

**DIFERENTES TÉCNICAS DE LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS APLICADAS
A LA TRIPSINA.**

**AUTORES: GRETHEL NEREYDA REYES OLAZÁBAL
LEYDEN FERNÁNDEZ VIDAL**

Resumen

La tripsina es una proteína globular, monomérica y no glicosidada compuesta por 223 residuos de aminoácidos, perteneciente a la familia de las serino proteasas y que constituye una de las enzimas más estudiadas y mejor caracterizadas. Esta enzima es activa frente a sustratos de varios pesos moleculares y es inactivada por un número de inhibidores macromoleculares. Todas estas propiedades han hecho de esta enzima un blanco excelente para la modificación química con diferentes polímeros donde las propiedades de estabilidad catalítica y térmica fueron mejoradas, así como su resistencia a la degradación autolítica y frente a agentes desnaturizantes como el SDS. A través de la inmovilización tanto por unión a un soporte (con o sin la presencia de brazo espaciador) como por entrecruzamiento también se mejoraron las propiedades de estabilidad térmica, resistencia al pH y reusabilidad en comparación con la enzima en su forma nativa. Mediante mutagénesis sitio dirigida se han sustituido aminoácidos del sitio activo, de los enlaces disulfuro conservados, así como en el sitio de autólisis con vistas a comprobar y estudiar como los cambios estructurales pueden modificar la actividad, la especificidad y la estabilidad en la tripsina mutada.

I. INTRODUCCIÓN

I.2- La tripsina.

I.2.1-Nombre e historia:

En 1876, Kühne describió y nombró a la tripsina por primera vez como “la actividad proteolítica presente en secreciones pancreáticas”. **(1)** Kühne diferenció esta “actividad” de la pepsina por el mayor valor de pH óptimo de la tripsina.

Se realizaron diferentes experimentos donde se logró la separación de esta proteasa pancreática, denominándosele **tripsina**, la cual está asociada con la actividad proteolítica y es capaz de romper los enlaces peptídicos C-terminales, cuando está presente la arginina (Arg) o la lisina (Lys).

La disponibilidad de aislar esta enzima del páncreas del ganado vacuno permitió, en 1931, su purificación por cristalización. **(2)**

I.2.2-Estructura química:

La tripsina de páncreas bovino es una proteína globular, monomérica y no glicosidada compuesta por 223 residuos de aminoácidos. **(3)** Con una masa molecular, determinada por su composición aminoacídica, de 23.3 kDa. Esta enzima presenta seis puentes disulfuros en su estructura primaria, localizados entre los residuos Cys7-Cys137, Cys25-Cys41, Cys109-Cys210, Cys116-Cys183, Cys148-Cys162 y Cys173-Cys197 (**Figura I.I**).

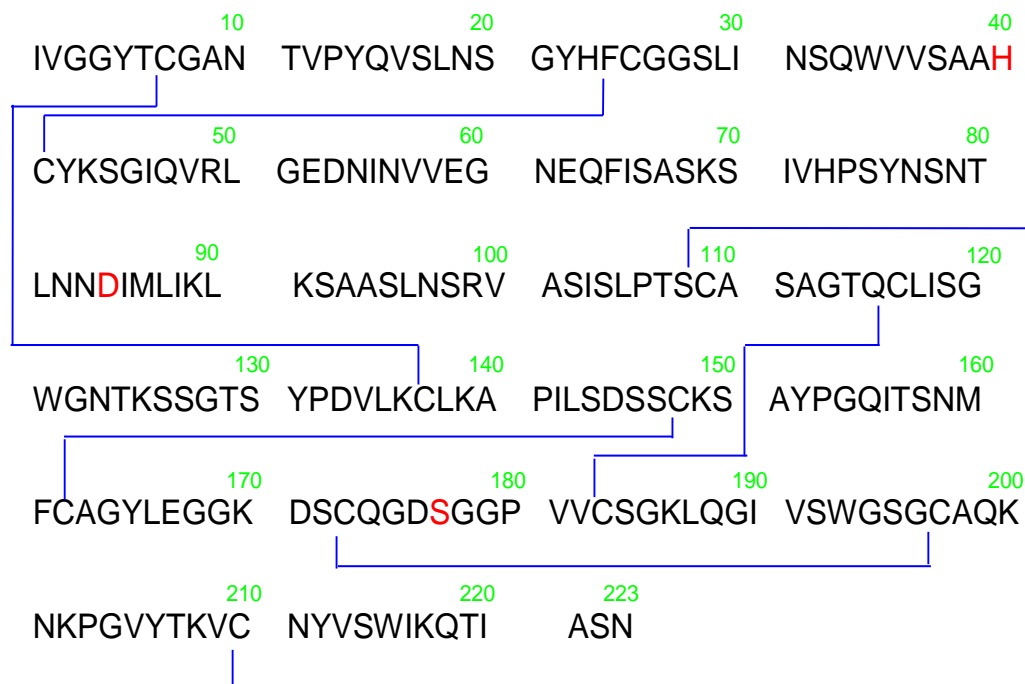


Figura I.I. Estructura primaria de la tripsina.

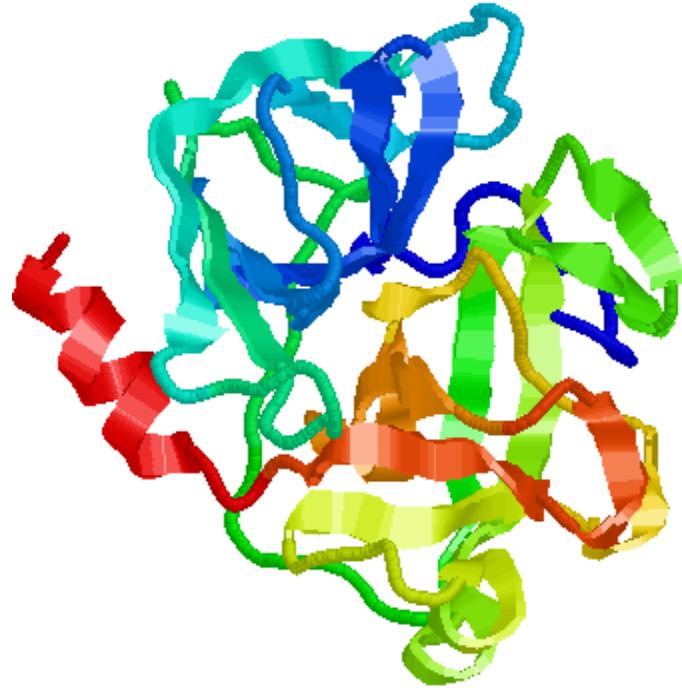


Figura I.2. Estructura tridimensional de la tripsina.

Esta enzima pertenece a la familia de las serino proteasas, donde los residuos catalíticos más importantes son aquellos que constituyen la tríada Asp/His/Ser (**Figura II.3**). La Ser 177 actúa como un nucleófilo, encargándose de la ruptura del enlace peptídico y la formación de una acil-enzima como intermediario. **(4)**

Todas las tripsinas, obtenidas de diferentes fuentes, son sintetizadas como proenzimas. Los propéptidos de mamíferos (por lo general, hexapéptidos) contienen la misma secuencia aminoacídica para el corte por enteropeptidasas, $-(Asp)_4-Lys$, anterior a la secuencia N-terminal Ile-Val-Gly-Gly-. El corte de este péptido trae como resultado la ruptura del puente de hidrógeno de la His23 con el Asp176, lo cual está seguido por la rotación del Asp176, pudiendo interactuar este con el nuevo residuo N-terminal, la Ile1.

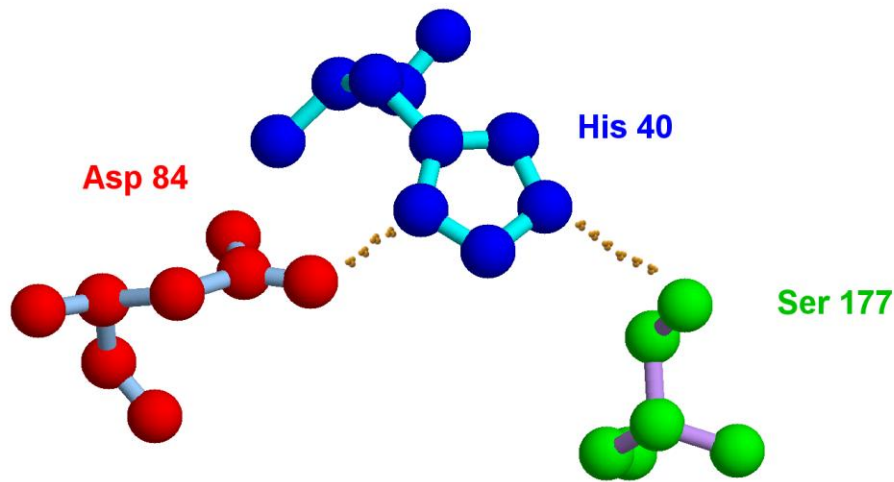


Figura I.3. Triada catalítica de la tripsina de páncreas bovino.

El sustrato forma una hoja plegada β antiparalela con el sitio de unión a la proteína. La especificidad del sustrato está determinada, primeramente, por el Asp171, el cual está situado al fondo de la cavidad de unión de la enzima **(5)**. Numerosos experimentos han mostrado que los lazos de la superficie protéica comprenden a los aminoácidos 166-175 (lazo 1) y los aminoácidos 195-202 (lazo 2), los cuales influyen fuertemente en la especificidad de la enzima; incluso se ha reportado que no están involucrados en el contacto con el sustrato. **(4)**

Otro aspecto estructural de la tripsina incluye la alta afinidad por los sitios de unión al calcio, el cual es necesario para la estabilización de la enzima; ocurriendo rápidamente la autodegradación en ausencia de este ión. Este sitio está formado por el lazo Glu52-Glu62. **(3)**

El lazo de “autólisis”, comprende los residuos 123-131, es muy flexible tanto en la tripsina como en el tripsinógeno. La ruptura de este lazo en la Lys125 trae consigo la formación de la α -tripsina, la cual retiene un poco la actividad catalítica.

El pI puede variar ampliamente según la forma de la tripsina, ya que tanto la forma aniónica como la catiónica existen en diversas especies.

I.2.3- Actividad y especificidad:

En el caso de la tripsina, el sitio S_1 (nomenclatura de Schechter y Berger, 1968) está definido por los residuos 171-177, 192-197 y 202-206 y la tríada catalítica Ser 177, His 40 y Asp 84. Muchos de los conocimientos fundamentales que se tienen de esta familia se han derivado del estudio de esta enzima.**(4)**

La tripsina hidroliza, con mayor preferencia, los sustratos tipo amida que contengan Arg o Lys en la posición P₁, **(6)**, lo cual se ve reflejado en sus valores relativos de eficiencia catalítica (k_{cat} / K_M) de hasta 10⁵ veces mayor que para otros aminoácidos naturales **(7)**. La afinidad de esta enzima por los sustratos tipo amida que contengan Arg sobre los que contienen Lys es de 2-10 veces mayor **(8)**. Sin embargo, la discriminación entre sustratos de tipo éster es mucho menos estricta.

La especificidad de la tripsina por residuos de Arg/Lys se explica por la presencia del Asp 171 en el fondo del sitio S₁. Como se debe esperar de su disparidad estructural, la Lys y la Arg interactúan de manera diferente con los determinantes primarios Asp 171 y Ser 172 **(3)**. El grupo guanidinio del sustrato P₁-Arg realiza una interacción por par iónico con el Asp 171, mientras que la interacción de P₁-Lys es solamente por contacto mediante el agua y tanto los sustratos que contienen Arg o Lys interactúan también con la Ser 172.

La estructura tridimensional de esta enzima de páncreas bovino se determinó en 1974 **(9)** y se ha convertido en el prototipo de la familia S₁ de proteasas. Las estructuras terciarias de las proteínas pertenecientes a esta familia son fuertemente conservadas, lo cual ha sido comprobado para la tripsina. **(3)** Aunque su estructura primaria (aislada de diferentes fuentes) puede variar sustancialmente; la forma en que ellas se pliegan es aproximadamente similar **(Figura I.2)**.

II. MODIFICACIÓN QUÍMICA DE LA TRIPSINA CON DIFERENTES POLÍMEROS.

La modificación de proteínas por unión de las mismas a polímeros solubles es de especial interés para médicos y científicos, debido a la posibilidad de cambiar algunos parámetros de la molécula modificada.

La tripsina constituye una de las enzimas más estudiadas y mejor caracterizadas. Es activa frente a sustratos de varios pesos moleculares y es inactivada por un número de inhibidores macromoleculares. Todas estas propiedades han hecho de la tripsina un blanco excelente para la modificación química con diferentes polímeros.

Venkatesh y Sundaram(1998) reportaron la modificación de la tripsina mediante su unión a sacarosa y polímeros de sacarosa, sin pérdida de la actividad. En cambio la temperatura óptima de la tripsina cambió desde 45°C hasta 76°C y la T₅₀ desde 54°C hasta 76°C, para el mejor modificador que fue el polímero de masa molecular de 400 kDa.**(10)**.

Marshall (1978) y Marshall y Rabinowitz (1976) describieron la preparación de un conjugado dextrana-tripsina, el cual fue resistente a la autodigestión. Aunque no se describen los resultados, se comprobó el tiempo de circulación en la sangre de este conjugado enzimático soluble, después de la administración repetida del mismo. **(11,12)**

Abuchowski y Davis (1979) informaron la modificación química de tripsina con Polietilenglicol(PEG-5000). La unión del PEG a proteínas es simple y ocurre en condiciones normales, a diferencia de la modificación química de la tripsina con la dextrana, lo cual conlleva un gran número de manipulaciones y se obtuvieron productos heterogéneos, los cuales fueron posteriormente purificados. También

se ha comprobado que mediante este procedimiento queda sin acoplar cierta cantidad de enzima. **(13)**

El conjugado tripsina- PEG exhibió una especificidad dependiente del tamaño del polímero. La habilidad de degradar sustratos de alto peso molecular se redujo marcadamente, mientras que los sustratos pequeños fueron hidrolizados por el conjugado a una velocidad 4 veces mayor que con la tripsina nativa. La actividad esterolítica también fue mayor para el conjugado y resistió la autólisis bajo condiciones que inactivan la enzima y fue resistente a la acción del inhibidor de tripsina de soya. Se comprobó la presencia de actividad fibrinolítica de este conjugado al ser puesto en contacto con sangre fresca de conejo, lo cual indicó que este no es inmunogénico al disolver los coágulos sanguíneos, pudiendo ser de gran valor terapéutico.

Gaertner y Puigserver (1992) informaron la modificación química de tripsina con monometoxipoli(etilenglicol) activado con varias masas moleculares. La modificación de los grupos amino de la tripsina por estos polímeros está acompañada por un incremento de la actividad enzimática, lo que es inusual en el caso de enzimas solubles en agua. Utilizando el N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida como sustrato, se obtuvo un incremento en la velocidad de hidrólisis de 3-4 veces con respecto a la enzima nativa. La modificación química de alrededor del 80% de los grupos amino libres con PEG mejoró significativamente la resistencia al calor y a los detergentes, lo cual es de gran interés desde el punto de vista de sus implicaciones estructurales como de su potencial biotecnológico. **(14)**

También ha sido reportado la modificación de la tripsina con polímeros iónicos como el oxoglutarato donde la estabilidad es inducida por la presencia de metales y la formación de quelatos. **(15)** Otros polímeros aniónicos que se han utilizado son los derivados de ciclodextrinas.

II.1-Modificación de la tripsina con ciclodextrinas y sus derivados:

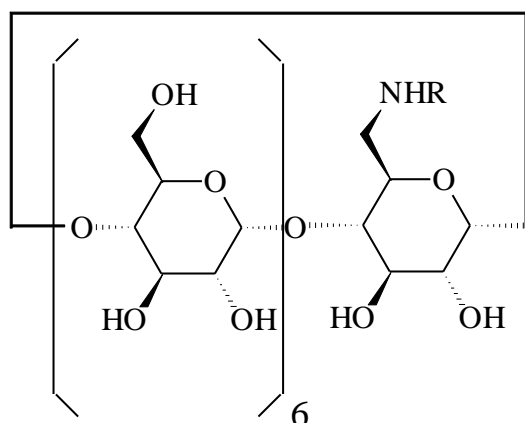
Las ciclodextrinas son una familia de oligómeros cíclicos no reductores compuestos por unidades de D-glucopiranosas enlazadas mediante uniones $\alpha(1-4)$. Las ciclodextrinas más comunes se denominan α , β y γ , las cuales contienen seis, siete y ocho unidades de D-glucosa, respectivamente. La estructura de estos interesantes receptores moleculares se asemeja a un cono anular truncado, con una cavidad central hidrofóbica, y tienen una talla apropiada para incluir una amplia variedad de compuestos hidrofóbicos (**Figura II.1**).



Figura II.1. Estructura de la β -ciclodextrina.

Las ciclodextrinas(CD) pueden ser químicamente modificadas para generar una variedad de derivados, incluyendo amino, tioles, aldehídos.(16)

A continuación se expondrán algunos ejemplos de conjugados tripsina-ciclodextrinas reportados en estudios previos:



CDNH₂, R = H

CDEN, R = -(CH₂)₂NH₂

CDPN, R = -(CH₂)₃NH₂

CDBN, R = -(CH₂)₄NH₂

Figura II.2. Aminoderivados de la β -ciclodextrina monosustituida en posición C-6.

Se ha propuesto el uso de algunos amino derivados de β -CD, denominados 6-mono-amino- deoxi- β -ciclodextrina (CDNH₂), 6- mono-etilendiamino-6 deoxi- β -ciclodextrina (CDEN), 6-mono-propilendiamino-6-deoxi- β -ciclodextrina (CDPN) y 6-mono-butilendiamino-6-deoxi- β -ciclodextrina(CDBN) como agentes modificantes para enzimas. Estos derivados se representan en la **Figura II.2.**

Las propiedades de estabilidad catalítica y térmica de la tripsina fueron mejoradas después de la unión de los residuos de ciclodextrinas, y este efecto fue marcadamente más notable para los derivados de CDs de número par de átomos de carbono y mientras más largos sean los brazos espaciadores. Debido a lo anteriormente explicado fue para el conjugado tripsina-CDBN (**Figura II.6**) que los parámetros cinéticos, la actividad estereolítica y la proteolítica manifestaron su más significativo cambio con respecto a la contraparte no modificada. El fenómeno mencionado ocurre ya que, según reveló el análisis estructural de la enzima, la modificación del residuo de Asp 153 está localizada muy cerca del sitio activo. Por lo que la localización de una molécula de CD cerca de los residuos catalíticos de la tripsina incrementa la afinidad de la enzima modificada por el sustrato, siempre y cuando su brazo espaciador tenga números pares de átomos de carbono.

La termoestabilización de la enzima también fue incrementada después de la modificación y los conjugados preparados fueron además más estables después de la incubación térmica en el rango de temperatura de 45°C hasta 60°C.

Los resultados del comportamiento de la autólisis de estos complejos ciclodextrina-tripsina indican que la unión covalente de los oligosacáridos previene la degradación autolítica en la tripsina modificada. Aquí también influye la estructura del brazo espaciador de estos agentes modificadores de la enzima, de manera tal que, mientras más largo sea el brazo espaciador más resistente es el complejo a la degradación autolítica. Sin embargo, la resistencia a la autólisis fue más marcada en el caso del conjugado CDPN-tripsina probablemente asociado a la baja actividad enzimática de este conjugado en comparación con los otros aductos preparados de tripsina. (16)

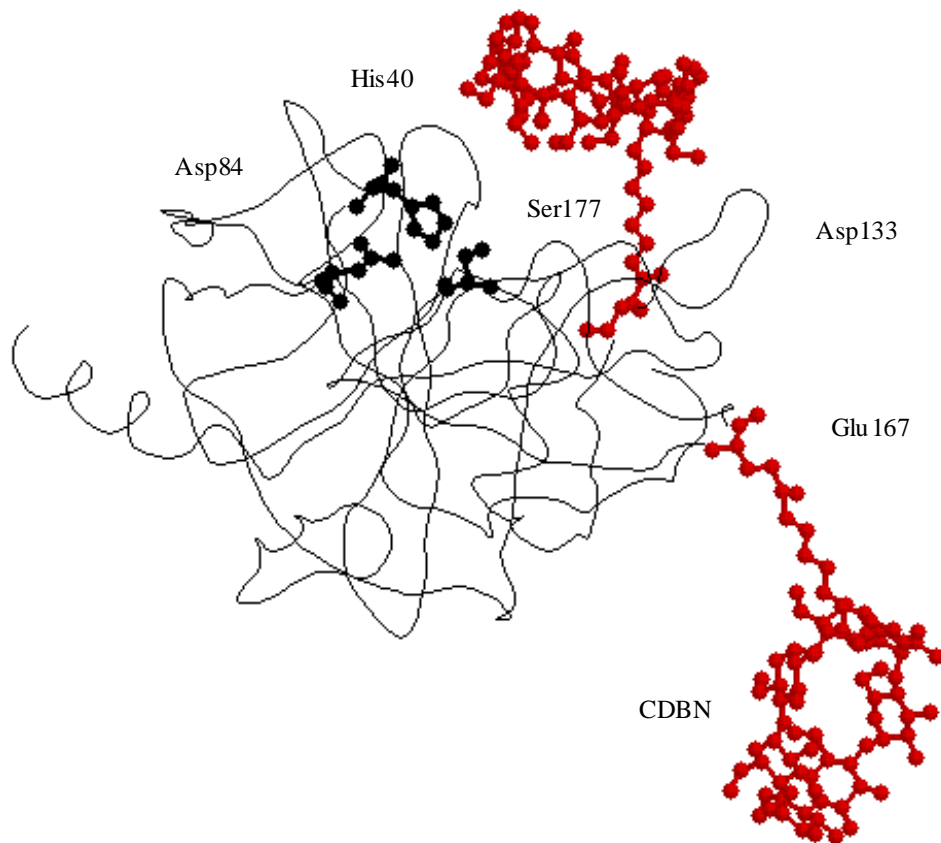


Figura II.3. Estructura de la tripsina modificada con derivados de CDBN.

Fernández y col. (16,17) reportaron también la modificación de la tripsina pancreática bovina con 6-amino-6-deoxi derivados de α -, β -, y γ -ciclodextrinas, usando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC) como agente acoplante. Para estos conjugados la actividad estereolítica y la afinidad, de la tripsina por su sustrato, fue incrementada después de la unión con el polímero. La termoestabilidad varió desde 14°C hasta 17.2°C, y fueron más estables durante la incubación térmica y más resistentes a la degradación autolítica. Similar mejoramiento de las propiedades cinéticas y de estabilidad fue obtenido para la tripsina modificada con esos derivados, pero utilizando la enzima transglutaminasa como catalizador. (19,20)

Otros conjugados tripsina- ciclodextrina reportados son:

- Tripsina con el polímero de β -ciclodextrina-carboximetilcelulosa.(21)
- Tripsina con β -ciclodextrina monoaldehído. (18)

II.2 Ejemplos de la variación de las propiedades catalíticas y de estabilidad de conjugados de tripsina

En la **Tabla II.2.1** podemos observar las propiedades catalíticas del conjugado CMPCD-tripsina. La neoglicoenzima preparada retuvo alrededor del 60% de la

actividad proteolítica original. Esta reducción podría ser explicada por una menor accesibilidad del sustrato de alto peso molecular al sitio activo de la tripsina, causada por la unión del polisacárido a la superficie de la enzima. Similar reducción en la actividad hacia sustratos macromoleculares ha sido reportada para las enzimas modificadas con polímeros solubles en agua (22,23,24,25,26,27,28) es interesante señalar los siguientes casos:

- La tripsina modificada con carboximetilcelulosa, donde la actividad proteolítica representó el 42% de la actividad de la enzima nativa. (24)
- La tripsina modificada con β -ciclodextrina-carboximetilcelulosa que retuvo el 95% de la actividad proteolítica inicial. (21)

Por el contrario, para el caso de la tripsina modificada con 6-amino-6-deoxi-derivados de ciclodextrina utilizando transglutaminasa como catalizador (17), la actividad proteolítica es similar a la de su contraparte no modificada, lo que podría estar dado porque la cantidad de azúcares unido a la enzima es menor que para el caso del conjugado CMPCD-tripsina, lo que conlleva a una mayor accesibilidad del sustrato al sitio activo de la enzima y esto provoca finalmente un aumento de la actividad proteolítica del conjugado 6-amino-6-deoxi ciclodextrina-tripsina vía transglutaminasa con respecto al conjugado CMPCD-tripsina.

Tabla II.2.1. Propiedades catalíticas de la tripsina nativa y modificada.

Formas de la enzima	Parámetros	
	Tripsina	Tripsina-CMPCD
Actividad proteolítica (katal kg ⁻¹)	3.0 x 10 ⁻²	1.8 x 10 ⁻²
Actividad estereolítica (U mg ⁻¹)	36.0	27.0
K _M vS BAEE ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	35.5	32.0
k _{cat} vS BAEE (s ⁻¹)	12.3	10.5
k _{cat} /K _M vS BAEE ($\mu\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$)	0.34	0.32

Por otra parte, la capacidad de la β CD para formar, complejos de inclusión con compuestos aromáticos, tales como, el BAEE (K_{stab} : 180 M⁻¹) (17) podría también generar un incremento en la concentración de BAEE en el microambiente de la neoglicoenzima, y entonces reducir el valor de la K_M frente a este sustrato. Un comportamiento similar sobre la afinidad al BAEE fue reportado para la tripsina modificada con derivados de CD monoactivados (17, 19) tal como se reporta en la **Tabla II.2.2.** donde se representa los valores de K_M para conjugados de tripsina con derivados monoamínicos de α , β y γ ciclodextrinas utilizando EDAC como agente acoplante (*), los valores de K_M para conjugados tripsina-6-amino-6-deoxi-ciclodextrina utilizando la enzima transglutaminasa como catalizador (**), y además se reportan estos mismos datos para la tripsina modificada con β -aminociclodextrinas monosustituidas

con diferentes brazos espaciadores (***) (ver **Figura II.5**). Como se puede observar en todos los casos se manifiesta una reducción de los valores de K_M lo que se traduce en un aumento de la afinidad .

Tabla II.2.2. Valores de K_M para diferentes conjugados cicodextrina-tripsina

	K_M (μM)
Tripsina	35.5
Tripsina α CD *	20.0
Tripsina β CD *	23.8
Tripsina γ CD*	24.3
Tripsina α CD **	23.0
Tripsina β CD **	25.7
Tripsina γ CD **	23.3
Tripsina-CDEN ***	24.6
Tripsina-CDBN ***	22.6

Otras propiedades que han mejorado considerablemente en los conjugados con respecto a la enzima nativa han sido el tiempo de vida media. Al igual que otros conjugados polisacárido-enzima (**10,23,18,25,26,27,28,29**) los enlaces covalentes intramoleculares deben ser el principal factor que contribuye a la termoestabilización mostrada por la tripsina glicosidada. También se ha visto estabilización frente a agentes desnaturizantes como el SDS, y frente a la degradación autolítica.

El perfil de estabilidad térmica para la tripsina modificada con CMPCD muestra el efecto de 10 min de incubación en el rango de temperatura desde 30 °C a 70 °C sobre la actividad catalítica de ambas formas de tripsina. La enzima modificada fue significativamente más resistente al tratamiento con calor a temperaturas mayores de 45°C en comparación con la contraparte no modificada. Consecuentemente el valor de T_{50} , definido como la temperatura a la cual el 50% de la actividad inicial es retenida, fue incrementado desde 49 °C hasta 63 °C para el caso de la tripsina después de la glicosidación con el polímero(**27**) En reportes previos, Murphy y Fágáin (**29**) describieron que en la modificación covalente de la tripsina con N-hidroxi-succimida-etil-éster del ácido acético, sólo obtuvieron un incremento de 5°C para la T_{50} . Similar estabilización fue además reportada para la tripsina modificada con carboximetilcelulosa, obteniéndose un incremento de 7°C para la T_{50} bajo similares condiciones experimentales. En comparación con estos resultados el conjugado CMPCD-tripsina es 14°C más estable que la tripsina nativa, similar resultado obtuvieron Fernández y colaboradores (**15**) para los conjugados CDEN y CDBN-tripsina con valores entre 12.5°C y 14.5°C mayores que la T_{50} de la tripsina nativa.

III. INMOVILIZACIÓN DE LA TRIPSINA.

Para aplicaciones técnicas las enzimas son inmovilizadas a una gran variedad de soportes.(31) Se ha reportado la inmovilización de la tripsina directamente sobre lana de poliéster o bien vía PEG- diamina, aldehído-dextrana, amino dextrana y albúmina de suero bovino (BSA) como espaciadores. Se ha establecido que los espaciadores largos son requeridos para una eficiente inmovilización de moléculas bioespecíficas a soportes sólidos. Esto minimiza el impedimento estérico y los efectos del ambiente provocados por las propiedades superficiales de las matrices, donde la superficie hidrofóbica de la lana de poliéster causa inactivación de la enzima inmovilizada. Sin embargo los espaciadores antes mencionados fueron empleados no solo para alcanzar una gran cantidad de enzima enlazada sino también para inmovilizar a la tripsina en su forma activa. Para caracterizar las propiedades de la tripsina enlazada se determinó la estabilidad térmica, la estabilizada frente al pH y el comportamiento en mezclas etanol-agua. Debido a los altos valores de actividad obtenidos con la BSA como espaciador, este sistema fue caracterizado mas detalladamente probando el comportamiento de la actividad después de su uso repetitivo y varias condiciones de almacenamiento donde la tripsina inmovilizada mostró una alta estabilidad térmica y al pH así como que puede ser almacenada por varios meses sin perder su actividad. La ventaja del poliéster en comparación con la poliamida es que proporciona una estructura más rígida., pero la fijación directa de la tripsina a la superficie de la lana sin uso de un espaciador rindió una enzima inmovilizada de baja actividad y la estabilidad térmica es menor. Este efecto puede ser atribuido al contacto directo de la enzima con la superficie menos polar de la lana, luego con todos los espaciadores aplicados, la actividad de la proteína permanece casi constante después de su utilización por una semana e incluso por meses. Como los espaciadores mantienen las moléculas de la enzima alejadas también las protegen de la autólisis, permitiendo mantener su actividad por un tiempo más prolongado. (32)

Clare y colaboradores (33) reportaron la inmovilización por afinidad de la proteína de fusión tripsina-streptavidina, la cual fue expresada en *Escherichia coli*. Una matriz de vidrio, porosa y biotinilada fue preparada y la adsorción selectiva resultó en una purificación en una sola etapa y la inmovilización de tripsina desde el lisado celular crudo. La actividad de la tripsina fue verificada usando un sustrato sintético. Este biorreactor enzimático podría servir como un excelente prototipo para futuros estudios para examinar los efectos de la proteólisis limitada sobre las proteínas de la leche con vista a evaluar sus características funcionales. (33)

Otros soportes que se han usado para la inmovilización de la tripsina son los que tienen como base copolímeros de poli (vinileno carbonato) (PVCA) y α -(2-aminoetilenoamino)- ω -(2-aminoetileno amino)-poli (óxido de etileno). El poli(óxido de etileno) cubierto en su terminal con grupos aminos (aa-PEO) fue disuelto en PVCA y en DMF, la solución fue suspendida en parafina líquida con agitación y consecuentemente las esferas hidrofílicas contienen grupos carbonatos cíclicos reactivos que fueron obtenidos para la posterior inmovilización de la enzima, (aa-PEO) fue usado como agente para el

entrecruzamiento y como modificador hidrofílico para el PVCA. Comparados con otros soportes activados por CNBr, glutaraldehído (GA), etc podría concluirse que la preparación de los soportes reactivos a través del polivinileno carbonato podría ser una forma conveniente debido a que no se necesita su activación. Además la cantidad de enzima inmovilizada depende de factores como el pH del medio porque a valores de pH bajos los grupos aminos de la enzima están protonados en una considerable extensión y como consecuencia no son efectivos como nucleófilos. A altos valores de pH puede ocurrir que el carbonato se transforme en carbamato y decrece por consiguiente la cantidad de grupos reactivos. La temperatura óptima no tuvo cambios con respecto a la nativa pero la K_M fue mayor a consecuencia de la limitación en la difusión del sustrato dentro del soporte. (34)

Para la inmovilización de la tripsina en copolímeros de acrílico fueron evaluados 26 transportadores de tres series de copolímeros de acrílico. Los siguientes monómeros fueron usados para preparar matrices poliméricas etilenglicol dimetacrilato, trimetilolpropano triacrilato, etilacrilato, butil acrilato, hidroxipropil acrilato, acrilonitrilo y divinilbenceno. Los transportadores con trimetilolpropano triacrilato como un agente para el entrecruzamiento fueron seleccionados como las matrices más aprovechables para expresar la actividad enzimática. Considerando la influencia de diluyentes inertes sobre la superestructura del transportador y la inmovilización de la tripsina fue demostrado que el ciclohexanol como codiluyente produce un adecuado microambiente para la actividad de la enzima mientras que el tolueno crea un ambiente inconveniente para la estructura del transportador. El transportador más efectivo fue un copolímero de acrilonitrilo y trimetilolpropano triacrilato sintetizado con la presencia de ciclohexanol y 2 etilhexanol. Una comparación entre las propiedades del complejo enzima-transportador y la tripsina nativa mostraron que la proteína unida incrementó sus propiedades de almacenamiento y la estabilidad al pH y temperatura, esto último puede ser debido probablemente al aumento de la rigidez de la estructura terciaria, en cuanto al pH esto puede deberse al efecto tamponeante de los transportadores de acrílico. (35)

LiNa Geng y col (36) reportaron la inmovilización de la tripsina debido al efecto desnaturalizante del GA sobre la proteína. En el caso de la enzima inmovilizada por acoplamiento a GA como transportador activado, la actividad recuperada fue mejorada en alguna extensión, siendo este un agente bifuncional capaz de reaccionar con los grupos hidroxilos de la superficie del transportador y los grupos aminos de la enzima. El GA podría aliviar eficientemente la fuerte interacción entre la enzima y la matriz, además tiene la habilidad de mantener la enzima inmovilizada más resistente a los cambios de pH y fuerza iónica. Como se había dicho anteriormente la actividad de la tripsina inmovilizada con BSA utilizando GA como agente entrecruzante fue mayor en comparación con la inmovilización con BSA como espaciador y GA como transportador porque siendo las macromoléculas de BSA preancladas al soporte podrían proveer mayor cantidad de sitios activos para reaccionar con el GA. Por otro lado si el BSA es preanclado sobre la matriz que antes fue activada con el GA, la efectividad de la tripsina acoplada al transportador de GA activado podría estar comprometida porque éste podría haber sido consumido en el entrecruzamiento con el BSA. (36) De forma eficiente sobre galerías de fosfato

y zirconium con aminos preintercaladas, se hizo de manera directa por adsorción física, acoplado la enzima al glutaraldehído como un transportador activado, o por entrecruzamiento y también mediante la incorporación de BSA como brazo espaciador durante la inmovilización por acoplamiento covalente al transportador de GA activado o por entrecruzamiento covalente de la enzima con el glutaraldehído. Se reportó que el acoplamiento covalente de la tripsina por entrecruzamiento con el GA usando el BSA fue superior a las otras estrategias de inmovilización investigadas por estos autores. En el primer caso de la enzima inmovilizada por adsorción física la actividad fue más baja de lo esperado eso podría deberse a que el centro activo fue deformado por interacciones electrostáticas.

En un estudio propuesto por Yamada y colaboradores (37) se unió por inmovilización covalente la tripsina a un ácido acrílico (AA) y al ácido metacrílico (MAA) unidos a platos de polietileno (PAA y PMAA respectivamente) usando una carbodiimida soluble en agua como agente acoplante, a través de la unión de los grupos aminos de la enzima con los carboxilos del PAA o el PMAA. La actividad de la tripsina inmovilizada a pH=6.0 decreció en correspondencia con el incremento en la cantidad de proteína inmovilizada porque aumentó el número de moléculas de tripsina en la vecindad lo que resulta en una restricción espacial, que puede provocar un bloqueo en el sitio activo y/o una desnaturalización de la enzima, otra explicación podría estar dada en que la unión multipuntual de las moléculas de tripsina mediante los enlaces peptídicos puede provocar una disminución de la flexibilidad conformacional en la vecindad de los sitios activos. Entre las propiedades de la tripsina inmovilizada que fueron mejoradas con respecto a la nativa se encuentran la estabilidad a pH alcalino la estabilidad térmica, la reusabilidad y la estabilidad durante el almacenamiento. En cuanto al incremento de la actividad a pH mayor que seis podría deberse a que las cadenas de PAA y PMAA pudieron haberse expandirse más cuando el pH aumenta como resultado de la repulsión entre grupos carboxilos negativamente cargados, la difusión de las moléculas de BANA (*N*-benzoyldl-arginine-nitroanilide hydrochloride) se incrementa porque la aglomeración de las moléculas de tripsina se ve reducida en este rango de pH. En el caso del mejoramiento de la termoestabilidad podría estar causado por el enlazamiento multipuntual entre la molécula de tripsina y las cadenas de PAA y PMAA. (37)

IV.Mutagénesis sitio dirigida.

La tripsina y la quimotripsina tienen bolsillos de especificidad con esencialmente la misma geometría, mientras la tripsina es específica para residuos básicos la quimotripsina es específica para residuos voluminosos e hidrofóbicos en el sitio P1 del sustrato; un modelo sugerido por Steitz, Henderson y Blow sugirió la presencia de una carga negativa en el sitio 189 como el mejor determinante de especificidad, luego el Asp189 resulta tróptico y su carencia le confiere a la molécula especificidad quimotriptica. Sin embargo recientes estudios de mutagénesis sitio dirigida han demostrado que una exitosa conversión de la especificidad de tripsina a quimotripsina requiere la sustitución de aminoácidos en los sitios 138, 172 y en otras 13 posiciones en dos lazos superficiales que no entran directamente en contacto con el sustrato En un intento por convertir quimotripsina a tripsina se comprobó que los datos

cinéticos de los mutantes de quimotripsina de las conversiones de especificidad de tripsina a quimotripsina y de la quimotripsina a tripsina no son casos simétricos a pesar de la casi idéntica arquitectura de las dos proteínas: sustituciones reversas en la quimotripsina que fueron suficientes al ser mutados para cambiar la especificidad a tripsina rindieron solamente una enzima no específica de muy baja actividad. Esta falla en la conversión de la especificidad no se esperaba e indicó que los sitios influyentes en la especificidad deben ser al menos parcialmente diferentes en ambas: la mutación Ser189Asp reduce la actividad trípica pero la especificidad de la quimotripsina se mantiene, posteriores sustituciones redujeron ambas actividades y la especificidad se perdió o fue ligeramente parecida a la de la tripsina. Este resultado indica que la tripsina y quimotripsina toman parte, por los átomos de la cadena principal, en la interacción con el residuo de sustrato P1, sin embargo a través de las interacciones de la cadena lateral numerosos aminoácidos pueden indirectamente influenciar el enlazamiento del sustrato por cooperatividad determinando la posición de los átomos que interactúan con el sustrato. Todas estas interacciones son parte de una red de enlaces de hidrógeno. Estas enzimas contienen diferentes números de enlaces y tienen un arreglo diferente en los sitios donde los lazos son divergentes. Los tipos de estabilización de esta red de enlaces de hidrógeno definen la estructura de los sitios determinantes de la especificidad por ejemplo el 189 y el 216 en la tripsina proporciona una estructura distinta en las moléculas de agua localizadas en los bolsillos de especificidad y probablemente provoca en los sitios de unión al sustrato una deformidad diferente. Ha sido propuesto que diferentes flexibilidades conformacionales en lugar de evidentes cambios en la estructura terciaria de los sitios de especificidad de la tripsina podrían representar la verdadera base estructural de la discriminación del sustrato. Por lo tanto la baja actividad y el carácter no específico de la quimotripsina mutada por Istvan y colaboradores podría ser consecuencia de la pérdida de la red de estabilización. **(38)**

Para mejorar la estabilidad de la tripsina mediante el empleo de mutagénesis sitio dirigida se seleccionaron mutantes donde se le eliminó la Arg177 y otros donde esta se reemplazó por otros residuos aminoacídicos con vista a destruir el sitio de autólisis. Después de la expresión y la purificación fueron estudiadas las propiedades cinéticas y antiautolíticas en el caso de las propiedades cinéticas variaron de uno a otro mutante por ejemplo R117L tuvo 32 veces más actividad que la proteína salvaje mientras que R117C no tuvo actividad detectable. Entre los 8 mutantes seleccionados con propiedades características 7 de ellos tuvieron tiempo de vida medio prolongado durante el ensayo antiautolítico con la excepción de R117M el cual es más sensible a la autólisis. **(39)**

Las enzimas de la familia de las serino proteasas, contienen tres enlaces disulfuro conservados: C42-C58, C168-C182, y C191-C220. C191-C220 conecta los lazos alrededor del bolsillo de enlazamiento del sustrato Varallyay y colaboradores reportaron el reemplazo de estas cisteínas por mutagénesis sitio dirigida por alanina en el caso de la tripsina. Al romperse los puentes disulfuros decrece k_{cat}/K_M en dos o tres órdenes de magnitud a consecuencia de un incremento en la K_M . **(40)**

El residuo del aspártico189 de la tripsina es conocido como esencial para el corte específico de los enlaces Arg-X y Lys-X. Para modular las propiedades catalíticas de esta proteasa, el residuo altamente conservado K188 fue reemplazado con residuos de aminoácidos aromáticos, con el fin de perturbar las interacciones electrostáticas y de amplificar las hidrofóbicas del sitio de enlazamiento del sustrato. Los análisis cinéticos de todos los mutantes conservan la capacidad de la tripsina para romper los enlaces Arg-X y Lys-X. Sorprendentemente, en dependencia de la mutación se produjeron cambios en la actividad a pH óptimo. Como se ha demostrado solamente por proteólisis de un sustrato natural todos los mutantes cortan en el enlace involucrado entre asparagina y glutamina. (41)

V.CONCLUSIONES.

La enzima tripsina, una serino proteasa, ha sido modificada químicamente con vista a mejorar sus propiedades de estabilidad térmica, estabilidad al pH, la resistencia a solventes orgánicos, a agentes desnaturizantes como el SDS y a la degradación autolítica. La enzima ha sido unida covalentemente tanto a polímeros solubles como insolubles.

Es interesante señalar los casos donde la tripsina se ha modificado químicamente con derivados de ciclodextrina donde se han mejorado considerablemente sus propiedades de estabilidad en comparación con la proteína nativa y otros conjugados reportados anteriormente por la literatura.

Alternativamente para mejorar las propiedades de estabilidad de la tripsina así como su reutilización y el tiempo de almacenamiento es posible el empleo de la inmovilización, que no es más que la retención de las moléculas de proteínas en una fase (microfase o fase proteica) la cual mantiene un constante intercambio con el resto del sistema o macrofase donde están inmersos los efectores. Se ha reportado la inmovilización de la tripsina, directamente ó mediante el uso de brazos espaciadores, por unión covalente a soportes; por entrecruzamiento y por afinidad usando la proteína de fusión tripsina-estreptavidina.

Otro procedimiento es el de mutagénesis dirigida, muy popular en nuestros días, donde se sustituyen los aminoácidos naturalmente presentes por otros utilizando técnicas de biología molecular. En el caso de la tripsina se han sustituido aminoácidos del sitio activo, de los enlaces disulfuro conservados, así como en el sitio de autólisis con vistas a comprobar y estudiar como los cambios estructurales pueden modificar la actividad, la especificidad y la estabilidad en las proteínas mutadas.

VI.REFERENCIAS

1. Kühne, W. F. (1876). Über die Verdavung der Eiweisstoffe durch den Pankreassa ft. **Virchows Arch.** **39**, 130 (reproduced by Gutfreund, H. (1976). **FEBS Lett.** **62** (suppl.), E-1-E-12).
2. Northrop, J.H y Kunitz, M. (1931). Isolation of protein crystals possessing tryptic activity. **Science** 73: 262- 263.

3. Bode, W, Walter, J.; Wenzel, H.R.; Tsechesche, H. (1984). The refined 2.2Å X-ray crystal structure of the ternary complex formed by bovine trypsinogen, valine-valine and Arg 15 analogue of bovine pancreatic trypsin inhibitor. **Eur. J. Biochem.** 144: 185- 190.
4. Perona, J.J.; Craick, C. S. (1995) . Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Sci.** 4:337-360.
5. Corey, D. R.; McGrath, M. E.,; Vásquez, J. R.; Fletterick, R. J.; Craik, C. S. (1992). An alternate geometry for the catalytic triad of serine proteases. **J. Am. Chem. Soc.** 114: 4905-4907.
6. Schechter, I.; Berger, A. (1968). On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 27: 157- 162.
7. Gráf, L.; Jackson, A.; Szilágyi, L.; Hegyi, G.; Pinter, K.; Naray- Szábo, G.; Hepp, J.; Medzihradzky, K.; Rutter, W. J. (1998). Electrstatic complementary within the substrate- binding pocket of trypsin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 85: 4961- 4965.
8. Perona, J. J.; Tsu, C. A.; Mc Grath , M. E .; Craick, C. S.; Fletterick, R. J. (1993). Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin . **J. Mol. Biol.** 230: 934- 949.
9. Stroud, R. M. (1974). A family of protein-cutting. **Scientific American** 23: 74-88.
10. Venkatesh, R.; Sundaram, P.V. (1998). Modulation of stability properties of bovine trypsin after in vitro structural changes with a variety of chemical modifiers. **Protein Engng.** 11:691-698.
11. Marshall, J. J.; Rabinowitz, M. L. (1976). Enzyme stabilization by covalent attachment of carbohydrate. **Arch. Biochem. Biophys** 167: 777-779.
12. Marshall, J.J. (1978). Manipulation of the properties of enzymes by covalent attachment of carbohydrate. **Trends Biochem. Sci.** 3: 79-81.
13. Abuchowski, A.; Davis, F. F. (1979). Preparation and properties of polyethylene glycol-trypsin adducts. **Biochim. Biophys. Acta** 578: 41-46.
14. Gaertner, H. F.; Puigserver, A. J. (1992) Increased activity and stability of poly(ethylene glycol)-modified trypsin. **Enzyme Microb. Technol.** 14: 150-155.
15. Villalonga, M. L., Reyes, G , Villalonga, R. (2004). Metal-induced stabilization of trypsin modified with α -oxoglutaric acid. **Biotechnology Letters** 26: 209–212, 2004.
16. Fernández, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. (2003). Improved functional properties of trypsin modified by monosubstituted amino- β -cyclodextrins. **J. Mol. Catalysis B. Enzymatic** 21: 133-141.
17. Fernández, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Baños, M.; Villalonga, R. (2002a). Chemical conjugation of trypsin with monoamine derivatives of cyclodextrins. Catalytic and stability properties. **Enzyme Microb. Technol.** 31: 543-548.
18. Fernández, M.; Villalonga, M. L.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. (2002b). Stabilization of α -chymotrypsin by modification with β -cyclodextrin derivatives. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 36: 235-239.
19. Villalonga, R.; Fernández, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Di Pierro, P.; Mariniello, L.; Porta, R. (2003a). Transglutaminase-catalyzed synthesis

- of trypsin-cyclodextrin conjugates. Kinetics and stability properties. **Biotechnol. Bioeng.** 81: 732-737.
20. Villalonga, R.; Fernández, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Mariniello, L.; Porta, R. (2003b). Thermal stabilization of trypsin by enzymatic modification with β -cyclodextrin derivatives. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 38: 53-59.
 21. Villalonga, M. L.; Fernández, M.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. (2003c). Functional stabilization of trypsin by conjugation with β -cyclodextrin- modified with carboxymethylcellulose. **Prep. Biochem. Biotechnol.** 33:53-66.
 22. Darias, R.; Herrera, I.; Fragoso, A.; Cao, R.; Villalonga, R. (2002). Supramolecular interactions mediated thermal stabilization for α -amylase modified with a β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose polymer. **Biotechnol. Lett.** 24:1665-1668.
 23. Darias, R.; Villalonga, R. (2001). Functional stabilization of cellulase by covalent modification with chitosan. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 76: 489-493.
 24. Villalonga, R.; Villalonga, M.L.; Gómez, L. (2000). Preparation and functional properties of trypsin modified by carboxymethylcellulose. **J. Mol. Catal. B Enzymatic** 10: 483-490.
 25. Gómez, L.; Ramírez, H.L.; Villalonga, R. (2000a). Stabilization of invertase by modification of sugar chains with chitosan. **Biotechnol. Lett.** 22: 347-350.
 26. Gómez, L.; Villalonga, R. (2000b). Functional stabilization of invertase by covalent modification with pectin. **Biotechnol. Lett.** 22: 1191-1195.
 27. Sundaram, P.V.; Venkatesh, R. (1998) Retardation of thermal and urea induced inactivation of α -chymotrypsin by modification with carbohydrate polymers. **Protein Engng.** 11: 691-698.
 28. Villalonga, M.L; Reyes, G ;Fragoso, A; Cao, R; Fernández, L; Villalonga, R . (2005) Chemical glycosidation of trypsin with O-carboxymethyl-poly-b-cyclodextrin: catalytic and stability properties. **Biotechnol. Appl. Biochem.** (2005) 41, (217–223)
 29. Srivastava, R. (1991). Studies on stabilization of amylase by covalent coupling to soluble polysaccharides. **Enzyme Microb. Technol.** 13:164-170.
 30. Murphy, A.O.; Fágáin, C. (1996). Stability characteristics of chemically-modified trypsin. **J. Biotechnol.** 49:163-171.
 31. White, C.A.; Kenedy, J.F. (1980). Popular matrices for enzyme and other immobilizations. **Enzyme Microb. Technol.** 2:82-90.
 32. Nouaimi, M; Moschel, K; Bisswanger, H. (2001). Immobilization of trypsin on polyester fleece via different spacers. **Enzyme and Microb. Technol.** 29: 567–574.
 33. Clarea, D.A; Valentine, V.W; Catignania, H.E. (2001). Molecular design expression and affinity immobilization of a trypsin-streptavidin fusion protein **Enzyme and Microb. Technol.** 28: 483–491.
 34. Ding, L and Qu, B. (2001) New supports for enzyme immobilization based on the copolymers of poly(vinylene carbonate) and α -(2-aminoethylene amino)- ν -(2-aminoethylene amino)-poly(ethylene oxide). **Reactive & Functional Polymers.** 49 : 67–76.
 35. Bryjak, J and Kolarz, B.N.(1998) Immobilisation of trypsin on acrylic copolymers. **Process Biochemistry.** 4:409-417.

36. Geng, L.; Li, N.; Xiang, M.; Wen, X.; Xu, D.; Zhao, F.; Li, K. (2003) The covalent immobilization of trypsin at the galleries of layered g-zirconium phosphate. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**.3099-109.
37. Yamada, K.; Nakasone, T.; Nagano, R.; Hirata, M. (2003). Retention and Reusability of Trypsin Activity by Covalent Immobilization onto Grafted Polyethylene Plates. **Journal of Applied Polymer Science**. 89: 3574–3581.
38. Venkei, I.; Szilágyi, L.; Gráf, L.; Rutter, J.W.(1996). Attempts to convert chymotrypsin to trypsin. **FEBS Letters**.379: 143-147.
39. Fang, X.; Xin, N.; Tangi, J.G. Anti-autolysis of Trypsin by Modification of Autolytic Site Arg117.(1998). **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 250:235-239.
40. Varallray, E.; Lengyel, Z.; Gráf, L.; Szilágyi, L. (1997) The Role of Disulfide Bond C191-C220 in Trypsin and Chymotrypsin. **Biochem. Biophys. Res. Commun**.230:592-596.
41. Chobert, J.C.; Briand, L.; Tran, V.; Haertle, T. (1998). How the Substitution of K188 of Trypsin Binding Site by Aromatic Amino Acids can Influence the Processing of b-Casein. **Biochem. Biophys. Res. Commun**.246:847-858.