

03072⁸
2ij



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
(UACPyP del CCH).

INTERACCIONES MOLECULARES ENTRE POLINUCLEOTIDOS Y LA ELASTASA PANCREÁTICA DE CERDO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA
P R E S E N T A
ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA

DIRIGIDA POR: DR. MANUEL SORIANO GARCIA.

0270993



MEXICO, D. F.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PMDCBQ/186/98

Q. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA
Alumno de la Maestría en Biotecnología,
Facultad de Química
P r e s e n t e

Los miembros del Subcomité Académico del Programa Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, en sesión ordinaria del 6 de mayo de 1998, conocieron de su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA, con la réplica de la tesis "Interacciones moleculares entre polinucleótidos y elastasa pancreática de puerco", dirigida por el Dr. Manuel Soriano García.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Dr. Eduardo Bárzana García
VOCAL	Dra. Adela Rodríguez Romero
SECRETARIO	Dr. Jaime Mas Oliva
SUPLENTE	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
SUPLENTE	Dr. Víctor Bolaños García

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 6 de mayo de 1998.
LA COORDINADORA DEL PROGRAMA

Amelia Farrés Saravia
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA

C.c.p. Archivo

AFGS*lgg.



A mi esposa, por ser la compañera ideal.

A mi hijo, por darnos la posibilidad de ser padres.

A mis padres y mi hermana, por ser la mejor familia.

A Dios, por permitirnos ser y estar.

Al Instituto de Química (UNAM), Instituto de Fisiología Celular (UNAM), Facultad de Química (UNAM), Departamento de Química (Biofísicoquímica) (UAM – Iztapalapa), Instituto de Biotecnología (UNAM), Sociedad Mexicana de Fibrosis Quística e Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar experimento en sus instalaciones, o proveerme del material para la realización de esta tesis.

A los Doctores Manuel Soriano García, Víctor Bolaños García, Eduardo Bárzana García, Adela Rodríguez Romero, Amelia Farres González-Saravia, Abel Moreno Cárcamo y Jaime Más Oliva por las fructíferas discusiones sobre el tema de esta tesis, y por la revisión del manuscrito.

Al CONACyT por la beca – crédito que me otorgaron para realizar los estudios de maestría.

A todos mis compañeros del Departamento de Bioestructura (Bioquímica) del Instituto de Química (UNAM) por compartir los problemas cotidianos de la investigación en México ... y salir adelante.

A la M. en C. María de Carmen Santillan Valverde, por su apoyo (moral, académico y económico), comentarios e ideas para realizar esta tesis.

INDICE

	Página
1.0 RESUMEN	1
2.0 ANTECEDENTES	3
2.1. Desarrollo de conocimientos científicos sobre fibrosis quística.	3
2.2. Relación entre infecciones pulmonares oportunistas y fibrosis quística.	6
2.3. Características y composición de las secreciones mucosas.	7
2.4. Uso de ADNasas (Pulmozime) para modificar las características físicas del moco pulmonar en fibrosis quística.	8
2.5. Células de defensa y su acción en procesos infecciosos.	9
2.6. Proteasas que forman parte del neutrófilo.	10
2.7. Hipótesis.	10
3.0 PARTE EXPERIMENTAL	12
3.1. OBJETIVOS	12
3.2. MÉTODOS	13
3.2.1. Obtención de elastasa de polimorfonucleares humana y elastasa pancreática de cerdo.	13
3.2.1.1. Purificación de la elastasa de polimorfonucleares.	13
3.2.1.2. Selección de una proteína modelo alterna a la elastasa de polimorfonucleares.	14
3.2.1.3. Purificación de elastasa pancreática de cerdo.	16
3.2.1.3.1. Purificación de proteínas.	16
3.2.1.3.1.1. Exclusión Molecular.	17
3.2.1.4. Obtención de oligonucleótidos.	18
3.2.1.4.1. Transformación.	18
3.2.1.4.2. Multiplicación de células transformadas.	18
3.2.1.4.3. Extracción de pBR322.	18
3.2.1.4.4. Electroforesis en geles de agarosa.	19
3.2.1.4.5. Limpieza del ADN.	19
3.2.1.4.6. Linearización del plásmido y número de cortes.	20

3.2.1.4.7. Ciclos de crecimiento en bacterias.	20
3.2.1.4.7.1. Ciclos de crecimiento de poblaciones Bacterianas.	21
3.2.1.4.8. Transformación genética.	21
3.2.1.4.8.1. Competencia.	21
3.2.1.4.8.2. Plásmidos.	21
3.2.1.5. Métodos para medir actividad enzimática de la elastasa.	22
3.2.1.5.1. Método de rojo congo - elastina.	22
3.2.1.5.2. Definición de unidad y actividad específica.	23
3.2.1.6. Métodos para medir concentración de proteínas.	23
3.2.1.7. Análisis de pureza de muestras (electroforesis).	24
3.2.2. Efecto de la adición de pBR322 <i>linearizado</i> sobre la actividad elastolítica de elastasa pancreática de cerdo.	25
3.2.3. Efecto de la adición de polinucleótidos de tamaño variable sobre la actividad elastolítica de elastasa pancreática de cerdo.	25
3.2.4. Medición de modificaciones en la estructura secundaria de la elastasa pancreática de cerdo en contacto con oligonucleótidos.	26
3.2.4.1. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por espectrofotometría de fluorescencia.	26
3.2.4.1.1. Espectroscopía de fluorescencia (EP).	26
3.2.4.2. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por dicroísmo circular.	28
3.2.4.2.1. Dicroísmo circular (DC).	29
3.2.4.3. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por infrarrojo con transformada de fourier.	30
3.2.4.3.1. Infrarrojo con transformada de fourier (IRTF).	31
3.2.5. Valoración sobre la existencia de agregados en solución.	33
3.2.5.1. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por el método de dispersión dinámica de la luz (DDL).	33
3.2.5.1.1. Dispersión dinámica de la luz (DDL).	33
3.2.6. Reconstrucción cristalográfica del complejo elastasa pancreática de cerdo y oligonucleótidos.	35
3.2.6.1. Cristalización del complejo elastasa - pBR322.	35

3.2.6.1.1. Cristalografía de macromoléculas.	36
3.2.7. Efecto del tiempo en la formación del complejo-elastasa - pBR322.	38
3.2.8. Modelo del acoplamiento ADN - elastasa.	39
3.3. RESULTADOS.	40
3.3.1. Obtención de elastasa de polimorfonucleares humana y elastasa pancreática de cerdo.	40
3.3.1.1. Purificación de la elastasa de polimorfonucleares.	40
3.3.1.2. Selección de una proteína modelo alterna a la elastasa de polimorfonucleares.	40
3.3.1.3. Purificación de elastasa pancreática de cerdo.	41
3.3.1.4. Obtención de Oligonucleótidos.	41
3.3.1.5. Efecto de la adición de pBR322 linearizado sobre la actividad elastolítica de elastasa pancreática de cerdo.	43
3.3.2. Medición de modificaciones en la estructura secundaria de la elastasa pancreática de cerdo en contacto con polinucleótidos.	43
3.3.2.1. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por espectrofotometría de fluorescencia.	43
3.3.2.2. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por dicroísmo circular.	44
3.3.2.3. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por infrarrojo con transformada de fourier.	45
3.3.3. Valoración sobre la existencia de agregados en solución.	45
3.3.3.1. Efecto de la adición de pBR322 a elastasa pancreática de cerdo por el método de dispersión dinámica de la luz (DDL).	45
3.3.4. Reconstrucción cristalográfica del complejo elastasa pancreática de cerdo y oligonucleótidos.	46
3.3.4.1. Cristalización del complejo elastasa - pBR322.	46
3.3.5. Efecto del tiempo en la formación del complejo elastasa - pBR322.	46
3.3.6. Modelo del acoplamiento ADN - elastasa.	46
3.3.7. Efecto de la adición de elastasa a un gel de agarosa.	46
3.4. DISCUSION.	60
3.5. CONCLUSIONES.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1-A Perfil cromatográfico de tamiz molecular de EPMNH	48
1-B Perfil cromatográfico de intercambio aniónico de EPMNH	48
1-C Gel de enfoque isoelectrico de EPMNH	48
2-A Superposición de EPMNH y EPP.	49
2-B Superposición de EPMNH y EPP (acercamiento al sitio activo)	49
3-A Potenciales electrostáticos de EPP.	50
3-B Potenciales electrostáticos de EPP (rotación de 180°)	50
4-A Perfil cromatográfico de permeación en gel 1 de EPP.	51
4-B Perfil cromatográfico de permeación en gel 2 de EPP.	51
4-C Perfil cromatográfico de permeación en gel 3 de EPP	51
5-A Efecto sobre la actividad de Elastasa y Quimotripsina de polinucleótidos.	52
5-B Emisión comparada de elastasa, polinucleótidos y regulador.	52
6-A Efecto en la emisión de elastasa con la adición de polinucleótidos 1.	53
6-B Efecto en la emisión de elastasa con la adición de polinucleótidos 2.	53
7-A Gel de retardamiento.	54
7-B Efecto sobre la elipticidad media molar de elastasa con polinucleótidos 2.	54
8-A Efecto sobre la elipticidad media molar de quimotripsina con polinucleótidos y fosfatos.	55
8-B Efecto sobre la elipticidad media molar de taumatina con polinucleótidos y fosfatos.	55
9-A Efecto sobre el espectro de emisión infrarrojo de elastasa con polinucleótidos.	56
9-B Efecto sobre el peso molecular y polidispersidad de elastasa con polinucleótidos con dispersión dinámica de la luz.	56
10-A Espectro UV con variación del tiempo elastasa-polinucleótidos 1.	57
10-B Espectro UV con variación del tiempo elastasa-polinucleótidos 2.	57
11-A Modelo tridimensional del probable acoplamiento elastasa-polinucleótido.	58
11-B Estructuras tridimensionales de EPP, Quimiotripsina y Taumatina.	58
12-A Estructuras tridimensional de EPP mostrando Trp y Tyr (Fluoróforos).	59
Tabla 1 Superposición de secuencias de EPP y EPMNH.	59

1.0 RESUMEN:

La fibrosis quística es actualmente la enfermedad autosómica y recesiva más común en poblaciones caucásicas, aunque existen reportes que demuestran su presencia en otras poblaciones como son la latinoamericana, según estudios realizados en Argentina y México (Orozco, L. *et al*, 1993). La fibrosis quística es causada por alguna de las 350 distintas mutaciones que ocurren en el brazo largo del cromosoma humano número 7, el cual codifica para una proteína transportadora de membrana, la CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Las modificaciones al gene (mutaciones puntuales o deleciones), repercuten en la eficiencia del transporte de iones cloruro a través de las membranas celulares, produciendo un aumento en la concentración de iones en los fluidos corporales, y por lo tanto la disminución de agua libre y el aumento de la viscosidad de dichos fluidos. Esto da por resultado manifestaciones clínicas como la esterilidad masculina, el aumento de viscosidad en las secreciones pancreáticas, el aumento de viscosidad del esputo pulmonar, aumento en la pérdida de iones en el sudor, etc. Desde el punto de vista clínico, las manifestaciones más destructivas de la enfermedad se centran en las áreas pancreática y pulmonar. En el caso de la enfermedad pancreática, el desequilibrio bioquímico causado por el deficiente transporte iónico da por resultado que las enzimas digestivas sean atrapadas en el fluido pancreático y no se mezclen con el bolo alimenticio que viene del estómago, por lo que la digestión de grasas no se realiza, y la de carbohidratos y proteínas, sólo ocurre parcialmente. Por fortuna la modificación del tipo de dieta, la ingesta de ácidos grasos de cadena corta fácilmente solubles y absorbibles, y la ingesta previa a la comida de complementos enzimáticos pancreáticos, han permitido a los pacientes aumentar su calidad y esperanza de vida. Sin embargo, debido a las distintas mutaciones o deleciones que dan lugar a la enfermedad, no siempre la manifestación pancreática es la más fuerte. De hecho la mayoría de los pacientes con fibrosis quística presentan la manifestación pulmonar, la cual los conduce en un 90% de los casos a la muerte. La serie de eventos bioquímicos que ocurren en la manifestación pulmonar de la enfermedad han sido dilucidados en parte con estudios realizados desde los años 50, e inician en un aumento de la cantidad de iones sodio y cloruro en el esputo pulmonar, lo que conduce a un aumento de la viscosidad. Mas aún, en conjunto con modificaciones en la cantidad de inmunoglobulinas se facilita la colonización por parte de microorganismos como *Staphylococcus aureus* y muy particularmente *Pseudomona aeruginosa*. Una vez alertado el sistema de defensa se desencadena una respuesta inflamatoria, en la que los leucocitos de polimorfonuclear se lisan liberando su contenido enzimático, entre las enzimas liberadas se encuentra la elastasa humana de polimorfonuclear. Al mismo tiempo se libera la Alpha-1-tripsinógeno, que actúa como inhibidor natural de la anterior. Además, entre la cascada de reacciones que se inician, una proteasa de *P. aeruginosa* llamada también elastasa (metaloproteinasa) destruye al inhibidor natural de la elastasa de polimorfonuclear, por lo que está lisa inespecíficamente a cualquier tejido con elastina, tanto humano como bacteriano. La inespecificidad de las elastasas de polimorfonuclear aumentan la concentración en el ahora esputo purulento de contenidos celulares, pero sobre todo de ácidos nucleicos, los cuales al hidratarse aumenta aún más la viscosidad del sistema. De manera interesante al mismo tiempo se reduce la actividad enzimática de la elastasa de polimorfonuclear. Este proceso da por resultado la generación

de verdaderas costras mucosas que reducen la luz broncoalveolar y conducen lentamente a la asfixia del paciente. En este contexto, compañías biotecnológicas como Genetech, Inc. (San Francisco, USA) introdujeron al mercado ADNasas modificadas genéticamente para reducir la respuesta inmune, las cuales se aplican a los espacios aéreos de los enfermos con fibrosis quística vía aerosoles. Como la aplicación de ADNasas resulta en un aumento de la actividad de elastasa de polimorfonuclear, el tratamiento obliga a la inmediata extracción del esputo. Debido a la importancia de saber que tipo de interacción existe entre la elastasa de polimorfonuclear y fragmentos de ADN en el presente trabajo, se estudió el problema en un modelo consistente en la elastasa pancreática de cerdo y plásmidos replicativos de *E. coli in vitro* , como una primera aproximación al sistema humano.

Los resultados del presente trabajo nos permiten aclarar que existen interacciones intermoleculares inespecíficas entre oligonucleótidos y la elastasa pancreática de cerdo, lo que fortalece la idea original de la existencia de interacciones intermoleculares (oligonucleótidos - elastasa) en el sistema humano. Las interacciones demostradas en este trabajo muestran que la interacción produce modificaciones en la estructura secundaria tanto de la proteína como de los oligonucleótidos empleados, así como el enmascaramiento de grupos fluoróforos superficiales de la proteína en contacto con oligonucleótidos. Por lo que de manera preliminar se apoya la utilización en el tratamiento a pacientes humanos de ADNasas (Pulmozime), pero con la adición de inhibidores de elastasa para evitar efectos degradativos secundarios en el ámbito de tejidos ricos en elastina.

2.0 ANTECEDENTES:

“Infortunado aquel niño que al besarlo tenga sabor salado. Él está embrujado y pronto morirá”. Este adagio del folklore norte-europeo es una antigua referencia de una enfermedad genética común conocida actualmente como fibrosis quística. Este desorden mata rutinariamente seres humanos en la infancia, y es identificado por el exceso de sal en el sudor. Una frente salada es en si una de las manifestaciones más benignas de la enfermedad, si bien, la anomalía hereditaria puede también destruir los pulmones y causar severos daños en el páncreas, intestino delgado e hígado.

Gracias a los continuos avances en la terapia desde las pasadas 3 décadas, se han mejorado notablemente las condiciones de vida de estos niños, permitiendo a más de la mitad de ellos sobrevivir 20 años o más. No obstante, ninguno de los tratamientos aprobados puede aún corregir de raíz la anomalía genética, y ninguno modifica la expectativa de una muerte relativamente temprana.

Investigadores en los principios de los años 80 trataron de identificar el desajuste genético que da lugar a la fibrosis quística. Después de una década de trabajo, se aisló el gene y se encontró la mutación que daba lugar en la mayoría de los casos a la aparición de la enfermedad. Posteriormente se descubrió que la proteína codificada funciona como un canal de iones cloruro en el ámbito de la membrana celular, por lo que la mutación de su gen bloquea el transporte de iones cloruro. Esta modificación en los flujos celulares de iones cloruro es la responsable de las manifestaciones clínicas de la fibrosis quística.

2.1. Desarrollo de los conocimientos científicos sobre fibrosis quística: Una de las primeras contribuciones para comprender la fibrosis quística se realizó en 1938 por Dorothy H. Andersen de la Universidad de Colombia. Después de realizar autopsias en niños y bebés y de revisar sus historias clínicas, Andersen dio la primera descripción comprensible de los síntomas de la fibrosis quística y de los cambios causados en los órganos. Estos cambios incluyen destrucción del páncreas y destrucción e infecciones en los pulmones. Andersen también le dio el nombre a la enfermedad, llamándola “fibrosis quística del páncreas” sobre la base de hechos microscópicos que ella observó en el tejido pancreático.

Al final de los años 40's se descubrió que algunos ductos corporales en el ámbito de los órganos afectados por fibrosis quística, generalmente estaban ocluidos por secreciones anormalmente pegajosas. En el páncreas, por ejemplo, los ductos que liberan enzimas digestivas al duodeno casi siempre estaban bloqueados, destruyendo la capacidad del sistema digestivo de digerir grasas y proteínas. Por su parte en el pulmón son los tubos bronquiales o bronquiolos los que son ocluidos (Bruce, M. C., *et al*, 1985). De manera normal, estos pasajes están recubiertos de una capa delgada de moco que atrapa partículas inhaladas y las transporta a la garganta para desecharlas. Pero en pacientes con fibrosis quística, el moco es excesivamente pegajoso y resistente para ser removido, por lo que esta modificación en si misma puede reducir el paso de aire e impedir la respiración (Blackwood, L. L., *et al*, 1983). Además, cuando las bacterias se mantienen en los espacios aéreos, establecen rápidamente infecciones (Fick, R. B. 1989) (Kharazmi, A., *et al*, 1986). Estás

infecciones, que son recurrentes, perjudican al tejido pulmonar gracias a la presencia de células inmunes que liberan sustancias químicas y enzimas (Doring, G., *et al*, 1985). Con el tiempo, la infección crónica destruye las vías bronquiales, y con el taponamiento de las vías aéreas, se produce finalmente un fallo respiratorio.

En 1946, estudios realizados en pacientes con fibrosis quística revelaron aspectos de la genética de la enfermedad. Luego de examinar el patrón hereditario en familias afectadas, se concluyó que la fibrosis quística es una condición recesiva, probablemente causada por la mutación de un sólo gene. Actualmente se sabe que la fibrosis quística es la enfermedad genética más común en poblaciones caucásicas, cerca del 5% de los norteamericanos blancos son portadores asintomáticos. Un niño en aproximadamente 2500 nacimientos en poblaciones caucásicas presenta la enfermedad. Sólo en Estados Unidos se presentan 1000 nuevos casos cada año, lo que significó en 1995 aproximadamente 30,000 personas afectadas por este mal. En México estudios realizados en las ciudades de México y Monterrey han demostrado que en poblaciones descendientes de blancos norte europeos la tasa es idéntica a la de los Estados Unidos. Además las poblaciones mestizas presentan también la enfermedad, pero desafortunadamente no se cuenta con datos confiables, ya que muchos de los decesos por fibrosis quística se cuantifican entre las enfermedades gastrointestinales, desnutrición y enfermedades respiratorias crónicas, la panorámica nacional es más bien desconocida (Orozco, L., *et al*, 1993).

Siete años antes de que el patrón genético fuera delineado, la ciudad de Nueva York atravesó una intensa onda cálida y los hospitales reportaron que los niños con fibrosis quística se deshidrataban más rápido que niños normales. Entonces Paul di Sany'Agnese y sus colegas de la Universidad de Columbia encontraron que los niños y niñas afectados por fibrosis quística pierden cantidades excesivas de sal en el sudor. Aunque la explicación de este fenómeno no fue resuelta en muchos años, en cambio si proporcionó una amplia utilidad clínica, dando por resultado el desarrollo de pruebas que aún son fundamentales en el diagnóstico de la enfermedad: Mediciones de cloruros en el sudor.

Con el paso del tiempo, diversos desarrollos clínicos han permitido realizar diagnósticos más precisos y mejores tratamientos. Por ejemplo, la falla pancreática actualmente es tratada con cápsulas que contienen a las enzimas digestivas faltantes, por lo que actualmente los problemas digestivos pueden ser controlados. En contraste, las alteraciones pulmonares aún causan en más de un 90 % la muerte a pacientes con fibrosis quística. La terapia utilizada en la enfermedad pulmonar consiste en drenajes de postura y percusiones del pecho, si bien los pacientes también se han beneficiado con un grupo amplio de antibióticos que ayudan a controlar las repetidas infecciones. Desde 1993, se utiliza en clínica la inhalación de ADNasas, enzimas que hidrolizan las cadenas nucleotídicas y por lo tanto, conducen a un aumento en la viscosidad del moco (Welsh, M. J., 1995).

La investigación bioquímica de las causas de la fibrosis quística continuó más lentamente que el trabajo clínico pero se reintensificó en la primera mitad de los años 80's. Durante este periodo se encontró que la función deficiente en el transporte de iones cloruro se presenta en todas las células del enfermo. En particular, se reveló que el epitelio de los

pacientes con fibrosis quística es relativamente impermeable al cloruro; tal descubrimiento implicaba que algún canal transportador de iones cloruro presente en el tejido epitelial tenía una función alterada.

Por otra parte, un grupo de investigadores encabezados por Paul M. Quinton de la Universidad de California en Riverside encontró que los ductos de las glándulas sudoríferas fallaban al tratar de expulsar iones cloruro del lumen glandular. Este hecho finalmente explicó por qué las personas con fibrosis quística tienen sudores anormalmente salados. El sudor es producido normalmente en la base de las glándulas sudoríparas y posteriormente fluye a la superficie de la piel a través de un estrecho conducto. Inicialmente el sudor es una solución rica en iones sodio y cloruro, pero al atravesar el ducto los iones se reabsorben en el epitelio dejando una solución ligeramente salada. En pacientes con fibrosis quística, en contraste, la incapacidad del tejido epitelial para absorber iones cloruro y el consecuente efecto en la absorción de iones sodio, producen que el sudor retenga un exceso de cloruros y sodio y se de lugar a una excesiva salinidad.

En otra línea de estudio, Michael R. Knowles y Richard C. Boucher de la Universidad de Carolina del Norte en Chapel Hill al examinar pulmones encontraron que los movimientos de cloruros del tejido epitelial al lumen aéreo estaba disminuido, y el canal de salida del sodio estaba aumentado, dando por resultado una falta de movilidad del moco pulmonar o esputo que favorece la colonización bacteriana.

Mientras los progresos en los estudios sobre transporte de cloruros continuaban, se aceleró la búsqueda del gene responsable de la enfermedad. Los esfuerzos culminaron en 1989 cuando un gran grupo de investigadores del Hospital para niños enfermos en Toronto y de la Universidad de Michigan lo aislaron. Debido a la probable influencia del gene en los movimientos celulares del ion cloruro, nombraron a la proteína como regulador transmembranal de conductancia en la fibrosis quística (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR). Este equipo también identificó una anomalía en el ADN que aparece en el 70 % de los casos de fibrosis quística, tal aberración, conocida como $\Delta F508$, que consiste en la delección de tres nucleótidos del gen, lo que da por resultado la pérdida de la fenilalanina 508 (Riordan, J. R., *et al*, 1989).

El efecto de la mutación $\Delta F508$ ha sido el más extensamente estudiado, esta delección engendra un defecto en el tráfico intracelular. Muchas proteínas, incluyendo la molécula normal de CFTR son procesadas después de ser sintetizadas, mientras que la molécula mutante tiene problemas para abandonar el retículo endoplásmico, debido tal vez a que su doblado deficiente impide su apropiado transporte. Si bien la mutación $\Delta F508$ es la más común, cientos de mutaciones distintas han sido identificadas, muchas de ellas bloquean el proceso de traslado de la proteína a la membrana, algunas otras evitan su síntesis, y otras permiten la síntesis e inserción en la membrana, pero modifican la actividad normal de la proteína. En algunos casos extremos, las mutaciones impiden el flujo de iones cloruro interrumpiendo la función de los nucleótidos que codifican para los aminoácidos del dominio de unión a cloruros o introduciendo un defecto en el poro de transporte iónico (Collins, F. S., 1992).

En general, los pacientes en cuyas células se tienen dos copias del gene defectuoso que dan lugar a la mutación $\Delta F508$ tienden a desarrollar una enfermedad severa, probablemente debido a que escapan pequeñas cantidades de la proteína mutada del retículo endoplásmico. En adición a lo anterior se ha descubierto recientemente que las glándulas submucosas producen grandes cantidades de la proteína CFTR. Se cree que esto pueda tener una relación con el hecho de que las vías aéreas de los pacientes con fibrosis quística están predispuestos a infecciones de un tipo de bacterias más que de otro (Hoiby, N. 1993). Por ejemplo, las infecciones con *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* son particularmente comunes (Storey, D. G., et al, 1992). Para las personas con fibrosis quística, el moco es muy pegajoso para ser retirado por los cilios broncopulmonares. Como resultado de esto, la capa de moco crece sobre la superficie epitelial, proporcionando un buen sitio para el crecimiento bacteriano (McElvaney, N. G., et al, 1991). Esto desencadena una respuesta inmune por parte de los glóbulos blancos que atacan a las bacteria, las capas de moco causan daño permanente si no son retiradas, por lo que las funciones respiratorias normales declinan lentamente (Groutas, W. C., et al, 1986). Tradicionalmente, la primera línea de defensa contra la acumulación de moco es el régimen de terapia física (el cual ayuda de una forma mecánica). Dicho tratamiento se aplica dos o tres veces al día.

Un tratamiento médico desarrollado recientemente se basa en una clasificación según la cual el moco purulento (infectado), está formado por tres componentes mayores:

1. - Bacterias
2. - Moco
3. - ADN

El ADN proveniente de la destrucción de los leucocitos es el principal responsable de la destrucción del tejido. Además, la concentración de glóbulos blancos es aproximadamente 1000 veces más alta en pacientes con fibrosis quística que en personas normales. Por su parte las grandes y viscosas hebras de ADN forman redes con alta viscosidad. Debido a esto último, se desarrolló *Pulmozime*^R de GENETECH^{MR}, el primer fármaco fabricado específicamente para problemas pulmonares de fibrosis quística y uno de los primeros fármacos obtenidos por procesos biotecnológicos modernos. La ventaja de este producto asiste únicamente en la disminución de la viscosidad del moco, pero esto implica el aumento de la actividad proteolítica presente en el moco (Jensen, E. T., et al, 1990) (Fick, R. B., et al, 1981).

2.2. Relación entre infecciones pulmonares oportunistas y fibrosis quística: A pesar que la mayoría de la enfermedades respiratorias son causadas por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* o *Hemophilus influenzae*, es la colonia mucoide de *Pseudomona aeruginosa* la que se encuentra en el esputo del 90 % de los pacientes de fibrosis quística de más de 3 años de edad (Kerckmar, C. M. 1992). Por comparación, la colonia mucoide variante de *Pseudomona aeruginosa* se encuentra con un 2 % de presencia entre las causantes de enfermedades respiratorias crónicas para poblaciones no afectadas por fibrosis quística. La aparición de *Pseudomonas* mucoides en los cultivos obtenidos de pacientes relativamente jóvenes con enfermedad crónica obstructiva de las vías aéreas casi siempre esta relacionada con un diagnóstico de fibrosis quística (Jaeger, K. E., et al, 1991) (Pedersen, S. S., et al, 1987). De manera interesante, los pacientes con fibrosis quística no son más susceptibles a infecciones del mismo agente patógeno en otras partes de su

organismo, por lo que la persistencia de *Pseudomonas* está limitada a las vías aéreas (Suter, S., *et al*, 1984). La colonización del tracto respiratorio de los pacientes con fibrosis quística y con *Pseudomonas* está correlacionada con el avance de la patología bronquial, la edad del paciente, la historia clínica, la extensión de la enfermedad pulmonar y la severidad de los cambios en el ámbito de las inmunoglobulinas séricas (Hoiby, N. 1993). Los médicos reconocen que a pesar del uso de potentes antibióticos, el patógeno es raramente erradicado del tracto respiratorio (Rizzo, V., *et al*, 1993). *Pseudomonas aeruginosa* es el único patógeno recuperado del esputo o tejido pulmonar mediante tricotomía o autopsia, y claramente es el microorganismo dominante a ser eliminado en la fibrosis quística (Fick, R. B., 1989) (Tournier, J. M., *et al*, 1985).

Los antibióticos anti *Pseudomonas* raramente tienen acción sobre éstas, debido a una barrera física provocada por la red formada por el moco viscoelástico, resultado de la gran cantidad de ADN presente (Doring, G. 1989).

2.3. Características y composición de las secreciones mucosas: Una persona normal produce alrededor de 100 ml de moco cada 24 horas, siendo la secreción clara, viscoelástica y adhesiva, con un grosor de 2 a 3 micrones. Aparentemente la mayoría de esta secreción es reabsorbida en la mucosa bronquial, dejando sólo 10 ml o más llegar a la glotis. Durante estados de enfermedad, el volumen de las secreciones puede incrementarse dramáticamente, y debe entonces ser expectorada o tragada. El moco es en realidad una macromolécula que consta de cadenas polipeptídicas unidas a cadenas de oligosacáridos con una estructura similar a la de un escobillón. Esta estructura general de proteína unida a grupos de oligosacáridos es conocida como glicoproteína, el moco forma una matriz flexible que está internamente estabilizada con puentes disulfuro y puentes de hidrógeno. El resultado es un gel que consiste casi completamente de agua organizada alrededor de elementos estructurales, y que es fuertemente hidrofílica e higroscópica. La gelificación final del moco es debida a la combinación de interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de puentes de hidrógeno. Bajo condiciones normales, el moco tiene baja viscosidad, pero alta elasticidad. A pesar de que el moco es predominantemente agua, el gel se asemeja más a una gelatina, también formada mayoritariamente por agua organizada en un semisólido. Es importante clínicamente notar que suficiente agua debe estar disponible en el cuerpo para formar moco con características físicas normales, pero una vez formado, el moco no reincorpora fácilmente el agua utilizada.

Adicionalmente al moco secretado por las vías aéreas, las secreciones bronquiales contienen otras sustancias como proteínas del suero (albúmina, inmunoglobulinas, α - 1 - antitripsina, componentes complementarios, etc.) y electrolitos (sodio, potasio, cloruro, calcio). Estos electrolitos son de vital importancia para la hidratación del moco y el transporte de agua en el epitelio superficial de las vías aéreas.

El esputo es un término que se refiere a la secreción expectorada, que contiene secreciones orofaríngeas, nasofaríngeas y linguales en adición a los componentes bronquiales. La saliva también está presente en el esputo y como resultado de ello el esputo y el moco no representan la misma secreción (Girard, F., *et al*, 1981).

En bronquitis crónica y en fibrosis quística, sin la presencia de infecciones, la composición de las secreciones no cambia, pero el volumen sí. En la bronquitis se presenta hipertrofia de las glándulas submucosas; en el asma, la cantidad de glicoproteínas neutras es mayor en comparación a las glicoproteínas ácidas, lo que modifica la naturaleza de las secreciones. Durante la infección, el ácido desoxirribonucleico (ADN) de los glóbulos blancos cambia la apariencia del moco de transparente a opaco, el color verde o amarillo que toma el esputo es causado por la enzima mieloperoxidasa, la cual aparece en rupturas celulares e indica secreciones retenidas. En general, bajo condiciones patógenas, estos cambios producen diferencias en las propiedades físicas del moco: la viscosidad aumenta, el movimiento ciliar reduce su velocidad o se detiene, y el resultado es un impacto mucoso que favorece la colonización bacteriana o viral.

Las características bioquímicas del moco determinan sus propiedades físicas, y tiene influencia en la eficiencia de las interacciones mucociliares y el transporte resultante. En el sistema mucociliar, existen dos tipos de fuerzas:

Cohesión: Se refiere a fuerzas entre moléculas iguales.

Adhesión: Se refiere a fuerzas entre moléculas distintas.

Las fuerzas adhesivas se refieren a las fuerzas de atracción y fricción entre la fase gel y la solución acuosa, en la superficie de las vías aéreas. El significado clínico de las fuerzas adhesivas sobre el transporte del moco no es claro aún y menos lo es la manera en la que las sustancias mucolíticas alteran a dichas fuerzas.

Las fuerzas cohesivas son resultado de la unión cruzada de las macromoléculas, y dan lugar a las propiedades reológicas de viscosidad y elasticidad presentes en el gel (Rao, J. L., 1989)

2.4. Uso de ADNasas (*Pulmozime*) para modificar las características físicas del moco pulmonar en fibrosis quística: La ADNasa I es una enzima que digiere ADN extracelular. Una copia exacta de la enzima humana nativa, ADNasa I recombinante humana, ha sido clonada y expresada. El producto dornasa α (*pulmozimer*) reduce la longitud del ADN presente en el esputo purulento de pacientes con fibrosis quística y reduce en mucho las propiedades viscoelásticas de esas secreciones.

Investigaciones realizadas proponían (Ramsey, B. W., 1993) que la reducción en las propiedades viscoelásticas del esputo en conjunto con la aplicación *in vitro* de rhADNasa podría incrementar el paso de aire en las cavidades broncoalveolares, por lo que se realizaron pruebas clínicas para probar la seguridad y eficacia de administrar esta enzima recombinante al tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística. Estas pruebas demostraron que Pulmozime mejora las condiciones del paciente afectado por la enfermedad pulmonar. No obstante, el uso profiláctico del medicamento en pacientes sin enfermedad respiratoria, especialmente en niños pequeños, no es recomendado. No existen datos que apoyen la premisa que Pulmozime prevenga el inicio de la enfermedad crónica. Los efectos secundarios presentes relacionados con la dosis administrada, incluyen la alteración de voz,

faringitis y rinitis, así como un aumento en la actividad proteolítica del esputo purulento (Ramsey, B. W., 1993).

2.5. Células de defensa y su acción en procesos infecciosos: Los tipos celulares clasificados dentro del término leucocitos de polimorfonuclear incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Estas células son identificables en películas sanguíneas debido a la morfología de sus núcleos, la cual por ser irregular y cambiante recibe el nombre de polimórfica (Goldstein, W., 1986). El citoplasma de estas células tiene una apariencia granular; Estos gránulos son de hecho organelos de unión a membrana, ya que sus distintas propiedades celulares e inmunitarias están dictadas por los constituyentes de estos gránulos. Las células polimórficas son también llamadas granulocitos (Hollsing, A. E., *et al*, 1987)

Los polimorfos se dividen en tres subgrupos en virtud de la capacidad de tinte de sus citoplasmas al ser tratados con pigmentos mixtos. Los eosinófilos se tiñen con colorantes ácidos, como la eosina, adquiriendo un color rojo en frotis sanguíneo. Los basófilos se tiñen con colorantes básicos y adquieren un color azul, mientras que los neutrófilos se tiñen con ambos tipos de colorantes y su citoplasma adquiere un color púrpura. Las diferencias entre los contenidos citoplasmáticos de estas células es mucho más importante de lo que sugiere las simples propiedades de tinción. Los gránulos de los basófilos, eosinófilos y neutrófilos contienen distintos constituyentes moleculares que confieren a estas células funciones especializadas durante los procesos de infección e inflamación.

Las células llamadas neutrófilos, son formalmente nombradas leucocitos neutrófilos polimorfonucleares. De hecho, la mayoría de las preparaciones de neutrófilos contienen aproximadamente de un 95 a 97 % de neutrófilos, el resto son eosinófilos. Los neutrófilos son los glóbulos blancos más abundantes en la sangre, representando del 40 al 65 % de los glóbulos blancos en sangre, y se encuentran normalmente en concentraciones dentro del intervalo de 3 a 5×10^6 células por mililitro de sangre. Pero este número puede incrementarse dramáticamente en el transcurso de un proceso infeccioso. Los neutrófilos poseen un tiempo medio de circulación relativamente corto, de sólo 8 a 20 horas, pero puede incrementarse a varios días si las células abandonan la circulación y se internan en los tejidos. Debido al gran número de neutrófilos en la circulación y su periodo de vida media, un gran número de neutrófilos entra y sale diariamente de la circulación. Por ejemplo, en un humano adulto con cinco litros de sangre, el total de neutrófilos es de alrededor de 2×10^{10} células. Si estas son reemplazadas dos o tres veces al día, entonces la médula ósea, que es la encargada de producirlas, debe ser capaz de generar al rededor de 5×10^{10} células al día. En un individuo infectado, este número puede incrementarse en un orden de magnitud. La gran cantidad de neutrófilos que se pueden producir en un día indica qué tan importantes son estas células en la protección del individuo contra infecciones. Los neutrófilos son la primera línea de defensa del cuerpo contra infecciones bacterianas o fúngicas: son las primeras células en presentarse al lugar de la infección y responder ante ella rápido y potentemente. Por lo tanto estas células son altamente móviles y poseen una impresionante cantidad de mecanismos citotóxicos que son capaces de matar un gran número de patógenos microbianos (Springer, T. A., 1988).

Al ser liberados de la médula ósea, los neutrófilos tienen apenas 10 μm de diámetro, con una morfología casi esférica y sin ninguna extrusión. En este momento se les conoce como neutrófilos en estado no activado. Una vez que se activan, tanto por un estímulo químico como por acoplamientos a su superficie, su morfología cambia. Los procesos posteriores que presentan frente a una infección, se resumen a continuación:

1. Unión del neutrófilo a los capilares de pared (marginación) justo antes de dejar la circulación.
2. Introducción entre las uniones de células endoteliales adyacentes (diapédesis).
3. Migración hacia el tejido infectado (quimiotaxis).
4. Reconocimiento del agente patógeno, iniciación de la fagocitosis y activación de los mecanismos bactericidas.
5. Liberación de productos citotóxicos si el patógeno es muy grande para entrar completo dentro de la vesícula o si la invasión es numerosa (fagocitosis frustrada).
6. Liberación de moléculas pro - inflamatorias (por ejemplo, quimioatrayentes) u otros estimulantes inmunitarios (citocinas) si la mayoría de las células del sistema inmune (incluyendo más neutrófilos) deben concentrarse en el sitio de la infección.

En particular, dentro de los procesos de fagocitosis y de los procesos pre y post inflamatorios, la liberación de sustancias químicas de los gránulos neutrofilicos incluye la liberación de elastasas, que debido a su origen reciben el nombre de elastasas de polimorfonuclear, las cuales atacan indiscriminadamente tanto a células microbianas como a células humanas. Este proceso es perfectamente natural y es en el ámbito de la actividad citotóxica, que en el caso de la elastasa de polimorfonuclear es la α - 1 - antitripsina (o, α - 1 - antiproteasa) (Meyer, K. C., et al, 1991). Pero en el caso de los pacientes con fibrosis quística, este regulador es destruido por la acción de una metaloproteinasa (también llamada elastasa) liberada por *Pseudomonas aeruginosa*, lo cual favorece la destrucción aleatoria de todas las células presentes, y por lo tanto, el aumento del ADN libre (Johnson, D. A., et al, 1982). Esto resulta en las típicas características viscoelásticas del esputo purulento, y en los ya mencionados efectos destructivos sobre la capacidad respiratoria de los pacientes (Sutter, S. 1989) (Naegel, G. P., et al, 1984).

2.6. Proteasas que forman parte del neutrófilo: Los neutrófilos, poseen varias proteasas con máxima actividad a pH neutro o ligeramente alcalino. Entre ellas se encuentran: catepsina G (proteína parecida a la quimotripsina), colagenasa, elastasa, proteinasa 3, proteína 7 del gránulo azurofilo y azurocidina. Algunas de ellas han mostrado ser microbicidas directas mientras que otras poseen una alta actividad proteolítica, si bien son bacteriostáticas según experimentos *in vitro*. Proteínas interesantes como la catepsina G mantienen actividad antimicrobiana aún si su sitio catalítico es destruido por tratamiento térmico, indicando que su capacidad para matar bacterias es independiente de su actividad proteolítica (Campbell, E. J., et al, 1989).

La elastasa es una glicoproteína catiónica presente en los gránulos azurofilicos de los neutrófilos humanos a una concentración de 1 a 4 $\mu\text{g}/10^6$ células. Su ADNc ha sido clonado y expresado. La proteína existe como 4 isoenzimas que difieren entre si en su grado de glicosilación. Si bien, existen pocos reportes que indiquen que la elastasa es microbicida,

esta bien establecido que puede incrementar la actividad antimicrobiana de otras proteínas del neutrófilo (Doring, G., *et al*, 1986). Por ejemplo, la elastasa potencia *in vitro* los efectos líticos de la lisozima y la catepsina G, y corta la porción amino terminal (25 kda) de la proteína inductora de permeabilidad bactericida (PIPB) a partir de la holoproteína. Esta actividad separa a la PIPB de los gránulos azurofílicos por lo que queda libre para fagocitar bacterias (Groutas, W. C., *et al*, 1993). La elastasa aparentemente tiene funciones en la degradación de la pared celular de las bacterias destruidas (Pipoly, D. J. 1987) y presenta la capacidad de activar otros sistemas microbicidas como resultado de su capacidad de realizar proteólisis limitada en la superficie de los organismos fagocitados, por lo que expone sitios blanco para el ataque de otros sistemas antimicrobianos del neutrófilo: por ejemplo, la proteólisis limitada de la superficie externa bacteriana puede exponer la cadena de peptidoglicanos de la pared celular al ataque de la lisozima. Por otro lado, la propiedad de la elastasa para incrementar la capacidad microbicida de los sistemas catepsina G y mieloperoxidasa - H₂O₂ es independiente de su actividad catalítica según se ha demostrado mediante una elastasa inactivada por choque térmico, la cual fue igualmente efectiva durante dicho proceso (Edwards, S. W., 1994) (Doherty, J. B., *et al*, 1986).

2.7 Hipótesis: El hecho clínico de la reducción de la actividad elastolítica en el esputo purulento de pacientes con fibrosis quística, y su posterior aumento tras el uso de polinucleasas, puede explicarse con la existencia de interacciones entre polinucleotidos y la elastasa de polimorfonuclear.

3.0. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. OBJETIVOS:

Durante los años 60's la investigación sobre fibrosis quística, y muy en particular, sobre el sistema bioquímico del esputo purulento de los pacientes, demostró que el esputo expectorado contiene inusuales cantidades de ADN y de bacterias, pero estudios meticulosos demostraron también que al digerir el ADN la actividad proteolítica, y en particular la actividad elastolítica aumentaba, por lo que se propuso la existencia de complejos entre el ADN y la única enzima elastolítica del sistema, la elastasa de polimorfonuclear (Lieberman, J., 1963). De hecho se propuso que el uso de ADNasas en el esputo de los pacientes con el fin de reducir las características viscoelásticas favoreciendo el drene del contenido pulmonar, pero con la aclaración de que se observara los aumentos de la actividad elastolítica (Lieberman, J., et al, 1965). Desafortunadamente en esa época el incipiente desarrollo de la manipulación genética no rendía aun sus frutos, y la propuesta se abandona por los problemas inmunológicos de rechazo ante el uso de ADNasas de origen diferente al humano (Janoff, A., 1968).

Esta idea es retomada en los años 90's con la aparición en el mercado farmacéutico de Pulmozime^R, por lo que la importancia de conocer la naturaleza real de la o las posibles interacciones presentes entre fragmentos de ADN y elastasa de polimorfonuclear recobra importancia, mas aún a la sombra del moderno desarrollo de técnicas estructurales.

Por lo que basándonos en la problemática que involucra el desarrollo de la enfermedad pulmonar de la fibrosis quística, y observando la dificultad de separar las isoformas de la elastasa humana de polimorfonuclear, se plantean los objetivos de la presente tesis:

1. Conocer a profundidad la relación entre la ruptura de la red ADN moco pulmonar - aumento de actividad de elastasa. Y si esta se puede atribuir a la simple modificación de una estructura física, a modificaciones en las condiciones fisicoquímicas del medio, o bien a alguna interacción específica o inespecífica entre la superficie de la elastasa de polimorfonuclear y fragmentos de ADN.
2. Encontrar un sistema bioquímico de fácil manipulación que permita extrapolar los resultados al sistema humano.
3. Validar la selección de este sistema.
4. Aplicar sobre el sistema seleccionado y validado métodos de elucidación de estructura secundaria por medio de técnicas espectrofotométricas modernas: Dicroísmo Circular, Infrarrojo con Transformada de Fourier y Espectroscopia de Fluorescencia; y métodos de crecimiento de agregados en solución: Dispersión Dinámica de la Luz. Con el fin de encontrar si existen o no interacciones entre la proteína modelo y fragmentos de ADN, así como la naturaleza de las mismas.
5. Encontrar la secuencia mínima de oligonucleótidos que presenten el efecto inhibitorio sobre el sistema estudiado.

3.2. MÉTODOS:

3.2.1. Obtención de la Elastasa Humana de Polimorfonucleares y la Elastasa Pancreática de Cerdo:

3.2.1.1. Purificación de la Elastasa Humana de Polimorfonucleares: Con el fin de purificar la elastasa humana de polimorfonucleares a partir del esputo purulento de pacientes con fibrosis quística, se contactó con la Asociación Mexicana de Fibrosis Quística y el Instituto Nacional de Pediatría, en ambos lugares se pudo entrar en contacto con pacientes con manifestación pulmonar crónica y con edades entre los 6 meses y los 13 años, se colectó esputo purulento de 26 pacientes hasta lograr 735 ml, los cuales se congelaron con hielo seco inmediatamente después de que los pacientes lo expectoraron, y una vez en el laboratorio la muestra se colocó en un ultracongelador a -70°C .

Con el fin de purificar a la elastasa a partir del esputo purulento, se modificó el procedimiento descrito por Twumasi y Liener (Twumasi, D. Y. and Liener, I. E., 1977). Con tal fin, una mezcla de 230 g de esputo y 250 ml de agua destilada a 5°C fue homogeneizada y centrifugada a $30,000 \times g$ a 5°C durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado se resuspendió en 900 ml de NaCl 2M agitándose durante 1 h. a 5°C y posteriormente fue centrifugado. El sobrenadante se almacenó a 5°C y el precipitado se resuspendió en 900 ml de NaCl 1M agitándose durante 1 h. a 5°C y posteriormente fue centrifugado. Los dos sobrenadantes se mezclaron y dializaron dos veces con 10 litros de solución reguladora de pH Tris-HCl 0.05M, MgCl₂ 0.035M, pH 7.5 durante 24 horas a 5°C , formándose una suspensión coloidal.

La suspensión coloidal obtenida es rica en ADN, por lo que se utilizó ADNasas con el fin de liberar a los probables complejos nucleoproteicos. La preparación de la ADNasa consistió en disolver ADNasa en solución reguladora de pH Tris-HCl 0.05M, MgCl₂ 0.035M, pH 7.5 y agregarlos a la suspensión coloidal hasta lograr una concentración final de 60 unidades/ml. La digestión del ADN se realizó durante 3h a 25°C , apareciendo un precipitado y un sobrenadante verde-amarillo. Después de clarificar la suspensión durante 12 horas a 5°C , el precipitado se recuperó por centrifugación a $30,000 \times g$ durante 20 minutos. El precipitado fue resuspendido en solución reguladora de pH Tris-HCl 0.05M, pH 7.5 y aplicado a una columna de AcA 54 de 200 ml, equilibrada con el mismo regulador de suspensión, el perfil cromatográfico mostró actividad elastolítica en el pico número 6 (figura 1-A).

Posteriormente el pico número 6 fue dializado durante 12 horas en solución reguladora de pH de Fosfatos 0.05M, NaCl 0.3M, pH 6.6 a 5°C . La muestra se aplicó a una columna de CM-Shadex (2.0 X 50 cm) previamente equilibrada con el mismo regulador de diálisis, la columna fue eluida con un gradiente lineal (800ml) hasta un límite superior de NaCl 0.6M. El perfil cromatográfico mostró actividad elastolítica en el pico mayoritario (figura 1-B).

La muestra con actividad elastolítica, fue aplicada a un gel de isoelectroenfoque (pH de 7 a 10), presentando al menos 9 isoformas en un intervalo de pH de 8.4 a 8.45 (figura 1-C).

3.2.1.2. Selección de una Proteína modelo alterna a la Elastasa Humana de Polimorfonucleares: Puesto que la estructura tridimensional de la elastasa humana de leucocitos esta determinada y depositada en el Protein Data Bank de Brookheaven (PDB). Se procedió a realizar búsquedas en el mismo con el fin de localizar las coordenadas depositadas tanto de la proteína nativa como de la misma formando distintos complejos, encontrándose 3 entidades con los siguientes códigos PDB:

1ppf Elastasa de Polimorfonucleares
1hne Elastasa de neutrófilo
1ppg Elastasa de Polimorfonucleares

Junto a las coordenadas tridimensionales de las proteínas se encontró la secuencia de las mismas, la cual se comparo con la estructura primaria que arrojo la búsqueda en el banco de datos de estructuras primarias SWISSPROT, siendo idénticas entre si. Con estos datos, y aprovechando la gran cantidad de programas disponibles en INTERNET y en nuestro laboratorio, especializados en realizar búsquedas de homología de estructura primaria, se procedió a alimentar la secuencia de 1hne al programa PRODOM seleccionándose del resultado obtenido la proteína con la mayor homología y al mismo tiempo comercialmente disponible, resultando que la elastasa pancreática de cerdo presento 40 % de identidad en estructura primaria (tabla 1) y al mismo tiempo esta disponible comercialmente, por lo que se realizo una búsqueda en PDB resultando 9 entidades depositadas de la elastasa pancreática de cerdo (nativa y acomplejada con inhibidores):

1est Tosil elastasa	6est Elastasa cristalizada con 10% DMF.
2est Elastasa con Trifluoroacetil-L-Lis-Ala-P-Trifluorometilfenilamida.	7est Elastasa con Trifluoroacetil-L-Leu-Ala-P-1FMA.
3est Elastasa Nativa	8est Elastasa con Guanidina (1.75 Å)
4est Elastasa con Ace-Ala-Pro-Val-Difluoro-N-Feniletacetamida.	9est Elastasa con Guanidina (1.90 Å)
5est Elastasa con Acido Carboxibenzoxi-Alanil-Isoleucilboronico.	

Utilizando las coordenadas tridimensionales de 5est y de 1hne, y sometiéndolas al programa de alineación estructural DALI, se encontraron los siguientes valores:

Z = 30.9	RMSD = 1.4
LALI = 199	%IDE = 41
NFRAG = 17	TOPO = S

Donde, se observa que 17 fragmentos de ambas son perfectamente equivalentes; que la estructura de ambos en general es equivalente, aunque detecta una identidad en estructura primaria de solo 41 %, la desviación estándar entre las cadenas principales es de solo 1.4 Å (figura 2-A).

Fragmentos equivalentes:

5est	1hne
1 - 20	1 - 20
26	21
27 - 47	23 - 43
52 - 65	50 - 63
69 - 80	67 - 78
82 - 84	79 - 81
85	84
90 - 116	85 - 111
119 - 136	114 - 131
138 - 139	132 - 133
140 - 153	135 - 148
155 - 158	149 - 152
169 - 178	153 - 162
180 - 194	165 - 179
196	180
200 - 210	181 - 191
213 - 237	193 - 217

Estos resultados nos permiten concluir que estructuralmente 1hne y 5est son equivalentes, pero no aclara si la diferencia del 59 % en las cadenas laterales repercute en las características fisicoquímicas de ambas, por lo que se analizó la distribución de cargas, los potenciales electrostáticos, la distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y la posición de los sitios activos de ambas proteínas con la ayuda de los programas DELPHI (INSIGHTII), O y GRASP, comprobándose la equivalencia, sobre todo en las zonas cercanas a los sitios activos de los dos dominios barril beta de cada una de las elastasas analizadas.

Con el fin de comprobar estos datos teóricos se alinearon las estructuras tridimensionales de 1hne y 5est con la ayuda del programa O mostrándose un RMS de 1.2 Å y plena complementariedad en el área del sitio activo (figura 2-B), por otro lado la alineación de las estructuras primarias con el programa BLAST muestra también un 40% de identidad y un 54% de aminoácidos idénticos o intercambiables, repetidos aleatoriamente a lo largo de las secuencias.

A este nivel es interesante comprobar que el área cercana al sitio activo de ambas proteínas muestra una distribución de cargas electrostáticas similares. En general, existe una canal transversal de cargas negativas que incluye al sitio activo y que está rodeado por una área cargada positivamente en todas direcciones. En general es válido considerar que el área cercana al sitio activo de ambas proteínas (1hne y 5est) está negativamente cargado, mientras el resto de las proteínas está cargado positivamente (figuras 3-A y 3-B)

Aun con estos datos la validación real del sistema se dará solo en el momento que se logren reproducir las características de disminución de la actividad elastolítica en presencia de ADN, y el aumento de la misma al agregar ADNasa al sistema, por lo que se procedió a obtener y purificar la elastasa pancreática de cerdo, los fragmentos de ADN y de esta manera probar la hipótesis planteada.

3.2.1.3. Purificación de la Elastasa Pancreática de Cerdo: La purificación de la elastasa pancreática de cerdo partió del hecho de que la proteína se encuentra disponible comercialmente y con características de homogeneidad relativamente buenas, por lo que se decidió adquirir la enzima de dos proveedores: SIGMA y ELASTIN PRODUCTS COMPANY. La proteína de SIGMA fue altamente soluble en medios acuosos, por lo que con el fin de corroborar la homogeneidad de la misma se le aplicó a una columna de 1 metro de largo por 2.3 cm de diámetro, empacada con ULTROGEL AcA 54 en solución reguladora de pH de fosfatos 0.15 M, pH 5.5. Este tipo de cromatografía de tamiz molecular nos permite separar los componentes de una muestra a partir de los pesos moleculares de los mismos. Las condiciones de corrida empleadas fueron:

Volumen de Gel: 200 ml
Velocidad de Empaque: 0.7 ml/min
Velocidad de Corrida: 0.3 ml/min
Temperatura: 5°C
Eluyente: Solución reguladora de pH de Fosfatos 0.15 M, pH 5.5
Volumen de Colecta: 1 ml/tubo

El cromatograma resultante presenta 6 componentes (figura 4-A), de los cuales sólo el número 7 presenta actividad con ROJO - CONGO, por lo que se recirculó en la misma columna, con las mismas condiciones, pero modificando el volumen de colecta a 0.5 ml/tubo (figura 4-B). El pico número 11 presentó actividad elastolítica, por lo que se recirculó por tercera vez en la columna de AcA 54 con las mismas condiciones de corrida que la recirculación anterior, de esta cromatografía se obtuvo un solo pico con actividad elastolítica, por lo que se colectó solo los tubos de mayor absorbancia a 280 nm (figura 4-C).

3.2.1.3.1. Purificación de proteínas: Las proteínas se unen a una gran variedad de tipos de fases sólidas, normalmente de una forma selectiva. Consecuentemente las técnicas de adsorción, especialmente cuando se adaptan a una columna cromatográfica, son comúnmente empleadas. Su uso generalmente resulta en pasos de purificación que dan un aumento en la pureza de la proteína de interés. Por ejemplo, en el caso de la purificación de una enzima, se tiene un incremento en la actividad específica.

Los principales adsorbentes para proteínas son los intercambiadores iónicos, tales como geles de fosfato de calcio y moléculas sintetizadas químicamente en donde el ligante es fijado a una matriz neutral de celulosa, agarosa o alguna variedad de polímeros naturales o sintéticos.

La teoría cromatográfica describe la separación de solutos de acuerdo a sus diferentes coeficientes de partición entre dos fases (la mayoría de las veces una sólida y otra líquida), dando por resultado diferentes movilidades en dirección del flujo. En casi todas las formas de cromatografía, la mayor parte de la adsorción ocurre dentro de las partículas, no en la superficie externa. Dentro de las partículas no hay flujo de solvente, todos los movimientos de solvente y soluto ocurren en los espacios entre partículas.

3.2.1.3.1.1. Exclusión molecular: Originalmente usado por Porath y Flodin, los materiales basados en dextrano, los llamados geles de sefadex, adquirieron rápidamente la reputación de geles filtrantes para separaciones rápidas de macromoléculas basadas en el tamaño molecular. Estas redes cruzadas de dextrano pronto se expandieron utilizándolas principalmente para separación de proteínas y para determinación de pesos moleculares. Desde entonces, el método se ha desarrollado mejorando los geles para dar procesos más rápidos y para cubrir un amplio intervalo de tamaños moleculares. El principio básico es simple, la matriz consiste en una red tridimensional cruzada abierta donde los poros que se forman son inaccesibles para algunas macromoléculas pero las pequeñas si pueden pasar a través de ellos.

En una columna cromatográfica empacada con una matriz de filtración en gel, el entorno de un tamaño particular de molécula puede expresarse de distintas maneras. Por ejemplo, puede relacionarse al volumen total de la columna V_t y al volumen excluido (fuera de las esferas del gel) V_o , por medio de la siguiente ecuación:

$$K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$$

Donde V_e es el volumen de elución de la molécula considerada y K_{av} es el coeficiente que define la proporción de poros que puede ocupar esta molécula en la matriz empacada. De manera alternativa, el volumen de elución puede relacionarse al volumen de elución de otras moléculas de tamaño conocido, por lo cual el peso molecular desconocido puede calcularse por simple extrapolación. El volumen de elución se relaciona teóricamente al radio de Stokes, no al tamaño o al peso molecular. El radio de Stokes describe una esfera con un ambiente hidrodinámico equivalente a una partícula de forma irregular. En consecuencia, debido a que la forma tanto de la proteína desconocida como de las moléculas de calibración son similares, los pesos moleculares pueden ser usados sin ningún problema en la calibración.

Con componentes de los geles esféricos, es inevitable que V_o presente un 30 y 35% del valor de V_t , dependiendo del empacado de la columna. Por lo tanto un intervalo útil para la separación de proteínas se mantiene cerca del 80% del volumen restante ($V_t - V_o$) es decir, a un 55% de V_t . El volumen total accesible para el líquido es ligeramente menor al volumen total de la columna debido a que el material sólido de la matriz del gel más la pequeña capa de agua unida, ocupan un volumen pequeño. La resolución depende también de la difusión (diámetro de la columna) y de ambientes no ideales en la columna. Las proteínas tienen normalmente bajos coeficientes de difusión, pero mayores a lo calculado teóricamente. Esto se debe a condiciones no ideales en la columna, presentes incluso en la

columna mejor empacada. En condiciones ideales, el frente de proteínas se mueve en la columna mostrando solamente pequeñas pérdidas por la difusión molecular y por separación cromatográfica; en la práctica se presentan dos complicaciones: primero, inestabilidades gravitacionales causadas por soluciones densas. Segundo, flujos turbulentos. Las inestabilidades gravitatorias pueden resolverse totalmente en muestras muy densas reduciendo al máximo la velocidad de la bomba lo que también reduce el problema del flujo turbulento. Pero es importante recordar que a velocidades extremadamente bajas se incrementa el problema causado por la difusión.

3.2.1.4. Obtención de Oligonucleótidos:

Ya que en el sistema pulmonar de los pacientes con fibrosis quística el ADN presente tiene dos fuentes: los mismos neutrófilos y el ADN bacteriano (Twumasi, D. Y. y otros, 1977), se decidió emplear como fuente de ADN al plásmido pBR322, el cuál es expresado en *Escherichia Coli*.

3.2.1.4.1. Transformación: Mediante este proceso se introdujo el plásmido pBR322 en *Escherichia coli* DH5 α , la técnica empleada fue la siguiente:

1. En un tubo Eppendorf colocar 1 μ l de plásmido mas 50 μ l de células competentes (*E. coli* DH5 α)
2. Colocar el tubo en baño de hielo durante 30 minutos.
3. Colocar el tubo en un baño a 37 °C durante 30 minutos.
4. Colocar el tubo en baño de hielo durante 5 minutos.
5. Agregar 500 μ l de medio LB líquido sin ampicilina incubar a 250 RPM, durante 1 hora a 37 °C.
6. Con una pipeta estéril tomar aproximadamente 100 μ l de la suspensión y sembrar en una caja Petri con medio LB sólido con ampicilina.
7. Incubar a 37 °C durante 12 horas.

Al termino de las 12 horas la caja Petri mostró colonias de bacterias transformadas.

3.2.1.4.2. Multiplicación de Células Transformadas: Puesto que se necesitaban grandes cantidades de plásmido para los experimentos subsecuentes, fue necesario aumentar el número de individuos transformados, para lo cual se utilizó el siguiente método:

1. Tomar 2 o 3 asadas de colonias transformadas del medio LB sólido.
2. Suspender los paquetes celulares en 10 ml de medio LB líquido con ampicilina.
3. Colocar el tubo en una agitadora a 37 °C, 200 RPM, durante 4 horas.
4. Centrifugar 5 minutos a 12 000 RPM durante 5 minutos y recuperar el paquete celular.

3.2.1.4.3. Extracción de pBR322: Una vez que se cuenta con una gran cantidad de células transformadas, se procedió a extraer el ADN plamídico (pBR322):

1. El paquete celular del paso anterior se resuspende en 100 μ l de solución I (Glucosa 50 mM, Tris-HCl (pH 8.0) 25 mM, EDTA (pH 8.0) 10 mM) con ayuda de un vortex.
2. Agregar 200 μ l de solución II (NaOH 0.2 N, SDS 1 %), mezclar por inversión e incubar en hielo durante 5 minutos.
3. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C, y transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
4. Agregar 450 μ l de fenol-cloroformo, centrifugar a 12 000 RPM por 2 minutos a 4 °C.
5. Recuperar la fase acuosa y agregarle 1 volumen de isopropanol, agitar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifugar a 12 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
7. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 75 % frío.
8. Repetir 2 veces más el paso 7.
9. Retirar el sobrenadante y dejar secar.
10. Almacenar en congelación.

3.2.1.4.4. Electroforesis en Geles de Agarosa: Con el fin de separar a los distintos componentes que puedan estar presentes en el último paso del punto anterior, se resuspendió el precipitado en 10 μ l de agua destilada y se aplicó a un gel de agarosa 1.2% en solución reguladora de pH TAE (Tris-Acetato 400 mM, EDTA 10 mM), y se corrió a 60 voltios durante 1 hora. Es importante recordar que se utilizó un marcador de tamaños de 1 Kb en uno de los carriles con el fin de conocer el número de pares de bases de cada banda presente.

Una vez terminada la electroforesis, el gel se tiñe con una solución de bromuro de etidio al 0.01%, y finalmente se observaron las bandas con ayuda de una lámpara de luz ultravioleta de onda corta.

3.2.1.4.5. Limpieza del ADN: Este paso es importante, ya que el ADN purificado se separa de otros con base a sus características de carga neta y tamaño (con electroforesis). Para poder trabajar posteriormente con el es necesario sacarlo de la matriz de agarosa sin dejar restos del gel que interfieran posteriormente, para lo cual se utilizó la siguiente metodología:

1. Con ayuda de un bisturí cortar las bandas de interés del gel.
2. Agregar 3 volúmenes de NaI 0.5 M, incubar a 55 °C, hasta que la agarosa se disuelva.
3. Agregar 10 μ l de suspensión de GLASMILK, incubar en hielo durante 15 minutos.
4. Centrifugar a 5 000 RPM, durante 5 segundos a 0 °C, remover el sobrenadante.
5. Lavar el precipitado con 1 ml de NEW WASH, repetir el lavado 3 veces.
6. Eluir el ADN del GLASMILK con ayuda de 30 μ l de agua destilada.
7. Centrifugar a 5 000 RPM, durante 5 segundos y retirar cuidadosamente el sobrenadante, aquí se encuentra el ADN, repetir la extracción 2 veces más con 10 μ l de agua destilada cada una, reunir los sobrenadante en el mismo tubo.

Con el fin de corroborar la homogeneidad del plásmido pBR322, se le aplicó a una columna de 1 metro x 2.3 cm empacada con ULTROGEL AcA 54 en solución reguladora

de pH de Fosfatos 0.15 M, pH 5.5. Este tipo de cromatografía de tamiz molecular nos permite separar los componentes de una muestra a partir de los pesos moleculares de los mismos. Las condiciones de corrida empleadas fueron:

Volumen de Gel: 200 ml
Velocidad de Empaque: 0.7 ml/min
Velocidad de Corrida: 0.3 ml/min
Temperatura: 5 °C
Eluyente: Solución reguladora de pH de Fosfatos 0.15 M, pH 5.5
Volumen de Colecta: 0.5 ml/tubo

El cromatograma resultante presenta 1 componente, por lo que se seleccionaron los tubos de mayor absorbancia a 260 nm (propia para ADN) y se almacenaron en congelación.

3.2.1.4.6. Linearización del plásmido y número de cortes: El ADN purificado y almacenado tiene una estructura circular, por lo que para tratar de reconstruir parcialmente las condiciones del esputo de pacientes con fibrosis quística, se le linearizó con ayuda de enzimas de restricción. El principal parámetro para la selección de la enzima de restricción estriba en el número de cortes que produce en pBR322. Con la idea de linerizarlo se empleo a la enzima BamHI y con ella se obtuvo un fragmento de 4361 pb, con la idea de tener muestras de distinto tamaño se utilizaron a las enzimas de restricción BsrDI, DsaI, HincII, Accl, EarI, HincII y DrdI, todas ellas cortan a pBR322 en dos sitios, pero utilizando las técnicas de purificación descritas previamente se obtuvieron 7 fragmentos de pBR322 con los tamaños de 4179, 3442, 3254, 2768, 1804, 1107 y 413 (Tablas 1, 2 y 3). Todos estos fragmentos, mas el de pBR322 linearizado con BamHI, fueron analizados por sus secuencias mostrando en general una relación AT - GC de 1:1, lo que nos permite asegurar que la composición de los oligonucleótidos no es una variables más en el sistema de experimentación empleado.

3.2.1.4.7. Ciclos de Crecimiento en Bacterias: El crecimiento se define como el incremento en el número de células microbianas, o bien, un incremento en la masa microbiana. La tasa de crecimiento es el cambio en la masa o número por unidad de tiempo. En los microorganismos unicelulares, el crecimiento involucra normalmente un aumento en el número de individuos donde una sola célula continúa incrementando su tamaño hasta aproximadamente el doble de su tamaño original; entonces ocurre la división celular, resultando en la formación de dos células que alcanzarán el tamaño de la célula original. Durante este ciclo de división celular, todas las estructuras celulares se duplican. El intervalo en que se da la formación de dos células a partir de una célula progenitora es llamado generación, y el tiempo requerido para que esto ocurra se llama tiempo de generación. El tiempo de generación es entonces el tiempo requerido para que el número de células se duplique. Debido a esto, el tiempo de generación es también llamado tiempo de duplicación. Se debe notar que durante una sola generación tanto el número de células como la masa celular se duplican. Este tiempo de generación varía ampliamente entre los microorganismos: va desde pocos minutos hasta varias horas.

3.2.1.4.7.1. Ciclo de crecimiento de Poblaciones Bacterianas: Una curva de crecimiento bacteriano se puede dividir en distintas fases llamadas: fase lag, fase exponencial, fase estacionaria y muerte.

1. **Fase Lag:** Cuando la población de microorganismos es inoculada a un medio fresco, el crecimiento no inicia inmediatamente, sino después de un periodo de tiempo llamado fase lag, el cual puede ser corto o largo según las condiciones. Esto es debido a que las células carecen de varias coenzimas u otros constituyentes celulares, y requiere tiempo para la síntesis de los mismos.
2. **Fase Exponencial:** La fase exponencial de crecimiento es consecuencia del hecho de que cada célula se divide para formar dos células, cada una de las cuales también se divide para formar dos nuevas células y así sucesivamente. La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente en esa fase, pero las tasa de crecimiento exponencial varían mucho.
3. **Fase Estacionaria:** En un sistema cerrado, el crecimiento exponencial no puede ocurrir indefinidamente, lo que realmente ocurre es que los nutrientes esenciales del medio de cultivo son usados y algunos productos de desecho del crecimiento de los microorganismos actúan como inhibidores, y el crecimiento exponencial se detiene, llegando rápidamente la población a una fase estacionaria.
4. **Fase de Muerte:** Si la incubación continúa después de que la población alcanza la fase estacionaria, las células pueden mantenerse vivas y continuar su metabolismo, pero siempre morirán. Cuando esto último ocurre la población entra a fase de muerte, durante la cual el número total de microorganismos puede mantenerse constante, pero la cuenta de microorganismos viables disminuye lentamente.

3.2.1.4.8. Transformación Genética: La transformación genética es el proceso por el cual el ADN libre es incorporado dentro de una célula. El descubrimiento de la transformación genética en bacterias fue uno de los eventos más importantes en la historia de las ciencias naturales, y probó sin lugar a dudas que el ADN es el material genético, lo cual es el punto de apoyo de la biología molecular y la genética moderna

3.2.1.4.8.1. Competencia: Una célula que es capaz de tomar una molécula de ADN y ser transformada se le llama competente. Sólo ciertas cepas son competentes; lo que parece ser inherente de cada organismo en particular. La competencia es afectada por el estado fisiológico de las células, por el medio en que están creciendo y por la etapa del ciclo de crecimiento. Existe un breve periodo, a la mitad de la fase exponencial, donde aumenta la competencia de la población, pero inmediatamente después disminuye. Existen buenas evidencias de que durante este breve periodo de competencia, la superficie de las células cambia, por lo que el ADN se une a ellas. Este cambio en la superficie puede también ser inducido por un factor enzimático, que al ser adicionado a un medio con bacterias no competentes las induce a convertirse en bacterias competentes. Al mismo tiempo que la cantidad de células competentes aumenta, virtualmente todas son capaces de tomar ADN exógeno.

3.2.1.4.8.2. Plásmidos: Los plásmidos son elementos genéticos circulares que se reproducen de una forma autónoma y que poseen una naturaleza extracromosomal. La

mayoría de los plásmidos se pueden eliminar de una célula por medio de varios tratamientos sin tener efectos letales en la célula. Muchos plásmidos pueden ser transmitidos de una célula a otra por medio de un proceso llamado conjugación. Algunos plásmidos tienen la propiedad de integrarse al cromosoma, y bajo estas condiciones su replicación se realiza sólo bajo control cromosómico. Subsecuentemente el plásmido puede liberarse y reasumir una replicación independiente. La secuencia de replicación independiente, integración cromosómica y escape de la integración es similar al que presentan algunos bacteriófagos.

3.2.1.5. Métodos para Medir Actividad Enzimática de la elastasa:

La elastasa pancreática de cerdo es una endopeptidasa que puede hidrolizar una gran variedad de sustratos. Es única entre las principales endopeptidasas pancreáticas, debido a su capacidad para digerir elastina, la proteína fibrosa del tejido conectivo. Esta propiedad es la base de muchos métodos que involucran la medición de una cantidad de elastina solubilizada por el efecto proteolítico de la elastasa en un periodo de tiempo. El método más conveniente es aquel que involucra la determinación de una cantidad de colorante liberado en una solución de la elastasa que actúa sobre sustratos de complejos elastina - colorantes. La elastina - rojo congo, azoelastina y elastina - orceína han sido empleadas con este propósito. De ellas, la primera y la última son las más comúnmente empleadas. El método de rojo congo - elastina de Naughton y Sanger consiste en la tinción de fibrina con rojo congo para medir actividad proteolítica general, mientras que el método de orceína - elastina de Sachar *et al*, tiene la ventaja de que este es un colorante específico para la elastina, por lo que trazas de colágena u otras proteínas contaminantes en el sustrato no afectan la validez del ensayo. Ambas son esencialmente similares, por lo que los procedimientos descritos para un sustrato pueden ser usados en el otro si se desea.

3.2.1.5.1. Método de Rojo Congo - Elastina: La metodología específica está dividida en reactivos requeridos y procedimiento.

Reactivos: Sustrato: rojo congo - elastina de SIGMA Chemical Co. a una concentración de 1 mg/ml en solución reguladora de pH de borato de sodio 20 mM, pH 8.8

Enzima: Solución acuosa de la elastasa en solución reguladora de pH de borato de sodio 0.02 M, pH 8.8

Procedimiento: Siete mililitros de suspensión de elastina - rojo congo se colocan en un tubo, se centrifugan y el sobrenadante se mide contra agua destilada en un espectrofotómetro a 495 nm. Al tiempo cero se agrega 1 ml de solución de la elastasa, la mezcla se agita vigorosamente por 5 segundos. La elastasa se une fuertemente al sustrato insoluble de elastina, por lo que una agitación constante no es necesaria para propiciar el contacto íntimo de la enzima con el sustrato. Se permite que la digestión continúe a temperatura ambiente, y a intervalos regulares de 5 minutos se agita la muestra, se centrifuga y se mide la densidad óptica del sobrenadante. Esto mismo se puede hacer decantando y midiendo la densidad óptica a 495 nm; después de cada medición el tubo se agita y se permite que la reacción continúe.

De la curva sigmoidal que se obtiene graficando la densidad óptica contra el tiempo, se determina el tiempo necesario para liberar el 50 % del rojo congo en solución. Una gráfica de una serie de ensayos de calibración contra el inverso de la concentración de la elastasa pura en cada uno de los ensayos da por resultado una curva de calibración casi lineal de la cual es sencillo determinar la cantidad de la elastasa activa presente en la solución problema. La forma precisa y el gradiente de la curva de calibración pueden variar ligeramente con modificaciones en el tamaño de la partícula, en la concentración de la suspensión de elastina - rojo congo empleada y en la temperatura.

El método da resultados precisos y reproducibles. Bajo las condiciones del ensayo, el 50% de digestión se logra en 15 minutos para una concentración de 0.1 mg/ml de elastasa. El coeficiente de extinción $E_{495\text{nm}}$ para una solución de 1 mg/ml de rojo congo - elastina digerida es aproximadamente de 1.0.

3.2.1.5.2. Definición de Unidad y Actividad Específica: En muchos de los ensayos de digestión de elastina, una unidad de elastasa se define como la cantidad de enzima que digiere a 1 mg de elastina bajo las condiciones del ensayo dentro de un tiempo arbitrario. Debido a la naturaleza del complejo rojo congo - elastina, no se definen unidades de actividad, y en su lugar se expresa en términos de actividad específica relativa en la que la elastasa pura es por definición la unidad. Esto es posible ya que la elastasa pancreática de cerdo se encuentra disponible pura en el mercado.

3.2.1.6. Métodos para Medir Concentración de Proteínas: El uso de la radiación UV para detectar y medir cantidades de proteína se ha empleado desde que Warburg y Christian reportaron un método basado en lecturas de absorción a 260 nm y 280 nm que permitían detectar el contenido de ácidos nucleicos y nucleótidos en una muestra (Warburg, 1941). Esa corrección reportada en los años 40 es muy útil en extractos crudos, pero se vuelve menos relevante en un proceso de purificación de proteínas, donde los compuestos de interferencia son gradualmente retirados. En estos casos una simple lectura a 280 nm es suficiente. Las proteínas absorben a 280 nm debido a la presencia de residuos de tirosina y triptofano, y ya que el contenido de estos aminoácidos varía enormemente entre distintas proteínas, el coeficiente de extinción, expresado como $E_{280}^{1\%}$ o $E_{280}^{1\text{mg/ml}}$, a su vez varía considerablemente. La mayoría de las proteínas caen en el intervalo (para 1 mg/ml) de 0.4 a 1.5, pero casos extremos incluyen en un extremo a algunas parvalbúminas (0.0) y en el otro, a la lisozima (2.65). La absorción a 280 nm da una idea general del contenido de proteína, excepto que se trate de proteínas totalmente puras. Si el coeficiente de extinción para una proteína pura es conocido con exactitud, entonces la lectura a 280 nm nos da una lectura precisa de la cantidad de proteína presente. De hecho este es el método más preciso para proteínas puras, ya que no involucra más que diluciones si la muestra lo requiere. Es muy importante que el solvente seleccionado no absorba a 280 nm, o si lo hace, utilizar un blanco al momento de la lectura. El método no es destructivo, y sólo algunos miligramos son necesarios para tener una lectura precisa.

Haciendo una corrección por el contenido de residuos aromáticos (lectura a 280 nm) el coeficiente de extinción a 205 nm se puede predecir con un error no mayor del 2%, usando la formula:

$$E_{205}^{1\text{mg/ml}} = 27.0 + 120 (A_{280} / A_{205})$$

Este método permite obtener concentraciones casi sin error de muestras muy importantes, aunque en términos prácticos la lectura directa a 280nm es suficiente en la mayoría de los casos.

3.2.1.7. Análisis de Pureza de Muestras (Electroforesis):

La ventaja principal de este método es su capacidad de separar proteínas con alta resolución de una mezcla relativamente compleja, si bien es cierto que como técnica preparativa presenta algunos problemas. Desde un punto de vista analítico es casi obligatoria para caracterizar a una proteína purificada. La electroforesis analítica en gel sólo requiere de 5 a 25 μg de proteína (o menos si se utilizan técnicas de teñido con plata). Ornstein en 1964 introdujo geles sintéticos, la poliacrilamida con enlaces cruzados. La electroforesis con geles de poliacrilamida se utilizó originalmente en sistemas de discos. Actualmente se utiliza como geles delgados planos, presentando las ventajas de que la superficie del gel recibe menos calor por centímetro cuadrado al aplicar el voltaje. Además, durante el proceso de tinción y desteñido, la difusión en las bandas de proteína es más rápido. Existen al menos 5 tipos de electroforesis utilizando geles de poliacrilamida:

1. Electroforesis simple.
2. Electroforesis con geles de poliacrilamida en presencia de urea.
3. Electroforesis con geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
4. Electroforesis con geles de gradiente.
5. Electroforesis de enfoque isoelectrico.

En nuestro caso solo trabajamos con electroforesis simple la cual consiste en correr la muestra en regulador de pH a un pH donde la proteína se mantenga estable y en su forma nativa. Este método fue el procedimiento original, haciendo uso tanto de las diferencias de carga como del tamaño presentes entre las proteínas. La solución reguladora de pH seleccionada, depende de la naturaleza de las proteínas, pero generalmente es ligeramente alcalino, en el intervalo de pH de 8 a 9, donde la mayoría de las proteínas están cargadas negativamente, por lo que migran en dirección del ánodo. El ánodo está normalmente en la parte baja del gel. Se debe notar que en estos sistemas no hay previsión sobre las proteínas que se muevan en dirección contraria, las proteínas básicas se diluyen en el regulador del cátodo. Si la mayoría de las proteínas a analizar se sabe que son básicas, entonces el regulador empleado debe tener pH menor y el cátodo se debe conectar al fondo del gel.

La concentración de la poliacrilamida puede variar en un amplio margen con relación al tamaño de las moléculas que se desea separar. Dos variaciones son posibles: variar el contenido total de acrilamida y variar el porcentaje de uniones cruzadas (N, N'- metilen bisacrilamida), cada una tiene el mismo objetivo de aumentar o disminuir el tamaño

promedio del poro. Para proteínas muy grandes, arriba de 10^6 daltones, un gel compuesto de 3 a 4% de acrilamida y 0.1% de bisacrilamida funcionara muy bien. Para proteínas muy pequeñas cercanas a los 10^4 daltones, se utiliza normalmente 15% de acrilamida y 1% de bisacrilamida. Un aumento en el porcentaje de enlaces cruzados hace que los geles se vean más opacos; 1 parte de enlazador cruzado con entre 20 y 50 partes de monómero está en el intervalo normal. Normalmente se emplean geles de 7 a 10 % de acrilamida. La polimerización es iniciada con persulfato de amonio disuelto al momento (1.5 a 2 mM) junto con un "cazador" de radicales libres, TEMED (0.05 a 0.1 % vol/vol, N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina). Como alternativa se utiliza rivo flavina, la cual no deja residuos tóxicos en el gel. La Gelificación se lleva a cabo completamente a temperatura ambiente en 30 minutos.

3.2.2. Efecto de la Adición de pBR322 linearizado sobre la Actividad Elastolítica de la Elastasa Pancreática de Cerdo:

Con el fin de poder observar el efecto de la adición de pBR322 a una cantidad constante de la elastasa, se prepararon 6 muestras con las siguientes composiciones:

- Experimento 1 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0436 mg/ml)
- Experimento 2 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0349 mg/ml)
- Experimento 3 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0261 mg/ml)
- Experimento 4 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0174 mg/ml)
- Experimento 5 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0087 mg/ml)
- Experimento 6 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0025 mg/ml)

Y se monitoreo la actividad en presencia de rojo congo - elastina, los resultados del tiempo necesario para digerir todo el rojo congo - elastina presente muestra que la adición de pBR322 linearizado mostraron una reducción en la actividad de la elastasa en comparación con la elastasa pura (figura 5-A).

3.2.3. Efecto de la Adición de Polinucleótidos de tamaño variable sobre la Actividad Elastolítica de la Elastasa Pancreática de Cerdo:

Con la idea de mostrar el efecto que tiene la longitud del ADN con la inhibición de la actividad, se utilizaron los fragmentos de 4361, 3442, 2768, 1107 y 413, aumentándose su concentración, manteniendo fija la de la elastasa (EPP).

- Experimento 1 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0436 mg/ml)
- Experimento 2 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0349 mg/ml)
- Experimento 3 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0261 mg/ml)
- Experimento 4 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0174 mg/ml)
- Experimento 5 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0087 mg/ml)

Experimento 6 (elastasa 0.45 mg/ml, Polinucleótido 0.0025 mg/ml)

El resultado de este experimento muestra que la adición de distintos fragmentos de pBR322 producen una disminución en la actividad de la elastasa (EPP), y que esta disminución esta relacionada con la longitud de la secuencia (figura 5-A).

3.2.4. Medición de modificaciones en la estructura secundaria de la Elastasa Pancreática de Cerdo en contacto con oligonucleótidos.

3.2.4.1. Efecto de la Adición de pBR322 a La elastasa Pancreática de Cerdo por Espectrofotometría de Fluorescencia: Como primer paso se selecciono 280 nm (tras probar distintas longitudes de onda), como la longitud de onda de excitación que permitía obtener en nuestro caso los mejores espectros de emisión, posteriormente se probó el efecto aislado de pBR322 linealizado, elastasa y solución reguladora de pH (figura 5-B), para asegurarnos que su efecto era despreciable en la emisión.

Finalmente el equipo ISS – PC Photon Counting Spectrofluorometer (se utilizo para monitorear los efectos sobre el pico de emisión del triptofano al agregar pBR322 linealizado, observándose que existe una disminución en la señal de los fluoroforos presentes, lo que se traduce en la formación de una interacción entre pBR322 y elastasa, por la cual los fluoroforos, poco a poco se ocultan tras la estructura del ADN (figura 6-A). De hecho la adición de 0.08 mg/ml de pBR322 a una solución de 0.09 mg/ml de elastasa da lugar a una disminución del 18 % en la emisión de los fluoroforos. Lo que hace pensar en que pBR322 linealizado se une a puntos específicos de la superficie de la elastasa.

3.2.4.1.1. Espectroscopia de fluorescencia EF: Una molécula que ha sido excitada electrónicamente con luz UV / visible, puede perder algo del exceso de energía adquirida y regresar al estado basal por varios procesos. Dos de estas formas son la fosforescencia y la fluorescencia. La primera es raramente observada en moléculas a temperatura ambiente, mientras la segunda se manifiesta a condiciones de temperatura que permiten que la mayoría de las proteínas no se desnaturalicen. Sin embargo los electrones pueden ser excitados a un distinto número de estados energéticos, la emisión en fluorescencia en muchos casos solamente ocurre desde primer nivel vibracional del primer estado excitado. Esto presenta dos implicaciones en la medición del espectro de emisión. La primera es que algo de la energía inicialmente absorbido es perdida antes de la emisión, lo que significa que la luz emitida será de menor energía, y por lo tanto de mayor longitud de onda que la luz absorbida. Esto ultimo es conocido como el desplazamiento de Stoke. La segunda implicación consiste en que el espectro de emisión y por lo tanto la longitud de onda del máximo de fluorescencia será independiente de la longitud de onda precisa utilizada para excitar a la molécula. Así, para la tirosina, la longitud de onda del máximo de fluorescencia es observada al rededor de 305 nm, sin importar si la excitación es al máximo de absorción (278 nm) o a cualquier otra en la banda de absorción. Por supuesto, la intensidad de la fluorescencia cambiara como consecuencia de la diferencia en la cantidad de luz absorbida a estas dos longitudes de onda.

La fracción de luz emitida como fluorescencia comparada con la inicialmente absorbida está en términos de una relación cuántica. El valor cuántico de un fluoróforo en particular, dependerá de un amplio número de factores ambientales, como la temperatura, solvente y la presencia de otras moléculas que puedan aumentar o disminuir la probabilidad de otros procesos de desactivación del estado excitado. La desactivación o extinción en fluorescencia por otra molécula, ya sea debido a colisiones o a la formación de complejos de estado excitado, es la base para explicar los estudios de fluorescencia en interacciones ADN - proteínas.

El estudio de interacciones ADN - proteína es altamente simplificado por el hecho de que toda la fluorescencia detectable procede sólo de la proteína, ya que al menos las cuatro bases presentes en los ácidos nucleicos, son comparativamente no fluorescentes. Los residuos de tirosina y triptofano aportan en conjunto y en términos prácticos toda la fluorescencia de una proteína. Como regla general, cuando ambos residuos están presentes, el espectro de emisión es dominado por el o los triptofanos, a menos que la relación de tirosinas sea muy alto con relación a los triptofanos. El efecto cuántico del residuo de tirosina en una proteína, comparada con el que presenta sólo en solución es generalmente muy baja, ilustrando la tendencia de la tirosina a extinguirse. Por otro lado, los residuos del triptofano son altamente sensibles a la polaridad del medio circundante, lo que afecta los niveles energéticos del primer estado excitado con el resultado de que el máximo de emisión puede variar desde 330 nm en un ambiente hidrofóbico, hasta 355 nm en agua. De este modo, en proteínas que sólo contienen un triptofano, el ambiente general del residuo puede determinarse utilizando esta técnica.

Tanto la fluorescencia del triptofano, como la de la tirosina, son extinguidos por la interacción con una gran cantidad de moléculas, incluyendo el ADN. En el caso de la tirosina, el máximo de emisión también puede cambiar si algún triptofano está involucrado en la interacción, lo que puede ser empleado para monitorear la unión con el ADN (Kneale, G. G., 1985). La cantidad de fluorescencia extinguida de una proteína por el ADN, es proporcional a la concentración de extinción. Ya que la extinción es causada por la formación de un complejo entre la proteína y el ADN, el porcentaje de la extinción, es proporcional a la cantidad de proteína unida al ADN. En consecuencia, cuando se determina la extinción total (saturación), es posible determinar la cantidad de proteína libre y unida en cualquier punto de titulación. De estos datos, se puede determinar la estequiometría y la constante de unión.

La espectroscopia de fluorescencia es una técnica útil para investigar interacciones de proteínas con ADN. Generalmente, se aprovecha la fluorescencia intrínseca de los aminoácidos aromáticos, la cual es perturbada en la formación de un complejo ADN - proteína. En algunos casos, estas interacciones no son detectadas por esta técnica, debido a que la interacción ADN - proteína no se lleva a cabo en la proximidad de los triptofanos o tirosinas superficiales, en estos casos el espectro de emisión no es perturbado por esta interacción. Por lo que en estos casos, si otra técnica indica la presencia de la interacción, esta técnica permite conocer si la interacción se lleva a cabo o no en una zona específica de

la superficie proteica. Existe otro caso en que el número de tirosinas y triptofanos superficiales es tan grande, que el espectro de emisión no es perturbado significativamente por la unión o interacción al ácido nucleico.

3.2.4.2. Efecto de la Adición de pBR322 a la Elastasa Pancreática de Cerdo por Dicroísmo Circular:

Para realizar este experimento se utilizo un equipo AVIV, y se dividió en dos partes, primero el efecto que tiene sobre la estructura de la elastasa la adición de pBR322 linearizada, para lo cual se prepararon las siguientes diluciones (manteniendo constante la cantidad de elastasa):

- Experimento 1 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0436 mg/ml)
- Experimento 2 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0349 mg/ml)
- Experimento 3 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0261 mg/ml)
- Experimento 4 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0174 mg/ml)
- Experimento 5 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0087 mg/ml)
- Experimento 6 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0025 mg/ml)

y segundo el efecto que tiene la adición de la elastasa sobre la estructura de pBR322 linearizado, para lo cual se prepararon las siguientes diluciones:

- Experimento A (pBR322 0.026 mg/ml, elastasa 0.1 mg/ml)
- Experimento B (pBR322 0.026 mg/ml, elastasa 0.2 mg/ml)
- Experimento C (pBR322 0.026 mg/ml, elastasa 0.3 mg/ml)
- Experimento D (pBR322 0.026 mg/ml, elastasa 0.4 mg/ml)

El resultado del primer efecto (adición de pBR322 a la elastasa) nos muestra fuertes modificaciones en la estructura secundaria de la elastasa con la adición de pBR322, mientras que el segundo efecto muestra también modificaciones de la estructura de pBR322 en presencia de la elastasa, lo que habla de que tanto pBR322 linearizado modifica la estructura tridimensional de la Elastasa (EPP), como la Elastasa modifica a la estructura de pBR322 linearizado.

Con el fin de mostrar si el efecto estructural de la adición de fragmentos de ADN sobre la Elastasa (EPP) eran generales o particulares, se repitieron los experimentos de pBR322 linearizado pero con taumatina, puesto que presenta una estructura mayoritariamente beta plegada (tal como La elastasa) y quimotripsina, perteneciente a la misma familia estructural de la elastasa (figura 11-B)(figura 8-A). Mostrándose un efecto nulo sobre la estructura de estas proteínas al adicionar pBR322 linearizado (figura 8-B).

Para mostrar si el efecto de modificación estructural de La elastasa con ADN es producido por cualquier especie aviónica (recordar que el ADN es fuertemente negativo por

la presencia de los grupos fosfatos), se experimento con el aumento de la concentración de iones fosfato sobre la estructura de la Elastasa, mostrando un efecto nulo (figura 8-B).

3.2.4.2.1. Dicroísmo Circular DC: Los carbonos asimétricos presentes en las azúcares de los nucleótidos, y en todos los aminoácidos (excepto glicina) permiten que tanto los ácidos nucleicos como las proteínas, presenten actividad óptica, posteriores contribuciones de los polímeros, son resultado de su habilidad para formar estructuras secundarias bien definidas, en particular hélices, que por si mismas poseen también asimetría. Como consecuencia de esto el dicroísmo circular ha sido utilizado ampliamente para la predicción de estructura secundaria en proteínas (Johnson, W.C., 1990), estudios similares, pero menos extensos, han tratado de correlacionar parámetros estructurales de ácidos nucleicos con su espectro de dicroísmo circular (Johnson, B. B. *et al*, 1981). El seguimiento de una modificación en la estructura secundaria, en por ejemplo un proceso de desnaturalización, puede ser realizado utilizando la modificación en los espectros de dicroísmo circular.

La luz polarizada, puede ser descompuesta en componentes polarizados circularmente a la izquierda y a la derecha, la técnica del dicroísmo circular, mide la diferencia de absorción de ambos componentes,

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_I - \varepsilon_D$$

Donde ε es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) para los componentes izquierdo (I) y derecho (D). Cuando la luz polarizada pasa a través de una muestra ópticamente activa, la luz polarizada también rota, lo que significa que el rayo emergente está polarizado elípticamente. De este modo, el dicroísmo circular, es siempre expresado en términos de elipticidad ($[\theta]_\lambda$ en grados) o elipticidad molar ($[\theta]_\lambda$ en grados $\text{cm}^2 \text{ dm}^{-1}$).

$$[\theta] = 100 (\theta_\lambda / c l)$$

Donde c es la concentración en moles y l es el paso de luz en cm. Ambas expresiones están relacionadas por:

$$[\theta] = 3300 \Delta\varepsilon$$

La sobreposición de las bandas de absorción UV de ácidos nucleicos y proteínas, dan por resultado que los estudios de dicroísmo circular de interacciones ADN - proteínas, puedan ser complicados por la contribución observada de ambos componentes. Esto es particularmente cierto para longitudes de onda menores a 250 nm. En la práctica los espectros de dicroísmo circular entre 250 y 300 nm son dominados por los ácidos nucleicos, la contribución debida a los cromóforos aromáticos de la proteína son comparativamente débiles. Al monitorear interacciones ADN - proteína, los cambios en la conformación pueden ser normalmente atribuidos a los polinucleótidos debido a que la distribución al asar de los aminoácidos aromáticos causa cambios significativos entre su espectro de dicroísmo circular y el espectro de la proteína pura.

La baja elipticidad molar de los polinucleótidos requiere que las mediciones de dicroísmo circular, se realicen a altas concentraciones de polinucleótido (10^{-4} o 10^{-5} M), por esta razón, el dicroísmo circular no es empleado comúnmente para determinar las constantes de unión en una interacción ADN - proteína, de todas formas, el dicroísmo circular puede ser utilizado para obtener valores precisos de la estequiometría de las interacciones proteína - ADN (Carpenter, M. L., 1991) y a sido utilizado para mostrar la existencia de dos formas de unión coexistentes (Kansy, J. W. *et al*, 1986). El dicroísmo circular ha sido empleado también para mostrar cambios conformacionales inducidos por la unión del represor *Lac* a su operador y a secuencias aleatorias de ADN (Culard, F., 1981). Estudios similares en el represor *Gal* demostraron el papel central de los pares G-C de la secuencia del operador en cambios conformacionales del represor (Wartell, R.M, 1988). Otros estudios de la interacción de la proteína *cro* del bacteriófago λ han revelado cambios conformacionales tanto para uniones específicas como uniones inespecíficas con fragmentos de ADN (Torigoe, C., 1991).

Es muy importante hacer énfasis en que el dicroísmo circular provee de datos complementarios a otras técnicas espectroscópicas, como la fluorescencia, debido a que estas técnicas permiten monitorear diferentes componentes de la interacción. De hecho, incluso la aparente estequiometría de unión puede ser significativamente diferente con relación al dicroísmo circular por esta razón, incluso cuando las mediciones se realizan en bajo las mismas condiciones.

3.2.4.3. Efecto de la Adición de pBR322 a la Elastasa Pancreática de Cerdo por Infrarrojo con Transformada de Fourier:

Utilizando el equipo de infrarrojo del departamento de servicios técnicos del Instituto de Química, se observo que la adición de ADN de cadena larga (pBR322 linearizado) a una solución de la elastasa pancreática de cerdo repercute en la modificación del espectro infrarrojo sobre todo en el intervalo que va de 1750 a 1600 cm^{-1} , la modificación en el espectro (figura 9-A), demuestra que la adición de ADN modifica la estructura secundaria de la elastasa a un nuevo acomodo, el cual se mantiene con la adición de distintas cantidades de ADN, este nuevo acomodo presenta un máximo en la zona de 1665 a 1660 cm^{-1} , lo que nos hace pensar que posiblemente la adición de ADN aumenta el empaquetamiento de la estructura favoreciendo un aumento de la señal de estructura beta, tanto β -plegada como vuelta β , lo que en el caso de la Elastasa nos aclara que la interacción ADN - Elastasa no se realiza en la zona alfa del amino terminal.

Los experimentos se realizaron con las siguientes concentraciones de proteína y de ADN:

- Experimento 1 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0436 mg/ml)
- Experimento 2 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0349 mg/ml)

3.2.4.3.1. Infrarrojo con Transformada de Fourier IRTF:

Un electrón presente en cualquier molécula ocupa un orbital atómico o molecular que tiene niveles de energía asociados a él. Si el electrón es excitado, ocurre un cambio en la energía vibracional durante un pequeño periodo de tiempo, y la luz dispersada tendrá una longitud de onda mayor o menor que la de la luz incidente con una diferencia energética equivalente a la energía de transición entre los dos niveles vibracionales. Si el fotón es dispersado por un electrón al estado vibracional excitado, la energía de transición permitirá que la luz dispersada tenga mayor energía. Si es dispersada por un electrón en el estado basal que pasa a un estado excitado durante su residencia, el fotón proveerá la energía para esta transición y la luz dispersada tendrá menor energía. Como resultado de esto, la intensidad de la luz dispersada varía simétricamente con relación a la energía de la luz incidente, este es el efecto Raman

Si la energía de la luz que excita al electrón es igual a la diferencia en energía cercana al nivel energético vibracional su enlace ocupado es inmediatamente absorbido y accesa a un nivel energético vibracional superior al inicial, la luz puede ser absorbida y la energía vibracional del enlace ocupado por el electrón y la de los enlaces acoplados a él incrementan su energía en el mismo paso. Mucha de la energía absorbida no será disipada de una forma radiante como luz, pero sí lo será de una forma no radiante por medio de colisiones, o por aumentos en las energías de rotación. Cualquier luz emitida es debida a la transición directa de un estado excitado a uno basal, presentando la misma longitud de onda que la luz absorbida, pero alterando la dirección y volviéndose inseparable de la luz dispersada elásticamente. La absorción de la luz infrarroja (en el intervalo de 2×10^4 a 2×10^3 nm, o 500 a 5000 cm^{-1}) produce transiciones en los niveles energéticos vibracionales, mientras que un espectro de absorción infrarroja tiene un máximo discreto que energéticamente corresponde a las transiciones entre un par de niveles energéticos vibracionales (Kyte, J., 1995).

La estructura secundaria que se encuentra en las proteínas es una repetición regular de conformaciones en la cadena polipeptídica. Ya que es generalmente aceptado que la fuerza direccional del doblado de las proteínas es proporcionada por las interacciones hidrofóbicas, mientras que la mayor fuerza de estabilización de una estructura secundaria se debe a los puentes de hidrógeno a través de los grupos amida secundarios de la cadena polipeptídica. Debido a que en una proteína, cada grupo amida $-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-$ representa un pequeño dipolo vibracional, y que la naturaleza de los puentes de hidrógeno es distinta con relación a cada configuración secundaria, los tipos vibracionales se presentan en distintas frecuencias, que se manifiestan en distintas bandas de absorción en un espectro de infrarrojo. Esto es la base para el análisis infrarrojo de estructura secundaria de proteínas.

Las proteínas muestran una gran variedad de bandas de absorción de infrarrojo que se originan en la cadena polipeptídica. Estas son llamadas generalmente bandas amida, estas se dividen en amida I, II y III, De ellas la amida I es la más sensible a cambios conformacionales, y por lo tanto la más empleada, se basa en un 80% en las vibraciones de extensión en el enlace $\text{C}=\text{O}$. Pero existe un serio problema con la interpretación conceptual de la banda de amida I, las mediciones experimentales representan también la suma de

componentes indeterminados provenientes de diferentes estructuras secundarias. Por lo que una curva con los componentes de esta banda, no tiene significado a menos que se conozca el número de bandas individuales y su posición aproximada. Debido a esto el primer paso en el análisis de datos de infrarrojo es identificar los componentes presentes bajo la región amida I, puesto que la separación entre las bandas individuales es pequeña en comparación con la amplitud de las mismas, el problema se resuelve aumentando simplemente la resolución, la única forma posible de reducir la amplitud de los componentes es por medio de un tratamiento numérico a los datos. Una aproximación posible consiste en calcular la derivada del espectro, particularmente se emplea la metodología conocida como autodeconvolución de Fourier. La deconvolución se realiza en el dominio de la transformada de Fourier, tomando la ventaja de que el espectro de Infrarrojo con transformada de Fourier (IR-TF) se obtiene interferométricamente. Por lo tanto, disminuyendo lentamente el decaimiento del interferograma, se reduce la amplitud de la banda de infrarrojo. En la autodeconvolución de Fourier el interferograma compuesto (que consiste de la suma de los interferogramas correspondientes a cada banda de infrarrojo), es multiplicada por una función de peso con incremento exponencial, la cual lentamente reduce la tasa de decaimiento, y por medio de una apropiada función de apodización se minimiza el ruido propio del interferograma. La transformación inversa de Fourier, aplicada en este nuevo interferograma, proporciona un nuevo espectro con la separación de cada uno de los componentes.

Una vez que el número y frecuencia de cada componente de la región amida I se establecen, los métodos de ajuste son aplicados para cuantificar el área que cada componente ocupa, el cual está directamente relacionado a la cantidad de estructura secundaria presente en una proteína homogénea. Para concluir esto se asume que los coeficientes de extinción infrarrojos de los distintos componentes de la banda amida I, son los mismos o muy similares, y que la absorción de las cadenas laterales del glutamato y del aspartato, que también tienen grupos amida, es despreciable con relación al gran número de grupos amida de la cadena principal (Mantsch, H. H., 1993).

El primer estudio comprensible, basado en la metodología mencionada, fue publicado en 1986 (Byler, M., 1986). Posteriormente la espectroscopia de infrarrojo ha sido aplicada en muchos aspectos de la investigación estructural de proteínas.

Las limitaciones prácticas en los estudios de alta resolución estructural de proteínas, han estimulado progresos continuos en el desarrollo y mejoramiento de métodos espectroscópicos de "baja resolución". Una de esas técnicas es los estudios de infrarrojo con transformada de Fourier, los cuales han avanzado rápidamente en la última década. Una ventaja en particular consiste en que es una técnica sencilla y rápida para adquirir espectros de alta calidad a partir de pequeñas cantidades de proteína (~100 µg), además permite realizar estudios de proteínas en una gran variedad de ambientes, incluyendo los medios turbios. Esto repercute en que la técnica se utilice en proteínas de membrana o en el seguimiento del proceso de formación de complejos entre proteínas, o entre proteínas y otras moléculas (Sürewicz, W. K., 1993).

3.2.5. Valoración sobre la existencia de agregados en solución:

3.2.5.1. Efecto de la Adición de pBR322 a la Elastasa Pancreática de Cerdo por el método de Dispersión Dinámica de la Luz (DDL):

En este experimento se monitorea la aparición y crecimiento de un agregado al colocar elastasa y agregarle pBR322, para realizar este experimento se prepararon 6 muestras con las siguientes composiciones:

- Experimento 1 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0436 mg/ml)
- Experimento 2 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0349 mg/ml)
- Experimento 3 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0261 mg/ml)
- Experimento 4 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0174 mg/ml)
- Experimento 5 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0087 mg/ml)
- Experimento 6 (elastasa 0.45 mg/ml, pBR322 0.0025 mg/ml)

Los resultados de los experimentos muestran la aparición y crecimiento de un agregado molecular polidisperso y el crecimiento del mismo con tendencia a estacionarse en un tamaño promedio de 25×10^6 Daltones. El aumento de la polidispersidad también termina estacionándose en aproximadamente 34 nm, mientras el radio hidrodinámico se mantiene al final en 37 nm. Este experimento también se realizó con fragmentos de 3442, 2768, 1107 y 413, mostrándose la existencia en todos los casos de especies polidispersas de tamaños moleculares decrecientes con relación al tamaño de pBR322 adicionado. (figura 9-B)

3.2.5.1.1. Dispersión Dinámica de la Luz DDL:

Es sabido, que desde los trabajos de Smoluchowski (1908) y Einstein (1910) las fluctuaciones en la densidad de los medios condensados resultan en pérdidas localizadas de la homogeneidad, lo cual ha repercutido en multitud de descripciones cualitativas de los fenómenos de dispersión de la luz (Schmitz, K. S., 1986). De hecho Leonardo Da Vinci (1500) fue el primero en apreciar que el azul del cielo es debido a la dispersión de la luz solar por las partículas dispersas en la atmósfera. Pero era necesario esperar hasta el desarrollo de las teorías electromagnéticas a principios del siglo XX para formular una teoría cuantitativa. La idea esencial de la naturaleza de la luz dispersada, está contenida en los trabajos de Rayleigh (1871, 1881). Asociando que la luz varía periódicamente su campo eléctrico, cuando la luz cae sobre la materia, el campo induce la polarizabilidad que oscila con la misma frecuencia de la luz incidente. La materia actúa entonces como una fuente secundaria de luz y la luz incidente es dispersada en varias direcciones. La nube de electrones en la materia, que está oscilando por acción de la luz incidente, actúa de forma similar a una antena de radio, y dispersa una cantidad de energía electromagnética. La intensidad de ésta es determinada por el tamaño del oscilador y por el número y frecuencia de las oscilaciones, es decir, por la longitud de onda de la luz incidente.

Posteriores desarrollos en la teoría, se relacionan principalmente con las interacciones entre las longitudes de onda dispersadas de partículas dependientes, o de partículas donde éstas no son tan pequeñas comparadas con la longitud de onda incidente.

Cuando un haz de luz incide en un sistema dispersor, su intensidad disminuye en virtud de la pérdida de energía como luz dispersada. Para partículas incoloras el logaritmo del decaimiento fraccional de la intensidad I , está dado por la turbidez τ donde:

$$I = I_0 \exp(-\tau l)$$

I_0 es la intensidad original del haz incidente, y l es el paso de luz del sistema dispersante. En términos logarítmicos:

$$\tau = (2.303 / l) \log_{10} (I_0 / I)$$

Así que τ se expresa en cm^{-1} , si l está en cm.

Para partículas independientes que son ópticamente isotrópicas, y que son lo suficientemente pequeñas comparadas con la longitud de onda λ de la luz incidente, es perfectamente aplicable la teoría de Rayleigh (Pollister, 1992):

$$\tau = HcM \quad H = (32 \pi^3 n_0^2 / 3 N \lambda^4) ((n - n_0) / c)^2$$

Donde c es la concentración en peso de las partículas en g / ml, M es el peso molecular, N es el número de Avogadro (6.022×10^{23}), n_0 es el índice de refracción del medio y n es el índice de refracción de la solución. El incremento en el índice refractivo $n - n_0/c$ es una constante independiente de la concentración, y para la mayoría de los materiales biológicos en agua es cercano a 0.17.

Para soluciones acuosas de proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos es posible considerar a las partículas como menos de un décimo de longitud de onda de la luz incidente, en el caso de emplear láser, por lo que las ecuaciones de Rayleigh son aplicables, debido también a que este sistema de ecuaciones es usado en sistemas dispersores de luz visible y de dispersores esféricos, con pesos moleculares variables, pero superiores a 15 000.

Para sistemas polidispersos, es decir, soluciones que contienen partículas del mismo material, pero de distintos tamaños, el peso molecular M en la ecuación de Rayleigh es un promedio de los pesos moleculares de las partículas presentes. Más específicamente, esto es llamado peso molecular promedio, y está dado por:

$$\Sigma \nu_i M_i^2 / \Sigma \nu_i M_i$$

Donde ν_i es el número de partículas que poseen un peso molecular M_i , tomadas de la suma de todas las partículas presentes en el sistema. Debido a que el número de partículas por unidad de volumen es proporcional a su concentración en peso c dividida por su peso molecular M , la ecuación de Rayleigh, también puede escribirse para un sistema polidisperso como:

$$\tau = A \Sigma \nu_i M_i^2$$

Donde A contiene constantes numéricas y ópticas, esta última ecuación es útil para seguir cinéticas de coagulación, sistemas en polimerización y estudios de complejos.

La dispersión dinámica de la luz presenta otra ventaja, en el caso de un sistema en que las partículas se agregan de manera aleatoria, es decir que cualquier partícula o agregado se combine con cualquier otra partícula o agregado, la turbidez decaerá cuadráticamente con relación al tiempo. De esta manera, se puede determinar la naturaleza del proceso de agregación, y posteriormente la tasa de agregación y los pasos involucrados. En el caso de una agregación lenta, como en el caso de albúmina de suero, esta característica de la disminución de la turbidez, se relaciona directamente con la selección científica de las condiciones propicias para una agregación ordenada propia de un crecimiento cristalino (Ferré-D'Amare, A. R., 1994).

Debido a sus características especiales, la dispersión dinámica de la luz, ha sido empleada para desarrollar modelos de nucleación cristalina, crecimiento y para monitorear la formación de núcleos contra agregados amorfos como una función de las condiciones del solvente y la concentración de proteínas. Estudios recientes demuestran que en particular las muestras de macromoléculas con monodispersidad, pueden cristalizar, mientras que las muestras que se agregan al asar no. Probando esta hipótesis con 15 proteínas sujetas a extensivos experimentos de cristalización, demostró una correlación del 100% entre monodispersidad y cristalización (Zulauf, M., 1992).

3.2.6. Reconstrucción cristalográfica del complejo Elastasa Pancreática de Cerdo y oligonucleótidos.

3.2.6.1. Cristalización del Complejo Elastasa - pBR322:

Con el fin de reconstruir la posible interacción con ayuda de la construcción de un cristal, entre distintas concentraciones de la elastasa pancreática de cerdo y los oligonucleótidos de 4361, 4179, 3442, 3254, 2768, 1804, 1107 y 413 pb se probó con una serie de condiciones de cristalización en las cuales se han obtenido cristales de interacciones ADN-proteínas, en ellos se probaron concentraciones desde 0 hasta 40% de PEG (Polí Etilen Glicol) 400, 800, 3350, 4000, 6000 y 8000, todos en solución reguladora de pH de fosfatos desde 2mM hasta 80 mM, con un intervalo de pH desde 5.0 hasta 8.0. Adicionalmente se probó con soluciones parecidas pero variando solo la presencia de PEG por la de MPD. Obteniéndose microcristales con distintas concentraciones de PEG 800 y solución reguladora de pH de fosfatos 20 mM, pH 5.5, pero aunque se utilizaron técnicas de macro y micro seeding, no se logró aumentar su tamaño. Se demostró que estos microcristales eran proteicos adicionándoles la solución *in situ*, pero no se demostró que existiera ADN acomplejado en la matriz cristalina.

Por otro lado, se utilizaron las matrices de Hampton Research 1 y 2, con los fragmentos de 4361, 4179, 3442, 3254, 2768, 1804, 1107 y 413 pb a una variedad de

concentraciones desde 1:1, hasta 10:1 ADN-Elastasa. Se intento reconstruir la interacción por medio del crecimiento de cristales, pero no se presentaron resultados en ninguna condición empleada.

3.2.6.1.1. Cristalografía de macromoléculas:

La cristalografía de proteínas, es una rama especializada de la cristalografía que investiga, utilizando técnicas de difracción sobre monocristales, la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas. Por largo tiempo, cristales de buena calidad sólo eran obtenidos de proteínas globulares, en nuestros días, otras macromoléculas biológicas como ARNt, polisacáridos y polinucleótidos, dan cristales que pueden ser analizados por técnicas de rayos X.

Partiendo del hecho, que los cristales de proteína han sido conocidos desde el principio del siglo XX, sólo alrededor de 1960 se elucidaron las primeras estructuras tridimensionales, la mioglobina y la hemoglobina. Su resolución fue posible principalmente debido al desarrollo de la técnica de remplazo isomórfico, desde entonces, avances técnicos y teóricos, han permitido el uso de dispersión anómala, reemplazo molecular, y el desarrollo de técnicas de oscilación en colectas de datos de cristales con celdas muy grandes. Al final de los años 70 el crecimiento del poder de las computadoras, hizo posible el refinamiento en espacio recíproco, al mismo tiempo, la introducción de poderosas estaciones gráficas, así como el desarrollo de programas gráficos interactivos, permitieron la rápida interpretación de mapas de densidad electrónica y la construcción de modelos teóricos. Sólo en los años recientes, se ha tenido la posibilidad de emplear radiación de sincrotron y detectores bidimensionales, que hacen de la colecta de datos un procedimiento relativamente rutinario.

El contenido de solvente hace la diferencia entre el clásico cristal molecular y el cristal de proteína. En el primero todos los átomos pueden ser descritos en términos de un ordenamiento regular, mientras que en el segundo el arreglo cristalino coexiste con una alta porción de moléculas en estado líquido. El líquido madre, que contiene entre un 30 y un 75 % de líquido, tiene una fuerte influencia en el entorno de este tipo de cristales, haciéndolos muy particulares y provocando algunas desventajas obvias. A diferencia de los cristales "secos", los cristales de macromoléculas biológicas, tienen una gran cantidad de material desordenado en su interior, mostrando una gran movilidad. Como consecuencia de esto, los datos de difracción no pueden ser medidos en la resolución lograda para moléculas "pequeñas". Por otro lado, a pesar de estas desventajas, el ambiente de las macromoléculas en el cristal no es muy diferente al estado completamente en solución del que la macromolécula es obtenida, por otro lado se aprovecha la alta cantidad de líquidos para difundir metales pesados, que permiten resolver el problema de fases.

El proceso de cristalización de una macromolécula es muy complejo y pobremente entendido. Un tratamiento teórico de este, ha presentado recientes progresos, pero es a la fecha aun obscuro. Como sea, mucha experiencia ha sido acumulada en la cristalización de proteínas solubles en agua (McPhearson, A, 1982), y si el cristalógrafo inicia con suficiente cantidad de material puro, tiene posibilidades razonables de obtener cristales de calidad para rayos X. Esto aun no se aplica a proteínas de membrana, de las cuales no se han obtenido muchas (Michel, H., 1983).

El crecimiento de un cristal de proteína, inicia de una solución supersaturada de la macromolécula, el cual es obligado a pasar a un estado termodinámicamente estable en que la proteína este repartida entre una fase sólida y otra en solución. El tiempo necesario antes de alcanzar este equilibrio, tiene gran influencia en los resultados finales, que pueden ir de un amorfo o un precipitado microcristalino, hasta un gran monocristal. Las condiciones de supersaturación pueden ser logradas con la adición de agentes precipitantes y/o por la modificación de alguno de los parámetros internos de la solución, como el pH y la temperatura. Debido a que una proteína es una molécula lábil, todas las condiciones extremas de precipitación, pH y temperatura deben evitarse. De hecho, el entendimiento de las propiedades biológicas y fisiológicas de las macromoléculas utilizando la determinación tridimensional es más simple, si los cristales crecen en condiciones no muy lejos del ambiente fisiológico en que opera la proteína.

Los precipitantes comúnmente usados pueden ser divididos en tres categorías: sales, solventes orgánicos y polietilenglicoles (PEG). De estos la forma en que actúan se puede resumir como sigue:

pH: El valor del pH tiene una fuerte influencia en la solubilidad, la cual tiene su mínimo cerca del punto isoeléctrico de la proteína.

Concentración de sal: La fuerza iónica puede tener efectos contrarios en la solubilidad de la proteína, por ejemplo la solubilidad decrece exponencialmente con el incremento de la fuerza iónica, un fenómeno conocido como **salting-out**, pero también tiene un mínimo a baja fuerza iónica, el efecto **salting-in**. En la práctica la precipitación puede lograrse por incremento de la concentración de sal o por diálisis de la solución de proteína contra agua.

Solventes orgánicos: Las propiedades precipitantes de los solventes orgánicos se debe a su doble efecto de sustraer moléculas de agua de la solución y de disminuir la constante dieléctrica del medio, por lo que pueden tener efectos sobre la conformación de la proteína, razón por la cual deben ser empleados con cuidado.

PEG: Los PEGs son agentes precipitantes con propiedades peculiares: son polímeros con pesos moleculares que van de 200 hasta 10000 Da, su efecto en la solubilidad, junto con algunas propiedades en común con sales y solventes orgánicos, es debida a su propiedad de volumen de exclusión, el solvente es reestructurado y la separación de fases promovida. Los PEGs son ampliamente utilizados y han demostrado trabajar con proteínas que no cristalizan otros agentes.

Muchos otros factores y parámetros pueden influenciar la cristalización: la concentración de proteína, la temperatura, la presencia de cationes (que en ocasiones estabilizan a las conformaciones) y la pureza de la muestra. La presencia de contaminantes es extremadamente importante y debe de ser observada para lograr cristales para difractar.

Recientemente se ha introducido una vieja idea con un nuevo enfoque, la cual consiste en generar gradientes dentro de un capilar que contenga la solución de proteína a pH y condiciones de fuerza iónica fijos y permitir que difunda el agente precipitante a traves de un gel que funciona de filtro y permite la formación de gradientes de concentración a lo

largo del tubo capilar, permitiendo explorar cientos de condiciones en un sólo paso y en caso de obtener el cristal ahorrar el paso de montaje del cristal.

Sea como sea sólo hay algo claro en la cristalización de macromoléculas, se requiere observar cuidadosamente lo que ocurra con cualquier método que se seleccione y posteriormente se debe ir modificando de una en una las distintas variables para lograr tarde o temprano el monocristal, para lo cual es también poderosísimo el uso de la dispersión dinámica de la luz con el objeto de conocer con claridad el comportamiento de nuestra macromolécula en solución.

Un número cada vez mayor de estudios estructurales se están realizando para identificar los principios que gobiernan los reconocimientos entre proteínas y ADN (Steitz, T. A., 1990). Estos trabajos dependen de la exitosa reconstrucción de los complejos proteína - ADN de sus componentes purificados. Tanto la cristalografía de rayos X como la RMN requieren grandes cantidades de proteína y ADN puros, los cuales pueden ser obtenidos por expresión en bacterias del ADN codificado en el caso de las proteínas, y por síntesis química en el laboratorio en el caso de pequeños fragmentos específicos de ADN.

La expresión de proteínas de interés en bacterias se ha convertido en una técnica muy popular, por ejemplo la combinación de cepas de *E. coli* BL21 transformada con el vector de expresión pET conteniendo un fuerte promotor de fagos adyacente al sitio de clonación (Dubendorff, J. W., 1991). Esta particular cepa de bacterias, puede integrar el gen de ARN polimerasa T7 con ayuda de IPTG (Studier, F. W., 1990). La selección del ADN blanco es fácil de dilucidar con el auxilio de técnicas como el "footprinting" de fragmentos marcados radioactivamente y que se encuentran unidos a la proteína de interés. Existen pequeños problemas técnicos para poder sintetizar secuencias de ADN de más de 50 pb en cantidades necesarias para realizar un estudio, pero se han desarrollado recientes avances que lo hacen posible. Se han realizado considerables progresos en la resolución tridimensional de complejos proteína - ADN (Steitz, T. A., 1990), en gran parte debido a que las proteínas, y más específicamente, sus dominios de unión a ADN son capaces de reconocer a una secuencia específica de ADN y formar complejos estables, de hecho complejos proteína - ADN han sido cristalizados conteniendo fragmentos de ADN tan cortos como 10 pb (Winkler, F. K., 1991)

3.2.7. Efecto del Tiempo en la Formación del Complejo Elastasa - pBR322:

En la formación del complejo monitoreado por dicroísmo circular, dispersión dinámica de la luz y fluorescencia, se observa que las lecturas no eran iguales si la mezcla se hacía en el momento de la medición, o si se preparaba la mezcla con un día de anterioridad, lo que nos indica que la formación del complejo posiblemente es dependiente del tiempo. Para mostrar este efecto se aprovecho que en el intervalo ultravioleta de 250 a 290 nm se encuentran los máximos de proteínas (aminoácidos aromáticos) a 280 nm y el de polinucleótidos a 260 nm, por lo que se realizó un barrido a tiempo cero de la mezcla formada por 0.45 mg de elastasa y 0.04 mg de pBR322 en 1ml de solución reguladora de

pH de Fosfatos 0.02 M, pH 5.5, en el intervalo de 250 a 290 nm, y posteriormente se repitió el barrido a las 12 horas.

3.2.8. Modelo del Acoplamiento ADN - Elastasa:

Una vez mostrada la existencia de una interacción inespecífica dependiente del tamaño entre fragmentos del ADN y La elastasa, decidimos mostrar un modelo que explicara los experimentos realizados. Para este fin se utilizó el programa GRAMM de acoplamiento automático de superficies obteniéndose un modelo preliminar que fue corregido manualmente con ayuda del programa O. Este modelo muestra que la interacción estaría mas favorecida en la zona opuesta al fragmento alfa terminal cerca del sitio activo, modificando la zona periférica del sitio activo y no bloqueándolo (figura 11-A).

La metodología del programa GRAMM (Global Range Molecular Matching) consiste en una aproximación empírica para "alisar" la función energética intramolecular modificando el intervalo de los potenciales atómicos. Esta metodología permite localizar el área de un grupo de mínimos globales de energía intermolecular para estructuras de diferente resolución.

3.3. RESULTADOS:

3.3.1. Obtención de Elastasa de Polimorfonucleares Humana y Elastasa Pancreática de Cerdo:

3.3.1.1. Purificación de la Elastasa de Polimorfonucleares: Tras extraer a la elastasa del esputo purulento y separar el ADN presente, la aplicación en la columna de permeación en gel nos permitió separar al menos 13 fracciones, de los cuales solo la fracción número 6 resulta con actividad elastolítica frente a rojo congo (figura 1-A).

Posteriormente la fracción número 6 fue dializada y aplicado a una columna de intercambio aniónico (ver métodos) con gradiente de NaCl del cual pudimos separar una fracción mayoritaria con actividad elastolítica (figura 1-B), el cual fue concentrado y aplicado a un gel de isoelectroenfoque, presentando al menos 9 isoformas en un intervalo de pH de 7 a 10 (figura 1-C). Esto es acorde con datos obtenidos por Twumasi (1977), el cual encontró 7 isoformas, pero a pesar de intentar separar estas fracciones con gradientes salinos cada vez menores en la misma columna de intercambio aniónico en HPLC, no se logro mas que separarlos en dos grupos uno de 6 y otro de 3 componentes todos con actividad elastolítica (datos no presentados).

MÉTODO	VOLUMEN (ml)	PROTEÍNA (mg/ml)	ACTIVIDAD (min)	PASOS DE PURIFICACIÓN
Esputo	150	12	30	1
Pp Fraccionada	40	5	19	8.7
Exclusión molecular	12	2.8	16	18
Intercambio Iónico	10	2	15.5	20

3.3.1.2. Selección de una Proteína modelo alterna a la Elastasa de Polimorfonucleares:

Tras realizar la búsqueda de secuencias depositadas en PDB y en SWISS-PROT, y seleccionar a 5est (ver métodos), el análisis de identidad en estructura primaria con elastasa de polimorfonucleares humana (pero de suero sanguíneo y no de esputo purulento), resulta en un 40 % de identidad en estructura primaria (tabla 1). Este dato nos permite suponer que las estructuras tridimensionales de ambas proteínas son idénticas, puesto que la sola presencia de un 25 % de homología entre estructuras primarias es suficiente para considerar a dos secuencias como miembros de la misma familia estructural (Horjales, E. comunicación personal). Aun así, y para probar esta premisa, se analizaron las coordenadas tridimensionales con ayuda de un método automático (DALI) y otro manual (O) resultados

en desviaciones de las cadenas principales en promedio de 1.4 Å y de 1.25Å. Lo que concluye la pertenencia de ambas proteínas a la misma familia estructural (figuras 2A y 2-B).

La distribución de cargas, potenciales electrostáticos, distribución de residuos hidrofóbicos e hidrofílicos y la posición de los sitios activos de ambas proteínas comprobó su equivalencia y aclaro que la zona cercana al sitio activo es mas afin entre ambas proteínas que el resto de las estructuras (figura 2-B). En cuanto al análisis de potenciales superficiales y carácter hidrofóbico o hidrofílico, se observo la plena complementaridad de ambas estructuras, resultando en general valido considerar que el área cercana al sitio activo de ambas proteínas (1hne y 5est) esta negativamente cargado, mientras el resto de las proteínas esta cargada positivamente (figuras 3-A y 3-B).

3.3.1.3. Purificación de Elastasa Pancreática de Cerdo: La purificación de elastasa pancreática de cerdo partiendo de la enzima comprada a SIGMA y ELASTIN PRODUCTS COMPANY, inicio con la aplicación a una columna de tamiz molecular Aca54 (ver métodos), el cual nos permitió localizar al menos 10 fracciones protéicos, de los cuales solo el fracción número 7 presenta actividad con ROJO - CONGO, por lo que se recirculó en la misma columna, con las mismas condiciones, pero modificando el volumen de colecta a 0.5 ml/tubo (figura 4-A). De esta primera recirculación, se separaron 14 fracciones de los cuales solo la fracción número 11 presentaba actividad elastolítica (figura 4-B), por lo que se recirculó por tercera vez esta fracción en la columna y se logro una fracción homogénea con actividad elastolítica presente (figura 4-C), el cual se congelo y se utilizó en el resto de los experimentos que se realizaron.

MÉTODO	VOLUMEN (ml)	PROTEÍNA (ml)	ACTIVIDAD (min)	PASOS DE PURIFICACIÓN
Frasco	5	10	23	1
Exclusión molecular 1	4	7	15	36
Exclusión molecular 2	4	6.6	14.9	38

3.3.1.4. Obtención de Oligonucleótidos: Tras seleccionar a pBR322 y transformar en *Escherichia coli* DH5 α , se multiplicaron las células transformadas y se extrajo a pBR322, finalmente se purifico al plásmido (ver métodos) y se inicio la linearización y obtención de oligonucleótidos de menor longitud. Para lo cual se utilizaron enzimas de restricción que nos permitieron obtener 21 distintos fragmentos a partir de pBR322.

Enzima de Restricción	Número de Cortes	Sitios de Corte en pBR322		Longitud de Secuencias	
Bam HI	1	375		4361pb	
Acc I	2	651	2244	1593 pb	2768 pb
Ban II	2	471	485	14pb	4347 pb

Bsr BI	2	2404	4205	1801 pb	2560 pb
Bsr DI	2	3420	3602	182 pb	4179 pb
Drd I	2	2162	2575	413 pb	3948 pb
Dsa I	2	528	1447	919 pb	3442 pb
Ear I	2	2351	4155	1804 pb	2557 pb
Enzima de Restricción	Número de Cortes	Sitios de Corte en pBR322		Longitud de Secuencias	
Eco 57I	2	3000	4048	1048 pb	3313 pb
Xmn I	2	2029	3961	1932 pb	2429 pb
Hinc II	2	651	3905	3254 pb	1107 pb

Longitud de Secuencia (pb)	Enzima de Restricción	Longitud de Secuencia (pb)	Enzima de Restricción
4361	Bam HI	1801	Bsr BI
4347	Ban II	1593	Acc I
4179	Bsr DI	1107	Bsr DI
3948	Drd I	1048	Eco 57I
3442	Dsa I	919	Dsa I
3313	Eco 57I	413	Drd I
3254	Hinc II	182	Bsr DI
2768	Acc I	14	Ban II
2560	Bsr BI		
2557	Ear I		
2429	Xmn I		
1932	Xmn I		
1804	Ear I		

De estos 21 distintos fragmentos del plásmido, se seleccionaron solo a 13 de estos, debido a que eran más representativos del posible efecto a distintas longitudes y al mismo tiempo retirando los de difícil purificación como el fragmento de 14 pb.

Longitud de Secuencia (pb)	Enzima de Restricción
4361	Bam HI
4179	Bsr DI
3442	Dsa I
3254	Hinc II
2768	Acc I
2557	Ear I
1932	Xmn I
1804	Ear I
1593	Acc I
1107	Hinc II
919	Dsa I

413	Drd I
182	Bsr DI

3.3.1.5. Efecto de la Adición de pBR322 linearizado sobre la Actividad Elastolítica de Elastasa Pancreática de Cerdo: Los resultados del tiempo necesario para digerir todo el rojo congo - elastina presente muestra que la adición de pBR322 linearizado reduce la actividad de la elastasa en un 40 % comparando elastasa pura con el experimento 1 (figura 5-A). Mientras que el efecto que tiene la longitud del ADN con la inhibición de la actividad, se probó utilizando los fragmentos de 4361, 3442, 2768, 1107 y 413, aumentándose su concentración y manteniendo fija la de elastasa (EPP).

El resultado de este experimento muestra que la adición de distintos fragmentos de pBR322 producen una disminución en la actividad de la elastasa (EPP), y que esta disminución está relacionada con la longitud de la secuencia, de hecho mientras que el fragmento de 4361pb en una relación de masa 1:10 (Fragmento de pBR322 - elastasa) produce un aumento en el tiempo para liberar al 50% de la elastina del 53%, el fragmento de 413pb aumenta el tiempo en 20%, también este experimento mostró que, si bien, la longitud del fragmento de ADN claramente repercute en la capacidad inhibitoria, no existe una diferencia significativa entre el efecto de los fragmentos de 413, 1107 y 2768pb, mientras que longitudes arriba de 3000pb aumentan claramente la inhibición (figura 5-A)

3.3.2. Medición de modificaciones en la estructura secundaria de la Elastasa Pancreática de Cerdo en contacto con oligonucleótidos.

3.3.2.1. Efecto de la Adición de pBR322 a Elastasa Pancreática de Cerdo por Espectrofotometría de Fluorescencia: La posibilidad de monitorear la interacción del polinucleótido con la superficie de la elastasa pancreática de cerdo se debe a la presencia de 15 fluoróforos (Trp y Tyr) en la superficie molecular de la proteína (Figura 12-A), a su vez la distribución de estos fluoróforos por toda la superficie molecular y no en lugares localizados, nos permite que este estudio, solo nos permita conocer si existe una interacción y no en que lugar específico se localiza. Para saber esto con ayuda de la Espectrofotometría de Fluorescencia, sería necesario marcar algunos de los fluoróforos con ayuda de mutagénesis dirigida o bien de marcado radioactivo selectivo.

Este experimento se realizó con el fragmento de 4361 pb y mostró que al ir aumentando la concentración del polinucleótido, la señal de los fluoróforos va disminuyendo, lo que nos permite asegurar que se forma una interacción entre el polinucleótido y la superficie de la enzima (figura 6-A). De hecho la adición de 0.08 mg/ml de pBR322 a una solución de 0.09 mg/ml de elastasa da lugar a una disminución del 18 % en la emisión de los fluoróforos. Lo que hace pensar en que pBR322 linearizado se une a puntos específicos de la superficie de la elastasa.

El efecto de la longitud del fragmento de ADN sobre el enmascaramiento de fluoróforos de Elastasa (EPP) se probó con los fragmentos de 3442, 2768, 1107 y 413, mostrándose un efecto menor en el enmascaramiento de fluoróforos, de hecho, la adición de 0.08 mg/ml del fragmento de 413 pb a una solución de 0.09 mg/ml de elastasa da lugar a una disminución del 10 % en la emisión de los fluoróforos (figura 6-B).

3.3.2.2. Efecto de la Adición de pBR322 a Elastasa Pancreática de Cerdo por Dicroísmo Circular: El resultado del primer efecto (adición de pBR322 a elastasa) nos muestra fuertes modificaciones en la estructura secundaria de la elastasa con la adición de pBR322, mientras que el segundo efecto muestra también modificaciones de la estructura de pBR322 en presencia de elastasa, lo que habla de que tanto pBR322 linearizado modifica la estructura tridimensional de la Elastasa (EPP), como la Elastasa modifica a la estructura de pBR322 linearizado.

Para probar el efecto de la longitud de la cadena de oligonucleótidos sobre la estructura secundaria de la proteína se seleccionaron a 8 fragmentos, estos muestran una relación AT : GC constante, lo que evita la presencia de la variable composición y limita el experimento a la variable longitud de los polinucleótidos.

Fragmento (pb)	% A	% C	% G	% T
4361	23.12	26.88	26.88	23.12
4179	23.07	26.92	26.92	23.07
3442	24.15	25.84	25.84	24.15
3254	22.71	27.28	27.28	22.71
2768	24.41	25.58	25.58	24.41
1804	24.86	25.13	25.13	24.86
1107	24.32	25.67	25.67	24.32
413	21.73	28.26	28.26	21.73

El efecto de la longitud del fragmento de pBR322 sobre la modificación de la estructura de la Elastasa (EPP) fue medido con los fragmentos de 4361, 4179, 3442, 3254, 2768, 1804, 1107 y 413 pb, mostrándose una dependencia que muestra modificaciones fuertes en la estructura de la Elastasa con la adición de fragmentos de arriba de 4000 pb, moderada en el intervalo de 1000 a 4000 pb, y baja con fragmentos menores a 100 pb (figura 7-B).

Con el fin de mostrar si el efecto estructural de la adición de fragmentos de ADN sobre la Elastasa (EPP) eran generales o particulares, se repitieron los experimentos de pBR322 linearizado pero con taumatina, puesto que presenta una estructura mayoritariamente beta plegada (tal como Elastasa) y quimotripsina, perteneciente a la misma familia estructural de la elastasa (figura 11-B). Mostrándose un efecto nulo sobre la

estructura de estas proteínas al adicionar pBR322 linearizado (todos los experimentos de DC se realizaron con 4 espectros promediados).

Para mostrar si el efecto de modificación estructural de Elastasa con ADN es producido por cualquier especie aniónica (recordar que el ADN es fuertemente negativo por la presencia de los grupos fosfatos), se experimento con el aumento de la concentración de iones fosfato sobre la estructura de la Elastasa, mostrando un efecto nulo (figuras 8-B).

3.3.2.3. Efecto de la Adición de pBR322 a Elastasa Pancreática de Cerdo por Infrarrojo con Transformada de Fourier: Este experimento mostró que el fragmento linearizado de pBR322 modifica la señal de la proteína sola en el intervalo de 1750 a 1600 cm^{-1} , la modificación en el espectro (figura 9-A), demuestra que la adición de ADN modifica la estructura secundaria de la elastasa a un nuevo acomodo, el cual se mantiene con la adición de distintas cantidades de ADN, este nuevo acomodo presenta un máximo en la zona de 1665 a 1660 cm^{-1} (figura 9-A)(B), lo que nos hace pensar que posiblemente la adición de ADN aumenta el empaquetamiento de la estructura favoreciendo un aumento de la señal de estructura beta, tanto β -plegada como vuelta β , lo que en el caso de la Elastasa nos aclara que la interacción ADN Elastasa no se realiza en la zona alfa del amino terminal. Por otro lado hay otra modificación en la zona de 1700 a 1725 cm^{-1} (figura 9-A)(A), ya que el espectro nativo presenta una pendiente positiva, mientras que la adición de ADN produce un mínimo y un aumento en dirección 1725 a 1750 cm^{-1} , lo que puede significar un aumento también de la estabilización de estructuras beta (Kyte, J., 1995).

3.3.3. Valoración sobre la existencia de agregados en solución:

3.3.3.1. Efecto de la Adición de pBR322 a Elastasa Pancreática de Cerdo por el método de Dispersión Dinámica de la Luz (DDL): Los resultados de los experimentos muestran la aparición y crecimiento de un agregado molecular con aumento en la polidispersidad con relación al aumento en el ADN y el crecimiento del mismo con tendencia a continuar su crecimiento con relación al aumento de la concentración de ADN. El aumento de la polidispersidad tiende a estacionándose en aproximadamente 40 nm, mientras el radio hidrodinámico se mantiene al final en 37 nm. Este experimento también se realizó con fragmentos de 3442, 2768, 1107 y 413, mostrándose la existencia en todos los casos de especies polidispersas de tamaños moleculares decrecientes con relación al tamaño del fragmento de pBR322 adicionado (figura 9-B).

Además se puede concluir con relación al aumento del peso molecular de los agregados, que se forman redes entre el ADN y las moléculas de elastasa (figura 9-A), ya que entre más ADN este presente mayor peso molecular presentan los agregados detectados, y mayor también su polidispersidad, lo que nos habla de que las interacciones son inespecíficas, ya que los agregados formados no presentan un tamaño uniforme.

3.3.4. Reconstrucción cristalográfica del complejo Elastasa Pancreática de Cerdo y oligonucleótidos.

3.3.4.1. Cristalización del Complejo Elastasa - pBR322: Tras explorar condiciones con distintos PEG y MPD, se logro encontrar microcristales proteicos con distintas concentraciones de PEG 800 y regulador de fosfatos 20 mM, pH 5.5, pero aunque se utilizaron técnicas de macro y micro seeding, no se logro aumentar su tamaño. Aunque no se pudo colocar estos cristales en el difractor, lo que nos impidió saber si existe o no la interacción, al menos por este método. Es interesante mencionar que el microcristal obtenido solo se logro con el fragmento de 4361 pb mientras que las pruebas con los demás polinucleótidos no resultan en ningún cristal. Esto nos puede hacer pensar que o bien, solo se puede formar un cristal con el fragmento de 4361 pd, debido a que es favorecido energéticamente al resto o bien, que en realidad el microcristal obtenido no es un complejo, sino la proteína nativa. Desafortunadamente solo podemos especular en este tema.

3.3.5. Efecto del Tiempo en la Formación del Complejo Elastasa - pBR322: El resultado del experimento muestra que a tiempo cero existen dos especies, una que absorbe a 257 nm (pBR322) y otra que lo hace a 279 nm (elastasa), mientras que el barrido a la 6 horas muestra una sola especie que absorbe a 275 nm (figura 10-A).

Por otro lado, si el complejo formado a las 6 horas es sometido a agitación por mas de 1 minuto genera a las especies iniciales, y a las 6 horas se regenera el complejo. Por lo que este experimento muestra la dependencia del tiempo para la formación del complejo, y la formación de una sola especie a partir de los dos constituyentes originales (figura 10-B).

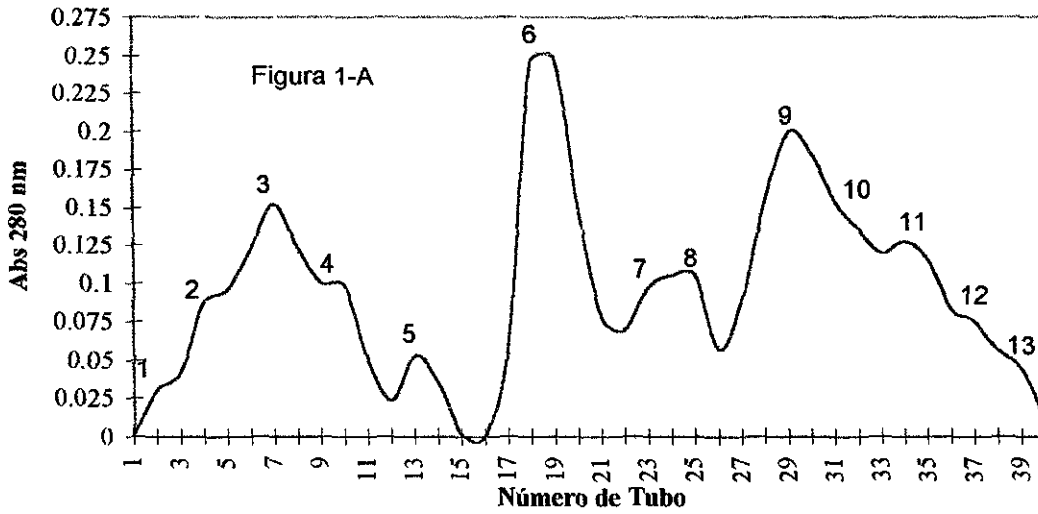
La posibilidad de que el efecto observado sea debido a la sedimentación de especies pesadas (complejos ADN-Elastasa) y no a la disociación de los complejos formados es anulada por el hecho de que la concentración tanto de proteína como de oligonucleótidos tras la agitación es idéntica a la original, lo que impide afirmar que parte de esta masa se encuentra sedimentada en el fondo del tubo.

3.3.6. Modelo del Acoplamiento ADN - Elastasa: Este modelo muestra que la interacción estaría mas favorecida en la zona opuesta al fragmento alfa terminal cerca del sitio activo, modificando la zona periférica del sitio activo y no bloqueándolo (figura 11-A). Lo que es perfectamente compatible con nuestros resultados que muestran una reducción en la actividad y no una inhibición completa de la enzima en presencia de polinucleótidos. Pero no aclara nada sobre el efecto de la longitud del ADN.

3.3.7. Efecto de la Adición de Elastasa a un Gel de Agarosa: La adición de EPP al polinucleótido de 4361 pb en un gel de electroforesis de agarosa, propio para medir el tamaño de polinucleótidos, mostró que la adición de EPP al fragmento de 4361 pb produce un retardamiento en la velocidad de corrida del polinucleótido, lo que nos permite concluir

que se forma un agregado molecular que por su tamaño no puede entrar en la matriz del gel (figura 7-B). Estos resultados se explican pensando en que el ADN y las moléculas de elastasa forman redes que impiden la entrada a la matriz de agarosa, y es acorde a los resultados encontrados en *DDL*.

Perfil cromatográfico en columna de Tamiz molecular de EPMNH



Perfil de elución en columna de Intercambio Anionico de EPMNH

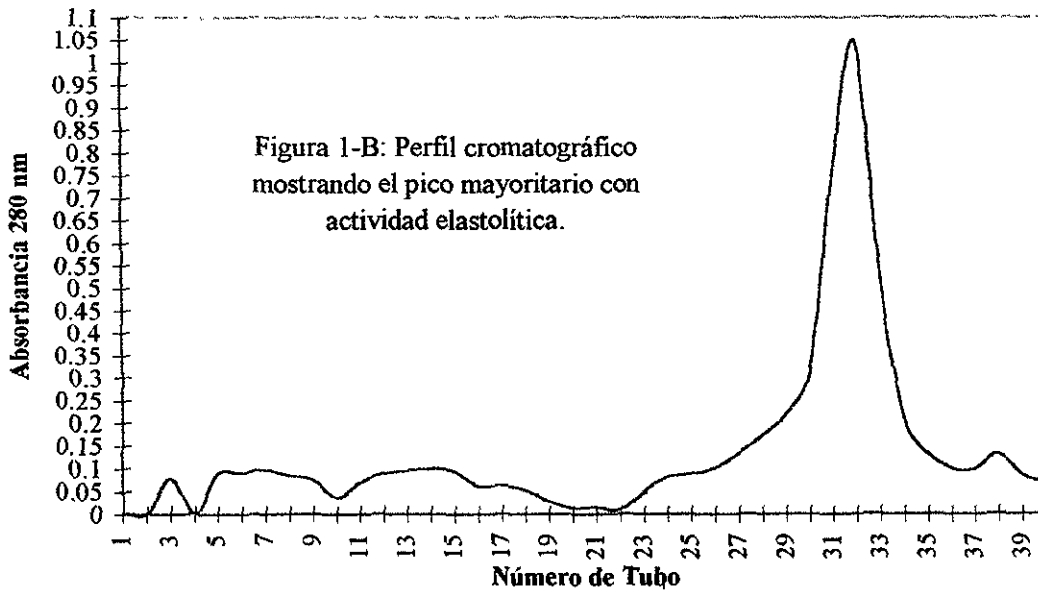
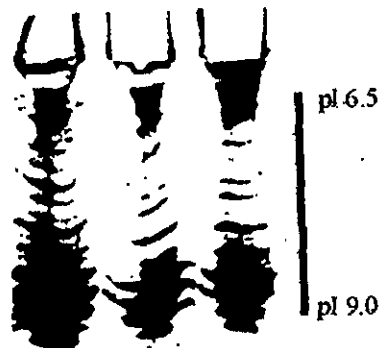


Figura 1-B: Perfil cromatográfico mostrando el pico mayoritario con actividad elastolítica.

Gel de enfoque isoelectrico

Carril1 Carril2 Carril3

Figura 1-C



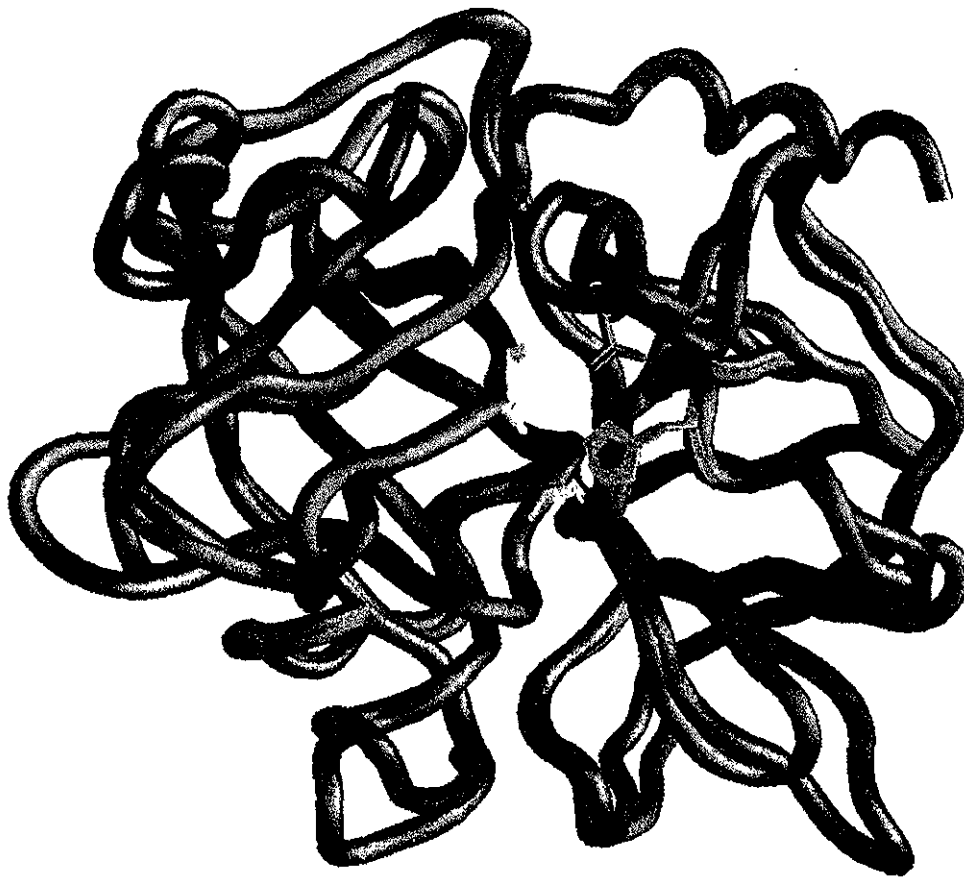


Figura 2-A: Superposición de cadenas principales de 1hne (elastasa humana – azul marino) y 5est (elastasa de cerdo – rojo)



Figura 2-B: Acercamiento al sitio activo, mostrando plena complementariedad estructural (residuos catalíticos: His 57 – verde, Asp102 - magenta, Ser 195 - amarillo y Ser 214 – azul)

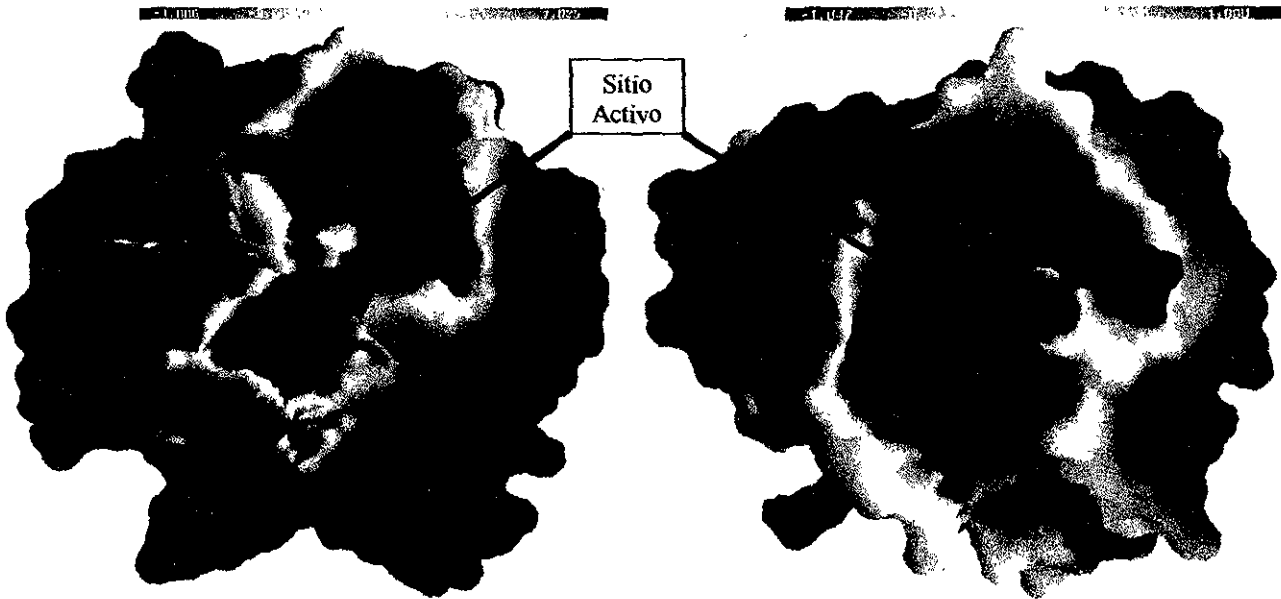


Figura 3-A: Potencial electrostatico de Elastasa Pancreatica de Cerdo (derecha) y Elastasa Humana (izquierda).

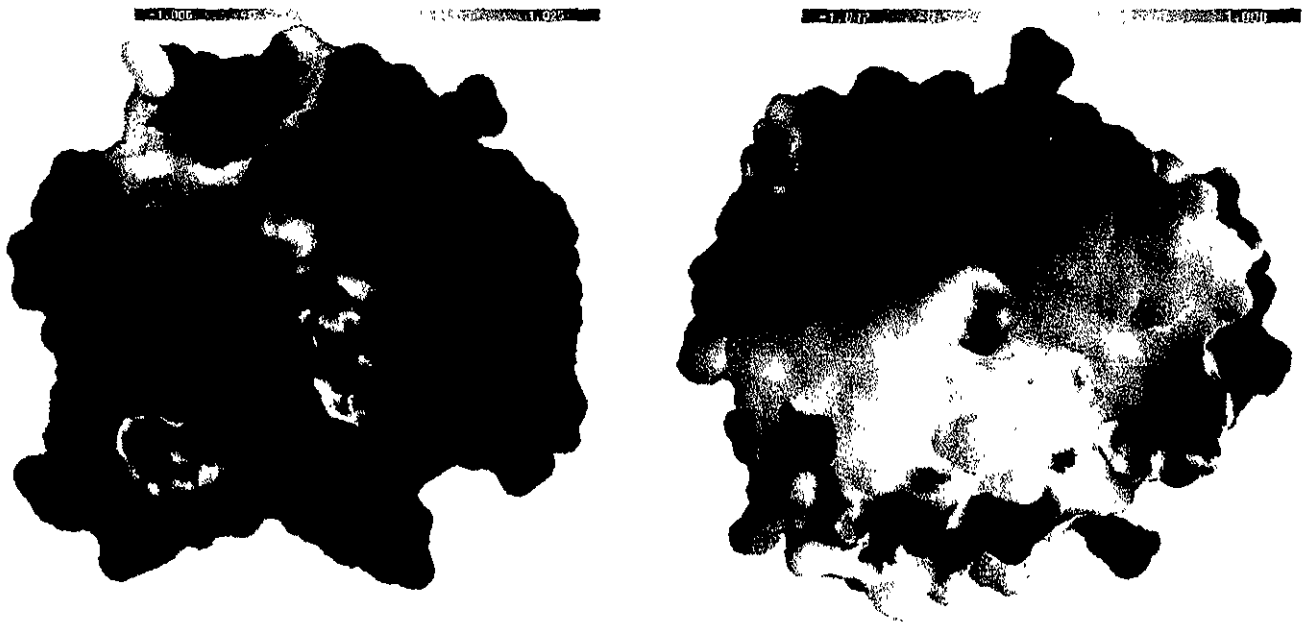
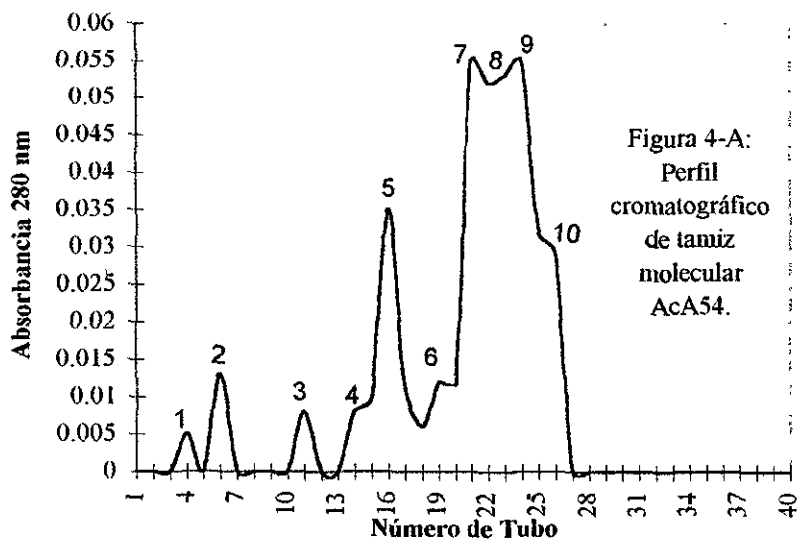
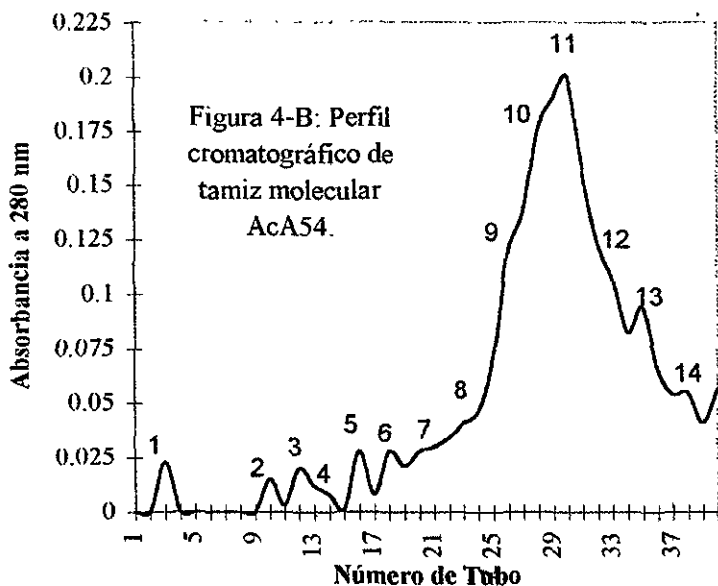


Figura 3_B: Potencial electrostatico de Elastasa Pancreatica de Cerdo (derecha) y Elastasa Humana (izquierda) (rotacion de 180 °).

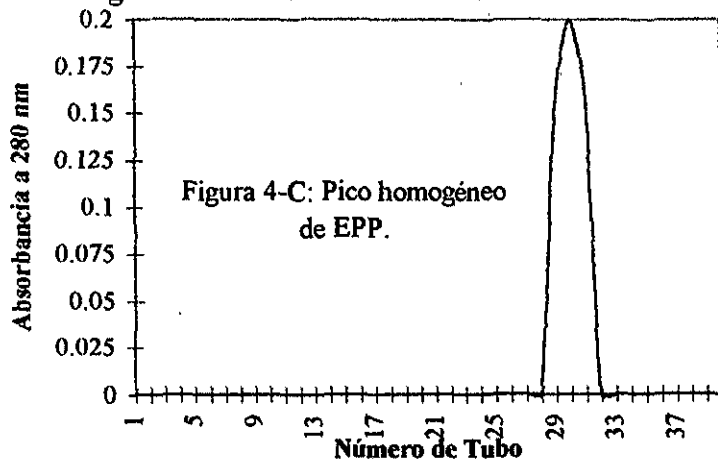
Tamiz molecular de EPP comercial



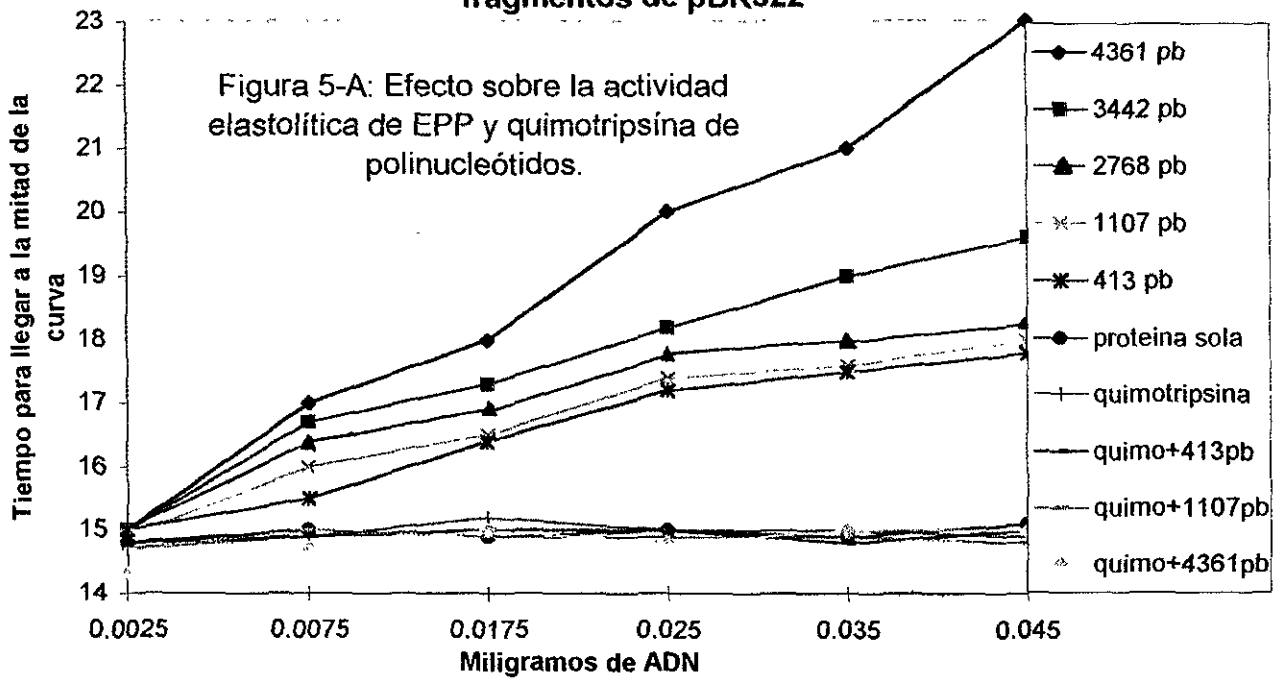
Primera Recirculación de EPP en Tamiz molecular.



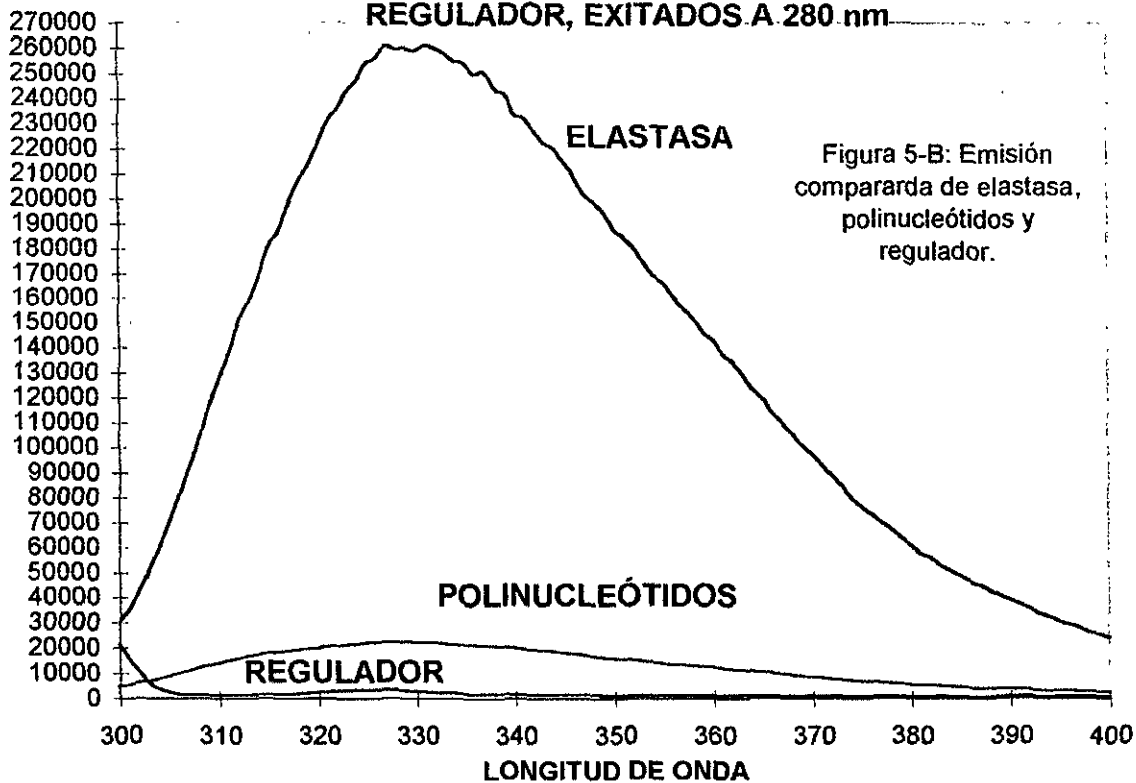
Segunda Recirculación de EPP en Tamiz molecular.



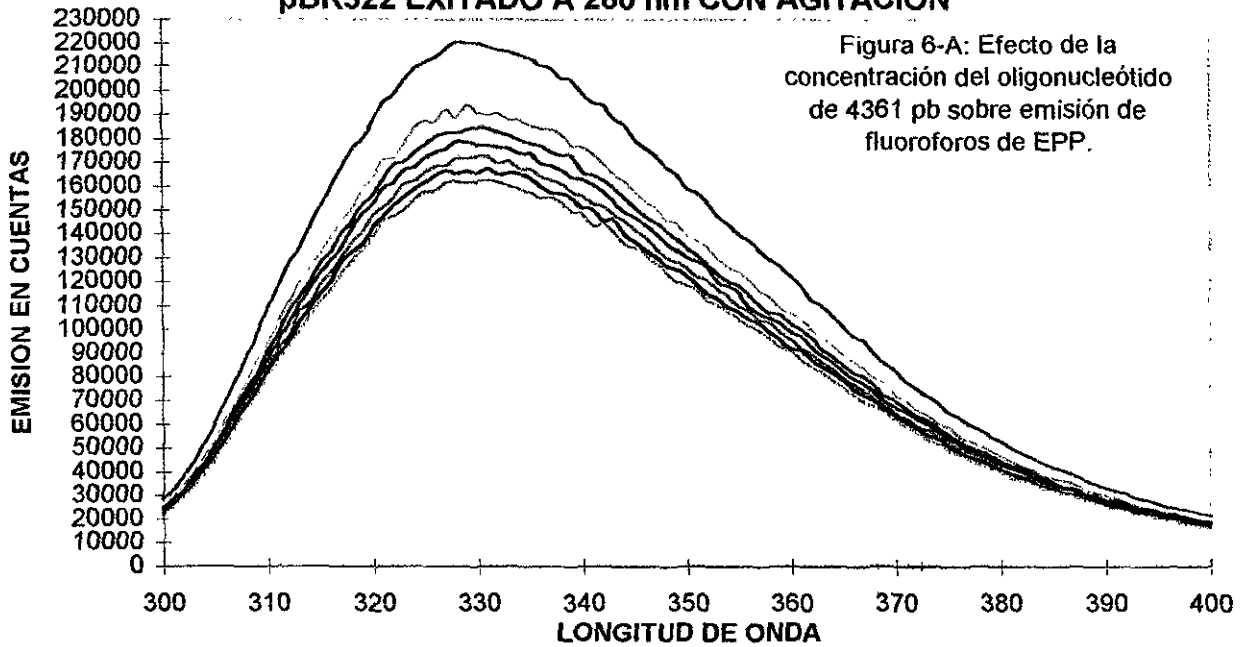
Efecto sobre la Actividad de Elastasa (EPP) y Quimotripsina de fragmentos de pBR322



EMISION COMPARADA DE ELASTASA, POLINUCLEÓTIDOS Y REGULADOR, EXITADOS A 280 nm



**EFFECTO EN LA EMISION DE ELASTASA CON LA ADICION DE
pBR322 EXITADO A 280 nm CON AGITACION**



**EFFECTO EN LA EMISION DE ELASTASA CON LA ADICION DE
POLINUCLEOTIDOS DE 3442, 2768 Y 1107 pb EXITADOS A 280 nm
CON AGITACION**

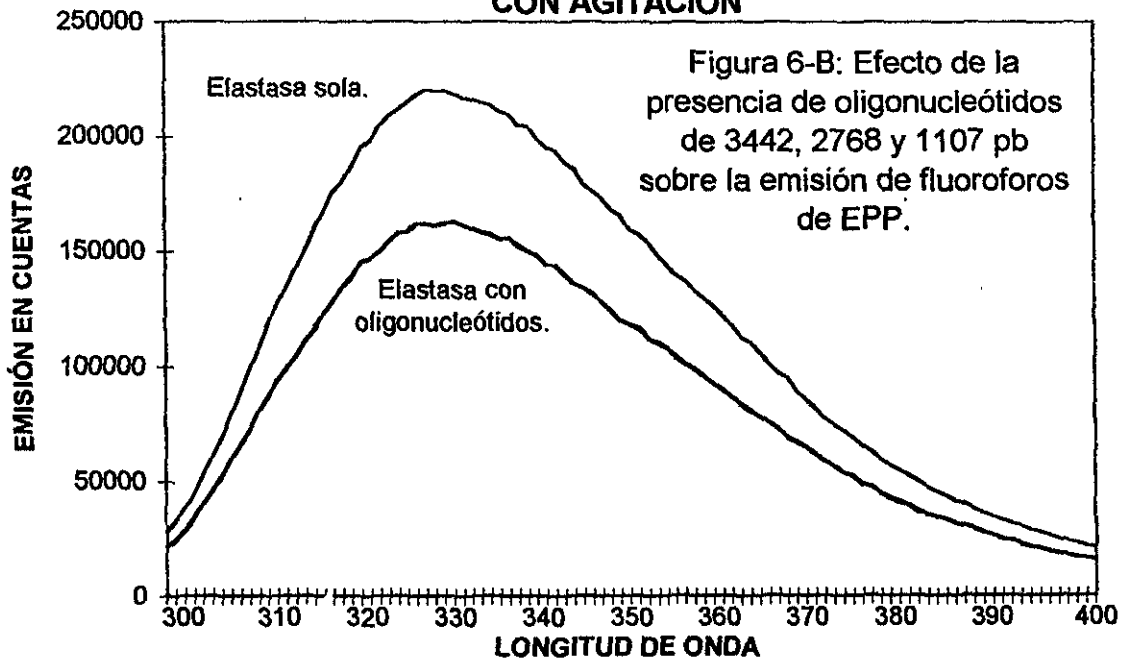
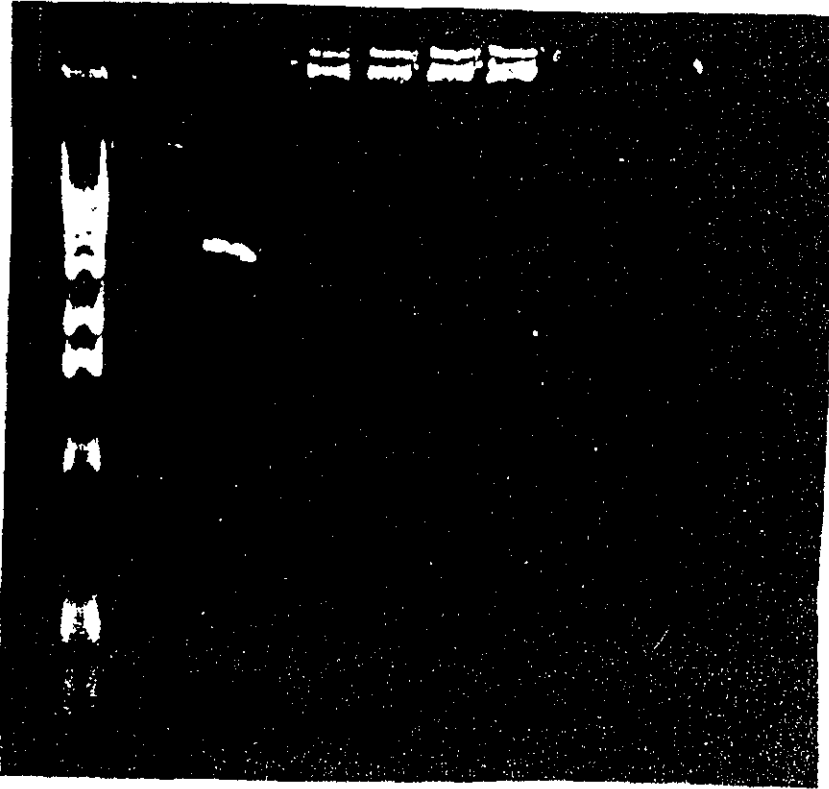
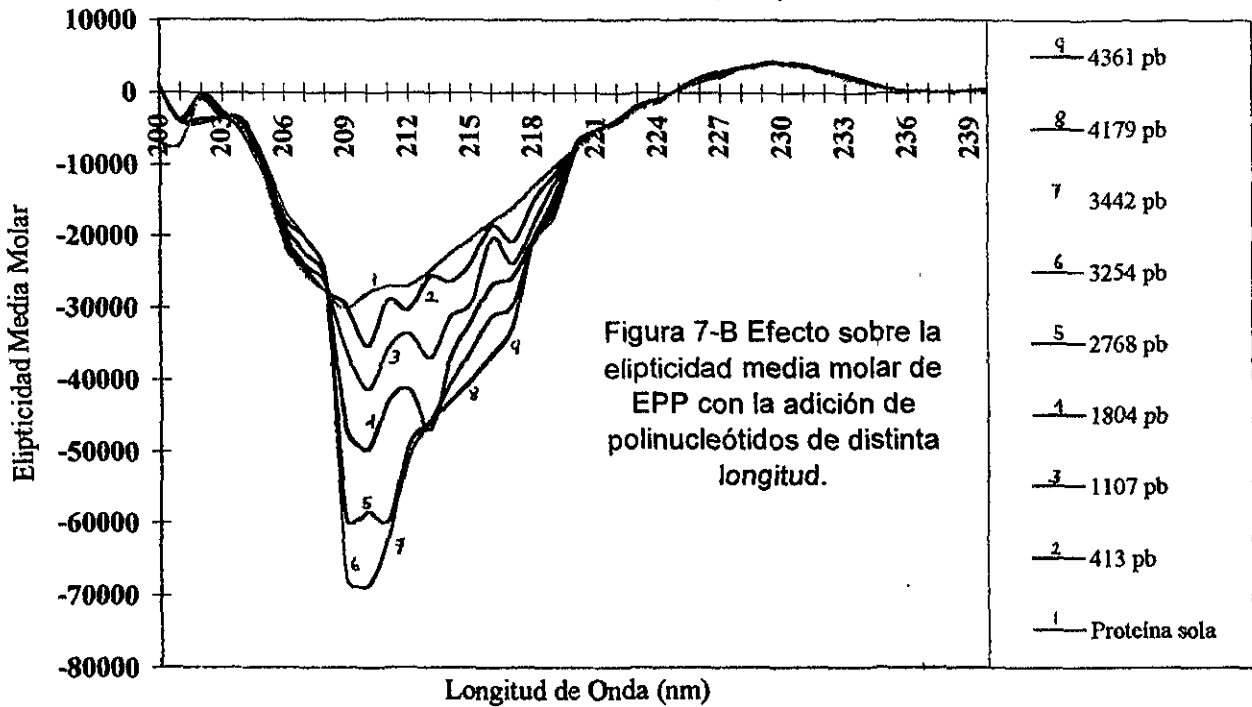


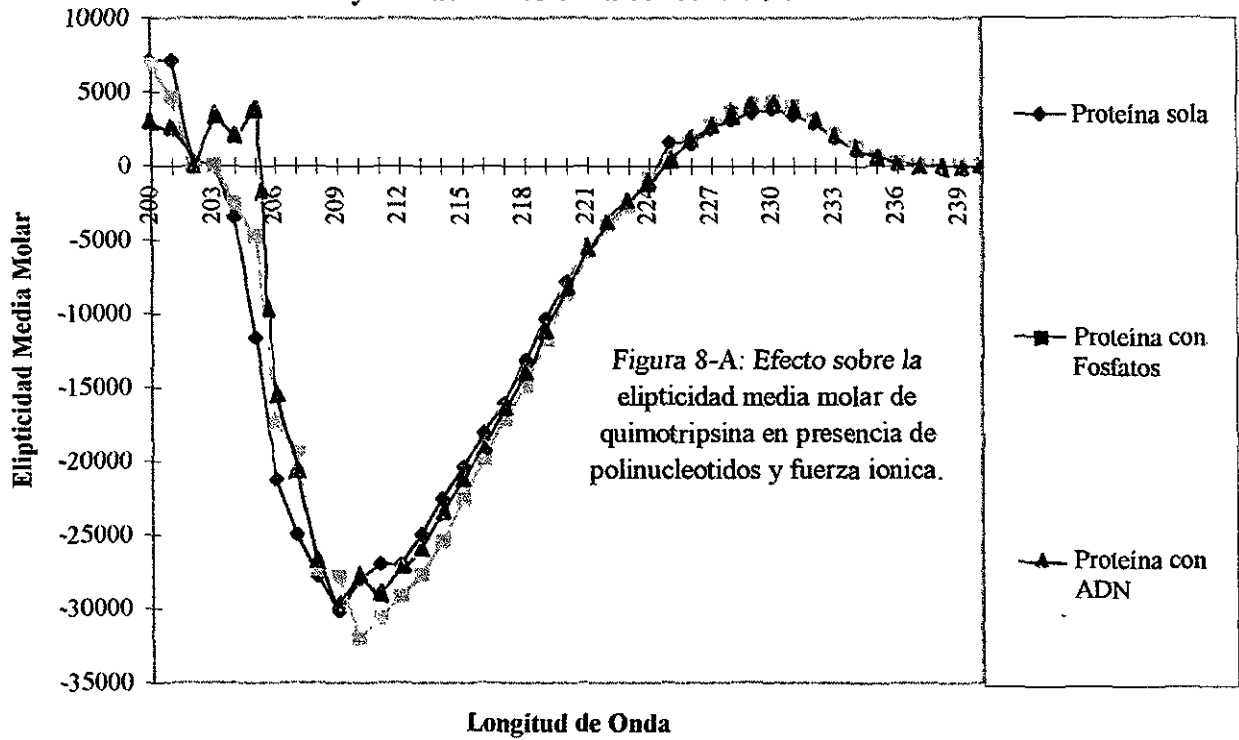
Figura 7-A: Gel de tamaño molecular nativo.



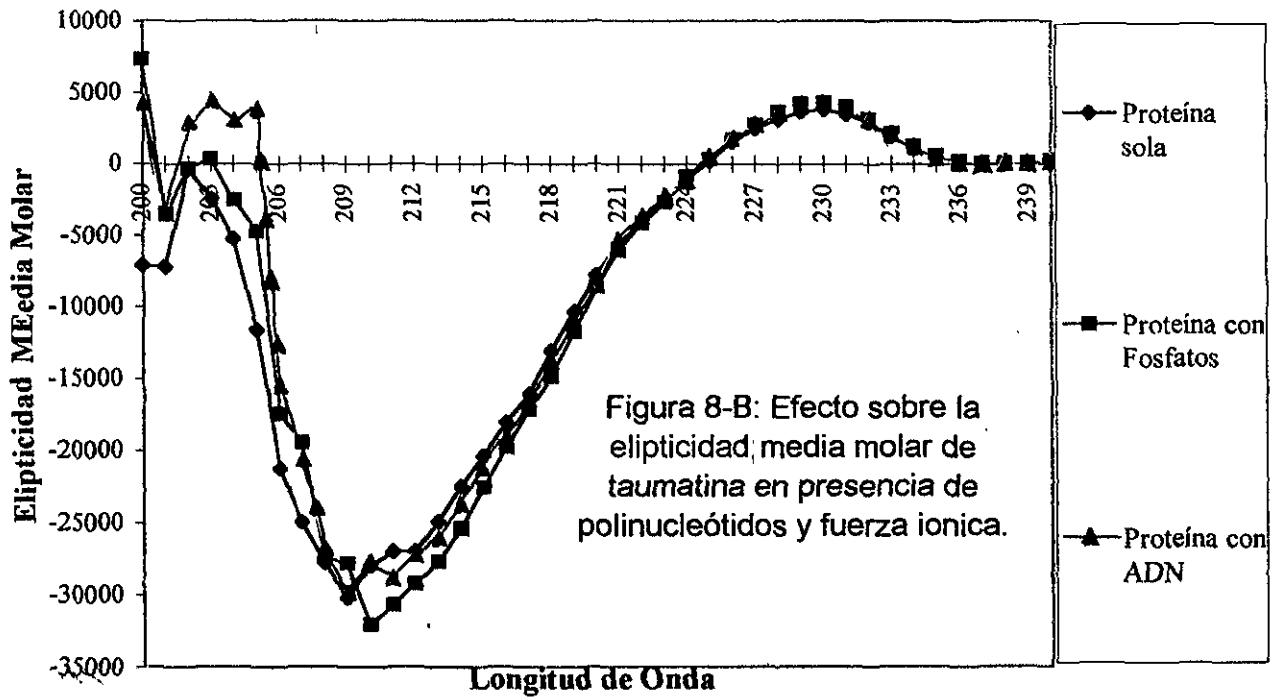
Efecto estructural de la longitud del fragmento del oligonucleótido sobre elastasa (EPP)

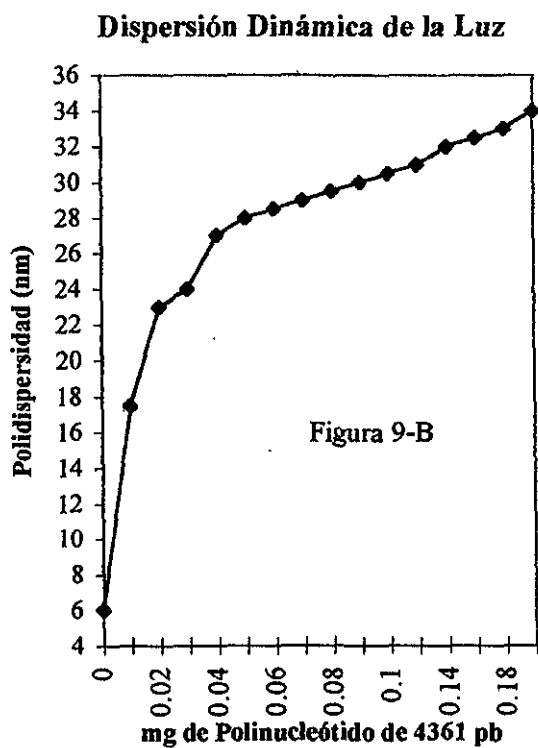
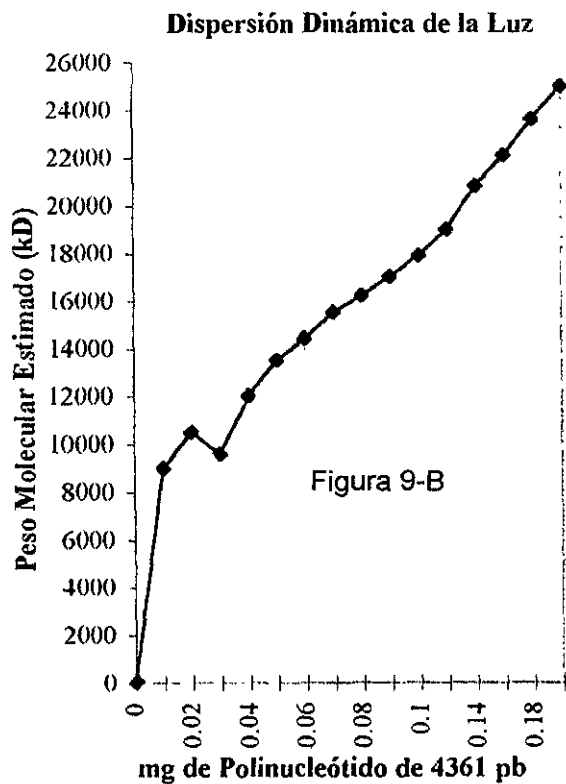
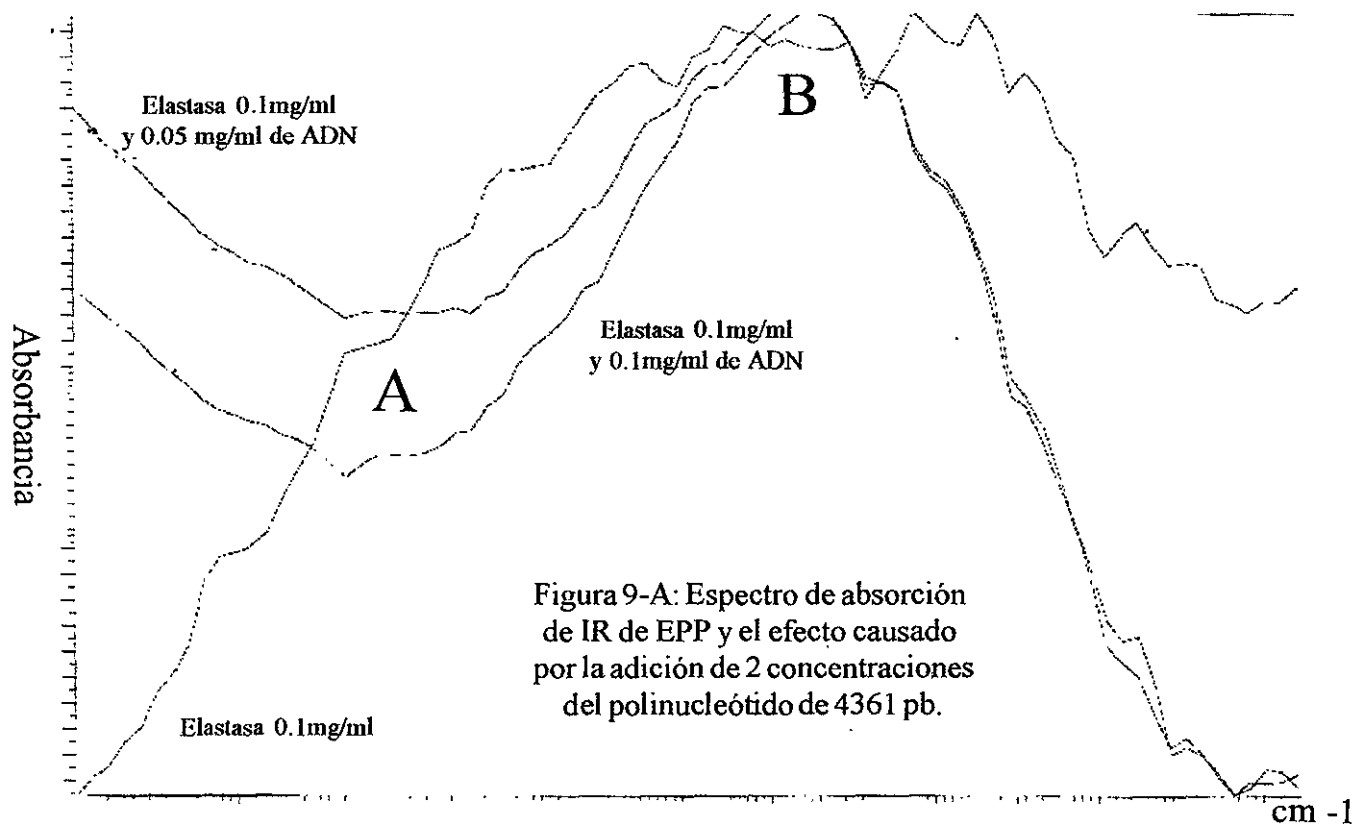


**Efecto de Quimotripsina sola, con aumento en la concentración de fosfatos
y con aumento en la concentración de ADN.**

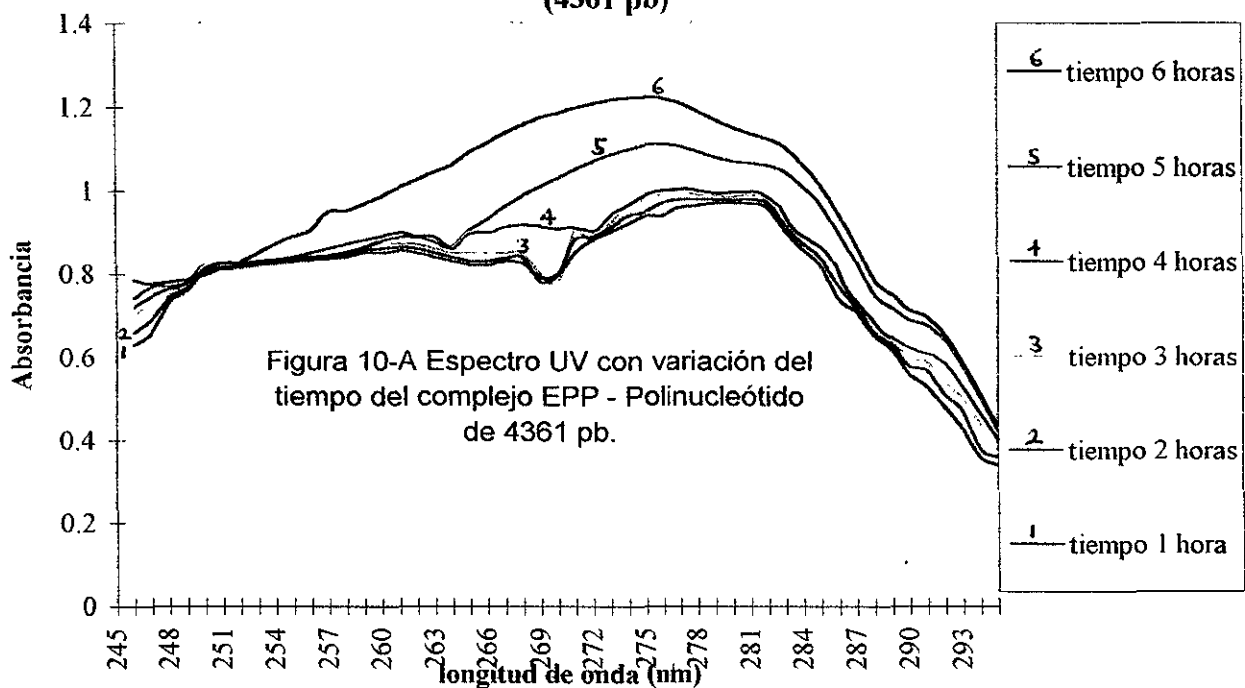


**Efecto de Taumatina sola, con aumento en la concentración de fosfatos y
con aumento en la concentración de ADN**

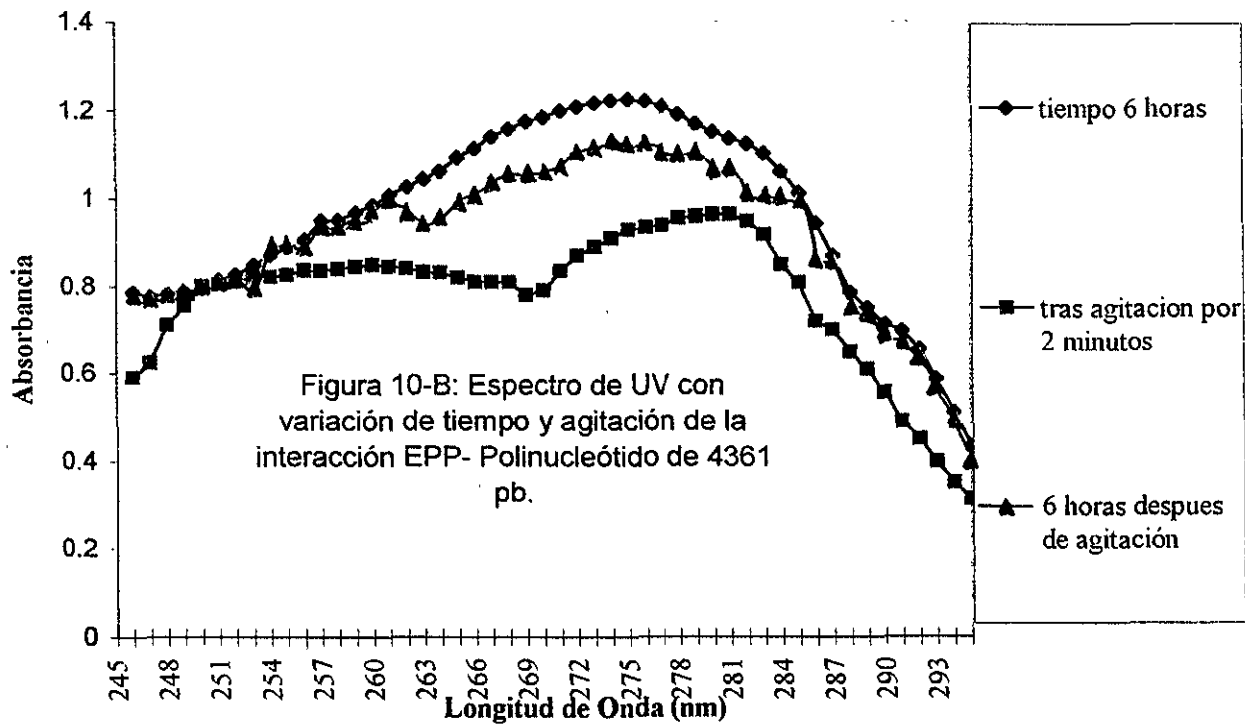




**Efecto del tiempo en la Formación del complejo Elastasa - Polinucleótidos
(4361 pb)**



Estabilidad de la interacción PBR322 (linearizado) - elastasa (EPP)



**SITIO
ACTIVO**

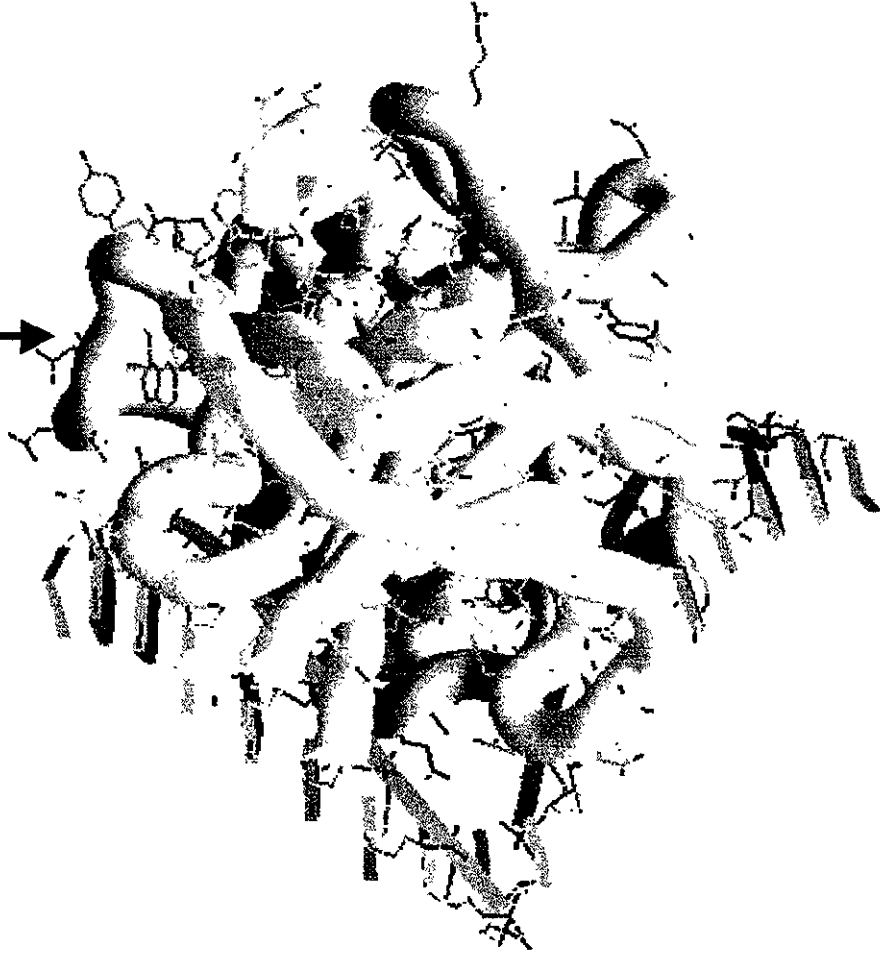


Figura 11-A: Modelo tridimensional del acoplamiento teórico (GRAMM) propuesto entre ADN (solo se muestra una hebra) y elastasa pancreática de puerco.



Figura 11-B: Estructura tridimensionales de Taumatococcus, Elastasa Pancreática de Cerdo y Quimiotripsina.



Figura 12-A: Elastasa pancreática de cerdo mostrando Trp (magenta) y Tyr (verde) (las dos figuras tienen 180° de rotación entre sí).

Alineamiento de Elastasa Pancreática de Puerco (5EST) con Elastasa de Polimorfonuclear Humana (1HNE).

Identities = 95/237 (40%), Positivas = 129/237(54%)

```

5EST: 1 VVGGTEAQRNSWESQISLQYRSGSSWAHTCGGTLIRQNVWMTAAHCVDRE--LTFRVVVG 58
      +VGG A+ ++WP +SLQ R G H CG TLI N+VM+AAHCV RVV+G
1HNE: 1 IVGGRRARFHAWPFMVSLQERGG----HFCCATLIAPNFVMSAAHCVANVNVRAVRVVLG 56

5EST: 59 EHNLNQNDGTEQYVGVQKIVVHPYWNITDDVAAGYDIALRLAQSVTLNSYVQLGVLPRAG 118
      HNL++ + T Q VQ+I Y D V DI +L+L S T+N+ VQ+ LP G
1HNE: 57 AHNLSRREPTROVFAVQRI FEDGY---DPVNLNDIVILQLNGSATINANVOVAQLPAQG 113

5EST: 119 TILANNSPCYITGWGLIRINGOLAQTLOCAVLPYDVAICSSSSYWGSTVKNSMVCAGGD 178
      L N C GWGL N +A LQ+ + TV ++C + S VC
1HNE: 114 RRLNGVQCLAMGWLLGRNRG IASVLEQLNV-TVVTSLC-----RRSNVCTLVR 162

5EST: 179 GVRSG-CQGDSCGFLHCLVNGQYAVHGVTSFVSRIGCNVTRKPTVFTVRSAYISWINNVI 237
      G ++G C GDSG PL C NG +HG+ SFV R GC P F V+ +++WI+++I
1HNE: 163 GRQAGVCFGDSGSELVC--NG--LIHG IASFV-RGGCASGLYPDAFAPVAQFVNWIDSII 217
  
```

Tabla I: Superposición de estructuras primarias de elastasa humana (1HNE) y elastasa pancreática de cerdo (5EST).

ESTA TERCERA NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

3.4. DISCUSION:

La primera etapa de este trabajo de tesis consistió en demostrar la existencia de un modelo de estudio de fácil acceso que permitiera extrapolar los datos clínicos del sistema elastasa humana de polimorfonucleares (EPMNH) - esputo de pacientes con fibrosis quística, debido fundamentalmente a los problemas que se presentaron en la purificación de la enzima a partir del esputo purulento de enfermos con fibrosis quística. Como se recordara, el sistema esputo purulento humano presenta un aumento sustancial en la concentración de enzimas provenientes tanto de la lisis de leucocitos como de la lisis bacteriana. En particular el sistema EPMNH presenta una fuerte actividad que favorece el incremento en la lisis general y el aumento de la concentración de material intracelular atrapado en la red mucosa del esputo, de manera importante la concentración de ADN se incrementa 20 veces y esto produce el doble efecto de aumentar las características viscoelásticas del esputo y la inhibición de la EPMNH. Al tratar de purificar a la EPMNH nos enfrentamos al problema de encontrar 7 isoenzimas las cuales no pudieron ser separadas unas de otras, por lo que se decidió encontrar un modelo de estudio, las búsquedas en el PDB y SWISS-PROT nos hicieron pensar en la posibilidad de utilizar elastasa pancreática de puerco (EPP). La sobreposición de la estructura primaria de ambas proteínas (1hne y 5est) mostró una identidad en secuencias del 40% con el programa de alineación PRODOM, mientras que el programa BLAST presento una identidad de 40% y 54% de aminoácidos intercambiables. Dado que la sobreposición de estructuras primarias mostró una relativa baja identidad se procedió a analizar la sobreposición tridimensional de las proteínas depositadas en PDB, 1hne y 5est. El programa DALI mostró que la superposición de estructuras terciarias era posible dando un valor de RMS entre cadenas primarias de 1.4 Å. El programa O mostró un RMS de superposición de 1.25 Å, por lo que el doblado tridimensional es perfectamente equivalente entre ambas proteínas. En particular el alineamiento tridimensional y de estructura primaria en un círculo de 20 Å de radio a partir del sitio activo es del 90%, con los 4 aminoácidos del sitio activo perfectamente sobrepuestos.

El análisis superficial de cargas de ambas proteínas (1hne y 5est) realizado con el programa GRASP y con el modulo DELPHI de InsightII nos muestran que en consenso existe una región de cargas negativas alrededor del sitio activo de ambas proteínas y que se extiende a lo largo de toda la cara del sitio activo, formando un canal de aproximadamente 60 x 20 Å, mientras que el resto de la proteína esta fundamentalmente cargada positivamente, este análisis nos permite concluir que las características electrostáticas superficiales de ambas proteínas son equivalentes entre si.

Con la seguridad de que el modelo de estudio (5est) es equivalente a la proteína EPMNH, se procedió a analizar el efecto que presenta la actividad de EPP al adicionar ADN, mostrándose que existe una inhibición de la actividad sobre rojo congo elastina proporcional tanto a la concentración como a la longitud del polinucleótido adicionado, la inhibición es acorde con los datos obtenidos de EPMNH, por lo que se decide que el sistema EPP es adecuado para extrapolar al sistema humano.

Los estudios de dispersión dinámica de la luz realizados mostraron que nunca se lograba una especie monodispersa a pesar de modificar tanto la concentración de EPP como la concentración y longitud de los fragmentos de ADN, así como los pH del sistema, lo que nos habla de la coexistencia de distintos complejos, tanto en tamaño como en especificidad. Esto origina una teoría de unión inespecífica ADN - EPP que se apoya en el hecho de que los experimentos de espectrofotometría de fluorescencia muestran un enmascaramiento de los fluoróforos superficiales de EPP (Trp), lo que significa que existe una interacción entre los distintos fragmentos de ADN y la superficie de la EPP. Los experimentos de dicroísmo circular apoyan la existencia del complejo y además nos permitieron concluir que no es un fenómeno extensible a todas las proteínas mayoritariamente beta (Taumatina), ni incluso a las restantes proteínas de la familia de la elastasa (Quimiotripsina) y mucho menos un efecto de la concentración iónica (exceso de fosfatos). Estos experimentos también mostraron que existe un aumento en la elipticidad molar media de la elastasa en el intervalo de 208 a 220 nm, al adicionar distintos fragmentos de ADN, lo que significa que la modificación se presenta fundamentalmente en la estructura beta de la proteína.

Por otro lado los experimentos de dicroísmo circular muestran que la modificación en la estructura secundaria de la EPP es relativa a la longitud de secuencia de los fragmentos de ADN, ya que fragmentos de arriba de 3000 pb modifican fuertemente a la estructura, mientras que fragmentos menores a 1000 pb parecen no tener un efecto importante en la estructura secundaria de la EPP, estos resultados aunados al hecho de que la actividad elastolítica de EPP se ve afectada fuertemente por fragmentos de arriba de 4000 pb y moderadamente por fragmentos en el intervalo de 400 a 3500 pb ,nos permiten concluir que existe una interacción EPP - ADN relacionada al tamaño del fragmento de ADN, y que fragmentos por abajo de 500 pb no modifican substancialmente la estructura secundaria de EPP, pero si producen inhibición de la actividad elastolítica.

También se demostró que la modificación estructural es ambivalente en el sistema ADN - EPP, ya que tanto EPP como ADN presentan alteración en la señal estructural secundaria en presencia de la otra.

Los experimentos de barrido uv nos mostraron que la formación de la interacción es dependiente del tiempo y de una baja energía, ya que una simple agitación volvió al sistema a los componentes originales separados, esto esta de acuerdo con el hecho de que no existe una secuencia específica de ADN que presente la inhibición, si no mas bien la longitud de la misma es la responsable. Los estudios de Infrarrojo, mostraron que la adición de ADN a elastasa produce una modificación en la señal en el intervalo de la región Amida I y en particular en la zona propia de vuelta-beta y de estructura beta. El hecho de que no se presente señal en la zona cercana a 1640, muestra que no existe alteración en las zonas de estructura alfa.

Con todos los datos experimentales acumulados se procedió a armar un modelo que explique el comportamiento del sistema EPP - ADN, por lo que con ayuda del programa GRAMM de acoplamiento de superficies se armo un modelo que muestra la estructura del probable complejo formado. Este modelo muestra que la unión entre ADN y EPP no se

presenta en la región del sitio activo, si no en la periferia del mismo, lo que explica los datos experimentales que muestra reducción en la actividad y no inhibición completa, por otro lado el modelo propuesto es acorde con el hecho de que las áreas alfa de EPP no son modificadas durante la formación del complejo. En cuanto al hecho de que la longitud mas que la secuencia es responsable de la reducción en la actividad de EPP, se puede pensar en que la longitud larga favorece la aparición de agregados enzimáticos, los cuales las longitudes cortas no permiten, aunque todo esto necesita mas estudios para su esclarecido.

En cuanto al problema original del sistema del esputo purulento humano, se puede pensar que la reducción en la actividad de EPMNH en el sistema pulmonar de enfermos con fibrosis quística es debida a interacciones inespecíficas con fragmentos largos de ADN. Estos datos concuerdan con los resultados experimentales donde la adición de ADNasas produce un aumento en la actividad elastolítica. De esta manera la adición de inhibidores elastolíticos en conjunción con ADNasas pudiera ser de alta eficacia con el fin de evitar los efectos degenerativos del tejido pulmonar que se presentan en pacientes sometidos al tratamiento de PULMOZIME.

3.5 CONCLUSIONES:

- A) La Elastasa Humana de Polimorfonucleares (EPMNH) presenta 7 isoformas al ser purificada a partir de esputo purulento de pacientes con fibrosis quística.
- B) La Elastasa Pancreática de Cerdo (EPP) tiene una identidad del 40% con EPH en secuencia primaria y un 54% de aminoácidos intercambiables entre si.
- C) El alineamiento de las estructuras tridimensionales de EPMNH con EPP da un RMSD de 1.25 Å, lo que significa el que presentan la misma estructura tridimensional.
- D) El análisis de cargas superficiales de EPMNH y EPP nos muestran una similar distribución de cargas.
- E) La inhibición sobre la actividad de EPP en presencia de polinucleótidos es directamente proporcional a la longitud y a la concentración.
- F) Existen en solución especies heterogéneas coexistiendo en mezclas de EPP y oligos de tamaño homogéneo, lo que nos habla de distintos complejos en tamaño y sitio de unión.
- G) La adición de fragmentos polinucleotídicos muestra modificaciones fuertes en la estructura de la Elastasa con la adición de fragmentos de arriba de 4000 pb, moderada en el intervalo de 1000 a 4000 pb, y baja con fragmentos menores a 100 pb.
- H) La adición de polinucleótidos a soluciones de EPP produce enmascaramiento de fluoróforos. Lo que confirma la existencia de interacciones superficiales.
- I) La interacción encontrada es dependiente del tiempo, y la fuerza necesaria para romperla es relativamente baja.
- J) Las modificaciones estructurales sobre EPP que produce la adición de polinucleótidos afecta en particular a la región vuelta beta y beta.
- K) El modelo de DOCKING automático comprueba que energéticamente es posible la interacción EPP – polinucleótidos. Esta ocurre en la periferia del sitio activo, lo que explica la reducción en la actividad en vez de la inhibición total (en el caso que se uniera específicamente al sitio activo).

- L) Las observaciones clínicas que iniciaron este trabajo se pueden explicar con la existencia de interacciones inespecíficas entre los fragmentos de ADN semi digeridos, los cuales son responsables (al menos parcialmente) de la inhibición enzimática observada, y que deben de ser tomados en cuenta al utilizar ADNasas, ya que es importante adicionar en la preparación inhibidores de elastasa.

3.6. PERSPECTIVAS:

- A) Purificar las isoformas de EPMNH con la ayuda de equipos de isoelectroenfoque como el ISO-PRIME.
- B) Replantear la búsqueda de cristales, ya que estos necesitan la existencia de interacciones específicas que permitan el acomodo cristalino.
- C) Desarrollar experimentos en sistemas vivos para probar la conclusión del uso de inhibidores de elastasa con el uso de ADNasas.
- D) Realizar experimentos en el esputo purulento que permitan evidenciar componentes extras en el problema clínico a los encontrados en esta tesis.

4.0. BIBLIOGRAFÍA:

1. Baugh, R. J. and Travis, J. (1976) Human leukocyte granule elastase: rapid isolation and characterization. *Biochem.* 15 (4), 836 - 841.
2. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F. Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T. and Tasumi, M. (1977) *Journal of Molecular Biology*, 112, 535 - 542.
3. Blackwood, L. I., Stone, R. M., Iglewski, B. H. and Pennington, J. E. (1983) Evaluation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a and elastase as virulence factors in acute lung infection. *Infection and Immunity*, 39, 198 - 201.
4. Boat, T. F., Cheng, P. W., Iyer, R. N., Carlson, D. M. and Polony, I. (1972) Human respiratory tract secretions. *Arch. of Biochem and Biophys.*, 177, 95 - 104.
5. Bode, W., Wei, A. Z., Huber, R., Meyer, E., Travis, J. and Neumann, S. (1986) X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. (1986) *EMBO J.*, 5, 2453 - 2458.
6. Brock, T. D. and Madigan, M. T. (1988) *Biology of Microorganisms*, Prentice Hall, New Jersey, U.S.A.
7. Bruce, M. C., Poncz, L., Klinger, J. D., Stern, R. C., Tomashefski, J. F. and Dearborn, D. G. (1985) Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132, 529 - 535.
8. Byler, M. and Sus, H. (1986). *Biopolymers* 25, 469 - 475.
9. Campbell, E. J., Silverman, E. K. and Campbell, M. A. (1989) Elastase and cathepsin g of human monocytes. *J. Immunol.* 143, 2961 - 2968.
10. Carpenter, M. L. and Kneale, G. G. (1991) Circular dichroism and fluorescence analysis of the interaction of Pfl gene 5 protein with poly (dT). *J. Mol. Biol.*, 27, 681 - 689.
11. Coan, M. H., Roberts, R. C. and Travis, J. (1971) Human pancreatic enzymes. Isolation and properties of a major form of chymotrypsin. *Biochem.*, 10, No. 114, 2711 - 2717.
12. Collins, F. S. (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic Implications. *Science*. 256, 774 - 779.
13. Culard, F. and Maurizot, J. C. (1981) Lac repressor - lac operator interaction. Circular dichroism study. *Nucleic Acid Res.* 9, 5175 - 5184.
14. Dewald, B., Rindler-Ludwig, R., Bretz, U. and Baggiolini, M. (1975) Subcellular localization and heterogeneity of neutral proteases in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 141, 709 - 723.
15. Doring, G., Goldstein, W., Roll, A., Schiotez, P. O., Hoiby, N. and Botzenhart, K. (1985) Role of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.*, 49, 557 - 562.
16. Doring, G., Goldstein, W., Botzenhart, K., Kharazmi, A., Schiotez, P. O., Hoiby, N. and Dasgupta, M. (1986) Elastase from polymorphonuclear leucocytes: a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 64, 597 - 605.
17. Doring, G. (1989) Host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Act. Paediatr. Scand Suppl.* 363, 37 - 40.
18. Doherty, J. B. et al. (1986) Cephalosporin antibiotics can be modified to inhibit human leukocyte elastase. *Nature*, 322, 192 - 194.
19. Dubendorff, J. W. and Studier, F. W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219, 45 - 59.

20. Eduards, S. W. (1994) *Biochemistry and physiology of the neutrophil*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
21. Enemark, J. H. (1988) Introducing chemists to x-ray structure determination. *Journal of Chemical Education*, June, 20 - 22.
22. Ferre-D'Amare, A. R. and Burley, S. K. (1994) Use of dynamic light scattering to assess crystallizability of macromolecules and macromolecular assemblies, *Structure*, **2**, 357 - 359.
23. Fick, R. B., Naegel, G. P., Matthay, R. A. and Reynolds, H. Y. (1981) Cystic fibrosis pseudomonas opsonins. *J. Clin. Invest.*, **68**, 899 - 914
24. Fick, R. B. (1989) Pathogenesis of the pseudomonas lung lesion in cystic fibrosis. *Chest*, **96**, 158 - 164.
25. Geneste, P. and Bender, M. L. (1969) Esterolytic activity of elastase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **64**, 683 - 685.
26. Giacovazzo, C. ed. (1994) *Fundamentals of Crystallography*, International Union of Crystallography, Oxford Science Publications.
27. Girard, F., Toumier, J. M., Polu, J. M., Puchelle, E., Beck, G. and Sadoul, P. (1981) Ultrasonic method of sputum homogenization and its application in the study of the enzymatic content of sputum. *Clinica Chimica Acta*, **113**, 105 - 109.
28. Goldstein, W. and Doring, G. (1986) Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **134**, 49 - 56.
29. Groutas, W. C., Giri, P. K., Crowley, J. P., Castrisos, J. C. and Brubaker, M. J. (1986) The lossen rearrangement in biological systems inactivation of leukocyte elastase and alpha-chymotrypsin by succinimide. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **141**, 741 - 748.
30. Groutas, W. C., Huang, H., Venkataraman, R., Houser-Archfield, N. and Epp, J. B. (1993) Dual action inhibitors of proteolytic enzymes potential therapeutic agents for cystic fibrosis and related ailments. *Bioorg. Med. Chem.* **1**, 273 - 277.
31. Hennessey, J. P., Jr., and Johnson, W. C., Jr. (1981) *Biochemistry* **20**, 1085 - 1094.
32. Heinz, D. W., Liersch, M. and Grutter, M. G. (1989) Crystallization of human leukocyte elastase with its inhibitor pro44-eglin c. *J. Mol. Biol.* **207**, 641 - 642.
33. Hoiby, N. (1993) Pseudomonas infection in cystic fibrosis. *Cystic Fibrosis, current Topics*, Volume 1. John Wiley and Sons, New York, U.S.A.
34. Holder, I. A. and Haidaris, C. G. (1979) Experimental studies of the pathogenesis of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase as *in vivo* virulence factors. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 593 - 599.
35. Hollsing, A. E., Lantz, B., Bergstrom, K., Malmberg, A. S. and Strandvik, B. (1987) Granulocyte elastase alpha antiproteinase complex in cystic fibrosis sensitive plasma assay for monitoring pulmonary infections. *The J. Pediat.*, **111**, 206 - 211.
36. Jaeger, K. E., Kharazmi, A. and Hoiby, N. (1991) Extracellular lipase of *Pseudomonas aeruginosa* biochemical characterization and effect on human neutrophil and monocyte function *in vivo*. *Microbial Pathogenesis*. **10**, 173 - 182.
37. Janoff, A. and Scherer, J. (1968) Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. *J. Exp. Med.*, **128**, 1137 - 1155.
38. Janoff, A. (1969) Alanine p-nitrophenyl esterase activity of human leukocyte granules. *Biochem. J.*, **114**, 157 - 159.
39. Jensen, E. T., Kharazmi, A., Lam, K., Costerton, J. W. and Hoiby, N. (1990) Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect. Immunity*. **58**, 2383 - 2385.

40. Johnson, D. A., Carter-Hamm, B. and Cralle, W. M. (1982) Inactivation of human bronchial mucosal proteinase inhibitor by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *A. Rev. Respir. Dis.* **126**, 1070 - 1073.
41. Johnson, B. B., Dakl, K. S., Tinoco, I., Jr., Ivanov, V. I., and Zhurkin, V. B. (1981) Correlations between deoxyribonucleotide acid structural parameters and calculated circular dichroism spectra. *Biochemistry* **20**, 73 - 78.
42. Johnson, W.C., Jr. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* **7**, 205 - 214.
43. Kansy, J. W., Chuck, B. A., and Gray, D. M. (1986) The binding of fd gene 5 protein to polydeoxyribonucleotides: evidence from CD measurements of two binding modes. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **3**, 1079 - 1110.
44. Kerckmar, C. M. and Davis, P. B. (1992) Resistance of human tracheal epithelial cells to killing by neutrophils, neutrophil elastase and pseudomonas elastase. *Am. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* **8**, 56 - 62.
45. Kharazmi, A., Schiotez, P. O., Hoiby, N., Baek, L. and Doring, G. (1986) Demonstration of neutrophil chemotactic activity in the sputum of cystic fibrosis patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Eur. J. Clin. Invest.*, **16**, 143 - 148.
46. Kneale, G. G., de. (1994) DNA - Protein interactions: principles and protocols, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 30, Humana Press, Totowa, N. J., U.S.A.
47. Kneale, G. G. and Wilnaendts van Resandt, R. W. (1985) Time resolved fluorescent of the Pfl bacteriophage DNA binding protein: determination of oligo and polynucleotide binding parameters. *Eur. J. Biochem.* **149**, 85 - 93.
48. Kyte, J. (1995) *Structure in protein chemistry*. Garland Publishing, Inc., New York and London.
49. Ladd, M. F. C. and Palmer, R. A. (1994) *Structure determination by X-ray crystallography*, Plenum Press, New York, U.S.A.
50. Lieberman, J. and Kurnick, N. B. (1963) Proteolytic activity and the role of nucleic acid in cystic fibrosis sputum. *Pediatrics*, June, 1028 - 1032.
51. Lieberman, J., Trimmer, B. A. and Kurnick, N. B. (1965) Substrate specificity of protease activities in purulent Sputum. *Laboratory Investigation*, **114**, No. 3, 249 - 257.
52. Lieberman, J. and Gawad, M. A. (1971) Inhibitors and activators of leukocytic proteases in purulent sputum. *J. Lab. Clin. Med.* **77**, 713 - 727.
53. Lieberman, J. and Keneshiro, W. (1972) Inhibition of leukocytic elastase from purulent sputum by alpha 1-antitrypsin. *J. Lab. Clin. Med.*, **80**, 88 - 101.
54. Mallory, P. A. and Travis, J. (1975) Human pancreatic enzymes: purification and characterization of a nonelastolytic enzyme, protease E, resembling elastase. *Biochem.* **14**, 722 - 730.
55. Mantsch, H. H. and Surewicz, W. K. (1993) *Probing protein secondary structure by infrared spectroscopy*, Oxford University Press.
56. Michel, H. (1983) *Trends in Biological Science*, 56 - 59.
57. Meyer, K. C., Lewandiski, J. R., Zimmerman, J. J., Nunley, D., Calhoun, W. J. and Dopico, G. A. (1991) Human neutrophil elastase and elastase/alpha 1-antiprotease complex in cystic fibrosis. *Am. Rev. Resp. Dis.* **144**, 580 - 585.
58. Morihara, K. Tsuzuki, H. and Oda, K. (1979) Protease and elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of human plasma alpha 1-proteinase inhibitor. *Infection and Immunity*, **24**, 188 - 193.
59. McElvaney, N. G., Hubbard, R. C., Birrer, P., Chemnick, M. S., Caplan, D. B., Frank, M. M. and Crystal, R. G. (1991) Aerosol alpha 1 antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *The Lancet.* **337**, 392 - 394.
60. McRee, D. E. (1993) *Practical protein crystallography*, Academic Press, California, U.S.A.
61. McPherson, A. (1982) *Preparation and analysis of protein crystals*. Wiley, New York, U.S.A.

62. Naegel, G. P., Randall-Young, K. and Reynolds, H. Y. (1984) Receptors for human IgG subclasses on human alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.*, **129**, 413 - 418.
63. Ohlsson, K. and Olsson, I. (1974) The neutral proteases of human granulocytes, *Eur. J. Biochem.*, **42**, 519 - 527.
64. Parthasarathy M. and Curtis Johnson W. Jr. (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochem.* **167**, 76 - 85.
65. Pedersen, S. S., Espersen, F. and Hoiby, N. (1987) Diagnosis of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis by ELISA. *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1830 - 1836.
66. Penicaud, A. (1996) Viaje al centro de la materia, Facultad de Quimica, UNAM, Mexico.
67. Perlmann, G. E. and Lorand, L. eds. (1971) Methods in enzymology, Vol XIX, Proteolytic Enzymes, A. P., U.S.A.
68. Pipoly, D. and Cronch, E. C. (1987) Degradation of native type IV procollagen by human neutrophil elastase implications for leukocyte mediated degradation of basement membranes. *Biochemistry*, **26**, 5748 - 5754.
69. Pollister Physical techniques in biological research, vol 1 optical techniques. A.P., U.S.A.
70. Provencher, S. W., and Glockner, J. (1981) *Biochemistry* **20**, 33 - 37.
71. Ramsey, B. W. and Dorkin, H. L. (1993) Consensus conference: practical applications of Pulmozime[®]. *Pediatric Pulmonology*, **17**, 404 - 408.
72. Rau, J. L. Jr. (1989) Respiratory care pharmacology. Mosby Year Book, MO, U.S.A.
73. Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., Drumm, M. L., Iannuzzi, M. C., Collins, F. S. and Tsui, L. C. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene; cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. **245**, 1066 - 1073.
74. Rizzo, V., Borghi, D., Sacchi, N., Alpegiani, M. and Perrone, E. (1993) Studies on cepem sulfones as mechanism based inactivators of human leukocyte elastase, reactions ensuring from enzymatic beta lactam cleavage. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, 2265 - 2270.
75. Sands, D. E. (1993) Introduction to crystallography. Dover Publications, New York, U.S.A.
76. Scopes, R. K. (1987) Protein purification: principles and practice. Springer-Verlag, New York, U.S.A.
77. Siegel, J. B., Steinmetz, W. E. and Long, G. L. (1980) *Analytical Biochem.* **104**, 160 - 167.
78. Schmitz, K. S., An introduction to Dynamic Light Scattering by macromolecules. (1989) A. P., U.S.A.
79. Springers, T. A., Anderson, D. C., Rosenthal, A. S. and Rothlein, R. (1988) Leukocyte Adhesion Molecules: structure, function and regulation. Springer-Verlag, New York, U.S.A.
80. Steitz, T. A. (1990) Structural studies of protein - nucleic acid interaction: the sources of sequence - specific binding. *Quart. Rev. Biophys.* **23**, 205 - 280.
81. Storey, D. G., Ujack, E. E. and Ravin, H. R. (1992) Population transcript accumulation of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin a and elastase in sputa from patients with cystic fibrosis. *Infect. Immun.* **60**, 4687 - 4694.
82. Studier, F. W., Rosenberg, A. G., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct the expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **85**, 60 - 89.
83. Surewicz, W. K., Mantsch, H. H. and Chapman, D. (1993) Determination of protein secondary structure by fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, **32**, 389 - 394.
84. Suter, S., Schaad, U. B., Roux, L., Nydegger, U. E. and Waldvogel, F. A. (1984) Granulocyte neutral proteases and *Pseudomonas* elastase as possible causes of airway damage in patients with cystic fibrosis. *The J. of Infectious Diseases*, **149**, 523 - 531.

85. Suter, S. (1989) The imbalance between granulocyte neutral proteases and antiproteases in bronchial secretions from patients with cystic fibrosis. *Antibiot. Chemother.* **42**, 158 - 168.
86. Taylor, J. C. and Crawford, I. P. (1975) Purification and preliminary characterization of human leukocyte elastase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **169**, 91 - 101.
87. Torigoe, C., Kidokoro, S., Takimoto, M., Kyoyoku, Y., and Wada, A. (1991) Spectroscopy studies on lambda cro protein - DNA interactions. *J. Mol. Biol.* **219**, 733 - 746.
88. Wartell, R. M. and Adhya, S. (1988) DNA conformational change in Gal repressor - operator complex : involvement of central G - C base pair(s) of dyad symmetry. *Nucleic Acid Res.* **16**, 11531 - 11541.
89. Warburg, O. and Christian, W. (1941) Isolierung und kristallisation des Gärungs-ferments Enolase. *Biochem. Z.* **310**, 384 - 421.
90. Werb, Z. and Gordon, S. (1975) Elastase secretion by stimulated macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, **142**, 361 - 377.
91. Winkler, F. W., D'Arcy, A., Bloecker, H., Frank, R., and Van Boom, J. H. (1991) Crystallization of complexes of EcoRV endonuclease with cognate and noncognated DNA fragments. *J. Mol. Biol.* **217**, 235 - 238.
92. Zulauf, M. and D'Arcy, A. (1992) Light scattering of protein as a criterion for crystallization. *J. Cryst. Growth.* **122**, 102 - 106.