como la digestión y la degradación de proteínas.

Por otro lado, el proceso patogénico de muchos microorganismos eucarióticos incluye a las proteinasas en procesos como la penetración al hospedero, la neutralización de los mecanismos de defensa del mismo, así como la nutrición del microorganismo durante la infección (North, 1982a). El estudio de los mecanismos proteolíticos, así como la caracterización de las proteinasas involucradas, permite una comprensión de la patogénesis y un posible control sobre ésta. Desde otro punto de vista, la actividad proteolítica también tiene importancia industrial en procesos de fermentación, preparación de alimentos, etc.

Todo lo anterior explica el creciente interés por el estudio de las proteinasas de organismos eucarióticos; de hecho, desde 1973 se pueden encontrar en la literatura reportes de la actividad proteolítica en más de 150 géneros de hongos, protoctistas y mamíferos. (Barret y Mc Donald, 1980; North, 1982a).

Muchas de las observaciones sobre el papel de las proteinasas en los organismos eucarióticos se realizan por medio del análisis *in vitro* de sus propiedades. Los métodos utilizados para estudiar la actividad proteolítica *in*

vivo incluyen el uso de inhibidores, el aislamiento de mutantes, así como la correlación de la actividad proteolítica con una actividad biológica particular. Este tipo de estudios ha provisto de información sobre el papel de las proteinasas en los organismos eucarióticos en fenómenos como el procesamiento postraducciona, la conversión de proteínas, la nutrición, el desarrollo y la patogénesis.

A partir de los reportes en los que se realiza una caracterización de las diferentes proteinasas presentes en varias especies de algunos grupos de organismos eucariontes, así como un análisis de las funciones que las mismas realizan en los organismos, ha sido posible realizar una comparación de las enzimas proteolíticas que se encuentran en los hongos, protoctistas, hongos mucilaginosos y mamíferos. De este tipo de comparaciones se puede observar que existe una predominancia de cierta clase catalítica en los diferentes grupos de organismos, por ejemplo, si se evalúa un listado de las proteinasas que existen en los mamíferos se puede ver claramente que hay un gran número de proteinasas de serina considerablemente mayor al número de proteinasas de cisteína, de aspártico o metaloproteinasa. (Barret y Mc Donald, 1980).

Por otro lado, las proteinasas aisladas de las especies de los diferentes grupos taxonómicos de los Eumycota ("hongos verdaderos") presentan ciertas características en común. Aunque se han encontrado las cuatro clases catalíticas de proteinasas en los hongos las proteinasas de aspártico y serina predominan. De todas las especies de hongos estudiadas una gran mayoría produce proteinasas que son activas a pH ácido y una gran proporción de éstas muestra propiedades de las proteinasas de aspártico. La mayoría de las proteinasas presentan masas moleculares entre 30000 y 45000 y sus pI se encuentran por debajo de 5.1. Tienen una amplia especificidad, sin embargo, prefieren enlaces peptídicos localizados entre dos residuos voluminosos. Por otro lado, las

proteinasas ácidas de los hongos han mostrado un alto grado de homología con las proteinasas de aspártico de los mamíferos, lo cual sugiere la existencia de un gen ancestral común (Tang, 1979).

Las metaloproteasas solo están representadas en pocos ejemplos de hongos como *Aspergillus oryzae* y *A. sojae*. Tienen una masa molecular entre 19000 y 20000 Da y presentan actividad a un pH óptimo de 5 a 6. Las proteinasas de serina, en cambio, son abundantes en este grupo, utilizan pH alcalino y su masa molecular se encuentra entre 18500 a 35000 Da, aunque en la mayoría es de 25000. Las proteinasas de serina son consideradas importantes en los hongos ya que en estos organismos la capacidad de producir proteinasas alcalinas se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento (Matsushima, 1979.). Por último, las proteinasas de cisteína casi no se reportan en los hongos, de hecho, algunas especies de *Microsporium* así como *Aspergillus oryzae* son las únicas en las que se ha reportado la presencia de estas proteinasas.

En el caso de las especies que se encuentran dentro del grupo de los protoctistas, la mayor parte de los estudios realizados se refieren a parásitos del hombre y animales domésticos. Esto se debe a que se considera que la proteólisis tiene un papel primordial en la relación hospedero-parásito. Aunque las proteinasas de los protoctistas no han sido totalmente caracterizadas, se ha observado una alta frecuencia de proteinasas de cisteína en amibas, esporozoarios, flagelados y ciliados. Esto se debe seguramente a que las proteinasas de estos protoctistas se encuentran localizadas intracelularmente (Steiger y col, 1980)

Si bien es notable la predominancia de las proteinasas de cisteína también existen proteinasas ácidas, como es el caso de una proteínasa de *Tetrahymena* que se considera una proteínasa de aspártico, también se encuentran proteinasas de serina en *Euglena gracilis* y *E. tenella*

El otro grupo donde se ha observado predominancia de una clase catalítica de proteinasas es el de los mixomicetes u hongos mucilaginosos, que son un grupo de organismos que se considera tienen características tanto de hongos como de protoctistas. En general es un grupo poco estudiado, de hecho la especie más conocida es *Dictyostelium discoideum*. Se sabe que en estos microorganismos las proteinasas de cisteína son las más abundantes y que son activas al mismo pH que en los protoctistas. Aunque en menor número, también se han observado otras proteinasas ácidas. Por otro lado, las proteinasas de serina y las metaloproteiniasas no se han encontrado en este grupo de microorganismos (Winier y Ashworth, 1970; North, 1982b; North y Harwood, 1979).

OBJETIVOS

Las proteinasas participan en una gran cantidad de procesos celulares tales como la digestión, la formación de moléculas biológicamente activas, el procesamiento de proteínas y otros que se han mencionado en la introducción de este trabajo. Muy interesante es el hecho de la predominancia de cierta clase catalítica en los diferentes grupos de organismos, lo cual abre las siguientes preguntas: ¿a qué se debe dicha predominancia?, ¿de qué depende que los organismos utilicen más un tipo de proteinasas que otro? ¿porqué no utilizan las proteinasas de las diferentes clases catalíticas de manera indiferente?, y sobre todo ¿qué beneficios adaptativos obtienen estos grupos al utilizar discriminadamente estas clases catalíticas?

A partir de estas preguntas decidimos realizar un modelo experimental que pudiera resolverlas, estableciendo los siguientes objetivos:

1. Investigar si una combinación de proteinasas de la misma clase catalítica libera una mayor cantidad de péptidos que una combinación de proteinasas de diferente clase catalítica.
2. Investigar si las condiciones que necesitan las proteinasas son un factor limitante para la actividad proteolítica de mezclas de proteinasas de la misma y diferente clase catalítica.
3. Encontrar un amortiguador que tenga condiciones tales, que dos proteinasas de diferente clase catalítica presenten una actividad proteolítica semejante..
4. Investigar si la actividad proteolítica se incrementa en mezclas de proteinasas que utilizan las mismas condiciones y en las que además existe competencia por el sustrato.

Capítulo II. MATERIALES Y METODOS

II.1 Preparación de Azocaseína

Para los ensayos de actividad proteolítica utilizamos azocaseína como sustrato, la cual fue preparada de acuerdo al protocolo descrito por Starkey, P.M. (1977).

Se preparó una solución disolviendo 50 gr de caseína comercial (Hoffmann-Pinther & Basworth, S.A.) en 1 litro de tetraborato de sodio 50 mM con agitación por una noche. Se ajustó el pH a 9 con NaOH 1N y el material insoluble se eliminó por centrifugación. Posteriormente se preparó una segunda solución disolviendo 5 gr de ácido sulfanílico en 200 ml de agua y agregando 12 ml de NaOH 5N. Se añadieron 2.2 gr de NaNO_2 y 18 ml de HCl 5M agitando durante exactamente 2 minutos y se mezcló inmediatamente con la primera solución, agitándose durante toda la noche a 4 °C.

Para purificar la azocaseína se agregó un amortiguador de fosfato de sodio-ácido fórmico 5M pH 3 con agitación constante midiendo el pH hasta un valor de 4. En este punto toda la azocaseína se precipitó. El precipitado se colectó por centrifugación y se resuspendió en un volumen mínimo de Tris-HCl 2M pH 9. Por último se dializó contra agua durante tres días. La proteína dializada se liofilizó durante 24 hrs.

II.1.1 Determinación de la concentración de proteína.

Para comparar los lotes de azocaseína preparados a lo largo de este trabajo se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976; Spector, 1978) se utilizó como estándar de concentración

albúmina de suero de bovino, en un intervalo de concentraciones de 1 a 10 μg de proteína.

II.1.2 Determinación de unidades de azocaseína.

Para normalizar los lotes de azocaseína utilizados a lo largo de este trabajo se determinaron las unidades de azocaseína como sigue: una vez dializada la azocaseína se disolvió en NaOH 1 M en una concentración al 6 % p/v y se ajustó el pH a 7.5. Se hicieron varias diluciones y se determinó la absorbencia a 366 nm. El valor se multiplicó por el factor de dilución de la solución y este valor se comparó con el de los demás lotes de azocaseína.

II.2 Ensayos de actividad proteolítica con azocaseína como sustrato.

La determinación de la actividad proteolítica de cada una de las proteinasas utilizadas en este trabajo se realizó con azocaseína como sustrato (Starkey, 1977) y de acuerdo al ensayo descrito para endopeptidasas con sustratos azoproteicos (Gautam y col. 1989). Este ensayo se utilizaron proteinasas de serina y de cisteína separadas y en combinación.

Se preparó una solución de azocaseína 20 mg/ml en un amortiguador de Tris-HCl 0.1 M pH 8. En tubo para microfuga de 1.5 ml se colocaron 250 μl de esta solución a 25 °C. Posteriormente se agregaron 150 μl de la proteinasa a una concentración conocida y se incubaron a 25° C durante 15 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 1.2 ml de ácido tricloroacético al 10%(v/v) y se dejó en hielo para precipitarla durante 15 minutos. Se centrifugó a 8000 X g (Microfuga Beckman modelo 11) durante 2 minutos y se transfirieron 1.2 ml de sobrenadante a un tubo de ensayo conteniendo 1.4 ml de NaOH 1M. La absorbencia se determinó contra un blanco compuesto de la solución de

azocaseína, ácido tricloroacético, y NaOH a 440 nm en un espectrofotómetro (Ultrspec II LKB Blochrom modelo 4030).

II.2.1 Ensayos de actividad proteolítica para tres proteinasas de serina: ensayos con una sola proteinasa de serina.

La tripsina, quimi tripsina y elastasa fueron obtenidas comercialmente (SIGMA.Chemical Company. St. Louis Missouri) y provienen de páncreas de bovino. Para estas tres proteinasas se prepararon soluciones a una concentración inicial de 1 mg/ml en un amortiguador de Tris-HCl 0.1 M pH 8 y a partir de ésta se hicieron diluciones. Los ensayos iniciales se hicieron para cada una de estas tres proteinasas por separado, se agregaron 150 µl de solución con 2.3, 4.68, 9.37, 18.75, 37.5, 75 y 150 µg de enzima y se determinó la absorbencia a 440 nm.

II.2.2 Ensayos de combinación de dos proteinasas de serina.

Para los ensayos en que se mezclaron dos proteinasas se realizaron las combinaciones tripsina-quimi tripsina, tripsina-elastasa y quimi tripsina-elastasa y se eligieron aquellas concentraciones de cada una de las proteinasas en las cuales el valor de la densidad óptica fuera semejante y que perteneciera a una región de la curva correspondiente (ver resultados) en la cual, el aumento en microgramos de enzima fuera directamente proporcional al aumento en la actividad.

De esta manera, se realizó el mismo ensayo de actividad descrito, al mezclar simultáneamente 75 µl de la solución, que contenían respectivamente el 50 % de microgramos de cada una de las enzimas y se hicieron dos controles para cada proteinasa: el control 1 contenía el 50 % de microgramos de la enzima y el

control 2 con el 100% de microgramos de la misma enzima pura. En la tabla VI se muestran las cantidades de cada enzima añadidos en este ensayo.

II.2.3 Ensayos de combinación de tres proteinasas de serina.

Antes de mezclar las tres proteinasas de serina se realizaron ensayos con tripsina y quimiotripsina mezclándolas con 15, 30 minutos y 1 hora de anticipación. Se observó que no había un efecto negativo sobre la actividad proteolítica, y se comprobó que las dos enzimas no se digerían mutuamente (no se muestran los resultados).

Por lo tanto se procedió a mezclar las concentraciones correspondientes de tripsina y quimiotripsina y se agregaron al sustrato 75 μ l de esta solución con 75 μ l de la concentración correspondiente de elastasa pancreática. Los controles 1 para cada enzima en este caso representan el 33.3% de cantidad de enzima de los controles 2 que corresponden al 100% de la concentración. (tabla VII).

II.2.4 Ensayos de actividad proteolítica para una proteinasa de cisteína.

El ensayo descrito en la sección II.1.2 fue utilizado para medir la actividad proteolítica de la papaína. Esta proteína fue obtenida comercialmente (SIGMA.Chemical Company. St. Louis Missouri). Las condiciones para llevar a cabo este ensayo fueron: se disolvió la azocaseína a una concentración de 20 mg/ml en un amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8, cisteína 0.01M y EDTA 0.002 M. Se preparó una solución inicial de papaína 1 mg/ml en este mismo amortiguador y a partir de esta se hicieron diluciones. En este primer ensayo se determinó la curva de actividad para la al papaína agregar 150 μ l de solución con 9.37, 18.75, 37.5, 75 y 150 μ g de enzima, posteriormente se determinó la absorbencia a 440 nm.

II.2.5 Ensayos de actividad proteolítica para la combinación de dos proteinasas de diferente clase catalítica.

Para los ensayos con tripsina y papaína se eligió, de acuerdo con la curva de actividad de cada una, una concentración de enzima en el que ambas enzimas tuvieran un valor de densidad óptica semejante. Este valor corresponde a una región de la curva en la cual el aumento en la concentración de enzima es directamente proporcional al aumento en la actividad proteolítica. Las condiciones utilizadas tanto para la solución de azocaseína como para la solución de cada una de las enzimas en este ensayo fueron: Tris-HCl 0.1 M pH 8, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002 M. Los microgramos de cada enzima seleccionados para hacer la mezcla de las dos proteinasas se encuentran en la tabla VI. El control c1 representa el 50 % de microgramos de cada enzima y el control c2 representa el 100 %. La combinación de tripsina y papaína se realizó mezclando los microgramos de enzima correspondientes a los respectivos controles c1.

Tabla VI. Cantidad de enzima para los ensayos de combinación de dos proteinasas.

Proteinasa	control 1 50% (c1)	control 2 100% (c2)
TRIPSINA	4.68 μg	9.37 μg
QUIMIOTRIPSINA	9.37 μg	18.75 μg
ELASTASA	37.5 μg	75.00 μg
PAPAINA	9.37 μg	18.75 μg

Tabla VII. Cantidad de enzima para los ensayos de combinación de tres proteinasas.

Proteinasa	control 1 33.3% (c1)	control 2 100% (c2)
TRIPSINA	3.12 μg	9.37 μg
QUIMIOTRIPSINA	6.25 μg	18.75 μg
ELASTASA	25.00 μg	75.00 μg

II.3 Determinación de un amortiguador óptimo para dos proteinasas de diferente clase catalítica.

Antes de buscar las condiciones ideales para ambas proteinasas se hicieron dos ensayos para saber de qué manera la actividad de tripsina se veía afectada por el amortiguador utilizado en el ensayo de combinación de proteinasas de diferente clase catalítica.

El primer ensayo consistió en medir la actividad proteolítica para tripsina en el amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8, tanto para la solución de azocaseína como para la enzima. El segundo ensayo consistió en cambiar el amortiguador a Tris-HCl 0.1 M pH8, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002 M, que es el utilizado en el ensayo de combinación de tripsina y papaína. Las soluciones de tripsina utilizadas para obtener las curvas de actividad se hicieron con 4.68, 9.37 y 18.75 μg de enzima.

Para determinar las condiciones en las cuales ambas proteinasas (tripsina y papaína) tuvieran una actividad semejante, se utilizó como base el amortiguador para papaína (Tris-HCl 0.1 M pH 8, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002 M). El criterio para elegir este amortiguador es que la papaína no presenta ninguna actividad en ausencia de EDTA y cisteína. (la cisteína provee de grupos SH reducidos sin los cuales la papaína no presenta actividad y EDTA actúa como quelante de calcio y otros metales que pueden inhibir la actividad de cisteína) por lo que no podíamos utilizar como base el amortiguador utilizado para tripsina.

Tomando esto en cuenta, se procedió a variar la concentración de cisteína manteniendo constante la concentración de EDTA y viceversa. Los amortiguadores probados, con sus respectivas concentraciones de cisteína y de EDTA se muestran en la tabla VIII.

Se determinó la actividad proteolítica en cada uno de estos amortiguadores de acuerdo al ensayo descrito para papaína y tripsina tanto en sus controles c1 como c2 y en la mezcla simultánea de las dos enzimas. El criterio para elegir al amortiguador fue que en presencia de éste, ambas enzimas mostraran una actividad proteolítica semejante.

Tabla VIII. Amortiguadores probados para medir la actividad proteolítica de tripsina y papaína separadas y en combinación. El amortiguador base es el número 1, que tiene Tris.HCl 0.1 M, EDTA 2 mM y cisteína 10 mM. Se muestran las variaciones efectuadas en la concentración de EDTA o de cisteína.

Amortiguador	Cisteína (mM)	EDTA (mM)
1	10	2
2	5	2
3	1	2
4	10	1
5	1	0.1
6	0.000025	0.001
7	0.00005	0.001
8	0.0001	0.001
9	0.0002	0.001
10	0.025	1
11	0.05	1
12	0.1	1
13	0.2	1

II.4 Medición de la actividad de tripsina y papaína con un sustrato fluorogénico.

Los siguientes ensayos se realizaron utilizando un sustrato fluorogénico, el N α -benzoiL-L-Argininin-7-amido-4-metilcumarina (Bz-L-Arg-MCA), el cual tiene un enlace peptídico específico para tripsina y papaína que al ser hidrolizado libera un producto fluorescente. Se utilizó dicho sustrato para obtener parámetros cinéticos de la tripsina y la papaína según el protocolo descrito por Kanaoka y col., (1977).

Ensayos para tripsina

En el caso de la tripsina se utilizaron concentraciones de sustrato comprendidas en un intervalo de 0.01 a 1 mM en un amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8 conteniendo 20 mM de CaCl₂ y 1% (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO). Se agregaron 75 μ l de tripsina 0.2 mg/ml a 25 microlitros de la solución de sustrato en una celda de cuarzo con capacidad de 150 microlitros a 25 °C. En un fluorómetro (SLM Instruments, Inc. modelo 4800) se midió la emisión de la muestra a 440 nm utilizando una luz de 380 nm para la excitación.

Ensayos para papaína

Se utilizaron concentraciones de sustrato entre 0.09 - 9 mM en un amortiguador 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, conteniendo 5 mM de cisteína, 2 mM de EDTA y 1% (v/v) de DMSO. Como en el ensayo anterior, a 25 μ l de la solución de sustrato se le agregaron 75 μ l de papaína 0.2 mg/ml, y se midió la emisión a 440 nm (excitación 380 nm).

II.5 Ensayos de actividad para tripsina y papaína en las condiciones óptimas y con Bz-L-Arg-MCA.

El mismo sustrato fluorogénico fue utilizado para obtener los parámetros cinéticos para la tripsina y la papaína en el mejor amortiguador para tripsina y papaína descrito en la sección II.3. Para el ensayo con tripsina las concentraciones de sustrato utilizadas se encontraban entre 0.01-1 mM disueltas en el amortiguador Tris-HCl 0.1M pH 8, cisteína 50 μ M, EDTA 1 mM y 1% (v/v) de DMSO. A 25 μ l de esta solución contenida en una celda de 150 μ l de capacidad se le añadieron 75 μ l de tripsina 0.2 mg/ml. Se midió el incremento en la fluorescencia en un fluorómetro a 380 nm de excitación y 440 nm de emisión.

Para la papaína las concentraciones de sustrato utilizadas se encontraban entre 0.09 y 9 mM siguiendo el mismo ensayo descrito y bajo las mismas condiciones. Una vez encontradas las condiciones "óptimas" para el ensayo, se procedió a medir la actividad en la mezcla de tripsina y papaína utilizando el sustrato Bz-MCA. Se siguió el mismo método y se utilizaron las mismas condiciones, las concentraciones de sustrato utilizadas estuvieron dentro de un intervalo de 0.09 a 9 mM y se añadieron 37.5 μ l de cada enzima a una concentración de 0.2 mg/ml simultáneamente.

II.6 Tratamiento de los datos

Para todos los ensayos fluorimétricos realizados en este trabajo se siguió el tratamiento de los datos, que consistió en lo siguiente:

En las curvas obtenidas en el graficador del fluorómetro se representan unidades relativas de fluorescencia contra tiempo. Estas unidades fueron transformadas a nanomolas de producto obtenido, utilizando aquellos puntos de la curva en los cuales todo el sustrato había sido consumido. A partir de la región inicial de

cada una de las curvas se trazó una pendiente con la cual se calculó la velocidad en nanomolas de producto/seg/mg de enzima.

Posteriormente estos datos de velocidad fueron graficados contra concentración de sustrato y sus valores se ingresaron a una hoja de datos del programa de cálculos de cinética enzimática "Grafit" de "Windows" Versión 3.0. En este programa, a partir de la ecuación de Michaelis-Menten se obtuvieron los parámetros de K_m , K_{cat} , K_{cat}/K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

Capítulo III. RESULTADOS

III.1 Actividad proteolítica de tres proteinasas de serina: Digestión de azocaseína por tripsina, quimiotripsina y elastasa.

Con el fin de verificar si la actividad proteolítica de una mezcla de dos o tres proteinasas de la misma clase catalítica es mayor que la cantidad equivalente de una sola enzima, lo primero que se realizó fueron ensayos para determinar la actividad proteolítica de cada una de las tres proteinasas de serina elegidas en forma aislada. Esto se hizo para tener tres curvas de actividad que permitieran elegir la concentración de cada una de las enzimas que se utilizarían en las combinaciones posteriores.

Los ensayos para la determinación de actividad proteolítica de cada una de estas enzimas se realizaron con azocaseína como sustrato, de acuerdo al ensayo para endopeptidasas con sustratos azoproteicos descrito en la metodología. Se realizaron ensayos para tripsina, quimiotripsina y elastasa pancreática y se determinó la actividad proteolítica por absorbencia a 440 nm a diferentes concentraciones de enzima. La figura 5 muestra estos resultados.

III.1.1 Digestión de azocaseína por tripsina-quimiotripsina, tripsina-elastasa y quimiotripsina-elastasa, separadas y en combinación.

Con el fin de confirmar si las combinaciones de proteinasas de la misma clase catalítica son más eficientes en la degradación de sustrato que la combinación de dos proteinasas de diferente clase, se decidió realizar inicialmente, ensayos para medir la actividad proteolítica de la combinación de dos proteinasas de serina, para lo cual se eligieron aquellas concentraciones de enzima que presentaran una actividad semejante a las otras dos proteinasas y que éstas se encontraran en una región de la curva de actividad proteolítica en la cual el aumento en la actividad fuera directamente

proporcional al aumento de la concentración de la enzima. Las combinaciones probadas fueron: tripsina-quimiotripsina, tripsina-elastasa y quimiotripsina-elastasa. En la figura 6A se observan los resultados obtenidos para la combinación tripsina-quimiotripsina. Las columnas con la letra T muestran los controles para tripsina y las columnas con la letra Q los controles correspondientes a quimiotripsina. La columna T-Q es el resultado de la combinación simultánea de ambas enzimas. La figura 6B muestra los resultados del mismo tipo de ensayo pero para la combinación tripsina (T) y elastasa (E); por otro lado, los resultados del ensayo para quimiotripsina (Q) y elastasa (E) se observan en la figura 6C.

Los resultados de estos ensayos de actividad proteolítica con dos enzimas de la misma clase catalítica, muestran que la cantidad de péptidos liberados por cualquier combinación de dos proteinasas es siempre mayor que la cantidad liberada por una sola enzima.

III.1.2 Digestión de azocaseína por tripsina-quimiotripsina-elastasa, separadas y en combinación.

El siguiente paso para comprobar que efectivamente la combinación de proteinasas es más eficiente que la actividad de una sola de ellas, fue el realizar ensayos para medir la actividad proteolítica de la combinación de tres proteinasas de serina. Debido a que anteriormente se habían realizado ensayos para determinar si la tripsina y la quimiotripsina mostraban digestión mutua y cuyos resultados fueron negativos, se procedió a realizar los ensayos con la combinación de las tres proteinasas, mezclando tripsina y quimiotripsina con anticipación y posteriormente la mezcla de las dos se combinó simultáneamente con la elastasa. La figura 7 muestra los resultados de este

experimento, en la que la última columna (TQE) representa la actividad proteolítica resultado de la combinación de las tres proteinasas.

Los controles c1 contienen la tercera parte de la cantidad de cada una de las proteinasas que se encuentran en los controles c2. La última columna muestra que la cantidad de péptidos liberados por la combinación de las tres proteinasas es mayor que la cantidad de péptidos liberados por la cantidad equivalente de una sola enzima.

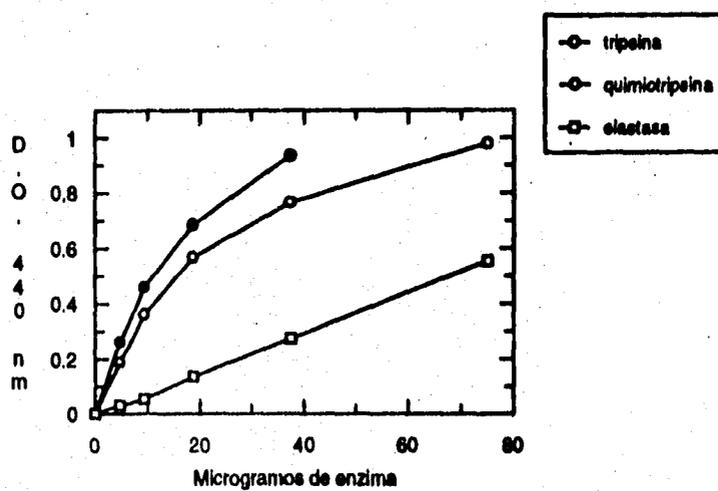
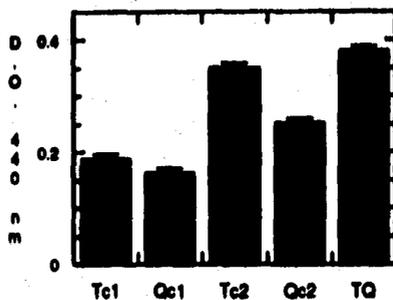
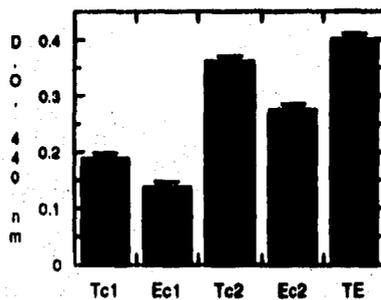


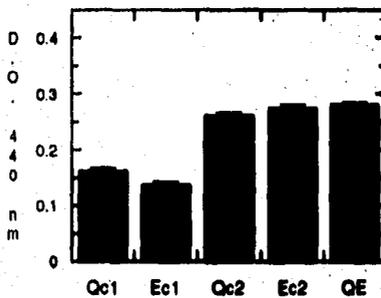
Figura 5 Digestión de azocaseína por tres proteinasas de serina. Se presentan las curvas de actividad para tripsina, quimi tripsina y elastasa pancreática. La densidad óptica se midió a 440 nm.



6.A



6.B



6.C

Figura 6 Digestión de azocaseína por dos proteinasas de serina, separadas y en combinación. Tripsina-quimiotripsina (A), tripsina-elastasa (B) y quimiotripsina-elastasa (C). Las columnas c1 son los controles con el 50 % de microgramos de enzima de los resultados de las columnas c2. La última columna de cada gráfica, muestra los resultados obtenidos con la mezcla simultánea de dos enzimas.

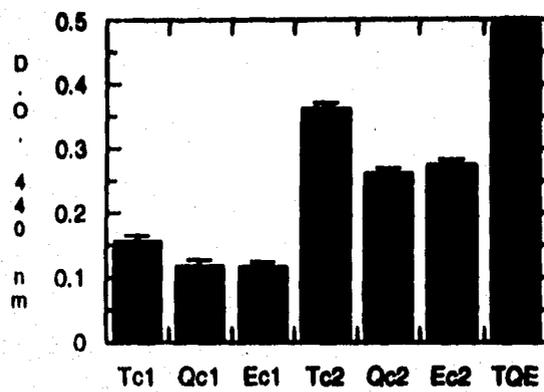


Figura 7. Digestión de azocaseína por tres proteínas de serina: tripsina, quimiotripsina y elastasa. Las columnas c1 muestran los controles con la tercera parte de cantidad de enzima de las columnas c2. La columna TQE indica la actividad proteolítica de la combinación de las tres proteínas.

III.2 Actividad proteolítica de una proteínasa de cisteína: Digestión de azocaseína por papaína.

En esta sección se presenta la curva de actividad para la papaína, estos experimentos fueron realizados usando el mismo ensayo que para las proteinasas de serina pero con el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002 M que es el que se utiliza para esta proteínasa. Se midió la densidad óptica a 440 nm contra la concentración en microgramos de papaína. La figura 8 presenta la curva de actividad obtenida.

III.3 Actividad proteolítica resultado de la combinación de dos proteinasas de diferente clase catalítica.

En la figura 9 se observan los resultados de actividad proteolítica para la combinación de dos proteinasas de diferente clase catalítica (tripsina y papaína) con sus respectivos controles. El amortiguador utilizado para estos ensayos fue Tris-HCl 0.1 M, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002 M y un pH de 8.

Como se puede observar, la proteólisis del sustrato por la combinación de papaína y tripsina no es más eficiente que la obtenida por la cantidad equivalente de papaína, y sobre todo, es muy notable que la actividad de tripsina se encuentra muy afectada. Tal y como se propuso al principio de este trabajo, con estos resultados se puede observar que el factor limitante para que la combinación de dos proteinasas de diferente clase catalítica sea eficiente es que las condiciones correspondientes a cada enzima son distintas, de manera que las condiciones que son necesarias para la actividad óptima de una de ellas pueden no favorecer e incluso afectar la actividad de la otra enzima. Para apoyar este argumento se muestran los resultados de la figura 10 en la cual se observan las curvas de actividad para tripsina en el amortiguador Tris-HCl 0.1 M pH 8 y con el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, cisteína 0.01 M, EDTA 0.002 M pH 8.

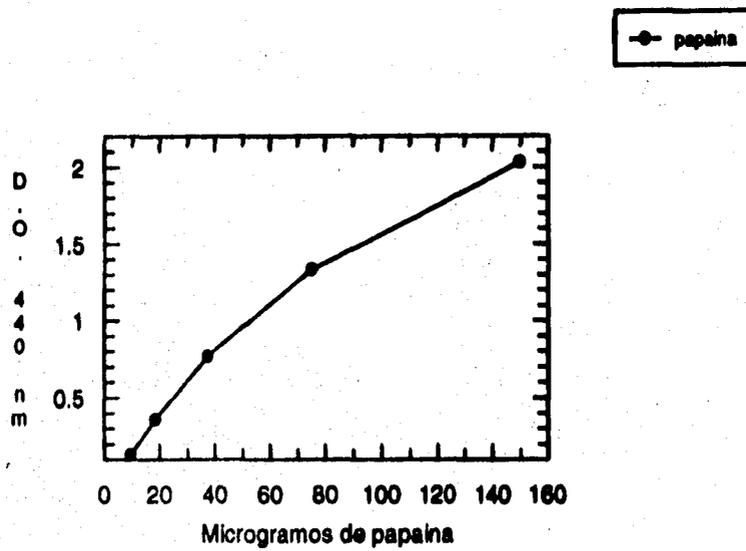


Figura 8. Curva de actividad para papaína con azocaseína como sustrato. Se midió la densidad óptica a 440 nm para diferentes concentraciones de papaína.

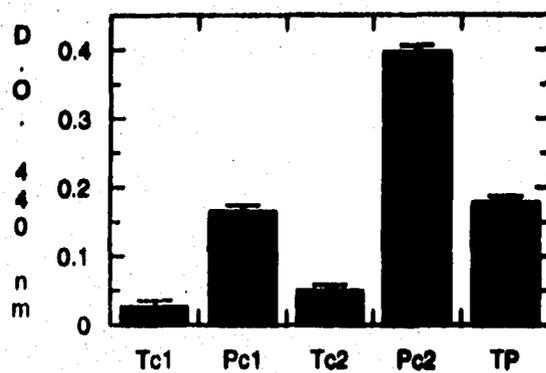


Figura 9. Digestión de azocaseína por dos proteínas de diferente clase catalítica. Los controles c1 para tripsina (T) y papaína (P) representan el 50% de concentración de enzima de los controles c2. La columna TP representa la combinación de las dos proteínas.

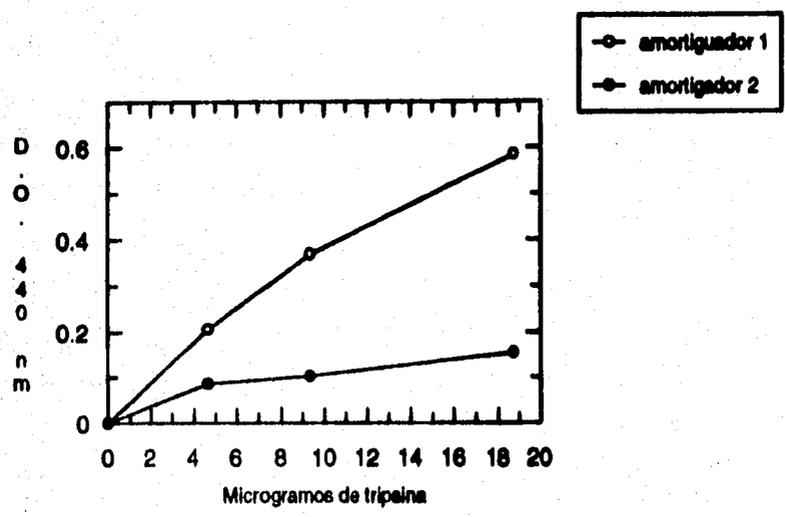


Figura 10 Digestión de azocaseína por tripsina en dos amortiguadores distintos. El amortiguador 1 es Tris-HCl 0.1 M pH 8. El amortiguador 2 es Tris-HCl 0.1M, cisteína 0.01M y EDTA 0.002M..

III.4 Determinación de un amortiguador óptimo para dos proteínas de diferente clase catalítica.

Como se puede observar, la actividad de la tripsina en el amortiguador para papaína es muy baja; entonces se pensó que el que la combinación de las proteínas no fuera más eficiente se debía a que el amortiguador usado en el ensayo no favorecía la actividad de la tripsina. Se decidió encontrar un amortiguador en el que ambas enzimas funcionaran eficientemente o por lo menos, la actividad de la tripsina aumentara sin afectar demasiado la actividad de papaína. Los ensayos siguientes se realizaron para cumplir dicho objetivo: se prepararon diferentes amortiguadores a partir del amortiguador base para papaína (Tris-HCl 0.1 M, cisteína 0.01 M y EDTA 0.002M) y se varió la concentración de cisteína y de EDTA (Tabla VIII). En estos ensayos se vió que el factor determinante en la actividad de la papaína es la concentración de cisteína y que la variación en concentración de EDTA no le afecta significativamente. Para la tripsina, el efecto es muy evidente cuando se aumenta la concentración de cisteína, ya que disminuye su actividad. Con EDTA a bajas concentraciones la actividad de tripsina disminuye muy poco. Por lo anterior, se procedió a mantener fija la concentración de EDTA y continuar variando la concentración de cisteína. En la figura 11 se representa el porcentaje de la actividad de la tripsina y la papaína contra la molaridad de la cisteína cuando se mantiene fija la concentración de EDTA. En la figura 12 se muestran cuatro gráficas representativas de todos los amortiguadores probados, con la concentración fija de EDTA (1 mM) y la concentración variable de cisteína a 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M y 200 μ M. En estas representaciones es posible observar que con el amortiguador que posee EDTA 1 mM y cisteína 50 μ M se obtiene una actividad muy semejante para la tripsina y la

papaína , y que en la figura 11 corresponde precisamente a los puntos más cercanos en el porcentaje de actividad de ambas enzimas. Dicho amortiguador fue elegido para los experimentos posteriores como un amortiguador "ideal", en el cual ambas enzimas presentan actividades semejantes.

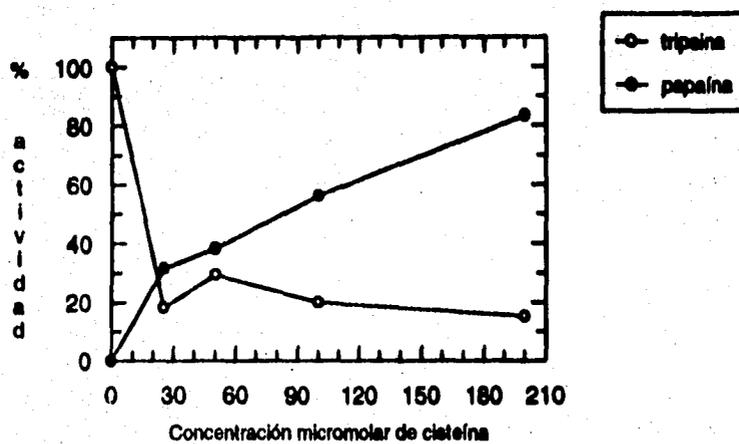
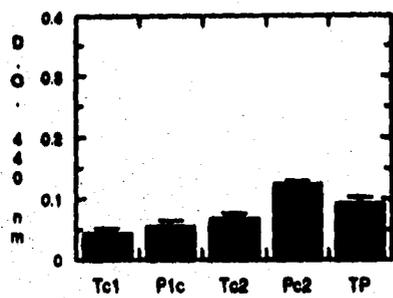
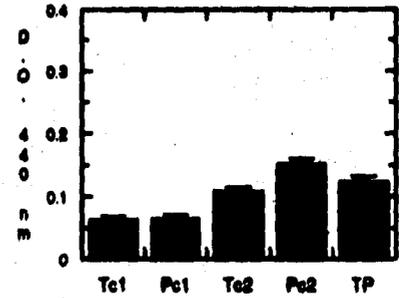


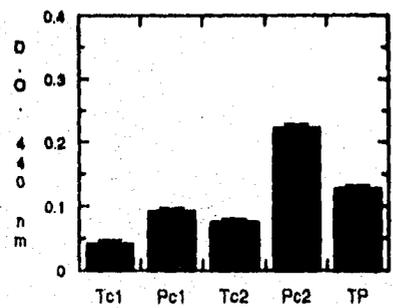
Figura 11 Cambios en el porcentaje de actividad de tripsina y papaina dependientes de la concentración molar de cisteína. La concentración de EDTA es fija 1mM). Los puntos más cercanos representan el amortiguador más cercano al que se buscaba, en el que la tripsina y la papaina poseen el porcentaje de actividad más parecido.



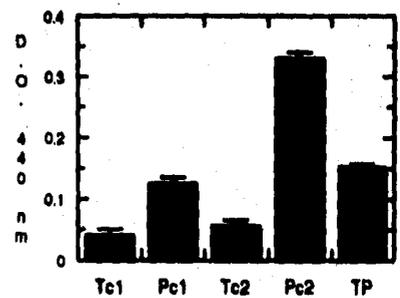
A.



B.



C.



D.

Figura 12. Se muestra la actividad proteolítica de tripsina y papaína en 4 amortiguadores representativos en los que se mantuvo fija la concentración de EDTA (1 mM) y la concentración de cisteína se varió. A. 25 µM de cisteína B. 50 µM C. 100 µM D. 200 µM. El mejor amortiguador es por lo tanto el que posee EDTA 1 mM y cisteína 50 µM.

III.5 Ensayos de actividad para tripsina y papaína con Bz-L-Arg-MCA.

De acuerdo con los resultados presentados hasta este punto, las diferencias en las condiciones óptimas que requieren las enzimas evitan que la combinación de proteinasas de diferente clase catalítica pueda ser más eficiente que la combinación de proteinasas de la misma clase catalítica. Es necesario hacer una observación : las proteinasas de serina utilizadas en este trabajo, además de que requieren las mismas condiciones, hidrolizan diferentes enlaces peptídicos, lo cual ayuda a que su combinación se traduzca en una mayor eficiencia proteolítica. Se pensó entonces, que aunque las proteinasas tuvieran las mismas condiciones, si compitieran por un único sitio de corte no se tendría por resultado una mayor eficiencia proteolítica. Para verificar esta suposición se realizó una búsqueda de sustratos sintéticos comerciales que tuvieran un único sitio de corte para dos proteinasas de serina. No se encontró un sustrato con estas características pero sí uno con un único sitio de corte para dos proteinasas de diferente clase catalítica, la tripsina y la papaína. Sin embargo, se habían encontrado condiciones en las cuales estas dos enzimas justamente, se comportaban de manera semejante, por lo que se procedió a utilizar este sustrato para ensayos con tripsina y papaína en el amortiguador en el que ambas mostraban actividad semejante. En primer lugar se intentaron reproducir los resultados publicados por Kanaoka y colaboradores. En la tabla IX se muestran los resultados obtenidos en nuestros ensayos utilizando el sustrato Bz-L-Arg-MCA bajo las condiciones reportadas por estos autores y se comparan con los resultados obtenidos por los mismos.

Se puede observar en estos resultados que la K_m para tripsina obtenida por nosotros es muy parecida a la reportada por Kanaoka, sin embargo, los parámetros para papaína no son así, ya que la K_m es casi nueve veces menor, sin embargo, lo consideramos un resultado significativo para la reproducción de nuestros datos ya que los valores no cambian de orden de magnitud.

Tabla IX. Parámetros cinéticos para tripsina y papaína utilizando Bz-L-Arg-MCA bajo las condiciones reportadas por Kanaoka y col. (1977a). Se presentan los parámetros reportados por estos autores así como los obtenidos en el laboratorio

Enzima	Km (mM)	Kcat (sec ⁻¹)	Kcat/Km (M ⁻¹ sec ⁻¹)	V máx
Tripsina (Kanaoka y col.)	0.11	0.42	3800	no reportado
Papaína (Kanaoka y col.)	0.92	0.53	580	no reportado

Enzima	Km (mM)	Kcat (sec ⁻¹)	Kcat/Km (mM ⁻¹ sec ⁻¹)	Vmáx (nmoles/sec/mg)
Tripsina (laboratorio)	0.1006	38.377	381.148	0.5755
Papaína (laboratorio)	0.1481	12.6782	85.60	0.190

III.5.1. Medición de la actividad para tripsina y papaína, separadas y en combinación con el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, cisteína 50 μ M y EDTA 1 mM con el sustrato Bz-L-Arg-MCA.

En esta sección de resultados se presentan los parámetros cinéticos obtenidos en los ensayos en los cuales se utilizó el amortiguador Tris-HCl 0.1 M cisteína 50 μ M y EDTA 1 mM con el sustrato fluorogénico Bz-L-Arg-MCA . Ya que bajo estas condiciones las dos enzimas, muestran una actividad semejante (por lo menos con azocaseína como sustrato), utilizamos dichas condiciones considerándolas estándar para ambas enzimas, y utilizando el sustrato fluorogénico medimos los parámetros cinéticos para tripsina, papaína y la mezcla simultánea de las dos enzimas. En la tabla X se muestran los parámetros cinéticos obtenidos para cada enzima por separado y la mezcla de ambas. Se puede observar que si bien la afinidad de la tripsina (K_m 0.04 mM) aumenta en comparación con las condiciones anteriores (K_m 0.1mM), la de papaína es menor. Por otro lado, aunque la afinidad por el sustrato de tripsina es mayor (K_m 0.04 mM) que la de papaína (K_m 0.4341 mM), la velocidad de tripsina es menor (0.1709nmolas/sec/mg) que la velocidad de papaína (0.8358 nmolas/sec/mg). En el caso de la combinación de las dos enzimas los resultados fueron curiosamente que los valores de K_m , la K_{cat} y las $V_{m\acute{a}x}$ obtenidas son valores muy cercanos al promedio de la suma de los valores de cada una de las enzimas por separado. Aunque estos resultados no eran precisamente los esperados (ver discusión) inicialmente nos permitieron pensar que al haber competencia por el sustrato por parte de las dos enzimas, la mayor afinidad de la tripsina es compensada por la mayor velocidad de la papaína, aunque ésta tenga menor afinidad por el sustrato. Con estos resultados podemos decir que ambas enzimas tienen una probabilidad semejante de actuar sobre el enlace peptídico susceptible de corte al compensarse la alta afinidad de la tripsina con su menor velocidad y la baja afinidad dela papaína con su mayor velocidad.

Tabla X. Parámetros cinéticos para tripsina, papaína y tripsina-papaína con el amortiguador óptimo y el sustrato fluorogénico Bz-L-Arg-MCA.

Enzima	Km (mM)	Kcat (sec ⁻¹)	Kcat/Km (mM ⁻¹ sec ⁻¹)	Vmáx (nmolas/sec/mg)
Tripsina	0.0439	11.39	259.53	0.1709
Papaína	0.4341	55.7228	128.36	0.8358
Tripsina-papaína	0.2002	44.58	222.67	0.6687

Capítulo IV . DISCUSION

La importancia de las proteinasas en los procesos celulares es muy variada, se ha mencionado la cantidad de procesos en los que participan, como digestión, corte de péptidos señal, formación de moléculas biológicamente activas, herramientas para la secuenciación de proteínas, aislamiento de dominios de proteínas complejas, penetración al tejido del hospedero y el proceso patogénico en general, entre otras.

Comprender los mecanismos de acción de las proteinasas, la especificidad por el sustrato y las condiciones que favorecen la actividad proteolítica, puede ayudarnos a tener una aproximación de los fenómenos *in vivo* en los que participan las proteinasas. Dentro de la gran variedad de procesos en los que participan las proteinasas, es interesante el hecho de que ciertas clases catalíticas de proteinasas predominen en ciertos grupos de organismos. Las preguntas obligadas son ¿a qué se debe dicha predominancia?, ¿qué ventajas adaptativas obtienen los organismos al utilizar proteinasas de la misma clase catalítica?

La hipótesis inicial fue que las proteinasas de la misma clase catalítica utilizan las mismas o semejantes condiciones para llevar a cabo la actividad de manera eficiente, y que por lo tanto, en un tipo de organismos se presentan ciertas condiciones que favorecen la actividad de cierta clase catalítica de proteinasas. Es así que la mezcla de proteinasas de la misma clase catalítica debería ser más eficiente que la combinación de proteinasas de diferente clase ya que, en este último caso, las condiciones que favorecen la actividad de una clase catalítica pueden ser inhibitorias para la otra.

A partir de los resultados en los que se mezclaron dos y tres proteinasas de la misma clase catalítica (serina), se pudo observar que la cantidad de péptidos liberados por la combinación de dos y tres enzimas fue siempre mayor que la

cantidad liberada por dos y tres veces respectivamente las enzimas puras. Por otro lado, la combinación de proteinasas de diferente clase catalítica siempre fue muy deficiente. En este punto, fue posible concluir que las condiciones que requieren las proteinasas para llevar a cabo su actividad son determinantes en que la combinación de las proteinasas de la misma clase catalítica sea más eficiente que la combinación de proteinasas de diferente clase. De esta forma, se sabe que las condiciones que favorecen la actividad de las proteinasas de serina no lo son para las de cisteína. Por ello fue necesario encontrar un amortiguador en el cual la concentración de cisteína y EDTA fuera tal que se obtuviera una actividad proteolítica semejante para dos proteinasas de diferente clase catalítica.

La actividad proteolítica por la acción concertada de dos proteasas de la misma clase catalítica sobre el mismo sustrato existe en la naturaleza, y tal como lo supusimos, la ventaja que obtienen los organismos es una mayor eficiencia en la actividad proteolítica utilizando las mismas condiciones. Este es el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno oportunista capaz de causar infecciones mortales por neumonías en pacientes que sufren de cáncer, quemaduras, fibrosis quística o pacientes recién operados de alguna enfermedad respiratoria (Moriyama y col., 1965). Este patógeno provoca hemorragias en órganos internos por destrucción de fibras elásticas de arterias, diafragma, tracto gastrointestinal, intestino y córnea. Se caracterizaron tres metabolitos determinantes en la infección por *P. aeruginosa* y que son dos proteasas y una exotoxina. Los pacientes con quemaduras carecen de una barrera anatómica por la piel quemada, lo que permite la invasión del patógeno a la sangre y por lo tanto la infección de *P. aeruginosa* es letal. Esto acrecentó el interés por caracterizar las proteasas que participan. En 1965, Moriyama y colaboradores propusieron que una de las proteasas era la elastasa, debido a que existía degradación de tejido

conectivo de paredes arteriales. Posteriormente se verificó la existencia de dicha elastasa y de otra proteinasa a la que durante mucho tiempo se le denominó proteinasa alcalina (Moriyama y col, 1965, Kharazmi, 1991.)

En 1990, Peters y Galloway purificaron dicha proteinasa a la que denominaron Las A y observaron que tenía el efecto de incrementar la actividad elastolítica de la elastasa. La proteína Las A posee una actividad elastolítica mínima, sin embargo, aumenta la actividad de la elastasa.

Galloway, en 1991, caracterizó dicha proteína. En ese reporte demuestra que la elastasa de *P.aeruginosa* no es, por sí sola, altamente eficiente como para causar tales daños al tejido conectivo. De tal manera, que la elastasa no actúa aisladamente para efectuar tan rápida y eficientemente la elastólisis severa que se observa durante la infección. Caracterizando a la proteinasa Las A observó que dicha enzima es una proteinasa tipo serina (al igual que la elastasa). Esta proteasa Las A rompe la elastina modificando su estructura y haciéndola más susceptible a la acción proteolítica y permitiendo que la elastasa actúe sobre una elastina modificada para una rápida y eficiente digestión proteolítica. En presencia de elastasa, una pequeña cantidad de proteína Las A contribuye de manera significativa a la rápida y total destrucción del tejido conectivo.

Lo mismo probablemente sucede en nuestros experimentos de combinación de dos y tres proteinasas de serina. Como se mencionó anteriormente, esta combinación resultó siempre más eficiente, sobre todo en el caso de tres proteinasas. En el caso de mezclar proteinasas de diferente clase catalítica nuestros resultados muestran claramente que las condiciones establecidas por el amortiguador en que cada una de las enzimas realizan óptimamente su actividad, determinan el que no haya un aumento en la actividad de la mezcla de dos proteinasas de diferente clase catalítica. Las condiciones en las que la

papaína realiza su actividad no son los mismas que para tripsina, y esto se traduce en que la actividad de tripsina es disminuída. Lo mismo sucede en el caso contrario.

En el caso de las proteinasas de serina es necesario tomar en cuenta que cada una de estas proteinasas tiene sitios específicos de corte, que son diferentes entre cada una de ellas. De tal manera, que si combinamos tres proteinasas para digerir un sustrato proteico, el cortar en diferentes sitios se traduce en ir exponiendo más enlaces peptídicos de la proteína, proporcionándole a las enzimas una conformación de sustrato más susceptible a la acción proteolítica y por lo tanto, la eficiencia se incrementa. Suponíamos que aún bajo las mismas condiciones para la actividad, la competencia por el sustrato no favorecería la actividad proteolítica, por lo que se decidió buscar un sustrato sintético con un único sitio de corte para dos proteinasas de la misma clase catalítica. El haber obtenido este sustrato, hubiera sido ideal para nuestros experimentos, sin embargo, solo se pudo obtener un sustrato con un único sitio de corte para tripsina y papaína. Se decidió utilizar este sustrato para estas proteinasas con el amortiguador Tris-HCl 0.1 M, cisteína 50 μ M y EDTA 1 mM, suponiendo que en bajo estas condiciones ambas enzimas presentarían una actividad semejante de acuerdo a nuestros resultados con digestión de azocaseína.

Los resultados que se obtuvieron en estos experimentos para tripsina y papaína con el sustrato sintético y en este amortiguador demostraron que la tripsina presenta una mayor afinidad por el sustrato (10 veces mayor) que la papaína. Sin embargo, su velocidad de hidrólisis es aproximadamente 8 veces menor que la de la papaína.

Al hacer la combinación de las dos proteinasas, los valores de K_{cat} y $V_{máx}$ son valores que se encuentran en un promedio de los obtenidos con las enzimas

por separado. Antes de obtener los resultados, en realidad suponíamos que la tripsina por tener mayor afinidad por el sustrato, dominaría sobre la mayor velocidad de la papaína.

Como después de observar los resultados no ocurrió lo que se esperaba, la primera conclusión fue que la mayor afinidad por el sustrato por parte de la tripsina comparada con la de papaína se compensaba con la mayor velocidad de esta última, y que esto explicaría la obtención de valores promedio en la combinación de las dos enzimas.

Sin embargo, existe un factor muy importante, que es que los experimentos en que se utilizó el sustrato sintético se hicieron con concentraciones saturantes de sustrato. Si consideramos ésto, no debería existir competencia por el sustrato aunque haya un solo enlace peptídico, ya que cada enzima posee un sitio independiente para hidrolizar. Esto nos indicaría que la ecuación de Michaelis que se utilizó para el tratamiento de los datos, aunque funciona para la papaína y la tripsina por separado, no permite ver qué es lo que está sucediendo cuando se realiza la combinación de las dos enzimas.

Una alternativa muy interesante es realizar el tratamiento de los datos con una ecuación que calcule la velocidad para un sistema de múltiples enzimas que catalizan la misma reacción. En el caso de una preparación de este tipo, la velocidad de la reacción con dos enzimas, a cualquier concentración de sustrato, es la suma de las velocidades de cada una de las enzimas (Segel, 1975). Sin embargo, existe una contribución relativa de cada enzima a la velocidad total de la reacción. En el caso de los datos reportados en la tabla X, se tiene un sistema compuesto por una enzima 1 (tripsina) que tiene una K_m y una V_{max} diez y ocho veces menores respectivamente que la enzima 2. Constituyendo un sistema de tipo: $V_{max1} < V_{max2}$; $K_{m1} < K_{m2}$. Teóricamente, a bajas concentraciones de sustrato, la enzima con menor K_m es la que contribuye a la velocidad

observada. Una forma gráfica de observar esto, es que si se obtiene una curva de $1/v$ versus $1/s$ de los valores para la preparación con dos enzimas, se puede ver que a menores concentraciones de sustrato, (conforme aumenta $1/s$) la curva tiende hasta una línea recta. Con altas concentraciones de sustrato se observa una curvatura muy cerca del eje $1/v$.

Esta curva puede decomponerse en dos líneas, una que incluye aquellos valores que forman la curvatura cerca del eje y la otra para la parte lineal a menores concentraciones de sustrato. A partir de esta representación es posible calcular gráficamente los valores de K_m y $V_{máx}$ para cada enzima, los cuales se comparan con los obtenidos para cada una de las enzimas por separado.

Este tipo de cálculos no se pudieron realizar en este trabajo debido a que por restricciones técnicas en los ensayos fluorométricos, (como el tiempo que se invierte en la medición para cada una de las concentraciones de sustrato, así como que el sustrato fluorogénico no puede utilizarse el día siguiente a su preparación), carecemos de una gran cantidad de valores que nos permitirían comprobar lo explicado anteriormente. Por otro lado, obteniendo este tipo de resultados podríamos comparar los valores de cada enzima para la mezcla de dos proteinasas y compararlos con los obtenidos por las enzimas por separado.

Esta es una perspectiva importante para este trabajo: obtener valores de velocidad en muchas más concentraciones de sustrato para la combinación de tripsina y de papaína y tratar de explicar los valores promedio que se obtuvieron con la mezcla de ambas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se llegaron a las siguientes conclusiones, mismas que se discuten en la sección anterior:

- La cantidad de péptidos liberados por la combinación de dos y tres proteinasas de la misma clase catalítica fue siempre mayor que la cantidad liberada por dos y tres veces respectivamente las enzimas puras.
- La combinación de dos proteinasas de diferente clase catalítica resultó ser una mezcla con muy poca actividad.
- Las condiciones que favorecen la actividad de las proteinasas de serina no lo son para las de cisteína y viceversa. Es así que las condiciones que requieren las proteinasas para llevar a cabo su actividad, son determinantes en que la combinación de proteinasas de la misma clase catalítica sea más eficiente que la combinación de proteinasas de diferente clase catalítica.
- La proteínasa Las A y la elastasa de *P aeruginosa* constituyen un ejemplo de que *in vivo* existe la acción concertada de proteinasas de la misma clase catalítica para incrementar la actividad proteolítica que tendrían cada una de ellas por separado.
- Se encontró un amortiguador en el cual fue posible obtener aproximadamente la misma actividad para dos proteinasas de la misma clase catalítica.
- Utilizando Bz-L-Arg-MCA y el amortiguador anterior se observó que la tripsina presenta 10 veces una mayor afinidad por el sustrato que la papaína.
- La velocidad de tripsina por otro lado, en estas mismas condiciones es aproximadamente ocho veces menor que la velocidad de papaína.
- Es necesario obtener más valores de velocidad a diferentes concentraciones de sustrato en el sistema con dos enzimas, para poder utilizar la ecuación que

calcula la velocidad de una reacción que incluye varias enzimas y las transformaciones siguientes que explicarán los valores obtenidos para la mezcla de tripsina y papaína con Bz-L-Arg-MCA.

REFERENCIAS

Barret,A., (1977) Introduction to the history and clasification of tissue proteinases, in Proteinases in Mammalian Cells and Tissues, Barret,A.J., Ed., Elsevier/North-Holland Biomedical Press.

Barret,A.J. and Mc Donald,J.K. (1980) Mammalian Proteases. Vol.1 Academic Press 416 pp

Barret,A.J. and G. Salvensen (1986) Proteinase Inhibitors Ed. Elsevier. Amsterdam. 661 pp

Barret,A., (1986) The classes of Proteolytic Enzymes. In Plant Proteolytic Enzymes Vol I, Michael J.Dalling Ed. CRC Press.Florida.

Barret,A.J., and Rawlings,N.D. (1991) Types and families of endopeptidases. Biochemical Society Transactions 19: 707-715.

Barret,A.J., and Rawlings,N.D. (1991) Types and families of endopeptidases. Biochemical Society Transactions 19: 707-715.

Blow, D.M. (1976) Structure and mechanism of chimotrypsin. Acc.Chem.Res. 9: 145-152

Bond,J.S.,and Beynon,R.J. (1989) Proteolytic Enzymes: a practical approach, Bond,J.S. and Beynon,R.J.Ed., IRL Press. 259 pp

Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive metod for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254

Branden,C. y J.Tooze. (1991) Introduction to Protein Structure. Garland Publishing Inc., New York. 302 pp.

Fersht, A., (1985) Enzyme Structure and Mechanisms. W.H.Freeman and Company, New York.

Galloway,D.R. (1991) *Pseudomonas aeruginosa* elastase and elastolysis revisited: recent developments. Molecular Microbiology 5(10):2315-2321

Gautam,S. De la Motte,R. y Wagner,F., (1989) Protease assays methods. En: Proteolytic Enzymes: a practical approach. (Ed. Bond, J.S. and Beynon,R.J.)IRL Press. 259 pp

Kanaoka,Y., Takahashi,T. Nakayama,H., Takada, K., Kimura, T., Sakakibara, S., (1977)a Synthesis of a key Fluorogenic Amide, L-arginine-4-methylcoumaryl-7-amide (l-Arg-MCA) and its derivatives.Fluorescence Assays for trypsin and papain.Chem.Pharm.Bull. 25(11) 3126-3128

Kanaoka,Y., Takahashi,T.and Nakayama,H., (1977)b Organic fluorescence reagent IV (Part III) Chem.Pharm.Bull. 25: 362

Kharazmi,A. (1991) Mechanisms involved in the evasion of the host defence by *Pseudomonas aeruginosa*.Immunology letters 30: 201-206

Kraut, J. 1988.Serine proteases:structure and mechanism of catalysis. Annu.Rev.Biochem. 46:331-358.

Lakowicz,J.R., 1983. Principles of Fluorescence Spectroscopy pp 341-382, Plenum,New York.

Matsushima,K., 1979A note on a novel fungal alkaline proteinase inhibitor from *Aspergillus oryzae* . Biochem.Biophys.Res.Commun.90: 1142-1146

McKerrow, J., Sun,E., Rosenthal,P., y Bouvier,J., (1993) The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa. Annu.Rev.Microbiol. 47:821-53

Morihara,K. y J.Y.Homma.(1965) *Pseudomonas* proteases. In Bacterial Enzymes and Virulence. Ian A.Holder., Ed. CRC Press,Florida.

Morihara,K.,Tsuzuki,H.,Oka,T., Inoue,H, and Ebata,M. 1965.*Pseudomonas aeruginosa* elastase, isolation,crystalization and preliminary characterization. J.Biol.Chem., 240: 3295-3298.

Morihara,K.,and Tsuzuki, H. (1967) Elastolytic properties of varios proteinases from microbial origin, Arch.Biochem.Biophys., 120:68-

Neurath,H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes.Science 224: 350-357

North, M.(1982)a Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic microorganisms. Microbiol.Rev. 46 (3): 308-340

- North, M.(1982)b a study of the proteinase activity released by *Dyctostelium discoideum* during starvation. *J.Gen.Microbiol.* 128: 1653-1659
- North,M.J. y J.M. Harwood (1979) Multiple acid proteinases in the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochim Biophys.Acta* 566:222-223
- Ostoa-Saloma,P. (1991)Relaciones estructurales entre dos proteinasas de *Entamoeba histolytica* Tesis (Doctorado en Investigación Biomédica Básica), Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peters,J.E., y Galloway,R.D. (1990) Purification and characterization of an active fragment of the Las A Protein from *Pseudomonas aeruginosa* :enhancement of elastase activity. *Journal of Bacteriol.* 172(5): 2236-2240
- Polgár,L. , 1989. Mechanisms of Protease Action. CRC Press Inc. 223 pp.
- Rawlings,N.D. y Barret,A.J. (1993) Evolutionary families of endopeptidases. *Biochem.J.*290: 205-218
- Rivett,J.A. (1989)a The multicatalytic proteinase of mammalian cells. *Arch. Biochem. and Bioph.*268(1): 1-8
- Rivett,J.A. (1989)b High molecular mass intracellular proteases. *Biochem. J.* 263: 625-633
- Segel, H.I. (1975).Enzyme kinetics. John Wiley & Sons, Inc. USA 957 pp
- Spector,T. (1978) Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation.*Anal.Biochem.* 86: 142-146
- Starkey,P.M. (1977) Elastase and cathepsin G, the serine proteinases of human neutrophil leucocytes and spleen p 83. En: Barret A.; editor *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues (Research Monographs in Cell and Tissue Physiology)* North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- Steiger,R.F. , F.R. Opperdoes y J. Bontemps. (1980) Subcellular fractionation of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms with special reference to hydrolases. *Eur.J.Biochem.*105:163-175
- Tang,J. (1979) Evolution in the structure and function of carboxyl proteases. *Mol.Cell.Biochem.* 26: 93-109
- Voet,D y Voet,J.G. (1990) *Biochemistry.* John Wiley & Sons, New York. 1223 pp
- Warshel,A., (1989)How do serine proteinases really work? (1989) *Biochemistry* 28: 3629-3637

Wiener, E. y M. Ashworth (1970) The isolation and characterization of lysosomal particles from myxamoebae of the cellular slime mould *Dictyostellium discoideum*. *Biochem. J.* 118:505-512