

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO DE LA MODIFICACION QUIMICA DE LA
PAPAINA CON EL REACTIVO 2-HIDROXI-5 NITRO
BROMO BENCILO. SU EFECTO EN LA ACTIVIDAD.

279

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE:
QUIMICO
PRESENTE A
EDUARDO ALEXIS PESCHARD MARISCAL



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

LAS Fesiv
BO
FECHA 1974
PROC Mit 26



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA

Presidente:	Prof. Enrique Garcia Galeano.
Vocal:	Prof. Alejandro Blanco Labra.
Secretario:	Prof. Javier Pérez Villaseñor.
1er. suplente:	Prof. Rubén Berra García Coss.
2o. suplente:	Prof. Oscar H. Galván Félix.

Sitio donde se desarrolla el tema: DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
División de Estudios Superiores. Facultad de Química, U.N.A.M.

Sustentante: Eduardo Alexis Peschard Mariscal.

Asesor del Tema: Dr. Alejandro Blanco Labra.

"Quería tan solo intentar vivir
aquello que tendía a brotar es-
pontáneamente de mí. ¿Porqué ha
bía de serme tan difícil?"

Herman Hess.

R.

A mis seres queridos.

Quisiera expresar mi agradecimiento más sincero a todas las personas que, gracias a su valiosa colaboración, hicieron posible la realización del presente trabajo.

C O N T E N I D O .

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	
Enzimas Proteolíticas.	3
✓ La papaína y sus características.	
a) Proteínicas.	5
b) Enzimáticas.	13
Determinación de Triptofanos en Proteínas.	38
Modificación Química de Triptofanos.	42
MATERIALES.	48
METODOLOGIA.	
Recristalización de la Papaína.	49
✓ Determinación de la Actividad Enzimática.	49
Determinación de la Constante de Catálisis (k cat.).	51
Modificación Química de Triptofanos.	53
Determinación Colorimétrica de Triptofanos.	54
Titulación Fluorométrica de Triptofanos.	55
Purificación de las Muestras Modificadas.	56
✓ Determinación de la concentración de la enzima después de la purificación.	57
✓ Activación de la Papaína.	59
RESULTADOS.	
Cristalización y Actividad de la Papaína.	61
Determinación Colorimétrica de Triptofanos.	64
Titulación Fluorométrica de Triptofanos.	67
Influencia de la Modificación en la Actividad Enzimática.	72
Efecto de la variación de la concentración del sustrato en la Actividad de las Enzimas Modificadas.	73
DISCUSION.	86
BIBLIOGRAFIA.	98

I N T R O D U C C I O N .

Dentro del extenso e interesante campo de la enzimología, una de las preguntas que más ha llamado la atención es la de "¿Cómo funcionan los catalizadores biológicos, cuya eficiencia, desde el punto de vista químico, es tan elevada?".

Con el fin de aclarar esta incógnita, se iniciaron experimentos en muy diversos laboratorios, que abarcaban desde la elucidación de la estructura primaria, hasta la determinación total de su estructura terciaria con métodos modernos y sofisticados.

Ya que se conoce como es la molécula, al menos en su forma más estable, surge la pregunta de ¿cuál es su parte activa?, y una vez investigados los aminoácidos que la forman, lo siguiente a saber sería como activan el sustrato y cual es la razón que justifica su presencia en el sitio activo. En esta forma se podría decir si la función principal de los aminoácidos del sitio activo radica en el mantenimiento de la estructura de la proteína, o si toma parte dentro del proceso de la catálisis (1).

Es hasta este momento que la "modificación química" se vuelve un arma de gran valor, ya que mediante ésta es posible dilucidar la función que posee un aminoácido específico dentro de la proteína.

Lo anterior se basa en el efecto que causa la reacción de un agente químico específico con un determinado residuo, sobre los parámetros cinéticos de la "enzima modificada".

Aún y cuando este método es muy utilizado, presenta inconvenientes puesto que para lograr resultados precisos y seguros, se requiere de agentes modificantes cuya reactivi-

dad sea lo más específica posible hacia un determinado grupo funcional.

A finales de la década pasada, mientras Drenth determinaba la estructura terciaria de la papaína, por cristalografía en Rayos X, completando así el conocimiento de las tres estructuras de esta enzima, Husain y colaboradores (2,3) demostraban que en diferentes enzimas proteolíticas sulfhidrúlicas, de origen vegetal (papaína, bromelina y ficina), existía un residuo de triptofano adyacente a la cisteína activa, a la vez que tenían evidencias de la afinidad de estas enzimas por sustratos aromáticos, característica que hasta ahora se ha tratado de explicar diciendo que el residuo indólico - del triptofano era capaz de interactuar electrónicamente - con compuestos aromáticos.

Por todo lo hasta aquí expuesto y con el afán de contribuir en este campo de la bioquímica tan interesante, se partió de la hipótesis de que el triptofano adyacente a la cisteína activa podía ser el responsable de la hidrólisis específica de estas enzimas sobre sustratos aromáticos. Así pues, se decidió desarrollar una investigación para tratar de proponer una teoría que explicara la razón por la cual las enzimas papaína, bromelina y ficina, que tienen un triptofano adyacente a la cisteína activa, presentaban una afinidad específica ante sustratos aromáticos. Por otro lado también se trató de establecer la función de cada uno de los demás residuos de triptofano dentro de la molécula de PAPAÍNA.

GENERALIDADES.ENZIMAS PROTEOLITICAS.-

Dentro del ámbito científico podemos considerar que en la investigación pura, los experimentos surgen de sucesos que se nos presentan y de los cuales no se tiene hasta el momento una respuesta. Así pues, la mayoría de las investigaciones -- surgen como consecuencia de la observación de fenómenos que se suceden en la naturaleza y de los cuales buscamos una explicación.

Ante esta situación nos encontramos con las enzimas proteolíticas o proteasas ya que el conocimiento de su funcionamiento y composición se viene realizando desde comienzos de este siglo, aunque ya en el siglo pasado se tenían evidencias de la acción de estas proteasas sobre proteínas, no teniéndose entonces un conocimiento claro de las reacciones involucradas.

Los primeros pasos que se dieron para un entendimiento del fenómeno y de los elementos involucrados en él se iniciaron con el conocimiento de que las proteínas eran entidades formadas por aminoácidos unidos entre sí por medio de enlaces peptídicos, como sugirieron independientemente, Emil Fischer y Hofmeister (63).

Demostraciones convincentes de que las proteasas hidrolizaban uniones peptídicas se lograron gracias a la utilización de péptidos sintéticos y sus derivados, los cuales probaron ser modelos adecuados para estudiar a partir de ellos, compuestos naturales de mayor complejidad. (4).

Desde décadas pasadas, las enzimas proteolíticas vienen siendo investigadas en forma intensiva primeramente por la -- disponibilidad de muchas de ellas de fuentes comerciales, se-

guido de su gran utilidad para el estudio de estructura en proteínas y finalmente por el interés de conocer su naturaleza -- química y mecanismo de acción (5).

Aunando a las causas anteriores la gran importancia que - las enzimas proteolíticas tienen en el campo de la fisiología de organismos animales y vegetales, pueden comprenderse los motivos por los cuales una parte considerable de la investiga---ción en enzimología se realice sobre enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos.

En 1942 surgió la primera clasificación de las enzimas, - basada en sugerencias de Bergmann (6) aunque ya un poco antes se hablaba de lo mismo por Waldschmidt-Leitz y Harteneck (7) y por Grassmann y Schneider (8).

Conforme los estudios fueron siendo más variados y profundos, se observó que las enzimas catalogadas como proteolíticas tenían ciertas características que las diferenciaban entre sí. Por lo tanto, desde el punto de vista de la naturaleza química de su sitio activo, las proteasas se dividieron en tres grupos importantes a saber:

1) Enzimas cuya actividad depende de la presencia de uno o más grupos tioles y que pueden ser inactivadas por reactivos que reaccionan con dichos grupos.

2) Aquellas cuya actividad es dependiente de iones metálicos unidos a la misma, como Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} , Zn^{++} , Fe^{++} y o--tros.

3) Todas aquellas que pueden ser inhibidas en su acción - catalítica por el diisopropil-fosfluorhidrato (DFP) y com---puestos órgano-fosforados similares. Estas enzimas no son inhi

bidas por metales pesados o reactivos para grupos tiol.

Debido a la creciente complejidad de los trabajos y estudios por realizar en este campo, surge la necesidad de encontrar modelos adecuados cuyos estudios específicos puedan ser extrapolados a entidades biológicas de mayor complejidad.

LA PAPAINA Y SUS CARACTERISTICAS.-

Características proteínicas.- La papaína es una enzima proteolítica de origen vegetal que se encuentra presente, junto con otras similares (9), en el árbol de la papaya (Carica papaya), principalmente en el látex del fruto no maduro.

Como es de esperarse, la papaína fué conocida inicialmente por sus propiedades enzimáticas y posteriormente se realizaron estudios para conocer como era y por qué mecanismo actuaba.

Así pues, desde hace siglos los indígenas mexicanos envolvían con cáscaras rayadas de papaya los trozos de carne que deseaban ablandar, y no fué sino hasta 1879 cuando Wurtz y Bouchut (10) le dieron el nombre de papaína al principio proteolítico presente en el exudado de la cáscara de papaya, siendo este un líquido viscoso que se oscurece al contacto con el aire.

En la actualidad el término papaína se aplica tanto al látex crudo y seco como a la enzima proteolítica cristalina; ambos productos son de interés considerable (11).

Hacia fines del siglo pasado, se inician los primeros estudios importantes de la papaína como una proteína, al mostrar el mismo Wurtz (12,13) que el material activo del látex era un "cuerpo albuminoide" por lo cual lo clasificó junto con la ---

tripsina; o sea, una endopeptidasa ya que como resultado de sus estudios sobre digestión de fibrina con papaína, postulaba que ésta actuaba uniéndose a la fibrina. Esta es, entre otras, la primera evidencia de un complejo enzima-sustrato (13).

Puede considerarse que los estudios sobre la composición de aminoácidos de esta enzima, tuvieron su origen con la observación realizada en 1901 por el botánico inglés Vines (14) sobre la presencia de triptofano libre en la digestión de fibrina por la papaína. Esto causó sorpresa ya que estudios realizados anteriormente por Chittenden (15,16) estaban en contraposición pues se creía que no había la formación de aminoácidos libres por la acción de proteasas en proteínas. Esta controversia se centró en el uso, por Vines, de cianuros y su peculiar "efecto activante" en la papaína. Este problema es aclarado finalmente por Mendel y Blood (17), al demostrar el efecto activante de cianuros y del ácido sulfhídrico en la papaína.

En esta forma se inician estudios de grupos sulfhidrilo - en la papaína por Bersin y Longemann (18) y Hellerman y colaboradores (19).

Con la idea de ahondar en el tema, surge la necesidad de trabajar con la enzima, lo más pura posible y es cuando Kimmel y Smith desarrollan un método para cristalizar la enzima (20), dedicándose posteriormente a estudiar su estructura; no sin antes ya tenerse una técnica adecuada para aislar la papaína del látex fresco (21).

Los estudios de la papaína como proteína se inician con la determinación de la composición de aminoácidos, mediante estudios de cromatografía de intercambio iónico (18) siendo redeterminada por métodos más nuevos, en el analizador automático de aminoácidos de Spackman, Stein y Moore (29).

De ambos estudios se evidenció que la hidrólisis en ácido clorhídrico 6N, a 110°C y por 70 h. no lograba romper completamente todos los enlaces peptídicos, conclusión obtenida de estudios cuantitativos de aminoácidos liberados por hidrólisis enzimática completa y por estudios de secuencia de péptidos obtenidos por degradación enzimática ya que las principales diferencias entre los resultados obtenidos por cromatografía y los más recientes obtenidos por Kimmel y colaboradores, en el analizador automático de aminoácidos, eran las recuperaciones de un residuo adicional de isoleucina, leucina, arginina, lisina e histidina. Con estas reformas, la papaína contenía 185 aminoácidos, con un peso molecular de 20,900.

Hasta este entonces se contaba con resultados verídicos - como la existencia de tres enlaces disulfuro (23,24), los grupos amino libres de la papaína y su secuencia aminoterminal (isoleucina, prolina, glutámico) determinados por Thompson (25) utilizando el procedimiento de Sanger (26), así como el contenido exacto de algunos aminoácidos (25).

Kimmel, Smith y colaboradores (27,28) abordan el problema de determinar la secuencia completa de la papaína, de la siguiente manera:

Derivados de papaína inactiva, como papaína oxidada (con ácido perbórmico, de 0° a -5° para romper enlaces disulfuro y convertir cistina y cisteína en ácido cisteico) (24) y S-carboximetil-papaína fueron degradados con tripsina y quimotripsina.

Los péptidos resultantes fueron separados por cromatografía de intercambio iónico y purificados por electroforesis de zona o cromatografía de partición, después de lo cual se realizó el análisis cuantitativo de cada péptido quedando así de

terminada la secuencia de los aminoácidos.

Los resultados de estos estudios estaban incompletos ya que en ambos casos de digestión con tripsina y quimotripsina, una gran cantidad de residuo insoluble, permanecería como tal después de que la digestión había aparentemente cesado.

Examinado los péptidos solubles resultantes, se observó que estas fracciones no constaban completamente con los aminoácidos de la papaína. Esto sugirió que ciertos enlaces en el residuo insoluble eran resistentes a la acción de ambas proteasas y también que existían varios fragmentos que no podían aislarse por los métodos usualmente utilizados; pero a pesar de lo anterior, se lograron establecer algunas secuencias de aminoácidos, sobreponiendo los datos analíticos de los fragmentos obtenidos en esta digestión. De todos estos estudios se propuso una secuencia que al cabo de los años resultó incompleta.

Durante la segunda mitad de la década pasada, se abordó nuevamente el problema de la determinación de la secuencia de los aminoácidos de la papaína, debido a que se observó que -- las publicaciones de Kimmel y colaboradores, en 1964 (29), ne cesitaban una considerable revisión, Esto surgió a causa de -- estudios que Drenth (30,31,32) había realizado sobre papaína aplicando cristalografía, dispersión óptica rotatoria y rayos X, con el fin de obtener la estructura terciaria de la misma, De la combinación de estos estudios se concluyó que la parte de la molécula comprendida entre los residuos 26 y 41 que no se hidrolizaba, formaba parte de una hélice alfa, que iba de la superficie de la molécula hacia el interior de la propia -- estructura molecular.

Los investigadores que se encargaron de estos estudios,

Husain y Lowe (33), publicaron la actual y completa secuencia de aminoácidos de la papaína. La forma en la que lo lograron fué tratar la enzima inactiva con ácido bromoacético marcado con C^{14} que reacciona selectivamente con el grupo tiol libre (34). Después se purificó por cromatografía en columna y los enlaces disulfuro se redujeron con mercapto-etanol y amino-etanaldehído, seguido de una digestión trípica. El polipéptido radiactivo contenía la fracción comprendida entre los residuos 18 al 58, el cual, posteriormente, se sometió a otra nueva digestión con pepsina obteniéndose ahora la fracción radiactiva del 18 al 47, Con ácido clorhídrico 0.4N se redujo a la sección del 24 al 43. Con posteriores degradaciones, utilizando las carboxipeptidasas A y B y la degradación cíclica de Edman (34) y, como medio de separación e identificación, la cromatografía en columna y en papel, lograron finalmente llegar a la conclusión de que los aminoácidos desconocidos (29 - al 41) eran, en el orden correcto, los siguientes: Serina-Ala nina-Valina-Treonina-Isoleucina-Glicina-Glicina-Isoleucina-Isoleucina-Lisina-Isoleucina y Arginina.

FIGURA I

Estructura primaria de la papaína, según Lowe (1971)

(1) Leu.	(10) Lis.	(19) Glu.	(28) Fen.
(2) Pro.	(11) Gli.	(20) Gli.	(29) Ser.
(3) Glu.	(12) Ala.	(21) Ser.	(30) Ala.
(4) Tir.	(13) Val.	(22) Cis.	(31) Val.
(5) Val.	(14) Treo.	(23) Gli.	(32) Val.
(6) Asp.	(15) Pro.	(24) Ser.	(33) Treo.
(7) Trp.	(16) Val.,	(25) Cis.	(34) Ilev.
(8) Arg.	(17) Lis.	(26) Trp.	(35) Gli.
(9) Glu.	(18) Asn.	(27) Ala.	(36) Gli.

(37) Ileu.	(71) Ala.	(105) Ala.	(139) Lis.
(38) Ileu.	(72) Leu.	(106) Lis.	(140) Asp.
(39) Lis.	(73) Gln.	(107) Treo.	(141) Fen.
(40) Ileu.	(74) Leu.	(108) Asp.	(142) Gln.
(41) Arg.	(75) Val.	(109) Gli.	(143) Leu.
(42) Treo.	(76) Ala.	(110) Val.	(144) Tir.
(43) Gli.	(77) Gln.	(111) Arg.	(145) Arg.
(44) Asn.	(78) Tir.	(112) Gln.	(146) Gli.
(45) Leu.	(79) Gli.	(113) Val.	(147) Gli.
(46) Asn.	(80) Ileu.	(114) Gln.	(148) Ileu.
(47) Gln.	(81) His.	(115) Pro.	(149) Fen.
(48) Tir.	(82) Tir.	(116) Tir.	(150) Val.
(49) Ser.	(83) Arg.	(117) Asn.	(151) Gli.
(50) Glu.	(84) Asn.	(118) Gln.	(152) Pro.
(51) Gln.	(85) Treo.	(119) Gli.	(153) Cis.
(52) Gln.	(86) Pro.	(120) Ala.	(154) Gli.
(53) Leu.	(87) Tir.	(121) Leu.	(155) Asn.
(54) Leu.	(88) Tir.	(122) Leu.	(156) Lis.
(55) Asp.	(89) Glu.	(123) Tir.	(157) Val.
(56) Cis.	(90) Gli.	(124) Ser.	(158) Asp.
(57) Asp.	(91) Val.	(125) Ileu.	(159) His.
(58) Arg.	(92) Gln.	(126) Ala.	(160) Ala.
(59) Arg.	(93) Arg.	(127) Asn.	(161) Val.
(60) Ser.	(94) Tir.	(128) Gln.	(162) Ala.
(61) Tir.	(95) Cis.	(129) Pro.	(163) Ala.
(62) Gli.	(96) Arg.	(130) Val.	(164) Val.
(63) Cis.	(97) Ser.	(131) Ser.	(165) Gli.
(64) Asp.	(98) Arg.	(132) Val.	(166) Tir.
(65) Gli.	(99) Glu.	(133) Val.	(167) Asn.
(66) Gli.	(100) Lis.	(134) Leu.	(168) Pro.
(67) Tir.	(101) Gli.	(135) Gln.	(169) Gli.
(68) Pro.	(102) Pro.	(136) Ala.	(170) Tir.
(69) Trp.	(103) Tir.	(137) Ala.	(171) Ileu.
(70) Ser.	(104) Ala.	(138) Gli.	(172) Leu.

(173) Ileu.	(183) Glu.	(193) Treo.	(203) Tir.
(174) Lis.	(184) Asn.	(194) Gli.	(204) Treo.
(175) Asn.	(185) Gli.	(195) Asn.	(205) Ser.
(176) Ser.	(186) Tir.	(196) Ser.	(206) Ser.
(177) Trp.	(187) Ileu.	(197) Tir.	(207) Fen.
(178) Gli.	(188) Arg.	(198) Gli.	(208) Tir.
(179) Treo.	(189) Ileu.	(199) Val'	(209) Pro.
(180) Gli.	(190) Lis.	(200) Cis.	(210) Val.
(181) Trp.	(191) Arg.	(201) Gli.	(211) Lis.
(182) Gli.	(192) Gli.	(202) Leu.	(212) Asn.

Complementando más la investigación sobre esta enzima, es tudios realizados por Drenth (35,36) y Lowe (37) culminan con - las últimas publicaciones en las que se dan a conocer las es--- tructuras primaria, secundaria y terciaria de la molécula de pa pa ña.

Resumiendo se puede decir que esta enzima actualmente tie ne las siguientes características estructurales.

Es una ca dena formada por 212 aminoácidos, cuya conforma- ción cristalina es ortorrómbica midiendo 5.0 x 3.7 x 3.7 mm. Es una pro teína binuclear, conteniendo cada núcleo, aproximadamen- te, el mismo número de residuos y estando unidos, principalmen- te, por los residuos Glicina 11, Arginina 111 y Tirosina 208.

La configuración espacial de la cadena en un núcleo, es - en gran parte independiente de la del otro núcleo.

La cadena, inicialmente, forma un centro hidrofóbico que se rodea pos teriormente, por 14 grupos metilo dando origen así al primer núcleo de la molécula; el proceso se repite para el - segundo núcleo, encontrándose ahora el centro rodeado por 16 --

grupos metilo.

Una característica importante es que cada centro comienza con una hélice alfa. En el residuo 24 se inicia la primera hélice alfa y un lado de esta hélice, de cinco vueltas, es el -- centro del núcleo I, terminando en el residuo 43. Una hélice - alfa de dos vueltas se forma del residuo 50 al 58, la cual va unida a la hélice alfa anterior por medio de una unión entre el residuo 50 (Glu) y el 35 (Gli).

Después de doce residuos, una tercera hélice alfa de tres vueltas completa el primer centro hidrofóbico. A partir del re siduo 82, la cadena forma una curvatura de carácter hidrofíli- co con lo que se completa la primera parte de la molécula.

En el residuo 111, la cadena pasa al núcleo II, después - de lo cual se transforma en una hélice alfa pequeña que va del residuo 117 (Asn), el cual es hidrofóbico por un lado, y por o tro constituye el centro del segundo núcleo de la molécula, -- hasta el residuo 126 (Ala) continuando como una cadena exten di da que adiciona algunos residuos hidrofóbicos al centro de este segundo núcleo.

A partir del residuo 160 (Ala), la cadena es completamen- te hidrofóbica.

Los residuos 164 (Val) al 173 (Ileu) forman una tira ple- gada tipo beta, formada por dos cadenas antiparalelas, siendo hidrofóbica internamente e hidrofílica externamente.

La parte final de la molécula, o sea hacia el carboxilo - terminal, se comporta en forma hidrofóbica.

Entre los dos núcleos existe una hendidura que contiene - al grupo -SH de la cisteína 25 y que constituye el sitio acti-

vo.

La molécula completa contiene tres enlaces disulfuro, los cuales se encuentran formados por las cisteínas 56-95, 22-63 y 153-200.

La unión entre los dos núcleos está dada por diferentes tipos de enlaces como son: tres ligaduras covalentes de los aminoácidos 11, 111 y 208; dos puentes de hidrógeno, entre la valina número 5 y la cadena principal de la tira plegada tipo beta y finalmente, por uniones hidrofóbicas entre la prolina 209 y grupos cercanos de la parte contraria; además existe otra interacción del mismo tipo entre la fenilalanina 207 y el triptofano 69.

Ya teniendo un conocimiento general de la estructura de la enzima, trataremos ahora de adentrarnos en el estudio de sus características enzimáticas para tratar de relacionar éstas con las características estructurales de la PAPAÍNA.

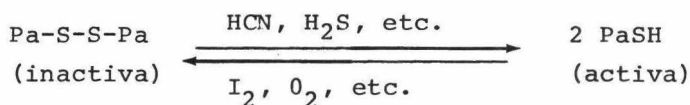
Características enzimáticas.- Los estudios sobre las características enzimáticas de la papaína se fueron realizando casi al unísono con los de su estructura, pero con la diferencia de que aquí no era posible seguir un camino lógico sino que cada investigador que trataba de abordar el tema, lo hacía a su manera y sobre el tópico que considerara más importante.

En esta forma, los primeros estudios que se realizaron sobre el respecto surgieron con los de Mendel y Blood (17) al suponer que un grupo tiol intervenía en la actividad, ya que ésta "aumentaba" al tratarse la proteasa con ácido sulfhídrico ó compuestos con grupos -SH libres.

Debido a lo anterior estos investigadores sugirieron que

los activadores funcionaban como coenzimas. Esto fué aceptado por mucho tiempo durante el cual se demostró que varios compuestos sulfhidrúlicos podían funcionar como activadores.

Sin embargo, esta teoría de la coenzima comenzó a ser estudiada por varios investigadores y uno de ellos, Krebs (38), observó que los activadores hasta entonces utilizados sobre la papaína, eran agentes efectivos para atrapar iones metálicos; por lo cual sugirió la teoría de que la activación de la papaína involucraba la eliminación de iones metálicos inhibidores. Como base a esta teoría, Krebs demostró que estos iones metálicos inhibidores ejercían su acción sobre la papaína en forma reversible al tratarse con pirofosfatos o citratos. Por otro lado, Bersin (39) y Bersin y Logemann (18) observan que los activadores utilizados son capaces de reducir enlaces disulfuro y por ello proponen el siguiente mecanismo en el cual tratan de explicar la activación de la papaína.



Kimmel y Smith (20) encuentran que la papaína no se logra activar completamente con ninguno de los reactivos utilizados y que existía una marcada diferencia en la habilidad de estos agentes reductores para activar la papaína, llegando a la conclusión de que a cualquier valor de pH, la combinación de cisteína y EDTA proporcionaba la máxima especificidad específica.

Finalmente, Smith y colaboradores (40) logran demostrar que aunque la papaína requería de una activación, la presencia continua del activador no era necesaria, lo cual probó que los activadores no funcionaban como coenzimas, desapareciendo así

la teoría que iniciaran Mendel y Blood a principios de este siglo.

Teniendo ciertos conocimientos sobre la activación de la enzima, Finkle y Smith (41) y posteriormente Glazer y Smith -- (42) estudian grupos tiol libres en la papaína y observan que esta reacciona con reactivos como p-mercuribenzoato, iodoacetamida y sales mercuriales en relación mol por mol y además, la proteína se inhibía irreversiblemente y completamente, con lo cual se demostraba que la enzima tenía un solo grupo -SH libre disponible para la reacción enzimática o actividad.

Hasta aquí se ha hablado un poco acerca de la activación de la enzima, pero mientras se realizaban estos estudios, también habían investigadores que se preocupaban por estudiar la especificidad de la proteasa, pudiéndose decir que estudios sobre este tópico se iniciaron con los experimentos de Calvery - (43), quien estudió la hidrólisis de albúmina de huevo con papaína cruda, pepsina y tripsina, encontrando que después de la digestión con papaína, ni la pepsina ni la tripsina lograban una mayor hidrólisis. Por otro lado, la digestión con pepsina y tripsina siempre permitían una posterior hidrólisis por la papaína. Con esto se demostró que esta enzima producía una mayor degradación en los sustratos que lo que otras enzimas conocidas lograban.

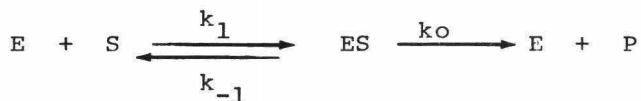
Puede considerarse que a partir de 1930 se desarrollan los estudios más extensos sobre la especificidad de la molécula, cuando Bergmann y Fruton (4), después de realizar investigaciones en 65 péptidos y derivados peptídicos, concluyeron que la especificidad de la papaína era similar a la de la tripsina, aunque no tan limitada; que era capaz de hidrolizar sustratos con o sin grupo alfa amino libre, aunque la hidrólisis de dipeptidos ocurría lentamente y que presentaba especificidad es-

tereoquímica hacia la forma L de todos los sustratos probados.

Otras características acerca de la especificidad de la molécula se fueron encontrando al realizarse estudios sobre catálisis, además de irse obteniendo al unísono, constantes y propiedades cinéticas de la papaína.

De estudios cinéticos de hidrólisis con sustratos sintéticos, cuya finalidad era la de lograr un mayor conocimiento acerca del mecanismo de acción y naturaleza de los grupos que participaban en la acción de la enzima, los realizados por Stockell y Smith (44) mostraron que la velocidad de reacción era directamente proporcional a la fuerza iónica del medio en rangos bajos de esta última, siendo la primera, independiente de la fuerza iónica en un intervalo de 0.05 y 0.3. Por encima de éste, se observaron cambios en el valor de K_m , a la vez que la papaína era lo suficientemente estable como para permitir estos estudios cinéticos en valores de pH que iban desde 2.8 hasta 10.8 y a temperaturas desde 5°C hasta 38°C.

Inicialmente se propuso un mecanismo cinético de reacción de la papaína, que fué la siguiente:



Donde:

$$K_m = \frac{k_0 + k_{-1}}{k_1} \dots\dots\dots(1)$$

Stockell y Smith trabajaron con diferentes sustratos viendo el efecto del pH sobre cada término de la ecuación (1) obte-

niendo como resultado que k_{-1} era esencialmente despreciable (44); con respecto a k_0 observaron que ésta era independiente del pH para valores mayores a 5; sin embargo, a valores menores k_0 decrecía.

Finalmente al analizar k_1 para todos los sustratos utilizados observaron que al graficar k_1 vs. pH se obtenían curvas similares a las de titulación para todos los sustratos. (Fig. 2).

De la parte ácida de la curva se determinó un valor de $-pK'$ de 4.30 el cual era virtualmente independiente de la temperatura (45). De aquí se concluyó que un grupo carboxilo sería el responsable de este valor, y que sólo podrían ser los grupos omega carboxílicos de los ácidos glutámico o aspártico, los cuales se ionizan en este rango de pH. Así pues, los datos indican la participación de un carboxilo ionizado en la actividad enzimática de la papaína. No es posible que el grupo carboxilo esencial fuera el alfa carboxilo terminal puesto que el pK' de 4.30 es más grande que el encontrado para un α -carboxilo en polipéptidos (46).

El pK' de la parte alcalina de la gráfica I depende de la temperatura, pero es casi de 8 a 37°C (45), y el calor de ionización calculado del efecto de la temperatura en el pK' es de 5.1 kcal/mol a 0°C, siendo ambos compatibles con las propiedades conocidas de un α -amino, o bien, de un grupo sulfhidrilo.

Estudios de degradación de papaína con aminopeptidasa indican que un grupo α -amino no se encuentra relacionado con el sitio activo, aunque tanto el valor del pK' como del ΔH^0 sean compatibles con las propiedades conocidas de un grupo α -amino. Por lo tanto, el grupo que debe de estar involucra

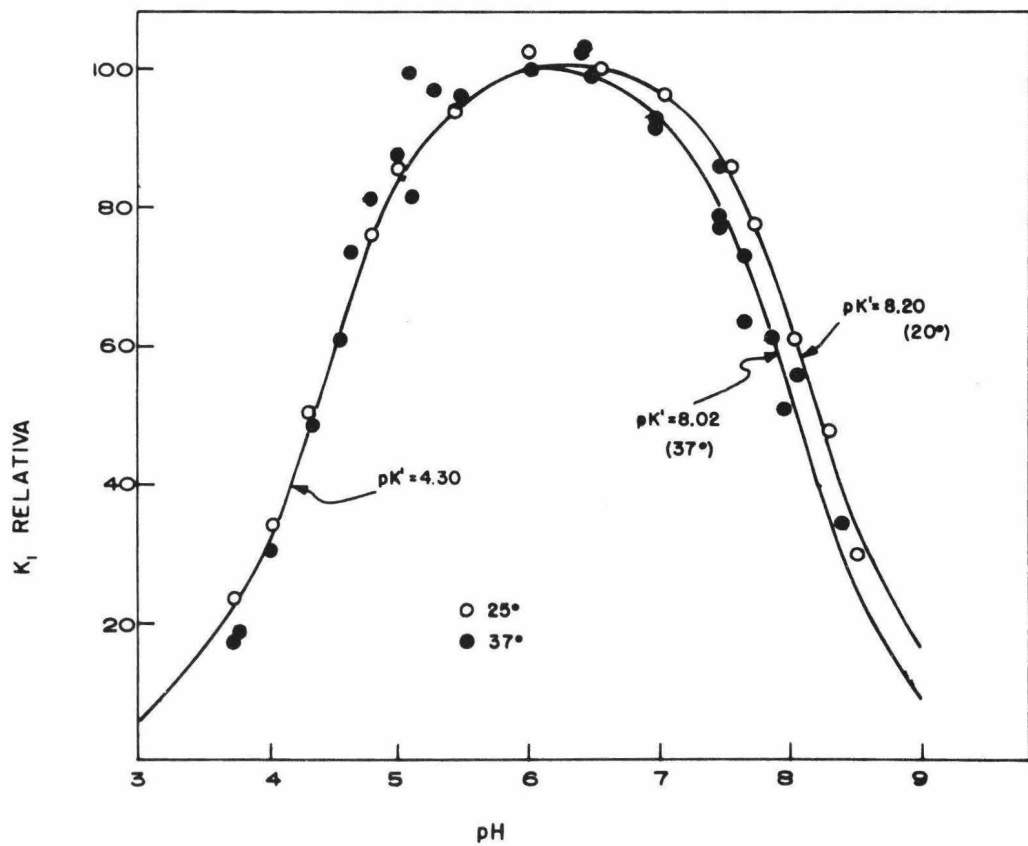


FIGURA 2

FIGURA 2. Valores relativos de k_1 como una función del pH para la hidrólisis del benzoil-L-arginin etil éster. Los valores de k_1 están dados en términos en los que el máximo es 100, con el fin de comparar los valores a las dos temperaturas. Las curvas ilustradas son teóricas, calculadas a partir de la ecuación de acción de masas para grupos titulables simples (94).

do es un tiol, estando los valores anteriores de pK' y ΔH° en concordancia con el comportamiento conocido de estos grupos -SH (45); además, existían evidencias que sostenían que un grupo tiol libre era esencial para la actividad de la papaína. Estos estudios cinéticos aportaron también la información de que debería de encontrarse no-ionizado en la enzima activa (47).

De los resultados hasta aquí expuestos se puede concluir que la actividad de la papaína depende de un grupo sulfhidrilo libre, no-ionizado y de un grupo carboxilo ionizado, supuestamente colocados en yuxtaposición uno del otro, debido al doblamiento de la molécula.

Un mecanismo posible, propuesto por Smith (45), en el cual los grupos químicos descritos anteriormente podían explicar los resultados experimentales hasta entonces conocidos, se muestra en la figura (3).

Este mecanismo postula que el paso inicial, gobernado por k_1 , involucra una reacción de transferencia en la cual el tio-éster interno es desplazado como resultado de la formación de un tio-éster con la porción carboxílica del sustrato, desprendiéndose al mismo tiempo el grupo originalmente unido al sustrato. El segundo paso enzimático, o sea el ataque del ión carboxilato de la enzima sobre el tiol-éster externo, ocasiona la liberación del grupo acilo, regenerándose el tio-éster externo, ocasiona la liberación del grupo acilo, regenerándose el tio-éster interno.

Este mecanismo es consistente con muchas de las características encontradas respecto a la influencia de varios factores experimentales sobre k_1 y k_0 como son pH, fuerza iónica, etc., sin embargo, lo más interesante es que los valores en-

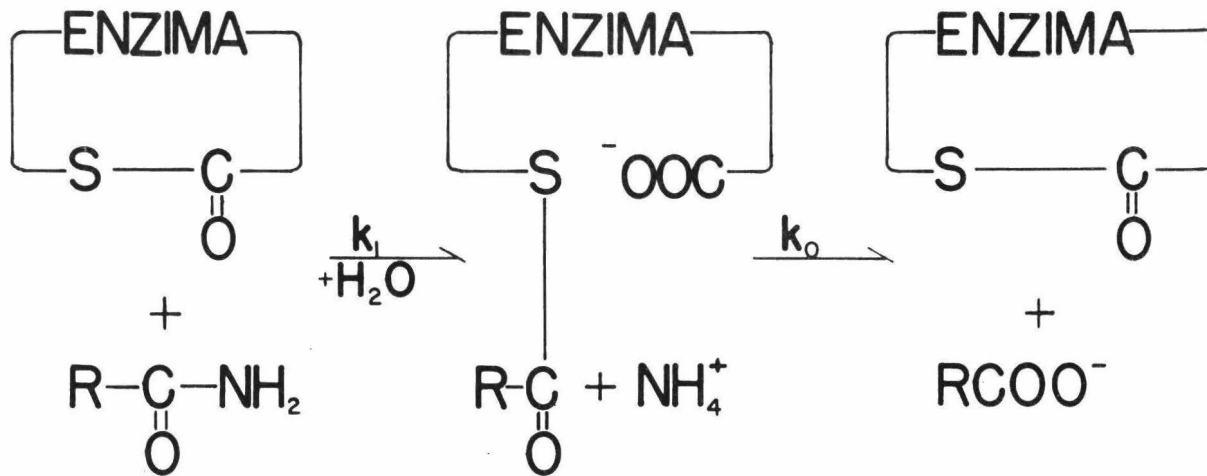


FIGURA 3

MECANISMO TENTATIVO DE ACCION DE LA PAPAINA PROPUESTO POR SMITH EN 1958. SE CONSIDERA UN TIO-ESTER EN EL SITIO ACTIVO (45).

contrados en todos estos experimentos, indican que la naturaleza del grupo saliente del sustrato juega un papel muy importante para la determinación de la velocidad relativa de reacción con el sustrato. Observaciones similares se han realizado con respecto a k_1 y k_0 para carboxipeptidasas (48).

En el mecanismo anterior, también se postula ya un intermediario acil-enzima, teniéndose como argumento convincente que la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x.}$) para los ésteres, es del orden de dos veces la de las amidas. Como lo normal es que las amidas reaccionen más lento que los ésteres, se sugiere que el paso determinante de la reacción no involucre o involucre muy poco el desplazamiento nucleofílico del grupo saliente, siendo éste probablemente, el de la desacilación del intermediario.

Estudios más recientes han indicado que el sulfhidrilo involucrado en la catálisis enzimática pertenece a la cisteína 25 y que el grupo carboxilo podría ser el del ácido aspártico 163 (44,49,50,51,52).

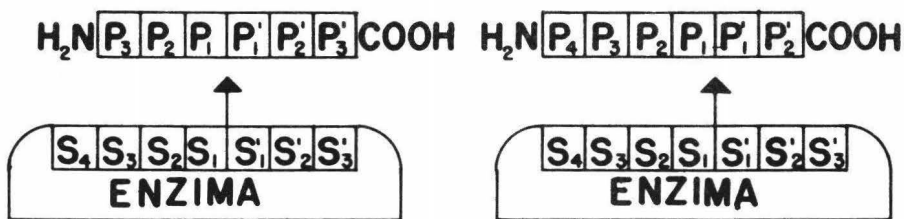
La función del sulfhidrilo, como aceptor del grupo acilo del sustrato, ha sido comprobada por estudios espectrofotométricos del complejo acil-enzima (52,53,54), mientras que la del carboxilo no ha sido aclarada todavía.

Con el deseo de seguir investigando más acerca del sitio de la papaína, Schechter y Berger (55,62,57) inician estudios del mapeo del sitio activo de esta enzima. Sabiendo que el sitio de una enzima desarrolla dos funciones que son la fijación del sustrato y la catálisis de una reacción, determinándose con ello la actividad total de la enzima hacia un sustrato en particular; es decir, determina su especificidad, estos investigadores pensaron en la posibilidad de obtener informa-

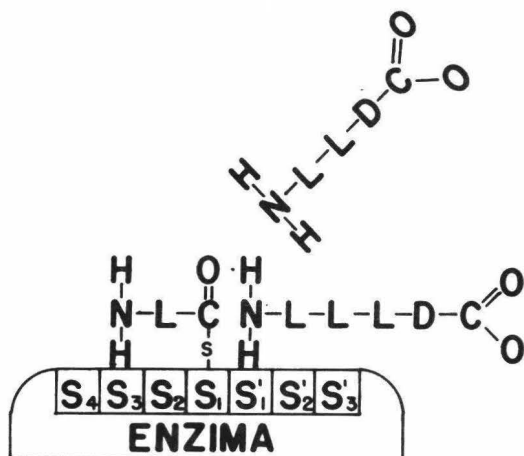
ción del sitio activo por medio de estudios cinéticos de varias reacciones enzimáticas con diferentes sustratos e inhibidores.

El principal interés de estos investigadores fué el de determinar el "tamaño" del sitio activo, por medio de estudios cinéticos de la enzima sobre 40 péptidos diastereoisoméricos de L-alanina, que iban desde di hasta hexapéptidos, comparando la actividad de la proteasa hacia: a) péptidos de longitud creciente, b) pares diastereoisoméricos de péptidos en los cuales un residuo en particular se reemplazaba por su antipoda y c) pares de sustratos en los cuales una porción particular de la cadena (un grupo metilo) se reemplazaba por otro (un grupo aromático). La influencia de estos cambios en las velocidades de reacción como una función de la distancia a partir del punto de ruptura, indicaría la longitud del sitio activo.

Su primer artículo aparece en 1967 (55) abarcando los incisos "a" y "b", obteniendo como conclusiones que existen siete subsitios activos en la molécula, localizados en ambos lados del sitio catalítico (4 en un lado y 3 en el otro), con una longitud total de 25 Å correspondiendo a siete residuos de aminoácidos de 3,5 Å cada uno, colocándose el sustrato linealmente en el sitio activo, en tal forma que cada aminoácido ocupe un subsitio de la enzima, a la vez que al cambiar una o varias L-alaninas por D-alaninas o simplemente al alargar la cadena peptídica con alguno de estos residuos se observaban fuertes efectos sobre el coeficiente $k_3/K_m = k_{cat}/K_m$ dentro de un rango de siete residuos de aminoácidos denominados de P_1 a P_4 y de P'_1 a P'_3 , correspondiendo a los siete subsitios de la proteína, denominados de S_1 a S_4 y de S'_1 a S'_3 , como se muestra en la figura (4).



A



B

FIGURA 4

FIGURA 4. A) Representación esquemática de dos posibles complejos enzima-sustrato con un hexapéptido. Las posiciones P en el sustrato, se cuentan a partir del punto de ruptura y por ello tienen la misma numeración de los subsitios que ocupan.

B) Representación esquemática de un intermediario acil-papaína (56).

Un año después los mismos autores (62) publican un trabajo acerca del mapeo del sitio activo, por medio de la identificación de interacciones específicas que varios subsitios podían presentar (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas) así como factores geométricos tales como estereoespecificidad y limitaciones de espacio, basándose para esto en lo establecido en el inciso "C", encontrando una nueva característica sobre la especificidad de la enzima, denominada --- Phe - X - Y donde el enlace entre X y Y se rompía específicamente si X iba precedida de una fenilalanina. De este trabajo logran obtener varias conclusiones como son que péptidos - en los cuales la fenilalanina ocupaba la posición del tercer residuo o alguna más distante a partir del carbono terminal, eran buenos sustratos para la papaína (péptidos conteniendo - fenilalanina como segundo residuo eran difícilmente atacados), queriendo decir con esto que la papaína presentaba una marcada afinidad hacia compuestos aromáticos, ya que donde quiera que ocurría una ruptura de un enlace peptídico, el residuo -- de fenilalanina ocupaba la posición "P₂" del sustrato, interaccionando con el subsitio S₂ de la enzima. Así pues puede - decirse que cuando el sustrato contenía un residuo aromático en la posición tres u otra más distante respecto del carbono terminal, el ataque de la enzima era siempre en el enlace con tigo inmediato en dirección hacia dicho carboxilo terminal.

También se observó que residuos de valina se comportaban en una forma similar a la fenilalanina, mostrando una fuerte afinidad por el subsitio S₂, deduciéndose que éste subsitio - interaccionaba, preferentemente, con aminoácidos hidrofóbicos tanto de pequeños péptidos como de grandes cadenas peptídicas.

Posteriormente, en 1970 (56) los mismos autores publican un artículo que resume los dos anteriores pero que además a--

barca nuevas investigaciones acerca de posibles grupos del sitio activo de la enzima que fueran los que interaccionarían con el sustrato concluyendo, como punto principal, con la hipótesis de que el grupo indólico del triptofano 177 parece ser el que interacciona con el grupo aromático del sustrato ocasionando así la especificidad en la hidrólisis de la papaína por esta serie de compuestos. Esta misma teoría la proponen Moriha et al. (57) en 1969 (figura 5).

En la década de los sesentas, el uso de inhibidores irreversibles que reaccionaran con el sitio activo aportaron, posiblemente, la evidencia más directa de residuos de aminoácidos en el sitio activo de una enzima. Con la excepción de métodos cristalográficos de rayos X, este ha sido el único método capaz de localizar estos residuos en la estructura primaria de las proteínas.

Así pues, gracias a estudios cinéticos realizados en papaína por Lowe y Williams en 1965 (58) y por Brubacher y Bender en 1966 (59), se ha sugerido que el grupo imidazol de una histidina, tenga una participación esencial en el mecanismo de acción de esta enzima.

Los trabajos publicados por Husain y Lowe en 1968 (60,61) apoyan lo anterior, basándose en experimentos realizados con agentes alquilantes sobre la papaína, los cuales han demostrado tener una especificidad exclusiva para reaccionar con la cisteína activa de la enzima.

Basado en lo anterior, estos investigadores utilizan un reactivo alquilante bifuncional (1,3 dibromoacetona, marcada con $2-C^{14}$), esperando que reaccione primero con la cisteína 25 y después con un segundo nucleófilo localizado dentro de un área definida por la estructura del reactivo (alrededor de 5 Å)

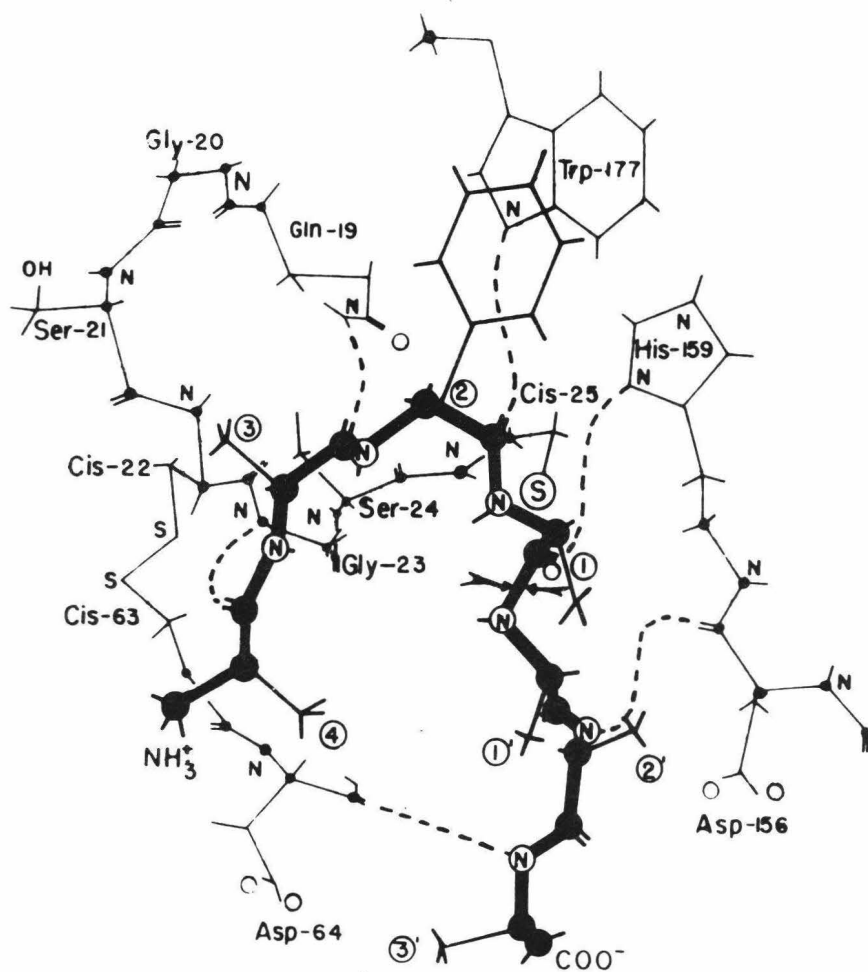


FIGURA 5
PROYECCION DE UNA PARTE DE LA ENZIMA Y
DE UN HEPTAPEPTIDO ALA₂PHE ALA₄ EN UNA
FORMA PROPUESTA DE UNION (56).

formando un enlace covalente estable. Los resultados que obtuvieron fueron que el segundo nucleófilo resultó ser una histidina, que tenía que localizarse a 5 Å de distancia de la cisteína 25 y que debería de estar en el sitio activo, por lo que se le identificó como la histidina 159.

Finalmente obtienen que la reacción entre la 1,3 dibromoacetona y el grupo imidazol de la histidina es a través del nitrógeno N-1, (fig. 6) además de que todos los datos disponibles de la dependencia del pH en la inhibición y mecanismo de acción de la papaína podían interpretarse en términos de un equilibrio prototrópico entre estos dos grupos funcionales involucrados en el sitio catalítico de la enzima, no siendo necesaria la participación de un grupo carboxílico ácido, ya -- que un estudio del ión carboxilato intramolecular, catalizando la hidrólisis del ácido s-hipuril-tioglicólico y del tio--succinato de etilo indicaban que el grupo carboxílico era un catalizador efectivo pero insuficiente como para intervenir -- en la desacilación de acil-papaína.

Estudios similares con la 1,3 dibromoacetona se realizaron sobre Ficina (3) y Bromelina (2), que son otras dos enzimas proteolíticas de origen vegetal, encontrándose los mismos residuos reaccionantes en el sitio activo.

En 1971, Jori, Scoffone et al. (64) publican los resultados de una investigación sobre la topografía del sitio activo de la papaína, los cuales concuerdan y apoyan la teoría de -- Husain y Lowe de que un residuo de histidina se encuentra muy cerca (aproximadamente 5 Å) del grupo -SH de la cisteína 25.

Sus experimentos se basaron en la propiedad que tienen -- los compuestos 2,4 dinitrofluorobenceno e isotiocianato de -- fluoresceína de poder oxidar por medio de luz visible (fotog

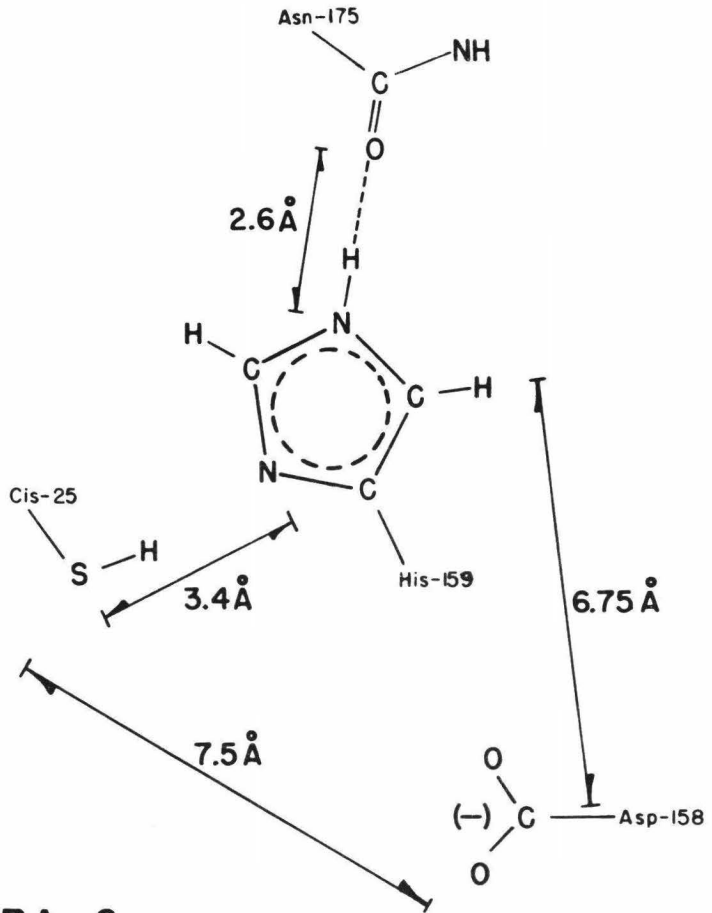


FIGURA 6

**ESQUEMA QUE INDICA LAS POSI-
CIONES RELATIVAS DE LOS GRUPOS
EN EL SITIO ACTIVO (36).**

xidación) compuestos que se encuentren a una distancia no mayor de 5 Å.

Ambos reactivos reaccionan inicialmente con la cisteína 25 y posteriormente, al exponerse a la radiación, foto-oxidación los compuestos que los rodean en un radio de acción de 5 Å.

La diferencia que existe entre estos dos compuestos es que el primero se encuentra "congelado" en el sitio activo, de acuerdo con estudios de análisis conformacional, mientras que con el segundo se lograba abarcar un mayor número de residuos cercanos a la cisteína activa.

Los resultados que obtuvieron fueron los de lograr la foto-oxidación, con la DNP-papaína, de los residuos histidina 159 y triptofano 177, mientras que con el derivado FTC-papaína se lograron modificar estos mismos residuos además del Triptofano 26, el cual se demostró estaba orientado en dirección diferente respecto al triptofano 177 y a la histidina 159.

Esta nueva modificación con la FTC-papaína se debe a -- que ésta es más voluminosa que la DPN-papaína, pudiendo interaccionar con una porción mayor de la molécula. También se observó que en esta última foto-oxidación, se ocasionaba un colapso drástico en la estructura terciaria de la enzima.

Se logra concluir de estos estudios la teoría de que tanto la Histidina 159 como el Triptofano 177 intervienen en la actividad catalítica de la enzima pero no en el mantenimiento de la estructura terciaria, mientras que el triptofano 26 sí interviene en la estructura pero no parece estar involucrado en la acción enzimática.

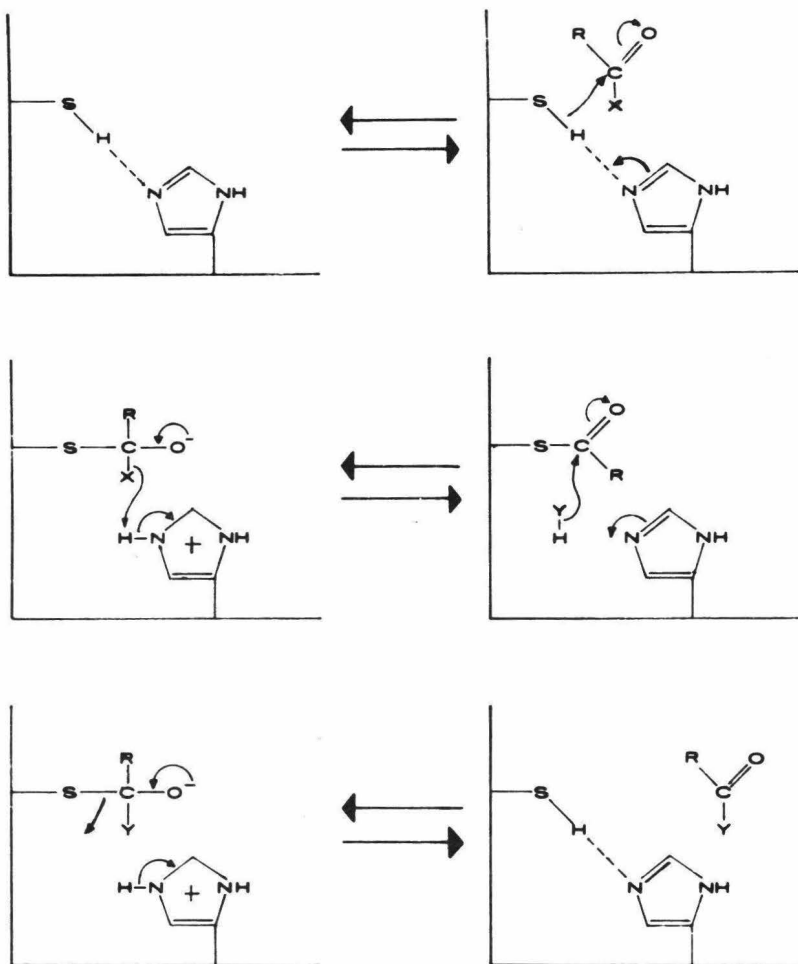


FIGURA 7

MECANISMO DE HIDROLISIS DE LA PAPAINA
 PROPUESTO POR HUSAIN Y LOWE (37).

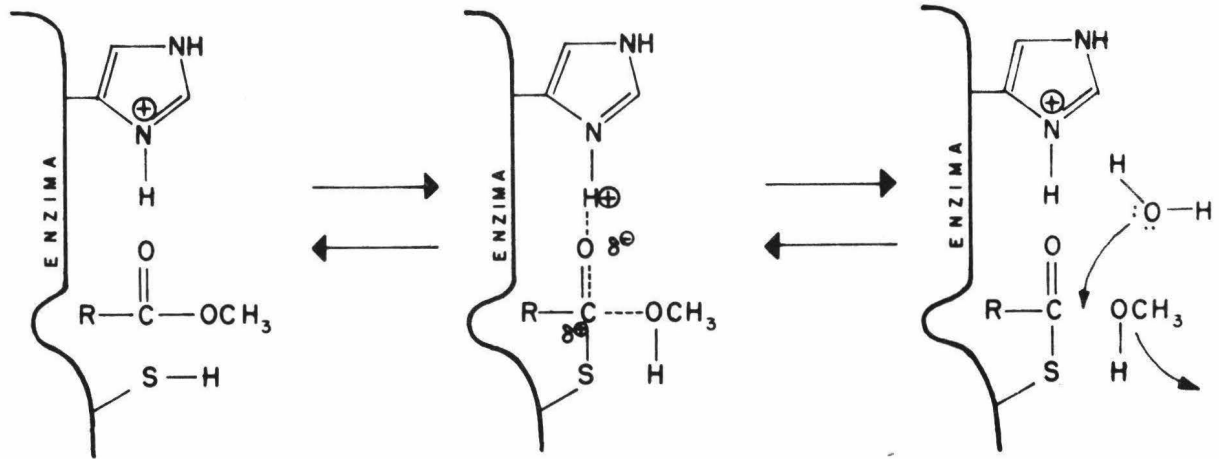


FIGURA 8

MECANISMO DE ACCION DE LA PAPAINA, PROPUESTO POR SLUYTERMAN Y WOLTERS (96).

Hasta el presente, sólo se han propuesto dos posibles mecanismos de acción hidrolítica de la papaína; siendo uno el - que proponen Husain y Lowe (figura 7) y el otro, el propuesto por Sluyterman y Wolthers (figura 8).

Ambos mecanismos establecen un tio-éster como intermediario, y en cada uno la desacilación se logra por un mecanismo exactamente igual a la de la acilación, pero en sentido inverso, con agua reemplazando el grupo saliente. El mecanismo de Sluyterman y Wolthers requiere que tanto la histidina 159 como la cisteína 25 se encuentren en forma ácida cuando sean -- reactivos. La histidina 159 protona el oxígeno del carbonilo del enlace que va a ser hidrolizado, mientras que la cisteína 25 cede su protón al grupo saliente y ataca el carbono del -- carbonilo para formar el tio-éster intermedio.

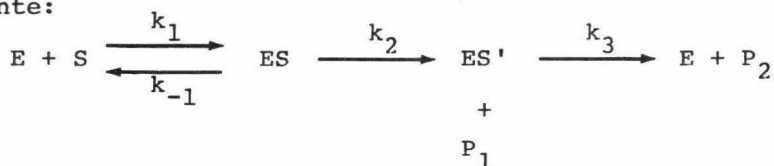
Por otro lado, Husain y Lowe han sugerido que en la enzima activa, la cisteína 25 está unida por un puente de hidrógeno a la forma básica de la histidina 159, separando parcial--mente el protón del átomo de azufre. El mecanismo involucra - un ataque nucleofílico, en el carbono del carbonilo del sustrato, por el grupo tiol (actuando el imidazol como una base general) y transfiriéndose un protón del grupo imidazol de la - histidina 159 al nitrógeno de la amida.

Hasta el momento estos son los dos mecanismos que tratan de explicar la forma como la enzima realiza su función catalítica pero en ninguna forma se pretende que sean los verdade--ros.

Las investigaciones siguen adelante y tal vez en un futuro no muy lejano, gracias a las nuevas técnicas que constantemente están surgiendo, como los equipos cada vez más precisos pero complicados, se logre aclarar esta incógnita estableciendo

do ya el mecanismo de acción de la papaína, así como los residuos de aminoácidos que en el intervengan.

Por otro lado, siempre ha existido un gran interés por conocer, lo más profundamente posible, la cinética de la -- reacción catalítica de la papaína. Durante cierto tiempo se pensó que el mecanismo propuesto por Stockell y Smith (44) lograban explicar este comportamiento cinético. Sin embargo, desde fines de la década de los cincuenta y a raíz de una - dependencia de los parámetros de Michaelis-Menten con el pH, tanto en quimotripsina como en papaína, surge la nueva proposición de que el mecanismo cinético debería involucrar un - intermediario acil-enzima, quedando la ecuación en la forma siguiente:



siendo:

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} ; \quad K_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad \text{y} \quad K_m = \frac{k_2}{k_2 + k_3} \cdot K_s$$

donde E es la enzima, S el sustrato, ES el complejo enzima-sustrato, ES' el intermediario acil-enzima, P₁ la amina, amonio o alcohol y P₂ el ácido carboxílico derivado del sustrato.

En 1965, Sluyterman (65) publica un trabajo en el cual indica que el sustrato se coloca en el sitio activo de la - papaína, aún y cuando ésta no se encuentre activada, concluyendo por esto que el grupo tiol de la papaína no era esencial para la unión del sustrato. Al mismo tiempo inicia el

camino para la deducción de que el mecanismo de reacción de la enzima era vía la formación de un complejo acil-enzima, ya que encontraba diferencias en las velocidades de acilación y desacilación, trabajando con α -N-Benzoilarginin-etil-éster.

Con el fin de aclarar el nuevo mecanismo de hidrólisis propuesto para la papaína, se inician estudios sobre la cinética de hidrólisis de esta enzima y en 1965, Whitaker y Bender (66) publican estudios cinéticos sobre la misma, empleando como sustratos, el α -N-Benzoil-L-arginin-etil-éster (BAEE) y la α -N-Benzoil-L-argininamida (BAA), encontrando como resultados importantes que la dependencia de $k_{cat}/K_m(ap)$ con el pH, era la misma para ambos sustratos, lo cual indicaba que la amida y el éster eran hidrolizados en el mismo sitio activo, vía el mismo mecanismo. Sin embargo, la dependencia de k_{cat} con el pH, para la hidrólisis de ambos sustratos, era diferente.

La única forma de explicar estas diferencias, asumiendo un sitio y mecanismo comunes, era el postular que en la hidrólisis se encontraban involucrados dos pasos de reacción y que la amida y el éster tenían diferente paso determinante de reacción.

Todo lo anterior implicaba la formación de un complejo de acil-enzima, por lo cual el proceso catalítico de un solo paso propuesto por Stockell y Smith era descartado.

Por lo anterior llegan a establecer que aunque k_{cat} - tanto para la amida como para el éster se determinaban a partir de k_2 (acilación) y k_3 (desacilación), el paso predominante y determinante de la reacción para el éster era k_3 , mientras que k_2 lo era para la amida; que K_s era similar pa

ra ambos y que $k_2(\text{lim})$ para el éster era 6 o 7 veces mayor que el de la amida.

Por otro lado observaron que existía una dependencia - del k_2/K_s con el pH, indicando la influencia del pH en los grupos ionizables del complejo enzima-sustrato que afectaba el paso de la acilación. Se vió que estos eran 2 grupos con valores de pK de 4.24-4.29 y 8.35-8.49 respectivamente.

También se observó la dependencia del pH en el paso de la desacilación, asumiendo razonablemente que k_3 para el éster y para la amida dependía de un grupo ionizable con un - pK' de 3.90. Valores similares en los pK's para estos sus--tratos se encontraron en estudios realizados en ficina (67) pero no en bromelina (68).

Por último aclaran que no es posible atribuirle un solo paso al mecanismo de reacción ya que esto implica que en la hidrólisis de un éster o de una amida se tenga, como paso común, la velocidad de desacilación, cosa que Whitaker y Bender no habían observado en sus experimentos.

Volviendo a sus resultados obtenidos, los autores proponen que de los dos grupos con pK de 4.3 y 8.4, uno actúa en su forma ácida y el otro en su forma básica. Como el grupo de pK de 3.9 (carboxilato), en la desacilación, actúa como una base, el grupo con pK de 4.3 actuará como tal (grupo carboxilato), y el grupo de pK de 8.4 (grupo sulfhidrilo) - actuará como un ácido.

Estos autores hablan de grupos carboxílicos y no mencionan al imidazol de la histidina 159 debido a los valores que encuentran de pK así como por la misma sugerencia propuesta por Smith y colaboradores en la que establecen un --

grupo sulfhidrilo y un ácido carboxílico como esenciales en la catálisis de la papaína, basándose en dependencias del pH, calores de ionización y estudios de inhibición química (44).

En 1965 Lowe (69,70) proponía la participación de un grupo indólico en el mecanismo de la catálisis pero no lo--graba demostrarlo completamente. En 1966, Kirsch e Ingels--tröm (71) estudian la cinética de la papaína con ésteres del tipo carbobenzoxiglicina, logrando nada más mostrar evidencias acerca de la formación de un intermediario acil-enzima, así como la posible participación de un grupo carboxilo en la cinética.

En 1967, Williams y Whitaker (72) realizan estudios cinéticos de la hidrólisis de la papaína en sustratos neutros, llegando a las mismas conclusiones anteriores, sin encon--trar evidencias de la participación de un residuo de histidina en la actividad de la papaína.

Sin embargo, las evidencias acerca de la existencia de un grupo imidazol dentro del mecanismo de acción de la papaína son muchas y con buenos fundamentos, tal y como lo --describe Lowe (37), en un artículo de 1970 en el cual trata lo más reciente e importante acerca de la estructura y mecanismo de acción de la papaína, así como Polgár (97), en su artículo acerca del modo de acción del grupo sulfhidrilo esencial en la catálisis de la papaína.

Hasta el momento, y aunque se trata de una enzima bastante estudiada, existen muchas dudas importantes que investigaciones futuras tal vez logren aclarar.

DETERMINACION DE TRIPTOFANOS EN PROTEINAS.-

La determinación de los residuos de triptofano en proteínas, ha tenido siempre un lugar muy importante dentro -- del estudio del análisis de aminoácidos, ya que su cuantificación no es tan sencilla como lo es la de otros residuos.

Utilizando el método de Spackman, Stein y Moore (22), el cual se basa en la hidrólisis ácida de una proteína con la subsecuente determinación de sus aminoácidos, es posible determinar los residuos constituyentes de una proteína, con excepción hecha del triptofano, ya que este se destruye durante la hidrólisis,

Debido a lo anterior se pensó en su determinación por medio de la espectrofotometría, pero resultados obtenidos -- por Barel y Glazer (73) demuestran que el triptofano absorbe fuertemente, en medio ácido, a 278-280 nm, al igual que lo hacen los residuos de tirosina y de fenilalanina, por lo cual su determinación se veía interferida por la presencia de estos dos residuos aromáticos.

Determinaciones por fluorometría mostraron buenos re-- sultados ya que aunque la molécula era excitada a 278-280 - nm, la emisión se analizaba a 350 nm. A esta longitud de on-- da la fluorescencia que se detectaba se debía casi exclusi-- vamente al triptofano, existiendo una muy pequeña participa-- ción por parte de los residuos de tirosina. Sin embargo, es-- ta participación puede considerarse como despreciable (74, 75).

Por otra parte, se desarrollaron varias técnicas basada en la colorimetría, las cuales consistían en hacer reaccio-- nar el triptofano con algún agente que tuviera un grupo cro-- móforo, que fuera selectivo para triptofanos y que pudiera determinarse a una longitud de onda tal que no interfiriese

con la proteína.

El método que se ha venido utilizando desde hace ya algún tiempo es el de Ehrlich, basado en la reacción del p-di metilaminobenzaldehído (76) con el anillo indólico del triptofano. Los resultados que se han obtenido al utilizar este método son bastante buenos; sin embargo, tiene la inconveniencia de la inestabilidad del color que se genera en la reacción.

En los últimos años se han venido desarrollando nuevas técnicas colorimétricas, teniendo como ejemplo la de Koshland, la cual utiliza el 2-hidroxi-5-nitrobromo bencilo, cuyo grupo cromóforo genera una coloración amarilla que absorbe a 410 nm, a un pH básico mayor de 10, con un coeficiente de extinción molar (ϵ) de $18\ 000\ M^{-1}cm^{-1}$ (77), siendo por el momento el reactivo que presenta la mayor especificidad hacia los residuos de triptofano.

Así mismo, basándose en que en estas determinaciones colorimétricas existe una reacción entre el indol del triptofano y el reactivo con su grupo cromóforo, surgió una nueva técnica en la que el triptofano se hacía reaccionar con un agente que ocasionara un decremento en la absorción del mismo a 278-280 nm., como podría ser por causa de una oxidación del indol, y que de acuerdo con el decremento y una serie de relaciones matemáticas, se pudiera cuantear el número de triptofanos presentes en la molécula original. El reactivo que se utiliza en esta técnica es la N-Bromosuccinimida, y sobre esto existen muchos trabajos (78). Sin embargo, tiene la inconveniencia de que no solo reacciona -- con el anillo indólico del triptofano, sino que hidroliza el enlace carboxílico que lo une dentro de la proteína, al mismo tiempo que su afinidad por el triptofano se ve dismi

nuida ya que tiene la posibilidad de reaccionar, en igualdad de condiciones, con otros residuos como cisteína, tirosina, histidina, cistina, lisina, metionina o arginina --- (79), dando así origen a reacciones colaterales.

En los últimos años, Scoffone y colaboradores han desarrollado un método espectrofotométrico para la determinación de triptofanos en proteínas, basado en la reacción de haluros de sulfenilo, con la posición 2 del anillo indólico del residuo de triptofano. El reactivo que más han empleado es el 2,4-dinitrofenil sulfenilo, el cual reacciona en medio ácido, detectándose a 365 nm, longitud de onda en las que las proteínas no absorben, y teniendo un coeficiente de absorción molar de $4\ 000\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (80,81). Su especificidad es muy marcada hacia triptofanos, al igual que hacia cisteínas (82,83).

Este reactivo de Scoffone, comparado con el de Koshland, presenta como diferencias el atacar con igualdad de especificidad al triptofano y a la cisteína, pero con la ventaja de poderse determinar el grupo cromóforo del reactivo, espectrofotométricamente, en el mismo medio donde se verifica la reacción, en cambio, el reactivo de Koshland tiene una especificidad preferente hacia triptofanos que hacia cualquier otro aminoácido, pero la determinación del reactivo se realiza a un pH diferente (mayor de 10) al requerido para que se verifique la reacción (entre 3 y 5), con el mayor grado de especificidad.

Como puede observarse, existen varios métodos para determinar el contenido de triptofano presente en un péptido o en una proteína, y la aplicación de cualquiera de ellos dependerá de las condiciones en que se tenga la muestra -- por estudiar, de su composición de aminoácidos como de sus

propiedades fisicoquímicas.

MODIFICACION QUIMICA DE TRIPTOFANOS.-

En el estudio de la química de las proteínas, los primeros tópicos que se estudiaron fueron: el comportamiento químico de los aminoácidos como tales, así como la síntesis y propiedades de pequeños péptidos.

No es sino hasta después de la Segunda Guerra Mundial, en 1947, que los investigadores Olcott y Fraenkel-Conrat a sí como Herriott, escriben los desarrollos más importantes acerca de la modificación de las proteínas.

A este tema muy poca importancia se le dió en un principio; sin embargo, en la actualidad se ha demostrado la gran importancia que tiene como arma tanto para confirmar como para ayudar a una mejor interpretación de valores o datos obtenidos experimentalmente de la cristalografía por Rayos X y de otros muchos procedimientos como espectros -- de absorción o estudios de titulaciones y dependencias del pH con el compartimiento cinético y de estabilidad de estas macromoléculas.

En la actualidad las técnicas de modificación química no solo se utiliza para determinar residuos específicos de aminoácidos en varias proteínas o simplemente para estudiar el efecto que una determinada modificación causa sobre la enzima; sino que en los últimos años éstas técnicas de modificación se han venido aplicando cuando se desea estudiar la importancia, que un determinado residuo de amino ácido, tiene dentro de la estructura de la propia proteína así como en el proceso de catálisis. Los resultados que se han obtenido han sido estupendos.

En el presente trabajo se utiliza la modificación química de acuerdo con este nuevo campo de aplicación; es decir, con el fin de determinar la posible participación de los cinco residuos de triptofano que contiene la papaína, tanto en el mantenimiento de la estructura terciaria como en la función catalítica de la propia enzima.

Lo anterior tiene su origen en los estudios realizados por Husain y Lowe que indicaban que en tres enzimas proteolíticas, sulfhidrúlicas, de origen vegetal (papaína, bromelina, y ficina), con características cinéticas muy similares se tenía siempre un residuo de triptofano adyacente a la cisteína activa.

Por lo anterior y debido a la gran especificidad que tenían por sustratos aromáticos, según estudios realizados por Schechter y Berger, se pensó que podría existir la posible formación de un complejo de transferencia de carga entre el anillo indólico del triptofano adyacente a la cisteína activa, con el anillo aromático del sustrato. Existían también estudios que apoyaban esta teoría, tanto de la participación del triptofano en el proceso de la catálisis como de la posible formación de un complejo de transferencia de carga con sustratos aromáticos.

Con el fin de estudiar las dos teorías anteriores, se seleccionó un reactivo que tuviera las siguientes características fundamentales: 1) Que fuera aromático y 2) Que interaccionara lo más selectivamente posible con el triptofano.

El reactivo que logra cumplir con los dos requerimientos anteriores es el reactivo de Koshland ó 2-hidroxi-5-nitrobromobencilo. Este reactivo se empleó por vez primera en

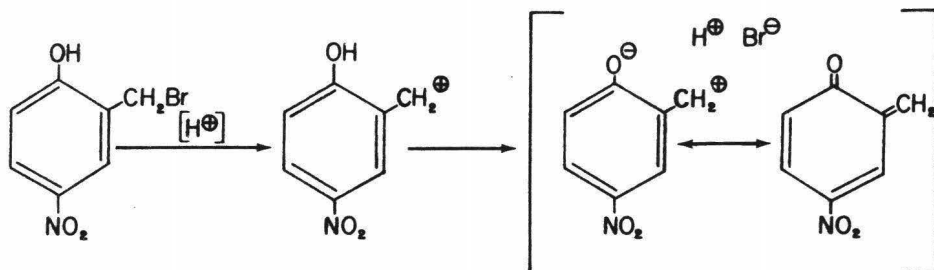
1964 por el propio Koshland (84) publicando sus resultados al tratar aminoácidos libres con este reactivo, bajo diversas condiciones, observando que en medio ácido la reactividad de este agente modificante era muy específica hacia --- triptofanos, comparando con cualquier otro aminoácido, ex--- cepción hecha de la cisteína, la cual también reaccionaba - con el reactivo pero su reactividad era cinco veces menor - que la del triptofano. También se estudió la reacción en medio básico, neutro y en presencia y ausencia de urea 8M, obteniéndose la misma modificación de los triptofanos. Sin embargo, en medio básico (pH=8) tanto la cisteína como la tirosina pueden protonarse y por ello la reactividad de ambos, en este medio, era similar a la del triptofano.

También se realizaron experimentos sobre proteínas (ribonucleasa y quimotripsina), obteniéndose los mismos resultados.

En 1965, Horton, Kelly y Koshland (85) publican estu--- dios realizados sobre el reactivo 2-metoxi-5-nitrobromobencilo con el fin de compararlo con el reactivo anterior, así como el tratar de obtener resultados acerca del comporta--- miento poco usual del compuesto 2-hidroxi-5-nitrobromobencilo. Finalmente llegan a la conclusión de que este nuevo --- reactivo es más resistente a la hidrólisis que el hidroxiderivado, pero que su reactividad es menos específica que la de éste mismo, además de ser más lenta.

Relacionando lo anterior con el comportamiento algo a-normal de este hidroxiderivado, proponen que la presencia - del grupo hidroxilo en la posición orto al grupo bromometi- lo, le confiere a la molécula una gran velocidad de reacción poco usual, así como su selectividad en modificar triptofa- nos, sugiriéndose la importancia de la forma resonante tipo

quinona.



Posteriormente, en 1967, Barman y Koshland (86) realizaron estudios sobre la determinación cuantitativa de residuos de triptofano en diferentes proteínas como lisozima, quimotripsina, quimotripsinógeno, tripsina, ribonucleasa, glucagon, apoferrredoxina y con la proteína del virus del mosaico de tabaco, observando que el procedimiento con el hidroxiderivado era bastante exacto, con una amplia variedad de proteínas.

Este método, desarrollado en un principio por Koshland, tuvo su primera aplicación en estudios sobre la importancia del triptofano en una proteína, en los experimentos realizados por Dopheide y Jones (87) sobre la pepsina y el pepsinógeno de puerco, llegándose a la conclusión de que la proteína contenía 4 triptofanos. Posteriormente se trabajó a diferentes condiciones de pH, obteniéndose como resultado más importante el poder postular que los dos primeros residuos que se modificaban no tenían importancia en la actividad catalítica observada al utilizar como sustratos, a la hemoglobina y al acetil-L-fenilalanil-L-diiodotirosina.

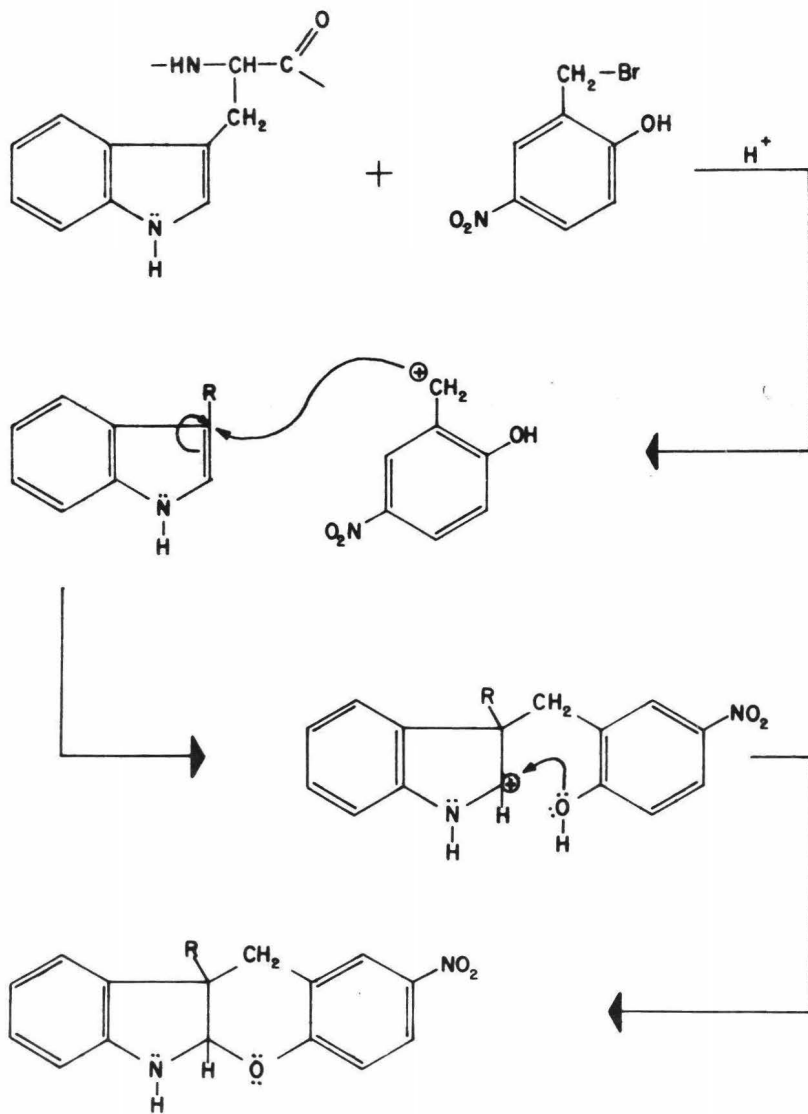


FIGURA 9. MECANISMO DE REACCION DEL HNBB SOBRE EL TRIPTOFANO (95).

En medio básico se lograban modificar tres residuos de triptofano, mientras que la modificación del cuarto se lograba sólo después de la ruptura de un enlace disulfuro de la proteína, por medio de una reducción seguida de una carboximetilación.

Como puede observarse, aquí ya la modificación servía no solo para determinar la cantidad de grupos triptofano - presentes en una molécula proteínica, sino además como un arma para el estudio de las funciones de cada uno de estos residuos en la proteína.

Así pues, la presente investigación se basó en modificar selectivamente todos y cada uno de los cinco triptofanos presentes en la molécula de papaína con el fin posterior de determinar la influencia que ésta tenía sobre la actividad catalítica de la enzima, así como el lograr establecer la posible participación de cada uno de estos cinco residuos tanto en la actividad catalítica como en el mantenimiento de la estructura terciaria.

El mecanismo que proponen varios autores (88,95) sobre la reacción entre el residuo de triptofano de una proteína y el 2-hidroxi-5-nitrobromobencilo se muestra en la figura 9.

M A T E R I A L E S.

- 1) Papaína (lot 1AA), conteniendo 31.5 mg/ml, dos veces ---
cristalizada, obtenida de la Worthington Biochemical Cor-
poration.
- 2) N-CBZ-glicil-p-nitrofenil éster (Lot. 15B-0670).
- 3) Triptofano (Lot. 119B-0630).
- 4) p-Dimetil-amino-benzaldehido (Lot. 87B-2380).
- 5) 2-hidroxi-5 nitro bromo bencilo (Lot. 65B-0430). Todos e
llos de la Casa Sigma Chemical Corporation.
- 6) Urea (Lot. 31568).
- 7) Cloruro de Mercurio (Lot. 32430). Todos de la casa J.T.
Baker S.A. de C.V.
- 8) L-Cisteína.HCl.H₂O (Lot. 7176).
- 9) Dithiotreitol (Lot. 5456). Ambos de la Nutritional Bio--
chemical Corporation.
- 10) Acetona, grado analítico (No. 1005), de Técnica Química
S.A.
- 11) 1,4 Dioxano, grado espectroscópico (Lot. 9642428), de la
casa E. Merck AG, Darmstadt.
- 12) 1,4 Dioxano, grado analítico (Lot. 166A), de la K. and K.
Laboratories Inc.
- 13) Acido Etilen-diamino-tetracético (Lot. 64080) de la casa
Dade de México, S.A.
- 14) Nitrito de Sodio (Lot. 7824), de la casa Mallinckrodt --
Chemical Works.
- 15) Acetonitrilo (Lot. 1405297) de la casa E. Merk A.G., ---
Darmstadt.
- 16) Para-toluen-tiol (P.T.T.) (Lot. 510) de la Eastman Orga-
nic Chemicals.

Otros reactivos fueron de grado analítico y se utilizó
agua desionizada en todos los experimentos llevados a cabo.

M E T O D O S.RECRISTALIZACION DE PAPAÍNA.-

La papaína, dos veces cristalizada, fué convertida en -mercuripapaína, que es una forma más soluble y que evita su autodigestión, por el procedimiento de Whitaker (89).

A 4.2 ml de una suspensión de papaína (100 mg de protefna) en amortiguador de acetato 0.05M, pH 4.5, se le agrega - un décimo de mililitro de clorhidrato de cisteína 1M., neu--tralizado con hidróxido de sodio 1N justo antes de usarse. - Después de mezclar la suspensión, se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos (10 minutos a 0°C es preferible). La preparación se centrifuga a 20 000 x g durante - 20 minutos, a 2°C, en una ultracentrífuga Beckman-Spinco modelo L. El sedimento de papaína se lava con 0.5 ml de amortiguador de acetato 0.05M, pH 5.2. Se vuelve a centrifugar en igual forma que la anterior y el sedimento se disuelve en -- 0.8 ml de una solución 0.01M de cloruro mercuríco (HgCl₂) y se le adicionan 0.8 ml de etanol al 95%. Se centrifuga para eliminar cualquier residuo insoluble. El sobrenadante se lleva a 3.2 ml con etanol al 95% y se deja en el refrigerador. Cantidades adicionales de etanol al 95% se agregan a las 15 h., 17 h. y 96 h. para llevar el volúmen a 5.5 ml, 6.0 ml y 6.4 ml respectivamente.

Al cabo de este tiempo, la papaína cristaliza y los --- cristales se recuperan por centrifugación. Finalmente se disuelven en 6 ml de amortiguador de acetato 0.05M, pH 5.0 y a sí se almacena en el refrigerador.

La solución de mercuripapaína es estable por un período de varios meses.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.-

La determinación de la actividad de la enzima nativa y de la modificada, está basada en la técnica descrita por Kirsh e Ingelström (71).

El procedimiento es el siguiente:

En una celda de cuarzo de 3 ml de capacidad, con un paso de luz de 1 cm. se agregan 0.25 ml de acetonitrilo bidestilado (cosolvente del sustrato, de forma que se logra una concentración final del 10%), 0.05 ml de N-carbobenzoxi-glicil-p-nitrofenil éster $1 \times 10^{-2} M$ disuelto en acetonitrilo bidestilado (en forma que queda con una molaridad de 2×10^{-4} en la mezcla de reacción y satura a la enzima por más de dos minutos), 0.1 ml de activador D.T.T. (dithiotreitol) $1 \times 10^{-2} M$ disuelto en agua. Al final se afora a 3 ml con amortiguador de acetato 0.2M, pH 4.0.

La reacción se inicia al adicionar una alícuota de enzima de 0.05 ml, registrándose el cambio en densidad óptica a 340 nm, debida a la liberación de p-nitrofenol, en un registrador lineal UNICAM AR-25. Las lecturas se realizaron en -- contra de un blanco que contenía todos los reactivos, excepto la enzima.

El coeficiente de extinción molar utilizado para convertir el cambio en densidad óptica a 340 nm por minuto, a micromoles de p-nitrofenol fué de $6.4 \times 10^3 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Previamente a la determinación práctica de la actividad enzimática, es necesario conocer la concentración de enzima que se va a utilizar. Para ello, de un concentrado de mercuripapaína se tomaron 0.06 ml, los cuales se diluyeron a 3 ml con amortiguador de acetato 0.2M, pH 4.0 y se midió la absorción de la proteína, a 278 nm, en un espectrofotómetro UNICAM SP-1800 de doble haz. Para obtener el valor de la concentra-

ción, se utilizó un coeficiente de absorción molar de $5.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Para los experimentos de efecto de la concentración del sustrato en la catálisis de la enzima modificada, la forma de determinar la actividad fué similar a la descrita anteriormente. Lo que se hizo aquí fué variar las cantidades de sustrato, acetonitrilo, ditioneitol y enzima en la manera siguiente:

a) Se utilizaron sólo 0.07 ml de activador, en lugar de 0.1 ml.

b) Se procuró trabajar cada enzima modificada en igualdad de concentración.

c) Las variaciones del sustrato que se realizaron fueron las siguientes:

Dilución	[S]	[S] real	ml CH_3CN	Volumen total
	$1 \times 10^{-2} \text{ M}$			
1:10		$1.1 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.267	0.300 ml.
1:10		$1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.246	0.300 ml.
1:10		$2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.225	0.300 ml.
1:10		$3.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.210	0.300 ml.
1:10		$5.0 \times 10^{-5} \text{ M}$	0.150	0.300 ml.
1:1		$1.1 \times 10^{-4} \text{ M}$	0.267	0.300 ml.

DETERMINACION DE LA CONSTANTE DE CATALISIS (k cat.)

La forma de determinar la k catalítica ó constante de velocidad de reacción de la enzima, se realizó en base a su definición propia de ser una relación entre el número de moles de producto liberadas por minuto, por mol de enzima pre-

$$k_{\text{cat}} = \frac{\frac{\Delta \text{D.O. } 340 \text{ nm}}{(60) (\epsilon 340 \text{ nm})} \times \text{Vol.}}{\frac{\text{D.O. } 278 \text{ nm}}{\epsilon 278 \text{ nm}} (\text{alícuota})} = \frac{(\Delta \text{D.O. } 340 \text{ nm}) (\text{Vol}) (\epsilon 278 \text{ nm})}{(\text{D.O. } 278 \text{ nm}) (\text{alícuota}) (60) (\epsilon 340 \text{ nm})}$$

Simplificando la ecuación con los valores conocidos tenemos:

$$k_{\text{cat}} = \frac{(\Delta \text{D.O. } 340 \text{ nm}) (3 \times 10^{-3} \text{ lts.}) (5.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})}{(\text{D.O. } 278 \text{ nm}) (5 \times 10^{-5} \text{ lts.}) (60 \text{ seg.}) (6.43 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1})}$$

Finalmente tenemos que:

$$k_{\text{cat}} = 8.98 \text{ seg}^{-1} \times \frac{\Delta \text{D.O. } 340 \text{ nm}}{\text{D.O. } 278 \text{ nm}} \dots \dots \dots (2)$$

Así pues, conociendo la densidad óptica a 278 nm de la enzima cuya actividad va a determinarse y calculando la pendiente $\Delta \text{D.O. } 340 \text{ nm/min.}$ directamente de la gráfica obtenida del registrador, es posible calcular la k catalítica, por medio de la ecuación (2). Todo lo anterior es válido para el sustrato que aquí se utiliza y con los volúmenes de enzima y sustrato especificados.

MODIFICACION QUIMICA DE TRIPTOFANOS.-

La modificación se realizó de acuerdo al método descrito por Koshland (84), pero con algunas modificaciones:

A 0.024 μ moles de papaína se le agregaron 0.02 ml, 0.05 ml, 0.105 ml y 0.245 ml de una solución de HNBB $1 \times 10^{-1} \text{ M di}$

suelto en dioxano seco (grado espectroscópico) preparada al momento de usarse, aforándose a 3 ml con un regulador de acetato 0.2 M y pH 4.0.

Cada una de las muestras así preparadas se sometió a una agitación magnética por 30 minutos, a 4°C, utilizándose un agitador magnético.

Al mismo tiempo se prepararon los blancos para cada muestra de enzima, los cuales contenían todo menos la propia enzima, aforándolos también a 3 ml con el amortiguador anterior.

Este mismo procedimiento se siguió cuando se realizó la modificación de la enzima en presencia, ahora, de un amortiguador acetato 0.2M, pH 4.0 con 5M de urea, variándose única mente el tiempo de agitación a 60 minutos.

DETERMINACION COLORIMETRICA DE TRIPTOFANOS.-

El método que aquí se empleó fué el que reporta Graham (76), realizándose de la siguiente manera:

Se tomaron alícuotas iguales de 0.5 ml de cada muestra, procurando tener cada una de estas entre 0.05 y 0.5 micromoles de triptofano; posteriormente se agregaron 2.5 ml de una solución de p-dimetil-amino-benzaldehído al 0.05% disuelto en ácido clorhídrico 12N.

Se agitaron las muestras y se dejaron reposar en la oscuridad por 30 minutos. Pasado este tiempo, se agregaron 2.5 ml de alcohol etílico al 95% y 3 gotas de nitrito de sodio - al 0.2%, disuelto en agua. Se volvieron a agitar los tubos y después de dejarlos reposar otros 30 minutos en la oscuridad,

se determinaron las absorciones a 620 nm, extrapolando los resultados a una curva tipo, obtenida por el mismo procedimiento, tomando concentraciones conocidas de triptofano. Los blancos se hicieron con agua bidestilada en lugar de triptofano.

También se puede tener una relación entre los valores de absorción obtenidos y los triptofanos libres mediante una regla de proporciones y corriendo en el experimento un blanco con enzima sin modificar. Así, la máxima absorción la tendrá el blanco de enzima y como ésta contiene 5 triptofanos libres, se puede establecer que:

$$\begin{array}{rcl} 5 \text{ TRP's Libres} & \underline{\hspace{2cm}} & \text{D.O. } ^{620 \text{ nm}} \\ & & (1) \\ \\ x \text{ TRP's Libres} & \underline{\hspace{2cm}} & \text{D.O. } ^{620} \\ & & (2) \end{array}$$

siendo D.O. $^{620 \text{ nm}}$ la máxima obtenida para la enzima pura, -- sin modificación, ⁽¹⁾ y D.O. $^{620 \text{ nm}}$ ⁽²⁾ la de cada muestra modificada, siendo siempre la densidad óptica de la modificada menor que la sin modificar.

TITULACION FLUOROMETRICA DE TRIPTOFANOS.-

Se tomaron 8×10^{-4} micromoles de papaína y se llevaron a 3 ml con amortiguador de acetato 0.2M, pH 4.0. Con esta solución se ajustó el 100% de la transmitancia, en un espectrofluorómetro Perkin Elmer 203, equipado con una lámpara de mercurio, colocando el excitador a 278 nm y el analizador a 350 nm. El cero del aparato se ajustó con el paso de luz cerrado.

Teniendo así ajustado el aparato, se midió la fluorescencia de 3 ml de amortiguador que contenían 2.0, 5.0, 10.5 y 24.5 micromoles de HNBB y de 3 ml de amortiguador conteniendo 8×10^{-4} micromoles de enzima modificada, que contenían los mismos micromoles de HNBB que los blancos respectivos.

La fluorescencia de la enzima modificada se obtuvo restando la fluorescencia de la papaína más HNBB y la del blanco que sólo contenía HNBB.

En igual forma se realizaron las determinaciones cuando se utilizó urea 5M en el amortiguador de acetato.

PURIFICACION DE LAS MUESTRAS MODIFICADAS.-

Las muestras ya modificadas fueron purificadas con el fin posterior de realizar los experimentos de actividad catalítica y efecto de la concentración del sustrato sobre la misma.

La purificación se realizó en la siguiente forma: cada muestra de enzima modificada se colocó en un tubo de diálisis de 8/32 de pulgada, de celulosa transparente, dializándose se las muestras contra amortiguador de acetato 0.2M, pH 4.0 con 5% de dioxano, teniendo aforado cada baño a un volumen final de 2000 ml.

Las muestras que contenían más cantidad de reactivo se trataron inicialmente y después de dos baños de diálisis de 1 h. y 6 h., se dializaron junto con las demás muestras, realizándose así 5 baños a diferentes tiempos, a saber:

1o.) 3 h.	3o.) 2 h.	5o.) 16 h.
2o.) 18 h.	4o.) 5 h.	

Los dos últimos baños se realizaron sin el 5% de dioxano, con el fin de eliminar éste de los sacos de diálisis.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE ENZIMA DESPUES DE LA -
PURIFICACION.-

A las muestras ya purificadas se les determinó su concentración en la siguiente forma:

Se ajustaron todas las muestras a un volúmen de 3 ml -- con amortiguador de acetato 0.2M y pH 4.0 y se determinó la densidad óptica de cada una a 278 nm.

Cabe indicar que el reactivo HNBB tiene una ligera absorción a esta longitud de onda y por ello es necesario restarle este efecto al valor obtenido inicialmente.

Por este motivo se les determinó la densidad óptica a 320 nm, donde la proteína es transparente pero el reactivo - HNBB tiene máxima absorción.

Bajo la suposición de que el coeficiente de extinción molar del HNBB no cambia aún después de reaccionar con la -- proteína, se calculó la concentración de reactivo presente, con la siguiente ecuación:

$$[\text{HNBB}] = \frac{\text{D.O.}_{278 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{HNBB}} \cdot \text{HNBB}} ; \quad \epsilon_{\text{HNBB}} = 3420 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$$

De esta ecuación es necesario conocer la concentración del reactivo para saber cual es la participación del reacti-

vo en el valor de la absorbancia de la mezcla.

Para conocer la concentración de reactivo, la cual es constante, se realiza lo siguiente:

$$[\text{HNBB}] = \frac{\text{D.O. } 320 \text{ nm}}{\epsilon_{320 \text{ nm}}^{\text{HNBB}}} ; \quad \epsilon_{320 \text{ nm}}^{\text{HNBB}} = 9\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

El valor de la densidad óptica a 320 nm es fácil de determinar ya que en esta longitud de onda la proteína es transparente, además que se conoce el valor de ϵ a 320 nm, que es de $9\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

De esta manera es posible calcular la concentración de reactivo, que conocido el valor del coeficiente de extinción molar, nos permite determinar que tanto participa el reactivo en la absorción de la mezcla a 278 nm.

Arreglando lo antes explicado, en forma matemática tenemos:

$$\text{D.O. } 278 \text{ nm}_{\text{enzima}} = \text{D.O. } 278 \text{ nm}_{\text{mezcla}} - \text{D.O. } 278 \text{ nm}_{\text{HNBB}}$$

pero

$$\text{D.O. } 278 \text{ nm}_{\text{HNBB}} = [\text{HNBB}] \times \epsilon_{278 \text{ nm}}^{\text{HNBB}}$$

Por relación lineal podemos decir que:

$$[\text{HNBB}] = \frac{\text{D.O. } 320 \text{ nm}}{\epsilon_{320 \text{ nm}}^{\text{HNBB}}}$$

Por lo tanto nos queda que:

$$D.O. \frac{278 \text{ nm}}{HNBB} = \frac{D.O. \frac{320 \text{ nm}}{\epsilon \text{ HNBB}}}{\epsilon \text{ HNBB}} \times \epsilon \frac{278 \text{ nm}}{HNBB} = \frac{\epsilon \frac{278 \text{ nm}}{HNBB}}{\epsilon \frac{320 \text{ nm}}{HNBB}} \times D.O. \frac{320 \text{ nm}}{nm}$$

$$D.O. \frac{278 \text{ nm}}{HNBB} = \frac{3420 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}}{9600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}} \times D.O. \frac{320 \text{ nm}}{nm} = 0.35625 (D.O. \frac{320 \text{ nm}}{nm})$$

Finalmente tenemos que:

$$D.O. \frac{278 \text{ nm}}{\text{enzima}} = D.O. \frac{278 \text{ nm}}{\text{mezcla}} - 0.35625 (D.O. \frac{320 \text{ nm}}{nm}).$$

ACTIVACION DE LA PAPAÑA.-

La activación de la papaña se realiza por una modificación del procedimiento de Soejima y Shimura (90) de la siguiente manera (89):

En un matraz de 25 ml se colocan 0.4 ml de mercuripapaña y se agregan 1.6 ml de amortiguador acetato 0.2M, pH 4.0. Se le adicionan 4 ml de una solución $4.5 \times 10^{-2} \text{ M}$ de 4-metilbencenotiol. Se tapa el matraz y se agita durante 5 minutos a razón de 100 agitaciones por minuto; se toma, con una pipeta Pasteur, la parte inferior o capa donde se encuentran la papaña y el activador en forma emulsionada, y se filtra a través de un papel filtro No. 2, previamente humedecido. Al filtrarse, la emulsión se rompe obteniéndose una solución totalmente transparente.

De la solución así obtenida se toman las alícuotas nece

sarias para determinar su densidad óptica a 278 nm y su actividad a 340 nm.

La enzima permanece totalmente activa por varias horas sí se almacena en una atmósfera de nitrógeno y a baja temperatura, para evitar que se oxiden los grupos -SH activos de la papaína.

R E S U L T A D O S .CRISTALIZACION Y ACTIVIDAD DE LA PAPAÑA.-

Como resultado del método anteriormente descrito, se obtuvo una solución de mercuripapaña, que contenía 14.25 mg de enzima/ml, concentración obtenida al medir la absorción a 278 nm de la muestra obtenida, utilizando un coeficiente de extinción molar para la enzima de $5.75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ y un peso molecular de 23,000. El rendimiento que se tuvo fue de un 93%.

La determinación de la actividad de esta solución, se realizó de acuerdo con el método mencionado, utilizando como activador el Dithiotreitol (D.T.T.).

Los cálculos para la constante catalítica se obtuvieron midiendo el cambio en densidad óptica por minuto a 340 nm, correspondientes a la cantidad de p-nitrofenol liberado, dividido por un coeficiente de extinción molar de $6.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

La concentración de enzima en la muestra se determinó espectrofotométricamente a 278 nm.

La relación entre las moles de p-nitrofenol liberado en 60 segundos y las moles de enzima presentes resultan en la medida de la actividad que se reporta como k catalítica en segundos recíprocos por tratarse de una reacción de primer orden.

En nuestro caso se obtuvo un valor de 4.95 seg^{-1} , medida en regulador de acetato 0.05M, pH 5.2.

FIGURA 10.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA.

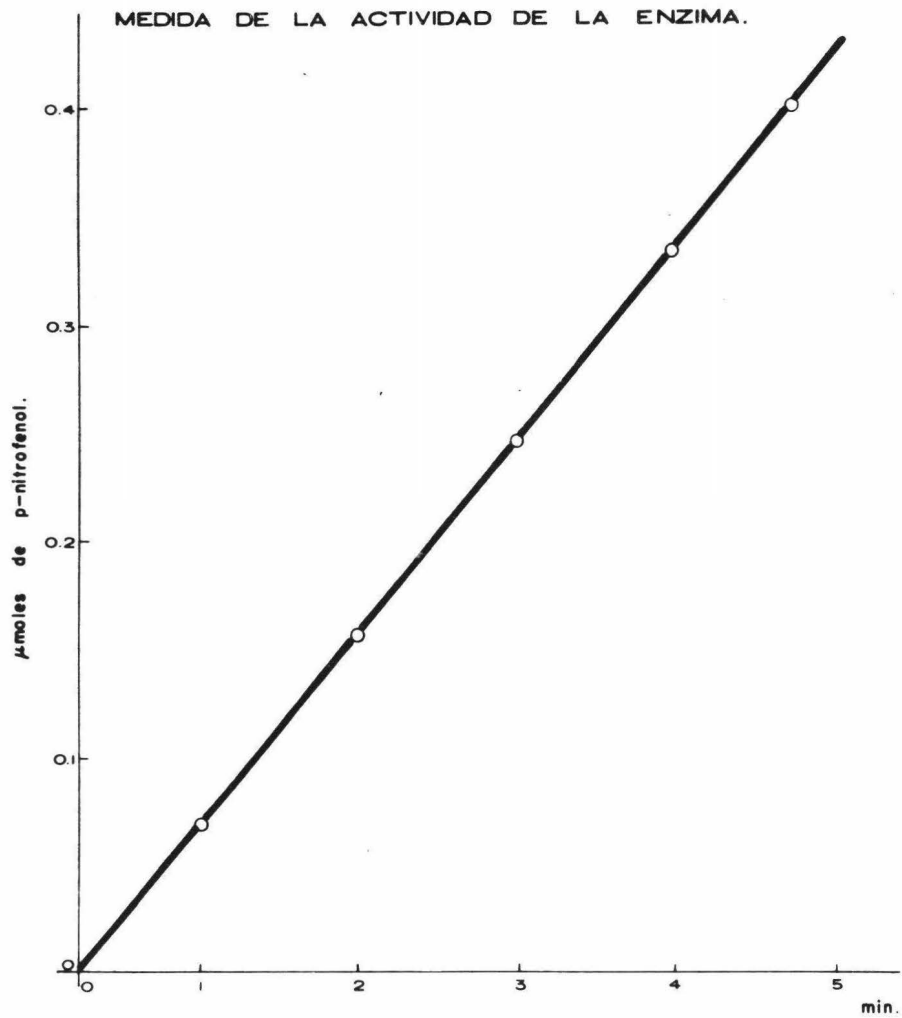


FIGURA 10.- Medida de la actividad de la enzima, activada -- con D.T.T., utilizando las siguientes concentraciones en la celda: 1.2×10^{-3} micromoles de papaína, 0.5 micromoles de sustrato (CBZ-glicil-p-nitrofenil-éster), 3 micromoles de -- EDTA y una micromol de D.T.T., aforando a 3 ml con amortiguador de acetato 0.05M, pH 5.2 con 8.3% de acetonitrilo bides-tilado como cosolvente del sustrato.

DETERMINACION COLORIMETRICA DE TRIPTOFANOS.-

La determinación colorimétrica es uno de los métodos -- que más se utilizan para el cuanteo de triptofanos libres, - basado en la generación de coloración que produce este resi-
duo de aminoácido con el p-dimetilamino benzaldehido y el ni-
trito de sodio. Es un método bastante específico y proporcio-
na resultados confiables.

En este experimento se sometió al triptofano a reaccio-
nar con el HNBB en concentraciones diferentes y por colorime-
tría se cuantificó el grado de modificación producido.

Inicialmente se realizaron experimentos con el fin de -
optimizar las condiciones de modificación, las cuales una --
vez establecidas dieron como resultado que el pH debería de
ser de 4, con una temperatura de reacción de 4°C, agitando -
las muestras magnéticamente por 30 minutos, en un medio de -
reacción que tuviera una fuerza iónica baja (la del propio -
amortiguador de acetato, 0.2M) y con concentraciones del a-
gente modificador tales que su solvente (dioxano) no excedie-
ra de un 5% en volúmen, respecto al volumen del medio de ---
reacción, ya que este disolvente a concentraciones altas pue-
de provocar, junto con la agitación, la desnaturalización de
la enzima.

Una vez optimizadas las condiciones de modificación, de-
terminadas inicialmente en triptofano libre y posteriormente
en mercuripapaína, se observó que a determinadas concentra-
ciones del reactivo HNBB, sólo se lograba un 40% de modifica-
ción (figura 10) y que aumentándola, se ocasionaba la preci-
pitación del reactivo y la desnaturalización de la enzima. -
La precipitación se podía eliminar centrifugando la muestra,
pero no así la desnaturalización.

FIGURA II. DETERMINACION DE TRIPTOFANOS EN PAPAÑA.

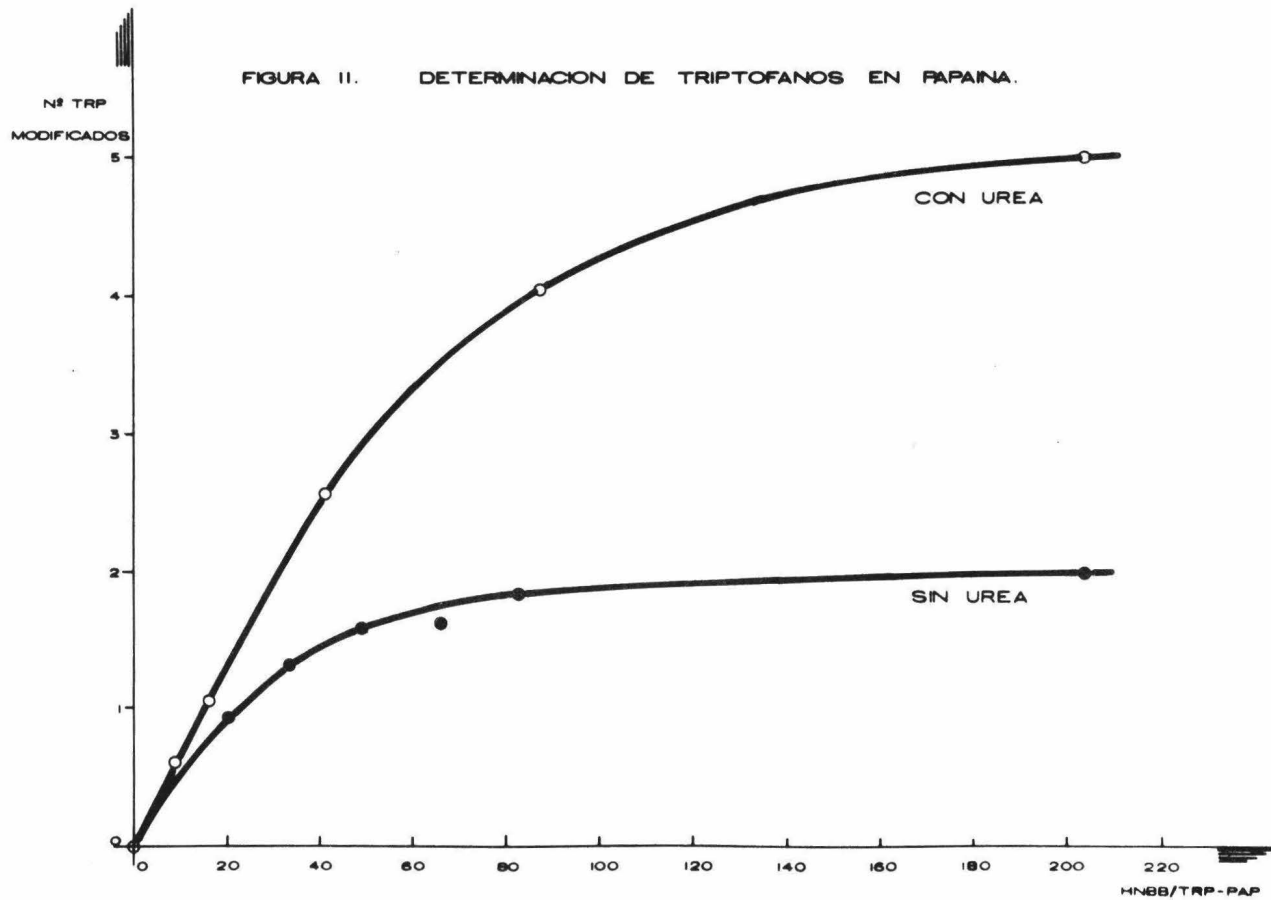


FIGURA 11. Determinación de Triptofano en Papaína. Para la determinación colorimétrica (sin urea), la concentración de enzima fué de $0.08 \times 10^{-4} \text{M}$ (0.08 micromoles de TRP) en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4, leyendo las muestras a 620 nm. Para la titulación fluorométrica (con urea), la concentración de enzima fué de 2.4×10^{-8} moles/3 ml (0.004 micromoles de TRP) en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4, 5M de urea. El selector utilizado fué X_{10} con un control de sensibilidad de 10, colocando el excitador a 278 nm y el analizador a 350 nm.

TITULACION FLUOROMETRICA DE TRIPTOFANOS.-

Con el fin de lograr una mayor modificación, a la vez que una mejor estabilidad de la enzima, se preparó un nuevo amortiguador que contuviera lo mismo que el anterior pero -- con la variante de contener además, urea en una concentra--- ción 5M.

Por experimentos realizados en el laboratorio (93) se - observó que la urea a esta concentración, no afectaba la ci- nética de la enzima, pero sí aumentaba su solubilidad así co mo su reactividad con el agente modificante.

Por estas razones se realizaron nuevas modificaciones - en presencia de urea, lográndose un mayor grado de modifica- ción.

Como puede observarse en la figura 11, en igualdad de - condiciones, mientras que en amortiguador sin urea se logra- ba modificar solo un 40% de los triptofanos, con urea en el amortiguador se alcanzaba casi el 100%, confirmando con esto que la urea favorece la reacción del reactivo HNBB, posible- mente exponiendo los triptofanos enmascarados de la papaína.

Cuando se utilizó la urea, la determinación de la modi- ficación se realizó por fluorometría, otro método bastante - confiable debido a que la urea con el p-dimetilamino benzal- dehído (PDMAB) genera una coloración amarilla que interfiere con la determinación final que se lee a 620 nm.

Por este motivo, al utilizar urea en el amortiguador, - se utilizó el método fluorométrico para cuantificar el gra- do de modificación. En las figuras 12 y 13 se muestran los - espectros obtenidos de todos los componentes del medio, en -

FIGURA 12. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DEL DISOLVENTE.

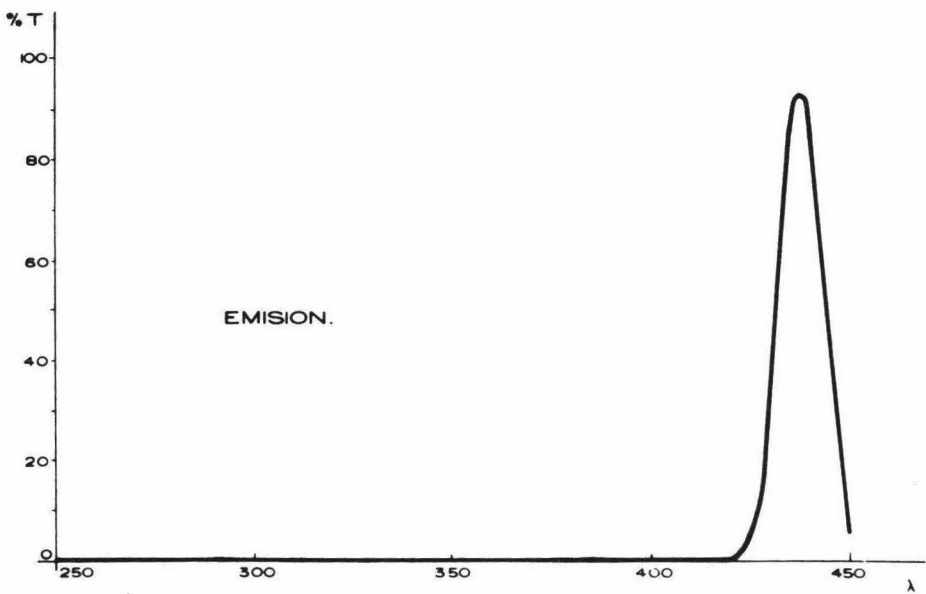
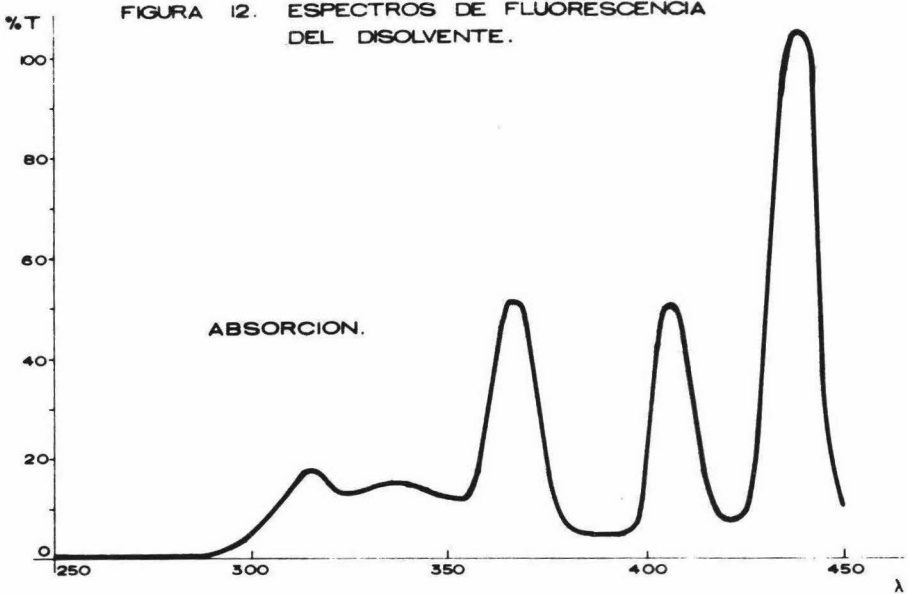


FIGURA 12. Espectros de Fluorescencia del disolvente. Se agregaron 0.5 ml de disolvente al amortiguador de acetato -- 0.2M, pH 4 determinando el por ciento de transmitancia a diferentes longitudes de onda tanto del excitador como del analizador, dentro del rango de 200 a 450 nm. El selector empleado fué λ_1 , con un control de sensibilidad de 12 para la absorción y de 10 para la emisión.

FIGURA 13. ESPECTROS DE FLUORESCENCIA DEL HNBB.

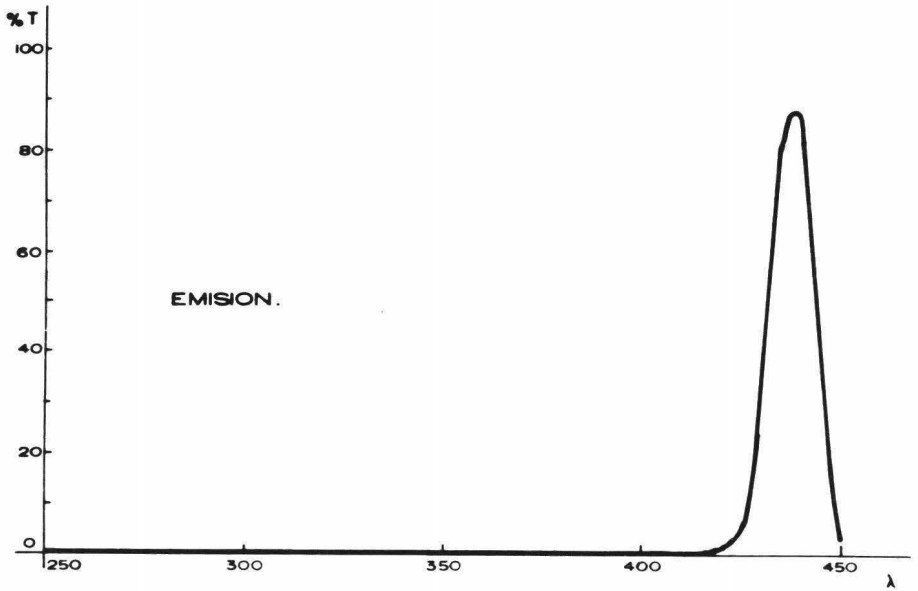
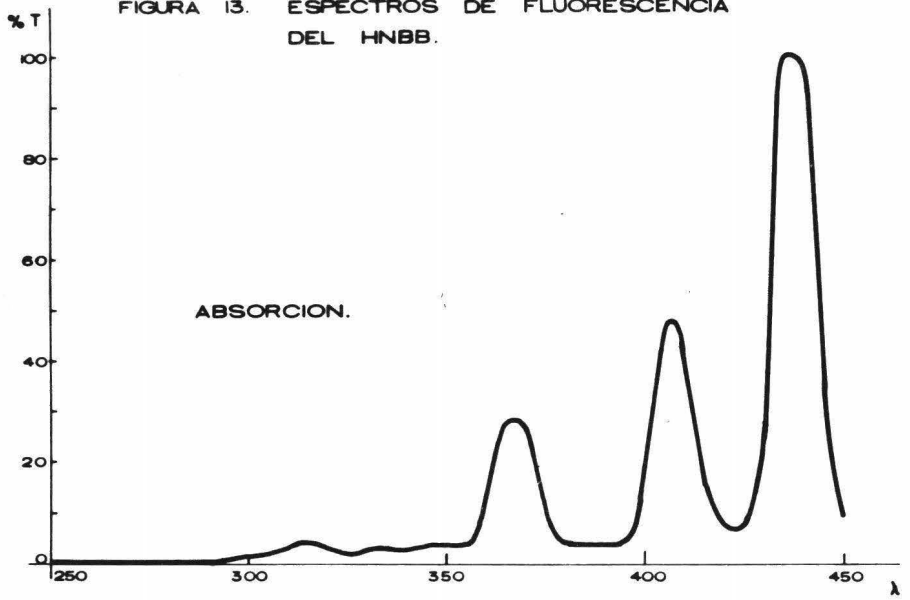


FIGURA 13. Espectros de Fluorescencia del HNBB. La concentración del reactivo es $1 \times 10^{-3} \text{M}$, tomando 0.5 ml y aforando a 3 ml con amortiguador de acetato 0.2M, pH 4. El rango de longitudes de onda estudiado fué de 200 a 450 nm utilizando el selector X_1 y con controles de sensibilidad para la absorción y la emisión de 11 y 10, respectivamente.

donde puede verse que a las longitudes de onda de absorción (280 nm) y emisión (350 nm) del triptofano, todos éstos no absorben ni emiten.

Cabe hacer notar que previendo la posible necesidad de utilizar urea en el medio de reacción, desde el inicio de -- los experimentos se establecieron las condiciones óptimas en las cuales ambos métodos de determinación aportaban los mis-- mos resultados.

Con lo hasta aquí obtenido, ya se tenía la forma de modicar, progresivamente, cada uno de los cinco triptofanos de la papaína, aspecto muy importante ya que el fin de esta investigación era el de conocer, hasta donde fuera posible, la influencia que tenía cada uno de estos residuos en el mantenimiento de la estructura terciaria o en la actividad catalítica de la molécula de papaína.

INFLUENCIA DE LA MODIFICACION EN LA ACTIVIDAD ENZIMATICA.-

Una vez que se tienen muestras de enzima modificadas en diferentes grados, se prosiguió a estudiar su cinética tanto de las modificadas sin urea como con urea. Sin embargo, previamente las muestras fueron purificadas por diálisis con el fin de eliminar el dioxano, la urea y el exceso de reactivo en el medio de reacción.

Los motivos por lo que se realizó lo anterior fueron -- porque el dioxano a ciertas concentraciones y con algunas enzimas, aumenta la velocidad de reacción; por otro lado, el - exceso de agente modificante podía reaccionar con el grupo - tiol de la cisteína activa, oxidándolo o interfiriendo en la interpretación de los resultados y, por último, el eliminar la urea del medio era necesario ya que por estudios anterior-

res (93) se sabe que la enzima no se ve afectada en su actividad al ponerse en presencia de urea, pero que al tener como mínimo un triptofano modificado, la enzima se volvía lábil a la acción de la urea y ésta ocasionaba la desnaturalización, la cual se demostró que era reversible.

Teniendo ya las muestras purificadas, los resultados cinéticos que se obtuvieron se reportan en la figura 14.

Como puede observarse, la disminución de la actividad es más rápida cuando se modifica en urea que cuando ésta no se encuentra presente en el medio de reacción. Las curvas obtenidas con y sin urea presentan la misma configuración y en ambos casos, con una relación de HNBB/TRP-Papaína de 204, la actividad de la enzima desaparece.

En las figuras 15 y 16 se muestra la disminución de la actividad respecto al número de triptofanos modificados, observándose que en amortiguador sin urea, basta modificar dos residuos de aminoácido para que la actividad desaparezca; -- mientras que en presencia de urea, es necesario modificar -- los cinco para que la enzima pierda completamente su actividad catalítica.

EFEECTO DE LA VARIACION DE LA CONCENTRACION DEL SUSTRATO EN LA ACTIVIDAD CATALITICA DE LAS ENZIMAS MODIFICADAS.-

Este experimento se realizó con el fin de determinar -- los valores de la constante de Michaelis-Menten y de la velocidad máxima, ya que se ha establecido que ambas pueden ser una medida de la afinidad de la enzima por el sustrato y de la conformación espacial de la proteína, respectivamente.

Lo anterior quiere decir que si se determinan estos pa-

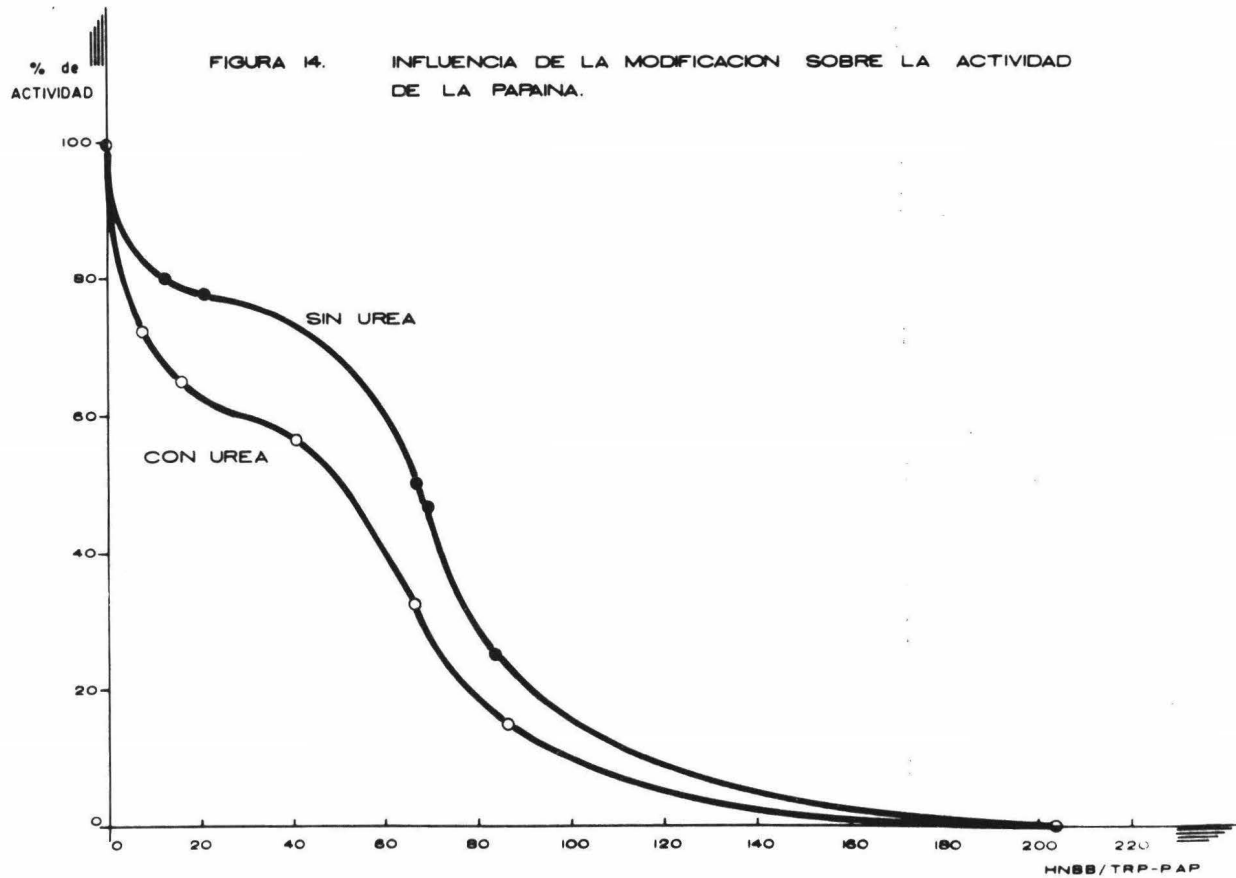


FIGURA 14. Influencia de la modificación de Triptofanos sobre la actividad de la papaína. La actividad se determinó -- por el método descrito con D.T.T. (0) actividad de las muestras modificadas en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4 y 5M de urea. (●) Actividad de las muestras modificadas en amortiguador 0.2M, pH 4, sin urea.

rámetros cinéticos a las muestras con distinto grado de modificación y se comparan con los de la enzima nativa, sería -- tal vez posible el explicar la causa o motivo por el cual se observa que la actividad decrece a medida que se modifican -- los residuos de triptofano, indicando si esto se debe a un -- cambio en la afinidad del complejo enzima-sustrato, un cambio en la estructura terciaria de la macromolécula o ambos a la vez.

Los resultados de esta experimentación se muestran en -- las figuras 17, 18 y 19 y un análisis de las mismas podría -- también explicar todos los resultados anteriormente obtenidos conducentes a la elaboración de una teoría que explicase la función de cada residuo de triptofano en la macromolécula.

En la figura 17 puede verse que la pendiente de las líneas S-1 y 2 son prácticamente iguales, además de -- que las líneas 2 y 3 tienen la misma intersección -- con el eje de las abscisas. Lo anterior quiere decir que, pa -- ra el primer caso, la relación $K_m/V_{m\acute{a}x}$ es igual, mientras -- que para el segundo caso el K_m es el mismo pero la $V_{m\acute{a}x}$ cambia.

Se puede comprobar que las rectas 2 y 3 tienen el mismo valor del K_m ya que en la figura 19 la inclinación de las líneas es la misma y representa el valor de la K_m .

Respecto a las líneas S-1 y 2, ambas tienen la misma relación $K_m/V_{m\acute{a}x}$, o sea la misma pendiente, y por lo -- tanto tendrán un mismo valor de ordenada al origen para la -- figura 18.

Lo que se puede obtener de cada una de estas tres gráfi -- cas, en forma más o menos precisa, es lo siguiente:

% de
ACTIVIDAD

FIGURA 15. EFECTO DE LA MODIFICACION DE TRIPTOFANOS EN LA ACTIVIDAD DE LA PAPAINA.

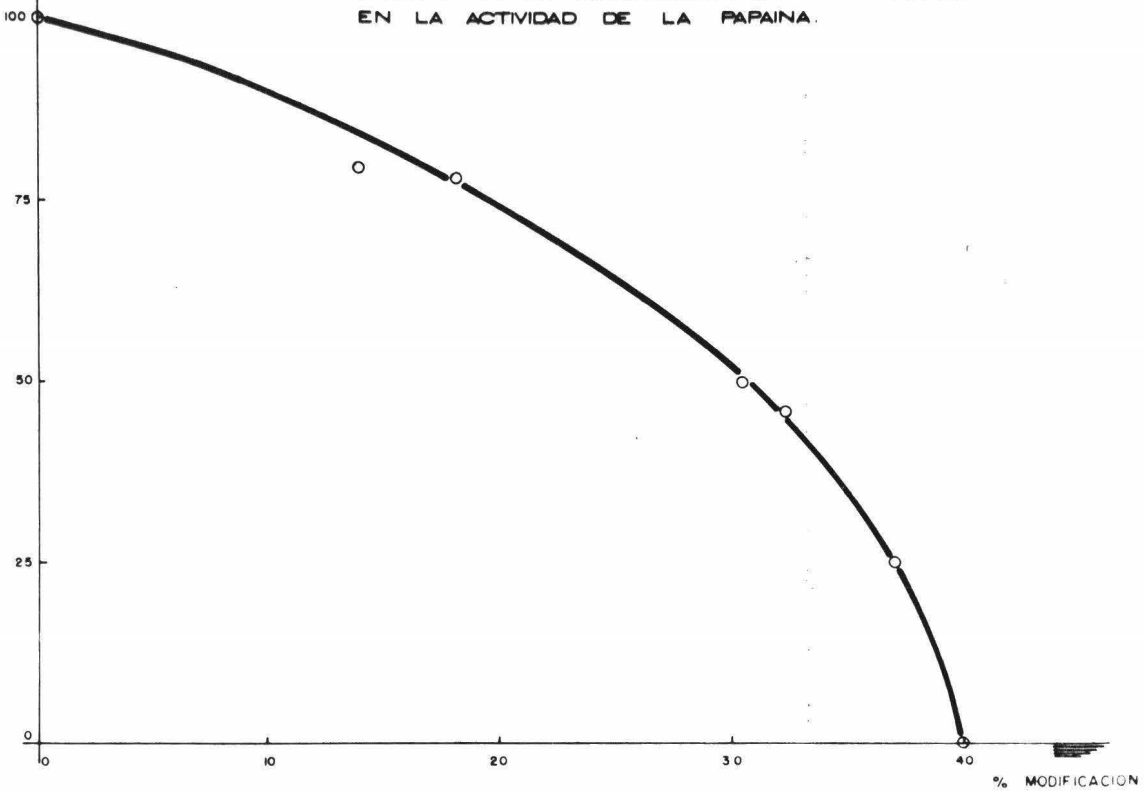


FIGURA 15. Efecto de la modificación de triptofanos en la actividad de la papaína, La actividad se determinó por el método descrito con D.T.T. Las muestras fueron modificadas en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4, en ausencia de urea.

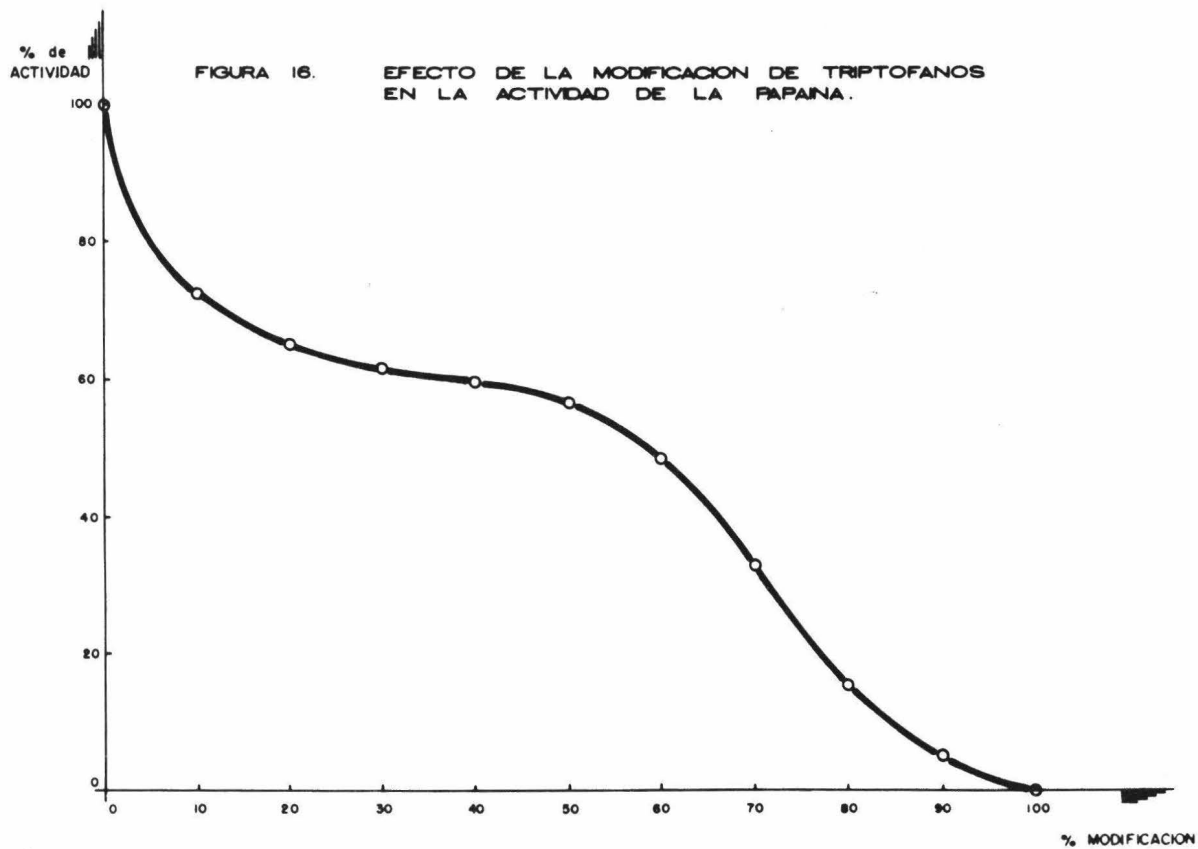


FIGURA 16. Efecto de la modificación de triptofanos en la actividad de la papaína. La actividad se determinó por el método descrito con D.T.T. Las muestras fueron modificadas en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4 y con urea 5M.

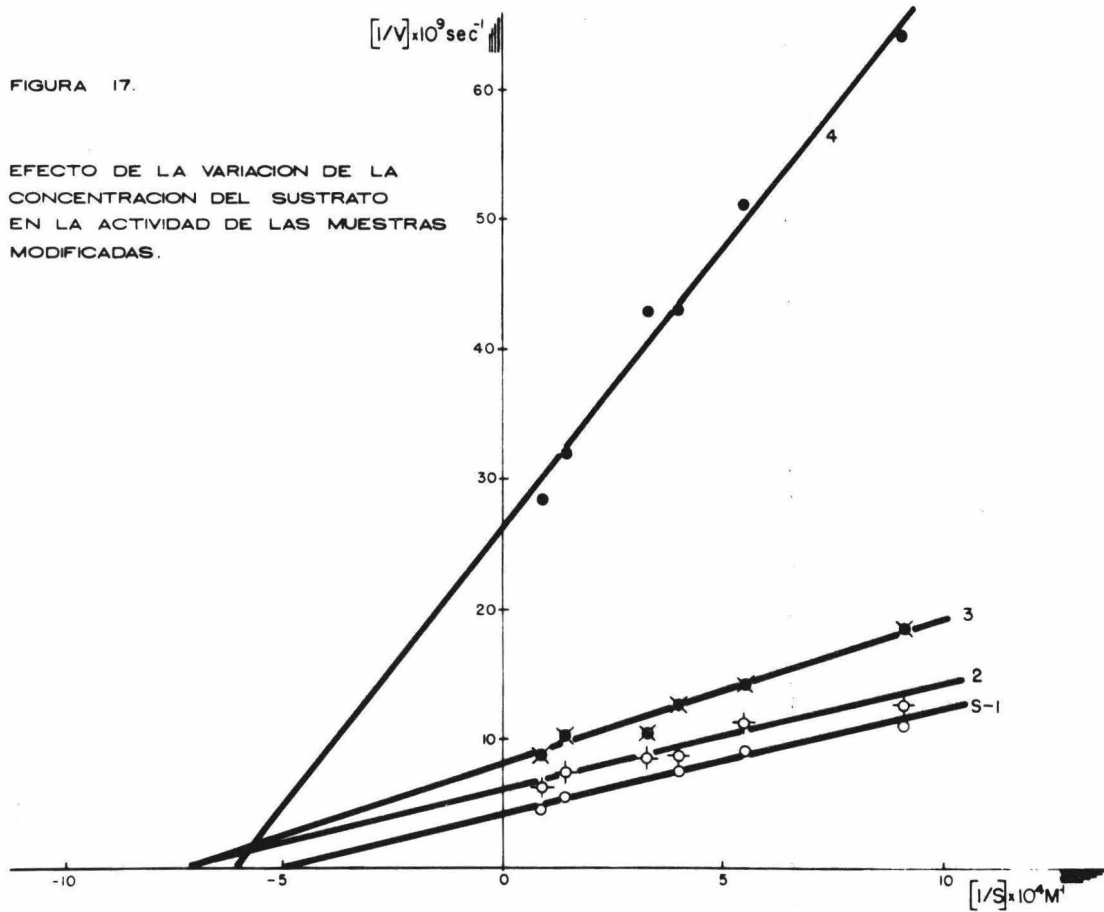


FIGURA 18.

EFFECTO DE LA VARIACION DE LA
CONCENTRACION DEL SUSTRATO
EN LA ACTIVIDAD DE LAS MUES -
TRAS MODIFICAS.

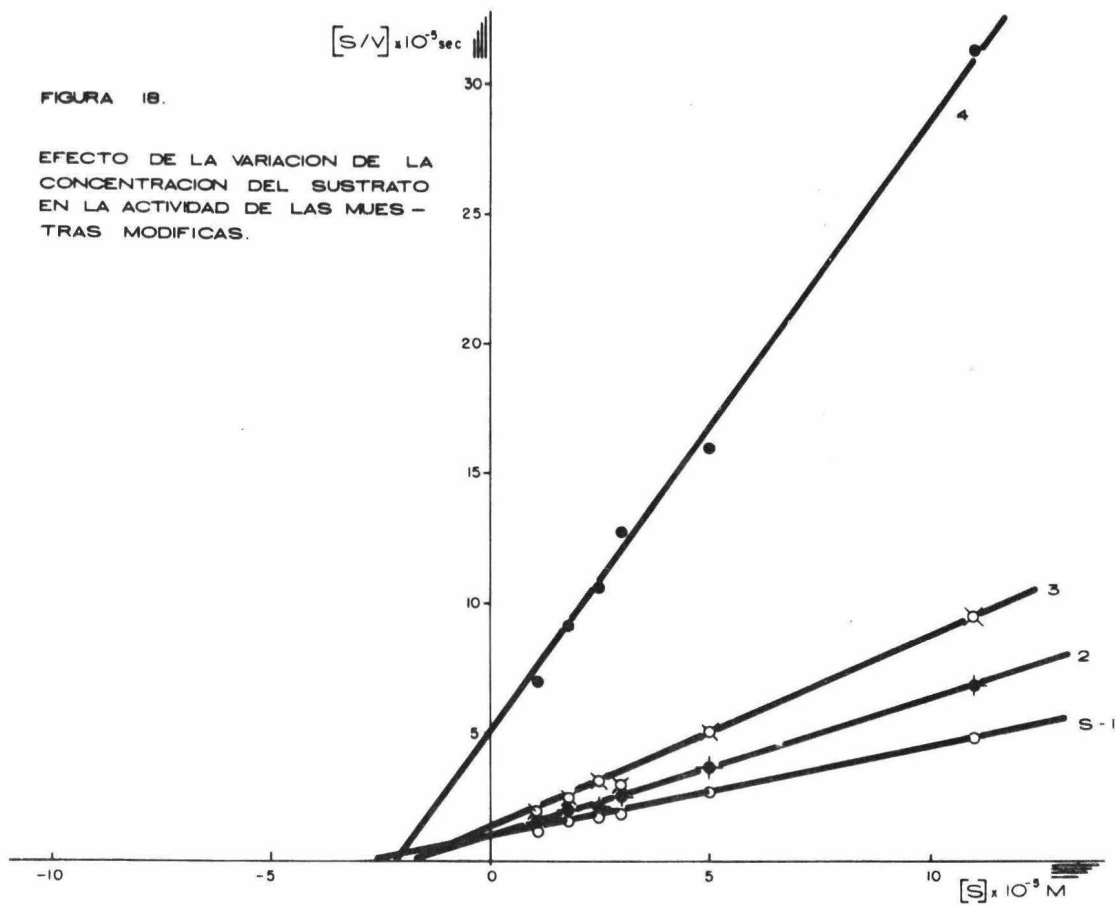


FIGURA 19.

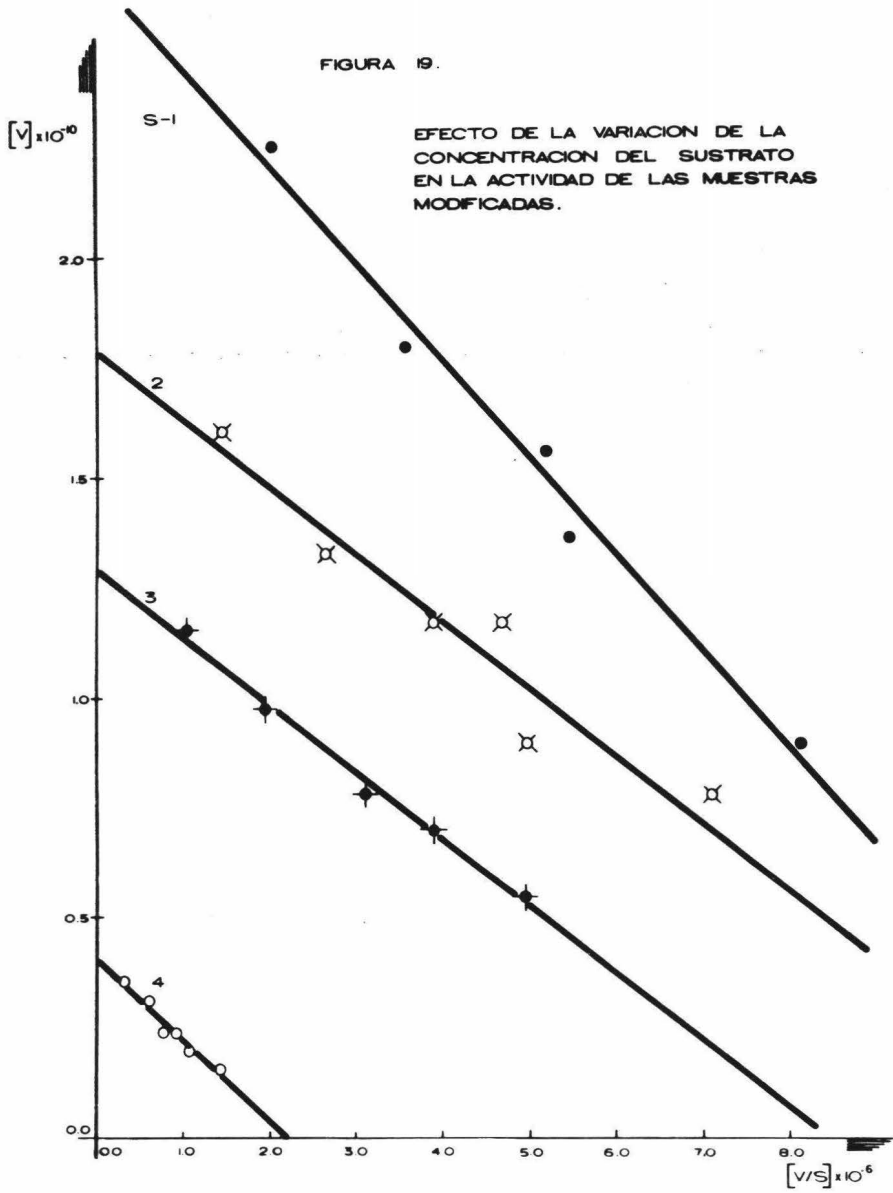


FIGURA 17, 18 y 19. Efecto de la variación de la concentración del sustrato, en la actividad de las muestras modificadas. La determinación de la actividad de estas muestras fué a través del método descrito con D.T.T. Todas las muestras fueron modificadas en amortiguador de acetato 0.2M, pH 4, -- 5M de urea. (S-1) enzima nativa; (2) enzima con un triptofano modificado; (3) enzima con un 50% de modificación y (4) - enzima modificada en un 80%.

CURVA	PENDIENTE	X para Y=0	Y para X=0
$1/v$ vs $1/S$	$K_m/V_{m\acute{a}x}$	$-1/K_m$	$1/V_{m\acute{a}x}$
S/v vs S	$1/V_{m\acute{a}x}$	$-K_m$	$K_m/V_{m\acute{a}x}$
v vs v/S	$-K_m$	$V_{m\acute{a}x}/K_m$	$V_{m\acute{a}x}$

Como lo importante es comparar los valores de K_m y $V_{m\acute{a}x}$, las gráficas más adecuadas para ello son las 18 y 19.

Finalmente, respecto a la línea (4), se observa que su afinidad aumenta aunque su actividad es menor, probablemente debido a que el reactivo es hidrofóbico y por ello tener algún tipo de interacción con los grupos aromáticos del sustrato, pero que por encontrarse modificados no pueden participar de manera normal en el proceso de la catálisis.

D I S C U S I O N.

En la investigación de la importancia que presentan --- ciertos residuos de aminoácidos en una proteína con función catalítica, la "modificación química" ha sido una de las --- técnicas que más ha ayudado y que mejores logros ha aportado al desarrollo científico; sin embargo, aún y cuando su aplicabilidad crece día con día, la investigación y desarrollo - de nuevos agentes modificantes con mayor especificidad, no - marcha al unísono ya que lo que se busca es modificar químicamente un residuo determinado de una proteína con un reactivo tal que únicamente reaccione con el aminoácido deseado, - lo cual no es fácil de lograr; no obstante, ya existen algunos que son muy específicos para ciertos residuos.

Means (88) presenta una lista de 46 agentes modifican--tes para los aminoácidos más comúnmente estudiados (figura - 20), en la cual puede verse que existen lo que son completamente específicos para radicales amino y sulfhidrilo y, ha--ciendo mención al triptofano, el 2-hidroxi-5-nitro bromo bencilo es el más específico de los hasta ahora conocidos, sin serlo totalmente.





En la presente experimentación se trataron de estable--cer las condiciones óptimas para la determinación y modificación química selectiva de los triptofanos de la papaína con el reactivo HNBB, así como determinar el efecto que esta modificación ocasionaba sobre la actividad catalítica de la enzima.

Para lo primero, existen tres técnicas para cuantificar el grado de modificación, a saber:

- 1) Titulación Espectrofotométrica.
- 2) Determinación Colorimétrica
- 3) Titulación Fluorométrica:

FIGURA 20

Agentes Modificantes.

Reactivo	-NH ₂	-SH					-COOH	-S-S-	-SCH ₃
Anhidrido Acético	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
N-Acetilimidazol	± ±	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Acilonitrilo	± ±	+++	-	-	-	-	-	-	-
Aldehído/NaBH ₄	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
N-Bromosuccinimida	-	+++	++	+	-	-	+++	-	-
N-Carboxianhidridos	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Cianato	+++	+++	++	+	-	+	-	-	-
Bromuro de Cianógeno	-	+	-	-	-	-	-	-	+++
1,2-Ciclohexanodiona	±	-	-	-	+++	-	-	-	-
Trímero de diacetilo	+	-	-	-	+++	-	-	-	-
Diazoacetatos	-	++	-	-	-	+++	-	-	-
Sales de Diazonio	+++	+	+++	+++	+	-	+	-	-
Diacetonas	+++	-	+	-	-	-	-	-	-
Dinitrofluorobenceno	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
5-5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Anhidrido etoxifórmico	+++	-	-	+++	-	-	-	-	-
Etilenimina	-	+++	-	-	-	-	-	-	+
N-Etilmaleimida	± ±	+++	-	-	-	-	-	-	-
Formaldehído	+++	+++	+++	+++	+	-	+	-	-
Etil Tiotrifluoroacetato	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Glioxal	++	-	-	-	+++	-	-	-	-
Haloacetatos	+	+++	-	+	-	-	-	-	+
Peróxido de Hidrógeno	-	+++	-	-	-	-	+	+	+++
2-Hidroxí-5-nitrobromobencilo	-	++	-	-	-	-	+++	-	-
Iodo	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
o-Iodobenzoato	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Anhidrido Maleico	+++	++	++	++	-	-	-	-	-
p-Mercuribenzoato	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Metanol/HCl	-	-	-	-	-	+++	-	-	-
2-Metoxi-5-Nitrotropona	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil-acetamidato	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
O-Metilisourea	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Acido Nitroso	+++	+++	±	-	-	-	-	+	-
Acido Perfórmico	-	+++	-	-	+++	-	++	+++	+++
Fenilglioxal	++	-	-	-	-	-	-	-	-
Foto-oxidación	-	+++	± ±	+++	-	-	+++	±	+++
Borohidruro de sodio	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Anhidrido Succínico	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-
Haluro de Sulfenilo	-	+++	-	-	-	-	+++	-	-
Sulfito	-	+++	-	-	-	-	-	+++	-
Haluros de Sulfonilo	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-
Tetranitrometano	-	+++	+++	+++	-	-	+	-	+
Tetrationato	-	+++	-	-	-	-	-	-	-
Tioles	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
Acido Trinitrobenzen sulfónico	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Carboxiimida soluble en agua y nucleófilo	±	±	±	-	-	+++	-	-	-

La primera de estas técnicas no fué posible aplicarla aquí, ya que el reactivo HNBB, en medio ácido, presenta una fuerte absorción positiva a 320 nm y una absorción negativa máxima a 270 nm. Con estas características, como el triptofano no absorbe a 278-280 nm existía una interferencia, además de que el coeficiente de extinción del reactivo, a 320 nm, es de $9\ 800\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ mientras que el del triptofano es de $5\ 500\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Debido a esto no era posible observar una bajada de absorción a 278-280 nm. Más aún, al reaccionar el reactivo con el triptofano se forma un compuesto que puede absorber por esta región.

Por los motivos anteriores, no fué posible aplicar este método para la determinación de la modificación; además, como se cuenta con otras dos técnicas bastante buenas, no se hizo hincapié en el estudio espectrofotométrico.

Las dos técnicas siguientes son de un alto grado de exactitud y lo que se realizó inicialmente (con triptofano puro y posteriormente con la enzima) fué el determinar las condiciones en las cuales ambos métodos aportaban los mismos resultados y así con ambos evaluar la modificación sufrida por la enzima.

Junto con lo anterior se optimizaron variables como temperatura de reacción (4°C) pH y concentración del amortiguador (4.0 y 0.2M respectivamente), tipo de agitación (magnética), tiempo de agitación (1/2 h, o 1 h), concentración del reactivo HNBB, etc., lográndose al final establecer las condiciones óptimas para la modificación selectiva de cada uno de los cinco triptofanos presentes en la estructura primaria de la papaína.

En un principio, la reacción se verificó en presencia -

de amortiguador de acetato lográndose únicamente un 40% de modificación, correspondiente a dos moléculas de triptofano. Mayor modificación no era posible lograr en estas condiciones ya que a mayor concentración del reactivo, éste se precipitaba en el medio pudiendo ocasionar una desnaturalización de la enzima.

Por otro lado, al agregar urea al amortiguador, en una concentración final de 5M., la modificación lograda en estas nuevas condiciones fué del 100%.

El triptofano siempre ha tenido un papel muy especial en una macromolécula, ya que tiene la posibilidad de interactuar con residuos hidrofóbicos (91) en varias formas, siendo una de ellas, posiblemente, la transferencia de carga.

En la figura 11 puede observarse que al agregar un agente desnaturalizante como es la urea, al medio de reacción, la hidrofobicidad del triptofano disminuye, permitiendo una mayor reactividad con el HNBB, Kauzmann (91) menciona que la acción de la urea puede ser del tipo desnaturalizante ya que causa la debilidad de uniones hidrofóbicas así como de puentes de hidrógeno.

Por estas razones era de pensarse que al tratar de modificar los triptofanos de la macromolécula, el grado de dificultad, en presencia de urea, fuera mucho menor que en ausencia de la misma.

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la figura 11, obteniéndose un 100% de modificación, en presencia de urea, a una relación HNBB/TRP-Papaína de 204; mientras que a esa misma relación, en ausencia de urea, sólo es posible modificar un 40% del triptofano presente.

Teniendo en esta forma establecida la técnica de modificación de cada uno de los cinco residuos de la papaina, se prosiguió al estudio de su cinética, obteniéndose una curva de por ciento de actividad contra relación HNBB/TRP-Papaina, pero no de la forma exponencial decreciente típica, sino presentando una anomalía en el intervalo de las abscisas de 20 a 60, que en el caso de la modificación en urea, equivaldría a tener de 1 a 3 triptofanos modificados. Este mismo fenómeno se presenta al realizar la reacción en amortiguador sin urea, sólo que aquí se logran modificar únicamente dos triptofanos de la molécula (figura 14).

Antes de dar una explicación a este fenómeno es conveniente mencionar que Drenth, en una comunicación personal a Weinryb (92), le indicaba que estudios que él había realizado de cristalografía en Rayos X revelaban que la papaina tenía dos triptofanos expuestos, el 69 y 177; dos parcialmente ocultos, el 17 y 181, y uno totalmente enmascarado que era el 26. De estos cinco, solo tres se encuentran en el sitio activo y son el 69, 177 y 26.

Con este antecedente es posible dar una explicación a los resultados cinéticos obtenidos, ya que siendo el 69 y 177 los triptofanos más expuestos, éstos serían posiblemente los que primero se modificaran. Así pues, la curva de actividad obtenida en amortiguador sin urea, indica que al modificar un triptofano, la actividad decrece en un 35%, desapareciendo completamente sólo hasta que se modifica el segundo. También, el modificar el primero parece ser que ocasiona un impedimento estérico hacia la modificación del segundo, lo cual se puede observar al examinar la figura 15.

Por otro lado, la explicación de la curva obtenida en presencia de amortiguador y urea es algo ya que en un traba

jo desarrollado en este mismo laboratorio (93), se demostró que en presencia de urea, al modificar un primer triptofano, la estructura de la proteína se veía labilizada, pudiendo -- ser atacada por la urea; mientras que sin esta primera modificación, la urea no ejercía ningún efecto sobre la estructura de la misma. Esto último está fundamentado por los experimentos realizados en nuestro laboratorio con NBS, además de un artículo publicado en 1971 por Jori, Scoffone et al., en el cual plantean que de los tres triptofanos que se encuentran en el sitio activo, el 69 y el 26 están involucrados en el mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína,

Basándose en lo anterior es posible proponer una explicación de la curva en cuestión diciendo que al modificar un triptofano, la molécula pierde actividad por la reacción del HNBB sobre los triptofanos 69 y 177, pero por cada molécula que tiene modificado el 69, se exponen dos nuevos triptofanos, el 7 y el 181, con igual reactividad que el otro expuesto, pero con la salvedad de que este último se encuentra protegido por un impedimento estérico ocasionado por el volumen molecular del HNBB unido al triptofano 69. Como los residuos 7 y 181 no intervienen en la actividad, es por lo que se presenta una anomalía entre el primero y tercer triptofano modificado. A partir de aquí, se van modificando los residuos -- restantes, desapareciendo la actividad cuando se tienen los cinco triptofanos modificados (figura 16).

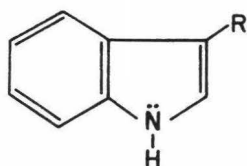
De aquí puede concluirse a priori que, de acuerdo a los trabajos realizados por Morihara y Nagami y por lo propuesto por Jori y Scoffone, el residuo 177 juega un papel primordial en la actividad de la enzima, en combinación con otros dos -- residuos hasta ahora propuestos y prácticamente comprobados que son la cisteína 25 y la histidina 159.

El proponer que el triptofano 177 tiene un papel importante en el proceso de fijación enzima-sustrato, se basa en que varios autores han encontrado que en el proceso catalítico se encuentra involucrado un residuo con carácter de carbonilo y debido a esto se proponía la participación de la asparagina 158 y la no participación de la histidina 159.

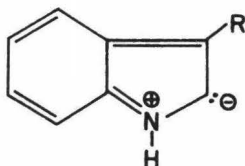
(Sin embargo, una serie de investigaciones, entre ellos Kimmel y Smith, indicaron que de acuerdo a un cierto mecanismo de reacción propuesto para la enzima, aunando a otra serie de resultados experimentales, la histidina 159 debería de encontrarse involucrada en la catálisis. Hasta la fecha se ha aceptado que tanto la cisteína 25 como ésta histidina, intervienen en la actividad catalítica de la papaína; sin embargo, la duda respecto a sí en verdad existía o no un grupo con νK de carbonilo dentro de la cinética de la enzima, quedaba -- sin resolverse, dejando inconformes a algunos investigadores.

No es sino hasta cuando surgen las investigaciones realizadas por Morihara y Nagami, sobre modificación química e inhibición de la papaína, que la duda anterior parece quedar aclarada puesto que de sus observaciones estos científicos - concluyen que el triptofano como el indol, reacciona con el bisulfito de sodio, un reactivo típico de carbonilos, formando un compuesto de adición, detectado por Dicroísmo Circular.

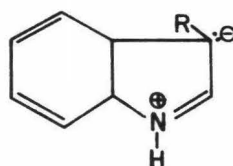
Este hecho sugiere que el residuo de triptofano existe - en un tautomerismo entre las formas indólica e indolénica, - al igual que lo hace el indol.



indol



2-indolenina



3-indolenina

La forma indolénica posee un grupo simulador de un carbonilo en el anillo y presenta reacciones similares a estos -- grupos.

Con esto y otra serie de conclusiones por ellos publicadas, terminan proponiendo, entre otras cosas, que un residuo de triptofano participa directamente en la actividad catalítica y que el pK de grupos carbonilo encontrados por ciertos investigadores, se explica debido a que el indol del triptofano existe en forma tautomérica con la indolenina, la cual reacciona con reactivos específicos para carbonilos, atribuyéndose esto a que un triptofano del sitio activo cambia a la -- forma indolénica debido a un cambio en el pH, en la región -- entre 3.0 y 4.5.

Como puede verse, no es arriesgado proponer aquí que el triptofano 177 juegue un papel importante dentro de la cinética de la papaína; y debería de ser este ya que los otros -- dos que restan en el sitio activo, 26 y 69 se piensa que no participan en la catálisis sino en el mantenimiento de la estructura terciaria.

Con el fin de tratar de fundamentar un poco más esta -- teoría, se realizaron experimentos sobre el efecto que tenía la variación de la concentración del sustrato sobre la actividad catalítica de la enzima modificada en diferente grado.

Los resultados que se muestran en las figuras 17, 18 y 19 representan las curvas obtenidas para la enzima nativa -- S-1 , la que tiene un triptofano modificado 2 , la que -- tiene entre dos y tres 3 y, finalmente, la que tiene cuatro residuos modificados 4 . No aparece la que tiene los -- cinco, ya que en estas condiciones la velocidad de reacción v es cero.

De estas figuras, lo importante a saber era sí al ir modificando sucesivamente cada residuo, el efecto que esto ocasionaba en la actividad era debido a un cambio en la estructura de la proteína, una variación en la afinidad enzima-sustrato o ambos a la vez.

Como puede observarse en estas últimas figuras, el valor del K_m para las muestras con uno, dos y tres residuos modificados, es prácticamente el mismo, indicando que la modificación del segundo y tercer residuo no afecta la afinidad del complejo enzima-sustrato, pensándose con esto que estos dos residuos no se encontrarían en el sitio activo y que debieran de corresponder a los residuos 7 y 181.

Por otro lado, analizando la curva con cuatro residuos modificados, vemos que tanto el K_m como la $V_{máx}$, varían, lo cual era de esperarse ya que en estas condiciones, la modificación sería sobre un cuarto triptofano localizado en el sitio activo, el cual se encontraba un poco enmascarado por la modificación inicial. A estas últimas concentraciones, es posible pensar que exista un cambio en la afinidad enzima-sustrato y en la estructura terciaria.

Finalmente, comparando la enzima nativa con la que tiene un residuo modificado, se puede ver que tanto el K_m como la $V_{máx}$. cambian en una forma especial ya que al observar la figura 17, las rectas obtenidas para estas dos muestras, tienen la misma pendiente, lo cual es indicativo, si se pudiera comparar este experimento con uno de inhibición, de una supuesta inhibición no competitiva en la cual se presenta el mismo fenómeno gráfico y que se explica, en términos muy generales diciendo que sería similar a que se eliminara enzima del medio o a que su concentración disminuyera.

Si esto fuera cierto, sería posible calcular el por ciento de enzima modificada así como el decremento en actividad ocasionado por la modificación y, posteriormente, comparar - estos valores con los obtenidos experimentalmente. Así, pues en un principio la concentración de la enzima era de 1.56×10^{-10} moles, con una constante de velocidad de reacción de 1.61 sec^{-1} y una velocidad máxima de $2.5 \times 10^{-10} \text{ mol/sec}$.

Para la muestra con un triptofano modificado (21% de modificación), los valores que se obtuvieron fueron de $1.66 \times 10^{-10} \text{ mol/sec}$ como velocidad máxima y una k_{cat} de 1.61 sec^{-1} .

De acuerdo con la ecuación

$$V_{\text{máx}} = k \left[E \right]$$

la concentración de enzima que se obtiene para estas últimas condiciones es de 1.035×10^{-10} moles.

Con lo anterior, la cantidad de enzima modificada es:

$$x_1 = (1.56 - 1.035) \times 10^{-10} = 5.25 \times 10^{-4} \text{ moles de enzima modificada}$$

y como cada molécula de papaína tiene cinco triptofanos, es posible calcular las moles de residuo modificados.

Así tenemos:

$$(1.56 \times 10^{-10}) \times 5 \quad \text{-----} \quad 100\%$$

$$x_2 \quad \text{-----} \quad 21\%$$

$$\therefore x_2 = 1.64 \times 10^{-10} \text{ moles de triptofano modificado.}$$

El cociente x_2/x_1 nos indica las moles de triptofano mo dificado por mol de enzima modificada.

$$Y = \frac{x_2}{x_1} = \frac{1.64 \times 10^{-10}}{5.25 \times 10^{-11}} = 3.12 \text{ moles de triptofano/mol de enzima modificada}$$

Finalmente, el por ciento de modificación referido a la concentración inicial de enzima sería:

$$\begin{array}{l} 1.56 \times 10^{-10} \text{ ————— } 100\% \\ 1.035 \times 10^{-10} \text{ ————— } x_3\% \end{array} \quad \therefore x_3 = 66.4\%$$

lo cual indica que se modificó un 33.6% del total de enzima, que si por lo antes expuesto equivale a quitar del medio de reacción éste porcentaje de enzima, la actividad de la muestra 2 debería de decrementar un 33-34%.

Observando la figura 16 se ve que al tener un triptofano modificado, la actividad disminuye un 30-32%, lo cual con cuerda con lo obtenido en este desarrollo matemático.

Aún con todos los resultados hasta aquí obtenidos, no es posible tratar de dar una explicación precisa a lo que su cede cada vez que se modifica un triptofano de la papaína, ya que se plantean muchas dudas de las cuales no se tiene ex plicación pero que tal vez se lograra obtener con experimentos más refinados y complejos. Lo que hasta aquí se propone es solo una teoría surgida de ciertos experimentos y que por ningún motivo puede decirse que sea definitiva.

Quedan las puertas abiertas para futuros caminos de investigación los cuales se espera sean estudiados y analiza--

dos con el fin de llegar, hasta donde humanamente sea posible, a aclarar la duda inicial de porqué ciertas proteínas - tienen propiedades catalíticas, cómo funcionan y cual es la función que desarrollan cada uno de los residuos que la integran, dentro del complejo sistema de la catálisis enzimática.

B I B L I O G R A P H I A.

- 1.- Shaw, E.
Phys. Rev. 50, [2] , (1970).
- 2.- Husain, S.S. and Lowe, G.
Biochem. J., 117, 341 (1970).
- 3.- Husain, S.S. and Lowe, G.
Biochem. J., 117, 333 (1970).
- 4.- Bergmann, M. and Fruton, J.S.
Advances in Enzymol., 1, 63 (1941).
- 5.- Smith, E.L.
The Enzymes
Boyer, P.D.; Lardy, H. and Myrback, K., ed.
Cap. I. Vol. IV
Academic Press.
New York (1960).
- 6.- Bergmann, M.
Advances in Enzymol., 2, 49 (1942).
- 7.- Waldschmidt-Leitz, E. and Harteneck, A.
Z. Physiol. Chem., 149, 203 (1925)
- 8.- Grassmann, W. and Schneider, F.
Ergeb. Enzymforsch., 5, 79 (1935).
- 9.- Kinimitsu, D.K. and Yasunobu, K.T.
Biochem. Biophys. Acta, 139, 405 (1967).
- 10.- Wurtz, A. and Bouchut, E.
Compt. Rend. Acad. Sci., 89, 425 (1879).
- 11.- Tainter, M.L. and Buchanan, O.H.
Ann. New York Acad. Sci., 54, 147 (1951).
- 12.- Wurtz, A.
Compt. Rend. Acad. Sci., 90, 1379 (1880).
- 13.- Wurtz, A.
Compt. Rend. Acad. Sci., 91, 787 (1880).
- 14.- Vines, S.H.,
Ann. Botany, 15, 570 (1901).
- 15.- Chittenden, R.H.

- Trans. Conn. Acad. Arts Sci., 9, 298 (1892).
- 16.- Chittenden, R.H., Mendel, L.B. and McDermott, H. E.
Am. J. Physiol., 1, 255 (1898).
- 17.- Mendel, L.B. and Blood, A.F.
J. Biol. Chem., 8, 177 (1910).
- 18.- Bersin, T. and Logemann, W.
Z. Physiol. Chem., 220, 209 (1933).
- 19.- Hellerman, L., Perkins, M.E. and Clark, W.M.
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 19, 855 (1933).
- 20.- Kimmel, J.R. and Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 207, 515 (1954).
- 21.- Balls, A.K. and Lineweaver, H.
J. Biol. Chem., 130, 669 (1939).
- 22.- Spackman, D.H., Stein, W.H. and Moore, S.
Anal. Chem., 30, 1190 (1950).
- 23.- Balls, A.K., Lineweaver, H. and Thompson, R.R.
Science, 86, 379 (1957).
- 24.- Kimmel, J.R., Thompson, E.O.P. and Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 217, 151 (1955).
- 25.- Thompson, E.O.P.
J. Biol. Chem., 207, 563 (1954).
- 26.- Sanger, F.
Advances in Protein Chem., 7, 1 (1952).
- 27.- Smith, E.L. and Kimmel, J.R.
Proc. First Intern. Wool Research Conf., Australia, 1955C,
199 (1956).
- 28.- Light, A. and Smith, E.L.
Federation Proceedings, 18, 274 (1959).
- 29.- Light, A., Frater, R., Kimmel, J.R. and Smith, E.L.
Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.), 52, 1276 (1964).
- 30.- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M. and
Wolthers, B.G.
Nature, 218, 929 (1968).
- 31.- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Marrink, J. and
Wolthers, B.G.

- J. Mol. Biol., 5, 398 (1962).
- 32.- Drenth, J. Jansonius, J.N. and Wolthers, B.G.
J. Mol. Biol., 24, 449 (1967).
- 33.- Husain, S.S. and Lowe, G.
Biochem. J., 114, 279 (1969).
- 34.- Gray, W.R.
Methods in Enzymology
Vol XI
p. 480
Hirs, C.H., ed.
Academic Press Inc.
New York.
- 35.- Drenth, J., Hol, W.G.J., Visser, J.W.E. and Sluyterman,
L.A.A.E.
J. Mol. Biol., 34, 369 (1968).
- 36.- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Sluyterman, L.
A.A.E. and Wolthers, B.G.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B257, 231 (1970).
- 37.- Lowe, G.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B257, 237 (1970).
- 38.- Krebs, H.A.
Biochem., 220, 289 (1930).
- 39.- Bersin, T.
Ergeb. Enzymforsch., 4, 68 (1935).
- 40.- Smith, E.L., Finkle, B.J. and Stockell, A.
Discussions Faraday Society, [20], 96 (1955).
- 41.- Finkle, B.J. and Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 230, 669 (1958).
- 42.- Glazer, A.N. and Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 240, 201 (1965).
- 43.- Calvery, H.O.
J. Biol. Chem., 102, 73 (1933).
- 44.- Stockell, A. and Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 227, 1 (1957).

- 45.- Smith, E.L.
J. Biol. Chem., 233, 1392 (1958).
- 46.- Cohn, E.J. and Edsall, J.T.
Proteins, Amino Acids and Peptides
Reinhold
New York (1943).
- 47.- Pérez Villaseñor, J.
Cristalización de Papaína
Tesis doctoral
University of California, Davis (1967).
- 48.- Lumry, R. and Smith, E.L.
Discussions Faraday Society, [20], 105 (1955).
- 49.- Smith, E.L., Chavré, V.S. and Parker, M.J.
J. Biol. Chem., 230, 283 (1958).
- 50.- Sanner, T. and Phil, A.
J. Biol. Chem., 238, 165 (1963).
- 51.- Sluyterman, L.A.A.E.
Biochem. Biophys. Acta, 85, 305 (1964)
- 52.- Bender, M.L. and Brubacher, L.J.
J. Am. Chem. Soc., 88, 5880 (1966).
- 53.- Lowe, G. and Williams, A.
Proc. Chem. Soc., 140 (1964).
- 54.- Bender, M.L. and Brubacher, L.J.
J. Am. Chem. Soc., 86, 5333 (1964).
- 55.- Scheter, I. and Berger, A.
Biochem. and Bioph. Res. Comm., 27, 157 (1967).
- 56.- Berger, A. and Schechter, I.
Phil. Trans. Roy. Soc. Lond., B257, 249 (1970).
- 57.- Morihara, K. and Nagami, K.
J. Biochem., Tokyo, 65, 321 (1969).
- 58.- Lowe, G. and Williams, A.
Biochem. J., 96, 189 (1965).
- 59.- Brubacher, L.J. and Bender, M.L.
J. Am. Chem. Soc., 88, 5871 (1966).

- 60.- Husain, S.S. and Lowe, G.
Biochem. J., 108, 855 (1968).
- 61.- Husain, S.S. and Lowe, G.
Biochem. J., 108, 861 (1968).
- 62.- Schechter, I. and Berger, A.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 32, 898 (1968).
- 63.- Bergmann, M. and Fruton, J.S.
Advances in Enzymol. 1, 63 (1941).
- 64.- Jori, G., Gennari, G., Toniolo, C. and Scoffone, E.
J. Mol. Biol., 59, 151 (1971).
- 65.- Sluyterman, L.A.A.E.
Biochem. Biophys. Acta, 113, 577 (1966).
- 66.- Whitaker, J.R. and Bender. M.L.
J. Am. Chem. Soc., 87, 2728 (.965).
- 67.- Bernhard, S.A. and Gutfreund. H.
Biochem. J., 63, 61 (1956).
- 68.- Inagami, T. and Murachi, T.
Biochemistry, 2, 1439 (1963).
- 69.- Lowe, G. and Williams, A.
Biochem. J., 96, 194 (1965).
- 70.- Lowe, G. and Williams, A.
Biochem. J., 96, 199 (1965).
- 71.- Kirsch, J.F. and Ingelstrom, M.
Biochemistry, 5, 783 (1966).
- 72.- Williams, D.C. and Whitaker, J.R.
Biochemistry, 6, 3711 (1967).
- 73.- Barel, A.O. and Glazer, A.N.
J. Biol. Chem., 244, 268 (1969).
- 74.- Teale, F.W. and Weber, G.
Biochem. J., 65, 476 (1957).
- 75.- Levdina, M. and La Bella, F.S.
Canadian Journal of Biochem., 49, 6 (1971).
- 76.- Graham. C.E., Smith, E.L., Hier, S.W. and Klein, D.
J. Biol. Chem., 168, 711 (1947).

- 77.- Koshland, D.E., Karkhanis, Y.D. and Latham, H.G.
J. Am. Chem. Soc., 86, 1448 (1964).
- 78.- Patchornik, A., Lawson, W.B. and Witkop, B.
J. Am. Chem. Soc., 80, 4747 (1958).
- 79.- Viswanatha, T. and Lawson, W.B.
Arch. Biochem. Biophys., 93, 130 (1961).
- 80.- Scoffone, E., Fontana, A. and Occhi, R.
Biochemistry, 7, 971 (1968).
- 81.- Fontana, A., Scoffone, E. and Benassi, C.A.
Biochemistry, 7, 980 (1968).
- 82.- Veronese, F.M., Boccu, E. and Fontana, A.
Annali di Chimica, 58, 1309 (1968).
- 83.- Boccu, E., Veronese, F.M., Fontana, A. and Benassi, C.A.
Eur. J. Biochem., 13, 188 (1970).
- 84.- Horton, R.H. and Koshland, D.E.
J. Am. Chem. Soc., 87, 1126 (1965).
- 85.- Horton, R.H., Kelly, H. and Koshland, D.E.
J. Biol. Chem., 240, 722 (1965).
- 86.- Barman, T.E. and Koshland, D.E.
J. Biol. Chem., 242, 5771 (1967).
- 87.- Dopheide, T.A.A. and Jones, W.M.
J. Biol. Chem., 243, 3906 (1968).
- 88.- Means, G.E. and Feeney, R.E.
Chemical Modification of Proteins.
Holden-Day, Inc.
U.S.A. (1971).
- 89.- Whitaker, J.R. and Pérez-Villaseñor, J.
Arch. Biochem. Biophys., 124, 70 (1968).
- 90.- Soejima, M. and Shimura, K.
J. Biochem., Tokyo, 49, 260 (1961).
- 91.- Kauzmann, W.
Advances in Protein Chemistry, 14, 1 (1959).
- 92.- Weinrub, I. and Steiner, R.F.
Biochemistry, 9, 135 (1970).

- 93.- Pérez Gavilán, J.P.
Estudio de la Modificación Química de la Papaina con la
N-Bromosuccinimida. Su efecto en la actividad.
Tesis. Facultad de Química. U.N.A.M. (1972)
- 94.- Smith, E.L. and Parker, M.J.
J. Biol. Chem., 233, 1387 (1958).
- 95.- Witkop, B.
Science, 162, 318 (1968).
- 96.- Blow, D.M. and Steitz, T.A.
Papain.
Annu. Rev. Biochem., 39, 63 (1970).
- 97.- Polgár, L.
Eur. J. Biochem., 33, 104 (1973).