

Matilde Esther Fuentes Ortega

**ANÁLISIS CINÉTICO DE LAS REACCIONES
DE ACTIVACIÓN DE ZIMÓGENOS:
APLICACIÓN A SISTEMAS ENZIMÁTICOS
DE INTERÉS FISIOLÓGICO**

I.S.B.N. Ediciones de la UCLM
978-84-8427-503-9



Ediciones de la Universidad
de Castilla-La Mancha

Cuenca, 2007



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA
Departamento de Química-Física

**“ANÁLISIS CINÉTICO DE LAS REACCIONES DE
ACTIVACIÓN DE ZIMÓGENOS: APLICACIÓN A
SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE INTERÉS FISIOLÓGICO”**

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor
por la Universidad de Castilla-La Mancha

Matilde Esther Fuentes Ortega

2006

D. **Jose Albaladejo Pérez**, Catedrático de Química-Física y Director del Departamento de Química-Física de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada: “**Análisis cinético de las reacciones de activación de zimógenos: aplicación a sistemas enzimáticos de interés fisiológico**”, constituye la memoria que presenta D^a **Matilde Esther Fuentes Ortega**, para aspirar al título de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Castilla-La Mancha, y ha sido realizado en el Departamento de Química Física bajo la dirección del Dr. **Ramón Varón Castellanos** y la Dra. **Edelmira Valero Ruiz**.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente CERTIFICADO en Ciudad Real, a dieciseis de Junio de dos mil seis.

D. **Ramón Varón Castellanos**, Catedrático de Química-Física de la Universidad de Castilla-La Mancha y D^a **Edelmira Valero Ruiz**, Catedrática de Escuela Universitaria de Química-Física de la Universidad de Castilla-La Mancha,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada: “**Análisis cinético de las reacciones de activación de zimógenos: aplicación a sistemas enzimáticos de interés fisiológico**”, realizada por D^a **Matilde Esther Fuentes Ortega**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, en los laboratorios del Departamento de Química-Física en la Escuela Politécnica Superior de Albacete, y que presenta para la obtención del grado de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Castilla-La Mancha.

A nuestro juicio reúne las condiciones necesarias para ser presentada en la Facultad de Ciencias Químicas, y juzgada por el Tribunal correspondiente.

En Albacete, a 15 de Junio de 2006

Fdo. Ramón Varón Castellanos

Fdo. Edelmira Valero Ruiz

Los trabajos de investigación recogidos en la presente Memoria han sido financiados por los siguientes proyectos:

- *“Análisis cinético de las reacciones de activación de zimógenos: Aplicación a sistemas enzimáticos de interés fisiológico”* (Proyecto nº BQU2002-01960), financiado por la Dirección General de Investigación (MCyT, España).
- *“Grupo de Modelización en Bioquímica”* (Proyecto nº GC-02-032), financiado por la Consejería de Ciencia y Tecnología de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.
- *“Análisis cinético de diversos mecanismos biológicos de amplificación de la respuesta frente a una señal”* (Proyecto nº PAI-05-036), financiado por la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

La firmante de esta Memoria disfrutó en los comienzos de su realización de una beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, de la Consejería de Ciencia y Tecnología, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha (J.C.C.M.), del 13 de mayo al 1 de julio de 2003 y posteriormente de una beca del Programa de Becas Predoctorales de Formación de Personal Investigador (MCyT, España), asociada al Proyecto BQU2002-01960, cofinanciada por el Fondo Social Europeo. Así mismo, ha disfrutado de una “Ayuda para Estancias Breves” del Ministerio de Educación y Ciencia, realizando una estancia en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia, bajo la dirección del Prof. Dr. Francisco García Cánovas.

Albacete, 15 de Junio de 2006

Fdo. Matilde Esther Fuentes Ortega

Las siguientes publicaciones recogen los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral:

- **M.E. Fuentes**, R. Varón, M. García-Moreno y E. Valero (2005) Kinetics of intra- and intermolecular zymogen activation with formation of an enzyme-zymogen complex. *The FEBS Journal*, **272**:85-96.
- **M.E. Fuentes**, R. Varón, M. García-Moreno y E. Valero (2005) Kinetics of autocatalytic zymogen activation measured by a coupled reaction: pepsinogen autoactivation. *Biological Chemistry*, **386**:689-698.
- R. Varón, **M.E. Fuentes**, M. García-Moreno, F. García-Sevilla, E. Arias, E. Valero y E. Arribas (2006) Contribution of the intra- and intermolecular routes in autocatalytic zymogen activation: application to pepsinogen activation. *Acta Biochimica Polonica*. (En prensa).
- **M.E. Fuentes**, E. Valero, M. García-Moreno, E. Vique y R. Varón (2006) Kinetic analysis of the mechanism of plasminogen activation by streptokinase. *Journal of Mathematical Chemistry*. (En prensa).

Son muchas las personas que han contribuido de alguna manera a la realización de esta Tesis Doctoral y a quienes deseo expresar mi gratitud.

*En primer lugar, a los Dres. D. **Ramón Varón Castellanos** y D^a. **Edelmira Valero Ruiz**, directores de este Trabajo, por su dirección, orientación, continuo apoyo y por la confianza depositada en mi a lo largo de la realización del mismo.*

*A la Dra. **Manuela García Moreno**, por su constante ayuda cada vez que me surgía cualquier duda de trabajo. Y junto con ella a las Dras. **María Llanos Amo Saus**, **Milagros Molina Alarcón** y **María José García Meseguer**, por su amistad, estímulo, apoyo constante y por sus atenciones y en general por los momentos tan agradables que hemos disfrutado juntas.*

*Al Dr. **José Albaladejo Pérez**, que tras la entrevista que realicé en la Facultad de Químicas de Ciudad Real le facilitó mis datos a mi directora como aspirante a la beca que hoy estoy disfrutando.*

*A **Daniel Valera Ruipérez** por su ayuda en el laboratorio.*

*A **Pedro Carrión Lozoya** por la orientación que me proporcionó a la hora de preparar la Memoria del DEA.*

*A **Esperanza Monedero Villalba** y **Andrés Garzón Ruiz**, doctorandos del Departamento de Química-Física, por su compañerismo y sus atenciones en mis viajes a Ciudad Real para realizar los cursos de doctorado.*

*A **María Elena Maeso Carbayo** por la información que, de manera tan amable, me proporcionó para la documentación tanto de esta Memoria como para la del DEA.*

*A **Alicia Rivas Moreno** por toda la ayuda prestada siempre que me surgía algún problema con el ordenador.*

*A la **Universidad de Castilla-La Mancha** y especialmente a la **Dirección de la Escuela Politécnica Superior de Albacete** por las facilidades que siempre me han brindado.*

*Al Dr. **Francisco García Canovas**, por acogerme en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A de la Universidad de Murcia para la realización de una Estancia Breve y por todas las atenciones dispensadas. Igualmente a todos los miembros de su grupo de investigación, por su amabilidad y ayuda, pero muy especialmente a mis compañeros **Francisco García Molina** y **Jose Luis Muñoz Muñoz**, que hicieron que mi estancia en Murcia fuese tan agradable.*

*A D^a. **Carmen López Molina**, mi profesora de Física y Química en el Instituto, que despertó en mí el interés por la Química gracias a la calidad de su enseñanza.*

*A la familia Roldan-González, **Loli, Lorenzo, Amparo, Maria José y Teresa**, por acogerme en su casa como una hija más. Por sus constantes atenciones y amistad.*

*A mis compañeros de piso en Albacete, **Eli, Nacho y Vanesa** por llenar la convivencia diaria de tantos buenos momentos y por su amistad.*

*A **Loli** por ayudarme en la búsqueda y elección de pisos en Albacete y en Murcia.*

*A mi amiga **Mari Paz** que a pesar de los kilómetros que nos separen siempre siento que está cerca, por ser como una hermana para mí y por lo bien que lo pasamos juntas.*

*A mis amigas de Almería, **Loli, Maria Dolores y Charo** por los momentos tan divertidos que hemos vivido juntas durante la carrera y desde entonces hasta ahora.*

*A mis amigos de Huércal-Overa, especialmente a mis compañeras de piso durante la carrera, **Lola, Navío, Ana Isabel y Pilar**, por tantos momentos inolvidables.*

*A **Denis** porque conocerlo es lo mejor que me ha pasado en Albacete, por su paciencia sobre todo en estos últimos meses y por ser tan especial.*

*A **mis hermanos** por estar siempre disponibles cada vez que los necesito.*

*A **mis padres**, por procurarnos a mis hermanos y a mí siempre todo lo mejor. Porque con su ejemplo me han dado la mejor enseñanza que podría recibir. Por las facilidades y la libertad que siempre me han dado para hacer las cosas que me gustan. Sin su apoyo, sus ánimos y sus consejos esta Memoria no habría salido adelante.*

*Así mismo, al resto de **mi familia** especialmente a **mis tías Ana y Mari Carmen**.*

A mis padres, Diego y Catina

A mis hermanos, Pedro y Martín

A Denis

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 REACCIONES ENZIMÁTICAS.....	2
1.1.1 <i>Concepto de fase de transición, estado estacionario y equilibrio rápido</i>	2
1.1.2 <i>Estudio cinético</i>	10
1.1.3 <i>El complejo Enzima-Sustrato (ES)</i>	13
1.2 PROTEASAS.....	16
1.2.1 <i>Clasificación</i>	18
1.2.2 <i>Transformación proteolítica y regulación fisiológica</i>	21
1.3 ZIMÓGENOS.....	24
1.3.1 <i>Reacciones de activación</i>	24
1.3.2 <i>Procesos autocatalíticos</i>	27
1.3.3 <i>Ejemplos fisiológicos</i>	29
1.4 SISTEMA ENZIMÁTICO PEPSINÓGENO-PEPSINA.....	37
1.5 SISTEMA ENZIMÁTICO PLASMINÓGENO-PLASMINA.....	41
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA	43
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	48
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1 MATERIALES.....	52
4.2 MÉTODOS.....	53
4.2.1 <i>Ensayos espectrofotométricos</i>	53
4.2.2 <i>Determinación de la concentración de pepsinógeno</i>	56
4.2.3 <i>Ajuste de los datos experimentales</i>	56
4.2.4 <i>Integración numérica</i>	56
4.2.5 <i>Transformada de Laplace</i>	57
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
5.1 “KINETICS OF INTRA- AND INTERMOLECULAR ZYMOGEN ACTIVATION WITH FORMATION OF AN ENZYME-ZYMOGEN COMPLEX”.....	59
5.2 “KINETICS OF AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION MEASURED BY A COUPLED REACTION: PEPSINOGEN AUTOACTIVATION”.....	73
5.3 “CONTRIBUTION OF THE INTRA- AND INTERMOLECULAR ROUTES IN AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION: APPLICATION TO PEPSINOGEN ACTIVATION”.....	85
5.4 “KINETIC ANALYSIS OF THE MECHANISM OF PLASMINOGEN ACTIVATION BY STREPTOKINASE”.....	103
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	129
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	133

ÍNDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS, TABLAS Y FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Esquema 1.1	7
Esquema 1.2	9
Esquema 1.3. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos que incluye una etapa intramolecular (ruta (a)) y otra intermolecular (ruta (b)).....	28
Esquema 1.4. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos incluyendo las etapas intramolecular (ruta (a)) e intermolecular (ruta (b)), y la hidrólisis de un sustrato de la enzima activa (ruta (c)).....	28
Esquema 1.5. Mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa (Boxrud y col., 2004; Boxrud and Bock., 2004).....	34
Tabla 1.1. Clases y familias de proteasas (Drenth y col., 1971; Neurath, 1984; Kostka, 1985).....	18
Tabla 1.2. Factores que participan en la coagulación sanguínea.....	31
Tabla 1.3. Ejemplos de zimógenos fisiológicos y fenómenos concretos afectados (Avilés y col., 1994).....	36
Figura 1.1. Representación esquemática de la variación de la concentración de producto de una reacción enzimática con el tiempo.	3
Figura 1.2. Curvas de progreso de reacciones enzimáticas.....	5
Figura 1.3. Formación del complejo enzima-sustrato.	14
Figura 1.4. Rotura proteolítica de un enlace peptídico.....	22
Figura 1.5. Activación de quimotripsinógeno.	25
Figura 1.6. Representación esquemática de una reacción de activación de zimógenos en cascada.....	26
Figura 1.7. Esquema simplificado de la activación de zimógenos en el duodeno.....	30
Figura 1.8. Reacciones de activación de zimógenos en cascada que se presentan en la coagulación de la sangre	32
Figura 1.9. Esquema simplificado de la fibrinólisis.....	33
Figura 1.10. Estructura tridimensional del pepsinógeno A humano.	39
Figura 1.11. Estructura de la pepsina humana.....	39

CAPÍTULO 4.

Figura 4.1. Esquema general del experimento.....	54
---	----

CAPÍTULO 5.

5.1. "KINETICS OF INTRA- AND INTERMOLECULAR ZYMOGEN ACTIVATION WITH FORMATION OF AN ENZYME-ZYMOGEN COMPLEX".

Esquema 1. Mecanismo de autoactivación de pepsinógeno a pepsina propuesto por Al-Janaby y col. (1972).....62 (86 art.)

Esquema 2. Mecanismo sugerido por Koga y Hayashi (1976).....62 (86 art.)

Esquema 3. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos que incluye una etapa intramolecular (ruta (a)) y otra intermolecular (ruta (b)).....62 (86 art.)

Esquema 4. Mecanismo mostrado en el Esquema 3 bajo condiciones de equilibrio rápido entre E, Z y EZ.....62 (86 art.)

Esquema 5. Mecanismo general simplificado para la autoactivación de zimógenos.....62 (86 art.)

Tabla 1, Valores de [Z] obtenidos a partir de las curvas simuladas ($[Z]_{sim}$) comparados con los obtenidos a partir de la ecuación (21) ($[Z]_{Eqn 21}$) y con los de la ecuación (B1) del Apéndice B (Al-Janabi y col., 1972) ($[Z]_{Eqn B1}$).....66 (90 art.)

Figura 1.A) Curvas de progreso simuladas correspondientes a las especies que intervienen en el mecanismo de reacción mostrado en el Esquema 3.....66 (90 art.)

Figura 1.B) Curvas de progreso correspondientes al consumo de Z.....66 (90 art.)

Figura 2. Representación de Z_0/λ vs Z_0 de acuerdo con la ecuación (40) para tres valores diferentes de k_369 (93 art.)

Figura 3.A) Curvas de progreso del consumo de pepsinógeno a diferentes concentraciones iniciales de éste.....69 (93 art.)

Figura 3.B) Gráfica secundaria de los datos anteriores.....69 (93 art.)

5.2. "KINETICS OF AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION MEASURED BY A COUPLED REACTION: PEPSINOGEN AUTOACTIVATION."

Tabla 1. Valores de [S] y [Z] obtenidos a partir de las curvas simuladas ($[S]_{t,sim}$ y $[Z]_{t,sim}$) comparados con los obtenidos a partir de las ecuaciones (32) y (33) ($[S]_{t,Eq}$ y $[Z]_{t,Eq}$) respectivamente.....80 (694 art.)

Figura 1. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos incluyendo las etapas intramolecular (ruta A) e intermolecular (ruta B), y la hidrólisis de un sustrato de la enzima activa (ruta C).....76 (690 art.)

Figura 2.A) Curvas de progreso correspondientes al consumo de sustrato a diferentes valores iniciales de S_079 (693 art.)

Figura 2.B) Curvas de progreso correspondientes a la especies que intervienen en el mecanismo de la Figura 1.....79 (693 art.)

Figura 3. Curvas de progreso experimentales correspondientes a la hidrólisis del sustrato peptídico.....80 (694 art.)

Figura 4.A) Representación de los valores de $1/\lambda$ obtenidos a partir del ajuste por regresión no lineal de las curvas de progreso experimentales a la ecuación (32) a diferentes concentraciones iniciales de zimógeno vs S_081 (695 art.)

Figura 4.B) Gráfica secundaria de las ordenadas en el origen obtenidas en la Figura 4.A) vs. $1/Z_0$81 (695 art.)

Figura 4.C) Gráfica Secundaria de las pendientes obtenidas en la Figura 4.A) vs. $1/Z_0$81 (695 art.)

Figura 5.A) Representación gráfica de los valores de r obtenidos a partir de la ecuación (42) a diferentes valores de t vs Z_082 (696 art.)

5.3. "CONTRIBUTION OF THE INTRA- AND INTERMOLECULAR ROUTES IN AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION: APPLICATION TO PEPSINOGEN ACTIVATION".

Esquema 1.....88 (408 art.)

Esquema 2.....88 (408 art.)

Esquema 3.....88 (408 art.)

Tabla 1. Valores de θ , t_∞ y $R_{u,\infty}$ correspondientes a cada una de las curvas de progreso de la Figura 2.....93 (413 art.)

Tabla 2. Valores de k_1 y k_2 obtenidos a diferentes pH por Al-Janabi y col., (1972) para la activación de pepsinógeno a pepsina.....95 (415 art.)

Tabla 3. Valores de θ , t_∞ y $R_{u,\infty}$ correspondientes a cada curvas de progreso de R_u en la Figura 3.....96 (416 art.)

Tabla 4. Valores de k_2 y k_{-2} , θ , t_∞ y $R_{u,\infty}$ correspondientes a cada curva de la Figura 4.....97 (417 art.)

Tabla 5. Valores de a , b , c obtenidos del ajuste de los datos de la Figura 4 a la ecuación (55).....98 (418 art.)

Figura 1. Curvas de progreso simuladas de $[Z]$, $[E]$, $[EZ]$, $[E_T]_u$ y $[E_T]_a$ obtenidas por integración numérica del conjunto de ecuaciones diferenciales (15)-(17).....91 (411 art.)

Figura 2. Curvas de progreso de R_u correspondientes al Esquema 2 obtenidas a partir de las curvas de progreso simuladas de $[E_T]_u$ y $[E_T]_a$ para los mismos valores de las constantes de velocidad de la Figura 1.....91 (411 art.)

Figura 3. Curvas de progreso de R_u para la activación de pepsinógeno a cuatro diferentes pH's y dos concentraciones diferentes.....95 (415 art.)

Figura 4. Diferentes curvas de progreso de R_u correspondientes a $K_m = 1.5 \times 10^{-7}$ M y a una concentración de pepsinógeno inicial fija $[Z]_0$ pero diferente valor de k_296 (416 art.)

Figura 5. Representación de t_∞ vs. $\ln k_2$ de la Tabla 5 para cada concentración de pepsinógeno correspondiente.....96 (416 art.)

5.4. "KINETIC ANALYSIS OF THE MECHANISM OF PLASMINOGEN ACTIVATION BY STREPTOKINASE".

Esquema 1.....107 (3 art.)

Tabla 1. Casos particulares del Esquema 1.....108-110 (4-6 art.)

Figura 1. Curvas de progreso correspondientes a la acumulación de $[E]/Z_0$, $[P]/S_0$ y $[P]$, obtenidas por integración numérica (líneas continuas) y curva de progres de $[P]$ obtenida de la Eq. (30) (línea de puntos).....115 (11 art.)

Figura 2. Curvas de progreso correspondientes a la acumulación de Z116 (12 art.)

Figura 3. Curvas de progreso correspondientes a la acumulación de $[P]$, obtenidas por integración numérica (curva i, línea continua), de la Eq. (30) (curva ii, línea de puntos) y de la Eq. (40) (curva iii, línea discontinua).....118 (14 art.)

Figura 4. Curva de acumulación del producto.....119 (15 art.)

Figura 5. Curva de progreso correspondiente a la acumulación de Z obtenida por integración numérica (línea continua), a partir de la Eq. (41) (línea de puntos) y de la ecuación propuesta por Boxrud y col.,(2004) (Eq. (B2), Apéndice B) (línea discontinua).....122 (18 art.)

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 REACCIONES ENZIMÁTICAS

Las enzimas son proteínas que catalizan la mayoría de las reacciones químicas que tienen lugar en los organismos vivos. Algunas enzimas, como ocurre con las enzimas proteolíticas del tracto digestivo, son secretadas y actúan fuera de la célula. Sin embargo, la mayoría de las enzimas catalizan distintos pasos del metabolismo celular, que abarca numerosas reacciones químicas relacionadas entre sí, constituyendo secuencias diferentes de reacciones consecutivas con intermedios comunes, de forma que el producto de una reacción actúa como sustrato de la siguiente.

El profundo conocimiento del mecanismo de una reacción enzimática es fundamental e imprescindible para optimizar su control en procesos bioquímicos de interés fisiológico, farmacológico, industrial, etc. El estudio cinético de una reacción enzimática abarca la identificación del número y secuencia de las especies enzimáticas intermedias, así como la determinación de las constantes de velocidad de sus etapas de interconversión. La caracterización cinética de una reacción enzimática permite la descripción cualitativa y cuantitativa de la afinidad y la rapidez de actuación de la enzima sobre los sustratos, en base a la deducción de ecuaciones analíticas explícitas que relacionan las concentraciones de cada especie química reaccionante con el tiempo de ensayo, bajo determinadas condiciones experimentales, tales como las concentraciones iniciales de reactivos, el pH y la temperatura.

1.1.1 Concepto de fase de transición, estado estacionario y equilibrio rápido

A nivel experimental, es frecuente la utilización de concentraciones de sustrato y de otros ligandos mucho mayores que la de enzima, así como que el consumo de ligandos sea despreciable durante todo el tiempo de ensayo de la reacción. En esas condiciones, la reacción comienza con una fase de transición preestacionaria, caracterizada por una acumulación de producto no lineal frente al tiempo (Figura 1.1, curva I). A continuación, tiene lugar una formación lineal de producto con el tiempo, correspondiente a la fase de estado estacionario

(Figura 1.1, curva II). Por último, la reacción entra en la fase final, desde que el consumo de sustrato comienza a ser significativo hasta su total agotamiento (Figura 1.1, curva III).

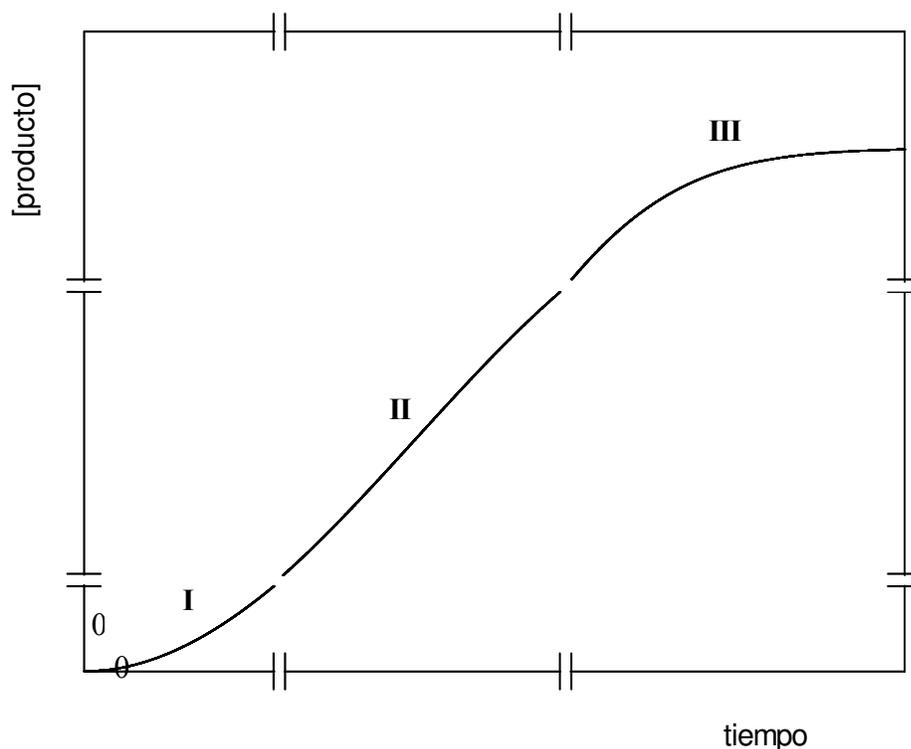


Figura 1.1. Representación esquemática de la variación de la concentración de producto de una reacción enzimática con el tiempo. I) Fase de transición, II) Estado estacionario y III) Fase final (Ahler, 1982).

Para conocer la variación con el tiempo de la concentración de las distintas especies implicadas en una reacción, es necesario plantear el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente a la evolución de los reactivos, productos e intermedios. Este sistema de ecuaciones diferenciales no está, en general, en forma lineal, por lo que no es posible obtener soluciones analíticas aplicables a las tres fases de la reacción. La solución analítica tiene carácter general y es más adecuada para el análisis de los datos cinéticos experimentales, puesto que es aplicable a diversos conjuntos de condiciones iniciales y conduce a la determinación de las constantes cinéticas que caracterizan el mecanismo de la reacción en estudio. Sin embargo, cada solución numérica tiene carácter particular y exige la asignación previa de valores a las constantes cinéticas que se desean determinar y es aplicable a un solo

conjunto de condiciones iniciales. La condición más frecuente que permite linealizar el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente a una reacción enzimática es la de utilizar una concentración inicial de sustrato mucho mayor que la de enzima, aunque a veces también se utiliza la condición inversa (Varón y col., 1988).

Fase de transición

La fase de la reacción comprendida desde el inicio de la misma, es decir, desde $t = 0$ hasta la consecución del estado estacionario, se denomina fase de transición preestacionaria y su duración varía con el tipo de reacción y las condiciones experimentales en las que ésta se realice. En aquellos casos en los que hay una reacción química acoplada a una enzimática, hay que distinguir entre la fase de transición de la reacción enzimática y la de la reacción química acoplada.

En aquellas condiciones iniciales en que cada una de las etapas del mecanismo de una reacción enzimática pueda considerarse de primer o pseudoprimer orden, el sistema de ecuaciones diferenciales que describe la evolución de las especies químicas que participan en la reacción es lineal y su solución analítica conduce, para la mayoría de las reacciones enzimáticas y para cualquiera de los productos, X , a una expresión del tipo (Maguire, 1974; Darvey, 1977; Gálvez y Varón, 1981):

$$[X] - [X]_0 = \beta + \alpha t + \sum_{h=1}^u \gamma_h \exp(\lambda_h t) \quad (1.1)$$

donde $[X]_0$ es el valor de $[X]$ a $t = 0$, los parámetros cinéticos β , α , γ_h , λ_h ($h = 1, 2, \dots, u$) dependen de las constantes de velocidad, de las concentraciones iniciales de los ligandos que se adicionan a alguna especie enzimática del mecanismo y, excepto las λ_h ($h = 1, 2, \dots, u$), de la concentración inicial de la enzima libre. Las λ_h ($h = 1, 2, \dots, u$) son negativas o complejas con la parte real negativa. En el sumatorio, u es un número entero siempre menor que el número de especies enzimáticas involucradas en el mecanismo de reacción. La ecuación (1.1) es válida tanto para la fase de transición como para el estado estacionario.

En la fase de transición de una reacción enzimática se puede observar un “burst” (salto rápido al principio de la reacción) o un “lag” (período de retardo) dependiendo del signo del parámetro cinético β . Cuando $\beta > 0$, aparece un “burst” en la curva de acumulación del producto (Figura 1.2, curva A); cuando $\beta < 0$, se observa un período de retardo en la

formación del producto (Figura 1.2, curva C). En el caso en que $\beta = 0$, el producto se acumulará linealmente desde el primer instante de la reacción (Figura 1.2, curva B), alcanzándose directamente la fase de estado estacionario, ya que cuando $[P] = 0$ a $t = 0$, se cumple que $\Sigma \gamma_h = -\beta$.

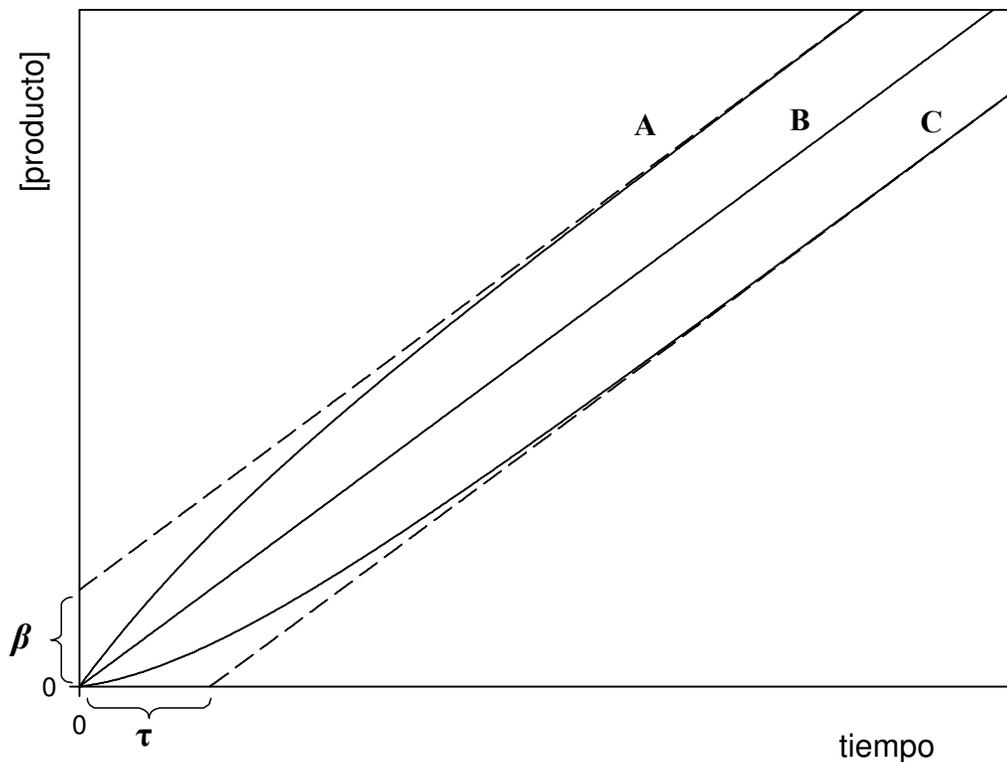


Figura 1.2. Curvas de progreso de reacciones enzimáticas. A) $\beta > 0$, B) $\beta = 0$ y C) $\beta < 0$. β y τ representan los cortes con el eje de ordenadas y abscisas respectivamente, de la prolongación de la porción lineal de la curva de progreso.

El análisis cinético de las reacciones enzimáticas se potencia con aproximaciones que facilitan la obtención de soluciones analíticas. La aproximación del estado estacionario hace posible la transformación del sistema lineal de ecuaciones diferenciales en un sistema lineal de ecuaciones algebraicas. La aproximación del equilibrio rápido permite considerar grupos de especies enzimáticas como una sola. A continuación se describen con más detalle estas dos aproximaciones:

Aproximación de estado estacionario

La aproximación del estado estacionario se basa en la hipótesis de que la concentración de las especies enzimáticas intermedias no cambia durante el curso de la reacción; es decir, que las especies enzimáticas se forman a la misma velocidad a la que se transforman. Si $[X]$ es la concentración de una especie enzimática, dicha aproximación supone hacer:

$$\frac{d[X]}{dt} = 0 \quad (1.2)$$

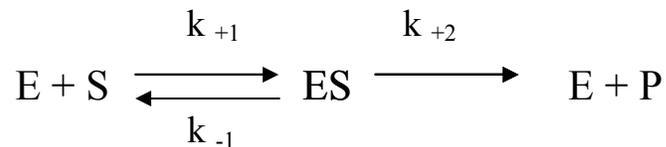
Esto permite simplificar considerablemente el sistema de ecuaciones diferenciales, transformándolo en un nuevo sistema lineal de ecuaciones algebraicas. En todo caso, una de estas ecuaciones puede ser sustituida por el balance de materia de las especies enzimáticas. Muchos autores (Laidler, 1955; Hommes, 1962; Walter y Morales, 1964; Walter, 1966; Wong, 1965; Wong, 1975) han discutido la validez de la aproximación del estado estacionario.

En general, como ocurre en las reacciones de activación de zimógenos, que serán objeto de estudio en la presente Memoria, bajo determinadas condiciones experimentales (Varón y col., 1987,1988, 1990a; Havsteen y Varón, 1990), las concentraciones de algunas especies enzimáticas pueden alcanzar un valor constante, mientras que otras pueden variar lineal, parabólica o exponencialmente con el tiempo. En estos casos pueden existir estados estacionarios restringidos a determinadas especies y no un estado estacionario de la reacción global. Una definición alternativa de estado estacionario ya ha sido implícitamente utilizada por varios autores (Darvey, 1968, 1977; Maguire, 1974; Wohl y col., 1980; Havsteen y Varón, 1990), para situaciones en que la variación de la concentración de las especies implicadas en la reacción se ajusta a una ecuación que contiene uno o más términos exponenciales, cuyo valor disminuye al aumentar el tiempo. En estos casos el estado estacionario de la reacción puede definirse como el estado correspondiente a valores altos de tiempo, es decir, a $t \rightarrow \infty$, situación en la que los términos exponenciales son despreciables frente a los demás. Así, la ecuación (1.1) se simplifica a:

$$[X] - [X]_0 = \beta + \alpha t \quad (1.3)$$

que es la ecuación que expresa la acumulación del producto X una vez que se ha alcanzado el estado estacionario, siendo α la velocidad de la reacción en dicho estado.

Consideremos, a modo de ejemplo, una reacción enzimática que siga el conocido mecanismo de Michaelis-Menten (Esquema 1.1):



Esquema 1.1

Las ecuaciones que describen el comportamiento cinético son:

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_{+1}[E][S] + (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (1.4)$$

$$\frac{d[S]}{dt} = -k_{+1}[E][S] + k_{-1}[ES] \quad (1.5)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (1.6)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_{+2}[ES] \quad (1.7)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (1.8)$$

$$[S]_0 = [S] + [ES] + [P] \quad (1.9)$$

Este sistema de ecuaciones diferenciales (1.4)-(1.7) es no lineal y por lo tanto, no tiene solución analítica.

En condiciones iniciales de concentración inicial de sustrato, $[S]_0$, mucho mayor que la inicial de la enzima libre, $[E]_0$, la ecuación de acumulación del producto para el ejemplo anterior, suponiendo $[P]_0 = 0$, es:

$$[P] = \beta + \alpha t + \gamma \exp(\lambda t) \quad (1.10)$$

donde:

$$\alpha = \frac{k_{+1}k_{+2}[S]_0[E]_0}{k_{+1}[S]_0 + k_{-1} + k_{+2}} \quad (1.11)$$

$$\beta = -\frac{\alpha}{k_{+1}[S]_0 + k_{-1} + k_{+2}} \quad (1.12)$$

$$\gamma = -\beta \quad (1.13)$$

$$\lambda = -(k_{+1}[S]_0 + k_{-1} + k_{+2}) \quad (1.14)$$

En el estado estacionario, es decir, cuando $t \rightarrow \infty$, la ecuación (1.10) se transforma en:

$$[P] = \beta + \alpha t \quad (1.15)$$

que indica que el producto se acumula linealmente con el tiempo en dicho estado.

Aproximación de equilibrio rápido

Por otra parte, existen muchas etapas reversibles de enlace de ligandos a enzimas que alcanzan rápidamente su equilibrio, antes de que tenga lugar una transformación apreciable de ligando. Esta situación cinética se denomina equilibrio rápido y puede aparecer en reacciones enzimáticas con un comportamiento cinético global de fase de transición o bien de estado estacionario.

La aproximación del equilibrio rápido permite tratar grupos de especies enzimáticas como si fuesen una sola (Cha, 1968; Huang, 1979; Cornish-Bowden, 1989). Esto tiene un doble efecto: en primer lugar facilita la obtención de las ecuaciones cinéticas y, en segundo

lugar, estas ecuaciones y las expresiones de los parámetros cinéticos que contienen resultan considerablemente simplificadas.

Como ejemplo ilustrativo de la aproximación de equilibrio rápido consideremos el mismo Esquema 1.1 de reacción en el que la única etapa reversible estuviese en equilibrio rápido. En estas condiciones el mecanismo se escribiría:



Esquema 1.2

donde K_1 es la constante de disociación del complejo ES , es decir, $K_1 = k_{-1}/k_{+1}$.

La ecuación de acumulación de producto resulta ser:

$$[P] = \frac{k_{+2}[S]_0[E]_0}{K_1 + [S]_0} t \quad (1.16)$$

ecuación de la que se deduce que el producto se acumula linealmente con el tiempo desde el instante inicial.

La aproximación de equilibrio rápido (ecuación (1.16)), supone un caso particular de ecuaciones más generales (ecuaciones (1.1) y (1.3)), que en ocasiones no permite discernir entre dos posibles mecanismos de reacción. El uso de esta aproximación debe justificarse adecuadamente.

Se han publicado una serie de trabajos en los que las ecuaciones correspondientes a la fase de transición, cuando se dan las condiciones de equilibrio rápido, se obtienen como casos particulares de las ecuaciones cinéticas generales obtenidas, suponiendo que en éstas las constantes de velocidad de primer o pseudo primer orden involucradas en las etapas reversibles sean mucho mayores que las demás y no muy diferentes entre sí (García-Cánovas y col., 1987; García-Moreno y col., 1987; Varón y col., 1988, 1989; Manjabacas y col., 1996).

La aproximación de equilibrio rápido se puede aplicar en la deducción de las ecuaciones cinéticas, tanto de la fase de transición como del estado estacionario. En la

práctica, el comportamiento cinético de las reacciones enzimáticas abarca la posible superposición en el tiempo de etapas en fase de transición, estado estacionario y equilibrio rápido.

1.1.2 Estudio cinético

La información cinética correspondiente a las situaciones de fase de transición y de estado estacionario se obtiene a partir de los respectivos parámetros cinéticos. Estos parámetros están relacionados con magnitudes controlables experimentalmente, como las concentraciones iniciales de enzima y de ligandos, el pH, etc.

La eficacia del control de un sistema enzimático se basa en el conocimiento de los aspectos estructurales y cinéticos de su mecanismo de reacción. Los estudios cinéticos permiten detectar el número y secuencia de los intermedios del mecanismo, la existencia de complejos y de cambios conformacionales, y la participación de grupos ácidos y básicos (Laidler y Busting, 1973; Segel, 1975; Dixon y col., 1979). Por otra parte, estos estudios conducen a la determinación de las constantes de velocidad del mecanismo, parámetros que describen cuantitativamente las propiedades de afinidad y de reactividad características del sistema enzimático considerado. Además, las constantes de velocidad también son útiles para comparar diferentes sistemas enzimáticos.

Para conocer la variación con el tiempo de las distintas especies implicadas en una reacción debe resolverse un sistema de ecuaciones diferenciales, que generalmente no está en forma lineal, por lo que en estas condiciones no es posible obtener soluciones analíticas rigurosas. En consecuencia, o se recurre a utilizar métodos de resolución numérica, o bien, en el caso de que deseemos disponer de expresiones analíticas, debemos utilizar métodos aproximados que, en esencia, consisten en linealizar el sistema de ecuaciones diferenciales que describe el esquema de reacción. Ambas formas de abordar la resolución del sistema de ecuaciones tienen sus ventajas e inconvenientes que, básicamente podemos resumir así:

Soluciones numéricas

La integración numérica por ordenador puede utilizar diferentes métodos, ya sea mediante simulación analógica (Higgins, 1961) o digital (Hayashi y Sakamoto 1986). En los

últimos años, los métodos de simulación digital están desplazando a los analógicos en el análisis cinético de las reacciones enzimáticas.

En la simulación digital, el principal problema consiste en elegir el método adecuado de integración numérica. Cada método posee sus propias ventajas e inconvenientes y la elección de uno u otro viene generalmente determinada por el problema a estudiar (Gordon y Alldridge, 1971). La mayoría de los programas de integración utilizan el método de Runge-Kutta-Gill para la resolución de ecuaciones diferenciales. Este método a menudo presenta numerosas dificultades al aplicarlo a sistemas de reacciones enzimáticas. Se han propuesto numerosos métodos de resolución (Garfinkel y col., 1977), siendo el método de Gear el más ampliamente utilizado (Gear, 1971).

Garrido del Solo y col. (1992) realizaron un programa de ordenador para MS DOS escrito en TURBO PASCAL para simular el comportamiento cinético de reacciones enzimáticas de hasta 20 especies. Dadas las concentraciones iniciales de cada especie, el programa resuelve el sistema de ecuaciones diferenciales mediante un algoritmo basado en el método de Adams-Bashforth de cuarto orden como predictor y una iteración del método de Adams-Moulton (Burden y Faires, 1985; Michavilla y Gavete, 1985; Gerald y Wheatley, 1989) como corrector después de calcular los tres valores siguientes a los valores iniciales mediante el método Runge-Kutta de cuarto orden.

Este programa fue posteriormente mejorado por García-Sevilla y col. (2000) al implementar un programa de ordenador específico para MS Windows 95/98/NT/XP, escrito en C ++, que puede ser utilizado para mecanismos de reacción que contengan hasta 32 especies. El tiempo de computación es corto, la entrada de los datos es fácil y los resultados se obtienen como imágenes gráficas de las curvas de progreso y como tablas ASCII. El programa utiliza el método de Runge-Kutta de cuarto orden, pero aplicando un control adaptativo del paso de integración inventado por Fehlberg (Fehlberg, 1970; Mathews y Fink, 1999).

Soluciones analíticas

Por otro lado, la aproximación generalmente más utilizada para la obtención de soluciones analíticas consiste en considerar que hay un exceso de concentración inicial de las

especies ligando que reaccionan con algún intermedio, con respecto a la de enzima inicial, lo que permite linealizar el sistema, que de esta forma se hace integrable analíticamente.

Los primeros trabajos teóricos para la obtención de soluciones analíticas válidas para la fase de transición fueron publicados por Roughton (1954) para un mecanismo con un solo intermedio. Posteriormente Ouellet y colaboradores (Ouellet y Laidler 1956; Ouellet y Stewart, 1959) extendieron este tratamiento al caso de un mecanismo con dos intermedios. En estos trabajos se supone que la concentración de sustrato es mucho mayor que la de las especies enzimáticas. Por su parte, Kasserra y Laidler (1970) han ampliado este estudio al caso en el que la enzima está en exceso respecto al sustrato, lo que permite obtener una información que no proporciona el caso inverso. Posteriormente, Darvey (1977) publicó un trabajo en el que permite que las concentraciones iniciales sean cualesquiera. Se han propuesto diversos métodos (Gálvez y Varón, 1981; Gálvez y col., 1982, 1983) para calcular las constantes individuales de velocidad de diversos mecanismos, a partir del análisis cinético de las curvas de progreso de los productos de reacción.

Un procedimiento utilizado a menudo para la obtención de las soluciones analíticas de un mecanismo en concreto es particularizar a él las ecuaciones cinéticas en fase de transición obtenidas en la literatura para un modelo general de reacción enzimática (Darvey, 1968, 1977; Gálvez y Varón, 1981; Chou, 1989). Otro procedimiento (Varón y col., 1990b) consiste en obtener las ecuaciones cinéticas en fase de transición correspondientes a un mecanismo determinado a partir de las ya conocidas de un mecanismo más complejo (mecanismo primitivo), del que el primero (mecanismo derivado) puede considerarse, real o formalmente, un caso particular. Este procedimiento es análogo al ya existente para la obtención de ecuaciones en estado estacionario (Varón y col., 1989).

Se han desarrollado programas de ordenador (Cornish-Bowden, 1977; Fromm, 1979; Canela, 1983; Herries, 1984; Ishikawa y col., 1988) que facilitan la deducción de la ecuación de velocidad en el estado estacionario. Se ha publicado también un trabajo (Zhang y col., 1989) que describe un programa de ordenador para obtener y representar las ecuaciones cinéticas de la fase de transición, a partir de valores numéricos de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales de los reactivos.

Así mismo, se han desarrollado programas de ordenador que permiten obtener las ecuaciones cinéticas de la fase de transición y del estado estacionario de una reacción

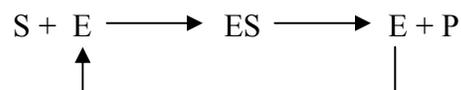
enzimática en función de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales de los reactivos, cuando la única especie enzimática presente al comienzo de la reacción es la enzima libre en una única forma conformacional (Varón y col., 1990c) o bien cuando hay más de una forma enzimática al comienzo de la reacción (Varón y col., 1990d). En ellos se obtienen las ecuaciones para condiciones estrictas, es decir, sin ninguna etapa reversible en equilibrio rápido. Posteriormente se han desarrollado dos programas de ordenador (Varón y col., 1997, 1999) que además de presentar una mejor entrada y salida de los datos en pantalla, facilitando así la interacción con el usuario, contempla casos en los que una o más de las etapas reversibles involucradas en el mecanismo puedan estar en equilibrio rápido.

1.1.3 El complejo Enzima-Sustrato (ES)

Una reacción $S \rightarrow P$ catalizada enzimáticamente puede escribirse como:



Pero se vio en seguida que la enzima y el sustrato debían combinarse de alguna forma durante la reacción. La secuencia de la reacción total puede escribirse como:



Aunque la enzima participa en la secuencia de reacción, no se consume. Así, solo unas pocas moléculas de E pueden catalizar la conversión de miles de moléculas de S en P cada segundo. La existencia de un complejo enzima sustrato, ES , se dedujo a partir de (Segel, 1975):

El alto grado de especificidad que presentan los enzimas (Fischer, 1894).

La forma de la curva de velocidad frente a la concentración de sustrato (Brown, 1902; Henri, 1902).

El hecho de que frecuentemente los sustratos protegen a las enzimas de la inactivación (O'Sullivan y Tompson, 1890).

La especificidad de las enzimas está relacionada con la estructura tridimensional de la molécula enzimática. En una reacción catalizada enzimáticamente, la enzima se combina temporalmente con el reactivo, el **sustrato** (S) de la enzima, formando un **complejo enzima-sustrato** (ES). Entonces, a medida que la reacción procede, el **producto** (P) se libera y la enzima (E) vuelve a su estado original:

La enzima es generalmente más grande que el sustrato(s) y la combinación de la enzima y el sustrato(s) depende normalmente de fuerzas débiles, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrófobas para unir la enzima con el sustrato. La pequeña parte de la enzima a la que se une el sustrato se conoce como el **sitio activo** de la enzima.

La unión del sustrato a la enzima produce el complejo enzima-sustrato. Ello sirve para alinear los grupos reactivos, tensionando enlaces específicos del sustrato. El resultado del complejo enzima-sustrato es la reducción de la energía de activación para que proceda la reacción, con la consiguiente conversión del sustrato en producto(s).

En la siguiente figura se ilustra la formación del complejo enzima-sustrato.

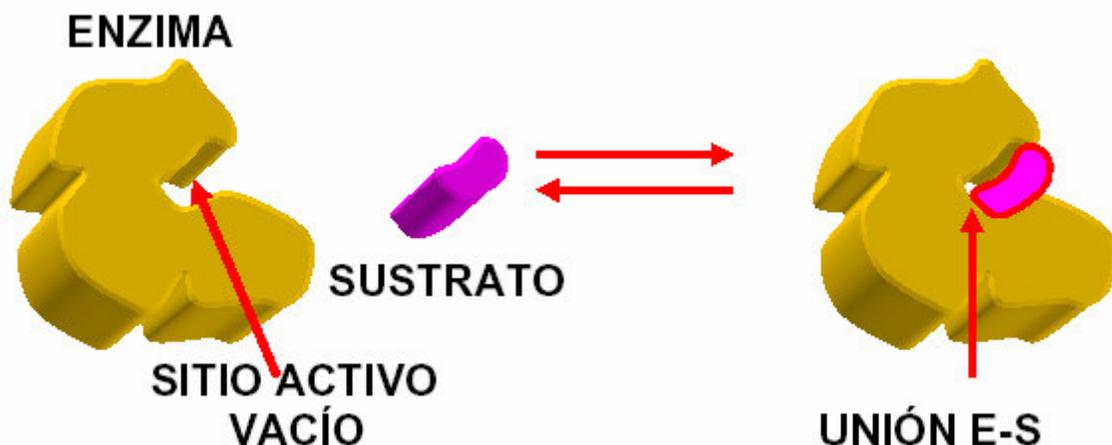


Figura 1.3. Formación del complejo enzima-sustrato.

Sin embargo aunque la formación del complejo enzima-sustrato ha sido deducida y demostrada por los experimentos de O'Sullivan y Tompson (1890), Fischer (1894) Brown (1902), Henri (1902) y posteriormente por Michaelis y Menten (1913), en la actualidad no suele ser incluido en los mecanismos de reacción propuestos para ciertas enzimas, debido a la complejidad matemática que este hecho implica.

1.2 PROTEASAS

La vida de los seres depende en buena parte de la acción de las proteínas, sus biomoléculas más versátiles. Las proteínas, y entre ellas las enzimas, se forman a partir de veinte aminoácidos distintos. La combinación de éstos en largas cadenas, con centenares de unidades cada una, posibilita la formación de millares de proteínas diferentes, adaptadas a los distintos procesos biológicos.

Los organismos necesitan controlar la actividad de esta multitud de proteínas para sus propias funciones. Los mecanismos de control de la actividad proteica han ido perfeccionándose a lo largo de la evolución. En ese camino han adoptado diversas formas: control genético de la cantidad de proteína sintetizada, control directo de su actividad mediante sustancias como sustratos o inhibidores que se unen a sus centros activos (que son las regiones de la molécula donde se lleva a cabo su acción biológica), o control indirecto de su actividad por unión de sustancias fuera de su centro activo (regulación alostérica). Así, los organismos vivos disponen de diferentes sistemas de amplificación biológica que les ayudan a alcanzar una rápida respuesta frente a un estímulo dado, cuya cinética ha sido ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación, tales como los denominados ciclos de sustrato (Newsholme y col., 1984; Valero y col., 1995, 1997, 2000, 2004, 2006), cascadas enzimáticas (Chock y col., 1980; Varón y col., 1994a,b, 2005a,b,c) y reacciones de proteólisis limitada (Neurath y Walsh, 1976; Butenas y Mann, 2002; Dobrovolsky y Titaeva, 2002; Nesheim, 2003; Varón y col., 1991; Manjabacas y col., 1995, 1996; Fuentes y col., 2005a,b).

Los ciclos de sustrato y las cascadas de modificación covalente de enzimas son procesos cíclicos reversibles, en los que un sustrato o una enzima, respectivamente, sufren modificación y desmodificación por dos enzimas diferentes. En cambio las reacciones de proteólisis limitada constituyen un mecanismo de control irreversible, ya que se produce una degradación parcial de una proteína, catalizada por unas enzimas denominadas proteasas. Los mecanismos de control irreversible están dedicados generalmente a proteínas que poseen una acción biológica muy potente o de especial riesgo para su entorno (enzimas degradadoras, neuropéptidos, hormonas y otras), para las que es necesario un control muy estricto de su actividad hasta alcanzar el lugar de destino y en el momento apropiado. Estas proteínas se

sintetizan, por lo común, en forma de precursores inactivos con una extensión peptídica que bloquea su funcionalidad.

Otras veces, la degradación limitada de proteínas tiene relación con los procesos encargados de dirigir las proteínas recién sintetizadas hacia su definitiva ubicación intracelular o extracelular. Éste es el caso de los segmentos “pre”, secuencias aminotermiales adicionales con las que se sintetizan las proteínas que deben ser secretadas fuera de la célula o que tienen su destino en membranas o en orgánulos celulares. Los segmentos en cuestión conducen a la proteína hasta su asiento final, cumplido lo cual se eliminan por proteólisis limitada. Además de la degradación limitada debemos considerar la degradación total que sufren todas las proteínas al final de su vida. Gracias a este mecanismo de control irreversible se ajusta la concentración de proteínas en tejidos y fluidos biológicos mediante el equilibrio entre degradación y síntesis. Ello permite, además, su renovación constante, eliminando las afectadas por procesos de envejecimiento.

La moléculas responsables de los mecanismos de control de la actividad proteica por degradación irreversible son las proteasas, enzimas de gran rendimiento catalítico capaces de catalizar a gran velocidad reacciones hidrolíticas en las cadenas polipeptídicas de las proteínas sustrato. La acción proteolítica de estas enzimas se halla controlada, a su vez, por inhibidores, cuyo efecto es el de impedir que su acción degradativa se lleve a cabo o se extienda. Y, al ser las proteasas moléculas peligrosas para su entorno, se suelen sintetizar en forma de precursores inactivos, las preproteasas o zimógenos.

El estudio de las proteasas y de sus precursores está facilitando una mejor comprensión de los procesos de regulación por proteólisis limitada, así como de los mecanismos de inhibición y activación de los precursores inactivos en general. Se conoce bastante bien la bioquímica de las proteasas, su estructura tridimensional y mecanismo de actuación, contándose entre las primeras enzimas que se cristalizaron.

Las proteasas son también una herramienta muy útil en el análisis de la secuenciación de aminoácidos y en la identificación y aislamiento de cadenas de proteínas multifuncionales más complejas (Walsh, 1986). Por otro lado, el aislamiento de proteínas de tejidos biológicos requiere una inactivación selectiva de las proteasas que interfieren mediante inhibidores específicos. Esta medida, que parece tan simple conceptualmente, puede ser una tarea laboriosa si la naturaleza, estabilidad y especificidad de las proteasas contaminantes no es

conocida. Con ayuda de la biología molecular se ha descubierto una nueva dimensión en el estudio de las proteasas a partir de sus correspondientes ADN. Esta información ha contribuido de forma significativa a nuestro conocimiento de la organización, funciones y evolución de proteasas reguladoras más complejas.

1.2.1 Clasificación

Originalmente, las proteasas se clasificaron de acuerdo con su masa molecular, carga o especificidad de sustrato. Un sistema más racional se basa en la comparación de sitios activos, mecanismos de reacción y estructura tridimensional. La Unión Internacional de Bioquímica reconoce cuatro clases. Cada familia posee un conjunto característico de residuos de aminoácidos dispuestos en una configuración particular para formar el sitio activo. En la tabla 1.1 se muestran estas clases y familias.

Tabla 1.1. Clases y familias de proteasas (Drenth y col., 1971; Neurath, 1984; Kostka, 1985)

CLASE	PROTEASA REPRESENTATIVA	RESIDUOS CARACTERÍSTICOS DEL SITIO ACTIVO
Serinaproteasas	Quimotripsina	Asp 102; Ser 195; His 57
	Subtilisina	Asp 32; Ser 221; His 64
Cisteínaproteasas	Papaína	Cys 25; His 159; Asp 158
Aspárticoproteasas	Pepsina	Asp 32; Asp 215
Metaloproteasas	Carboxipeptidasa A Bovina	Zn; Glu 270; Try 248
	Termolisina	Zn; Glu 143; His 231

Dentro de cada familia se cree que sus miembros proceden de una proteasa común y que a partir de ahí tuvo lugar una evolución divergente.

1. Familia de las serinaproteasas

Es la familia de proteasas mejor caracterizada y fisiológicamente más versátil (Kraut, 1977). Incluye enzimas íntimamente relacionadas que contienen un residuo reactivo de serina en el sitio activo. El grupo de las serinaproteasas es muy amplio y puede ser dividido en otras subfamilias, de cada una de las cuales se puede tomar un miembro representativo. El grupo de la quimotripsina contiene proteasas como tripsina, elastasa, acrosina, calicreína, catepsinas (A, G y R), factores de coagulación (VII, IX, X, XI), activador del plaminógeno, trombina, proteína C y factores del sistema del complemento. Todas ellas se caracterizan por constar en su estructura de dos barriles beta entre los que se encuentra el centro activo, donde hay un aminoácido serina indispensable para su acción catalítica. Los barriles beta deben su nombre a que la cadena polipeptídica adopta una estructura extendida y ondulada (estructura beta) que se repliega en segmentos antiparalelos que adoptan la forma de un barril. Si bien poseen unas estructuras y unos mecanismos de reacción similares, presentan distintas especificidades de sustrato. El mecanismo de reacción de la quimotripsina ha sido estudiado exhaustivamente durante cuarenta años y es típico de las serinaproteasas, pudiendo extrapolarse a otras reacciones catalizadas enzimáticamente

Las serinaproteasas intervienen en la coagulación sanguínea, defensa inmunitaria y fecundación, entre otras funciones.

Otra subfamilia es la representada por subtilisina, una serina proteasa bacteriana producida por *Bacillus subtilis*, cuya estructura y conformación se diferencia marcadamente de las serinaproteasas de vertebrados. Existe una analogía entre la quimotripsina y la subtilisina, que se considera un ejemplo de una evolución convergente, fenómeno por el que proteínas de especies no relacionadas han desarrollado una función y un mecanismo de reacción común para un proceso dado.

Otros grupos interesantes son las prolil oligopeptidasas y las serina carboxipeptidasas.

2. Familia de las asparticoproteasas

Esta familia está representada por la pepsina gástrica, proteína que consta de dos regiones globulares o dominios similares, formados esencialmente por cadenas beta, y asociados en forma de “croissant”, entre los cuales discurre un amplio surco que contiene el centro activo. Los residuos característicos del sitio activo son los aminoácidos Asp-32 y 215 (numeración de la pepsina porcina) (Beynon y Bond, 1989). En este mismo grupo de proteasas se inscribe la quimosina, responsable de la coagulación gástrica de la leche en mamíferos neonatos, y la renina, enzima que circula por el torrente sanguíneo y activa la angiotensina, hormona que controla la presión arterial y el balance de electrolitos, así como ciertas proteasas de origen bacteriano. Un inhibidor muy potente de las proteasas aspárticas es la pepstatina.

3. Familia de las cisteinaproteasas

Esta familia encuentra en la papaína uno de los miembros más representativos. La estructura de la papaína contiene dos dominios abrazados, lo que le sirve de protección contra la autólisis, con un aminoácido cisteína no oxidado en su centro activo (Cys-25) (Beynon y Bond, 1989). Diversas catepsinas (L, S, H, B, etc), mayoritarias en los lisosomas (orgánulos celulares en donde se degradan proteínas), son cisteinaproteasas. Se ha observado la participación de cisteinaproteasas en la replicación y acción de parásitos y virus, así como en procesos patológicos, tales como distrofia muscular, osteoporosis e invasividad tumoral.

4. Familia de las metaloproteasas

Los componentes de la heterogénea familia de las metaloproteasas poseen un metal, cinc por lo común, en su centro activo. Sus cadenas polipeptídicas presentan plegamientos tridimensionales muy diversos. En las estructuras conocidas de enzimas de este grupo se ha observado que el átomo metálico presenta tres ligandos con la cadena polipeptídica y el cuarto ligando es una molécula de agua que se activa cuando se inicia el ataque nucleofílico sobre el enlace a hidrolizar. Se conocen hasta 25 familias de metaloproteasas que incluyen subfamilias de endopeptidasas como la de la termolisina, la colagenasa y astacina, y de exopeptidasas como las carboxipeptidasas y las aminopeptidasas. En vertebrados, la carboxipeptidasa A es secretada por el páncreas en forma de zimógeno al intestino delgado. Tras su activación, esta proteasa participa en la digestión de las proteínas. Las colagenasas, ejemplo de

metaloendopeptidasas, intervienen en la degradación del tejido conjuntivo y revisten interés en patologías reumatoides y en invasión tumoral.

- **Otras peptidasas**

Hay otras peptidasas que no están representadas en ninguna de las cuatro familias. Entre ellas se encuentra la familia N-terminal hidrolasas nucleofílicas que incluyen el proteosoma 20S de levadura, penicilina G amidasa (PGA), glutamina PRPP amidotransferasas, glicosilasparaginasas y penicilina V amidasa (PVA). Este diverso grupo muestra rasgos en común como un único plegamiento y el hecho de que todas necesitan ser activadas para exhibir sus propiedades como hidrolasa. Estas hidrolasas se caracterizan por el hecho de que el nucleófilo del sitio activo es Thr, Cys o Ser, está localizado en la posición del extremo N-terminal y debe ser destapado por la activación para llegar a ser activo.

Otra familia incluye la proteasa de la germinación (GPR) responsable de la degradación de proteínas que protegen el ADN antes de la germinación de esporas (Lazure, 2002).

Los estudios cristalográficos de rayos-X han contribuido significativamente al entendimiento de la activación de peptidasas, han suministrado mecanismos y estructuras novedales y continuarán siendo una herramienta principal en el análisis del funcionamiento de las peptidasas. Sin embargo, en pocos años, debido al conocimiento total del genoma, existen numerosas familias y miembros emergentes que obviamente no tienen homólogo cristalográfico. Algunos ejemplos son: las caspasas, que son proteasas intracelulares que actúan como reguladores de la muerte celular y son los efectores de la apoptosis, y las matrix metaloproteasas (MMPs), que son sintetizadas como zimógenos.

1.2.2 Transformación proteolítica y regulación fisiológica

La transformación proteolítica es la etapa final en la expresión de la actividad de una gran variedad de proteínas, operando cambios en la estructura tridimensional y en la funcionalidad de las proteínas. La proteólisis está dirigida y limitada a la rotura de enlaces peptídicos específicos situados en determinadas regiones de la proteína (Figura 1.4). Estas regiones presentan un plegamiento espacial laxo para facilitar la acción proteolítica y, a veces,

las proteasas de vertebrados del tracto digestivo, fundamentalmente las de secreciones pancreáticas y gástricas, y, por lo tanto, están entre las mejor caracterizadas estructural y funcionalmente, las proteasas reguladoras más complejas son de mayor importancia a causa de la gran variedad de procesos fisiológicos en los que toman parte. Éstos abarcan desde la transformación y asociación molecular de las crecientes cadenas polipeptídicas hasta la transformación de precursores de hormonas proteicas, receptores y factores de crecimiento, y la activación de proteasas reguladoras implicadas en la coagulación sanguínea, fibrinólisis y en el sistema del complemento. Igualmente importantes, aunque menos caracterizadas, son las proteasas celulares encontradas en una gran variedad de tejidos.

Así pues, estas proteínas constituyen uno de los modelos más utilizados para la aplicación de metodologías de manipulación y transformación genéticas y de ingeniería de proteínas, gracias a su variedad de formas, al profundo conocimiento que se tiene de ellas y a la potencialidad de sus aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Con la introducción de métodos más sofisticados de aislamiento y caracterización de proteínas y la aplicación de métodos de biología molecular, las proteasas se han convertido en un campo muy importante dentro de la investigación aplicada (Craik, y col., 1995; Gardell y col., 1985; Bryan y col., 1986; Neurath, 1986; Neurath, 1999; Chang y Yang, 2000; Dunn y col., 2002; DeClerck y col., 2004).

1.3 ZIMÓGENOS

1.3.1 Reacciones de activación

Una importante cantidad de proteínas se sintetizan como precursores inactivos, que se activan en un tiempo y lugar apropiados fisiológicamente, para proteger la célula que los produce. Estos precursores se denominan proenzimas o zimógenos, y deben sufrir un proceso de activación para convertirse en enzimas activas.

Éste es un fenómeno de gran importancia para entender el comportamiento de muchos procesos fisiológicos fundamentales, tales como la digestión (Chen y col., 2003), la muerte celular (Boatright y Salvesen, 2003; Shi, 2004), la diferenciación (Pearson y col., 2001), la respuesta inmune (Kanost y col., 2004), la coagulación sanguínea (Spronk y col., 2003), la fibrinólisis (Varón y col., 1986; Marin y col., 2003) y la respuesta a una lesión (Lluis y col., 2001). Otros ejemplos son la evolución de los virus, oncogenes y células metastáticas (McKay, 2003).

La reacción de activación de zimógenos requiere la rotura catalítica de uno o más enlaces peptídicos por proteólisis limitada. Este proceso es una reacción exérgica en condiciones fisiológicas normales y tiene carácter irreversible, no existiendo reacciones opuestas que regeneren el mismo enlace peptídico hidrolizado o que reinserten el péptido liberado correspondiente. En este sentido, la activación de zimógenos es un mecanismo de control del organismo que difiere, esencialmente, de las transiciones alostéricas y de las modificaciones covalentes reversibles (Stadtman, 1970). En la figura 1.5 se muestra, como ejemplo, la activación de quimotripsinógeno a α -quimotripsina.

Los zimógenos pierden uno o varios péptidos en la proteólisis. La naturaleza tiende a ahorrar la pérdida de grandes regiones proteicas que son de síntesis costosa. En alguna ocasión, sin embargo, los péptidos o fragmentos de activación eliminados pueden superar, en tamaño, a la propia proteína activa. Un ejemplo de este proceso es la activación del plasminógeno, proteína sanguínea que pierde 560 aminoácidos de sus 791 iniciales.

En algunos casos, el proceso de activación de zimógenos consta de una sola reacción, mientras que en otros, el proceso implica una serie de reacciones consecutivas o cascada, que

sirve para amplificar un estímulo y obtener una mayor respuesta fisiológica (Neurath, 1975). En virtud de una cascada de activación, fenómeno característico de los sistemas regulados por proteólisis limitada, varios precursores inactivos de proteasas se activan consecutivamente de forma específica, multiplicando así la acción inicial de unas pocas moléculas.

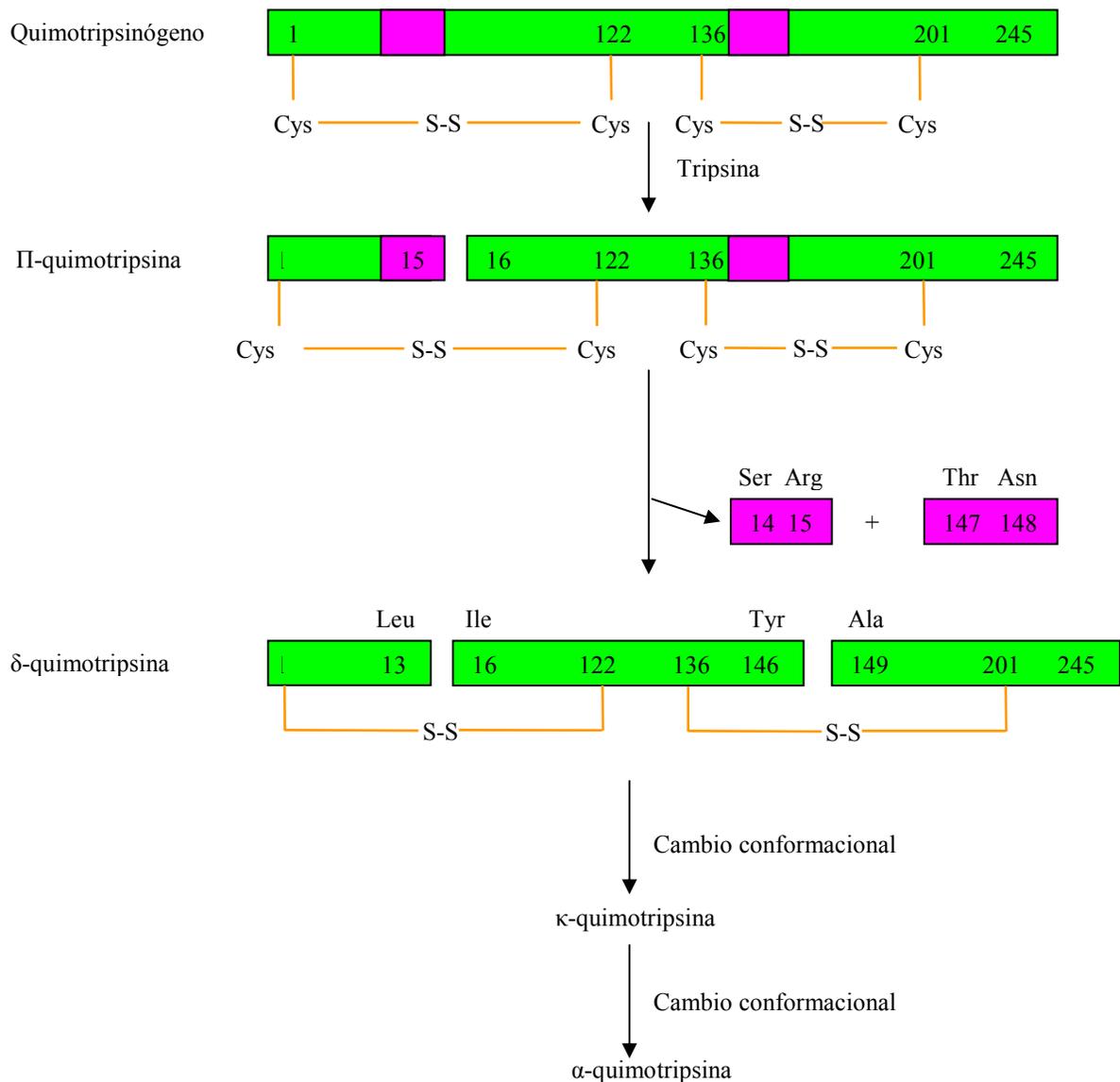


Figura 1.5. Activación de quimotripsinógeno. La formación de la estructura final de la quimotripsina ocurre en varias etapas. En la primera, la tripsina rompe el enlace entre los residuos de arginina 15 y de isoleucina 16, resultando una forma activa de la quimotripsina llamada π -quimotripsina. A continuación, unas roturas proteolíticas autocatalizadas por la quimotripsina conducen a la formación de la δ -quimotripsina, que sufre ciertos cambios conformacionales sucesivos, resultando en primer lugar κ -

quimotripsina y en segundo término α -quimotripsina, forma activa final de la enzima (Rawn, 1989).

En la Figura 1.6 se esquematiza un proceso de activación de zimógenos en cascada. En la cascada de activación, el producto de una reacción se convierte en el catalizador de la siguiente. La secuencia de los acontecimientos viene determinada por la especificidad de cada enzima, por la posible presencia de inhibidores y el grado de amplificación del estímulo inicial debido a la eficacia de cada proceso de activación.

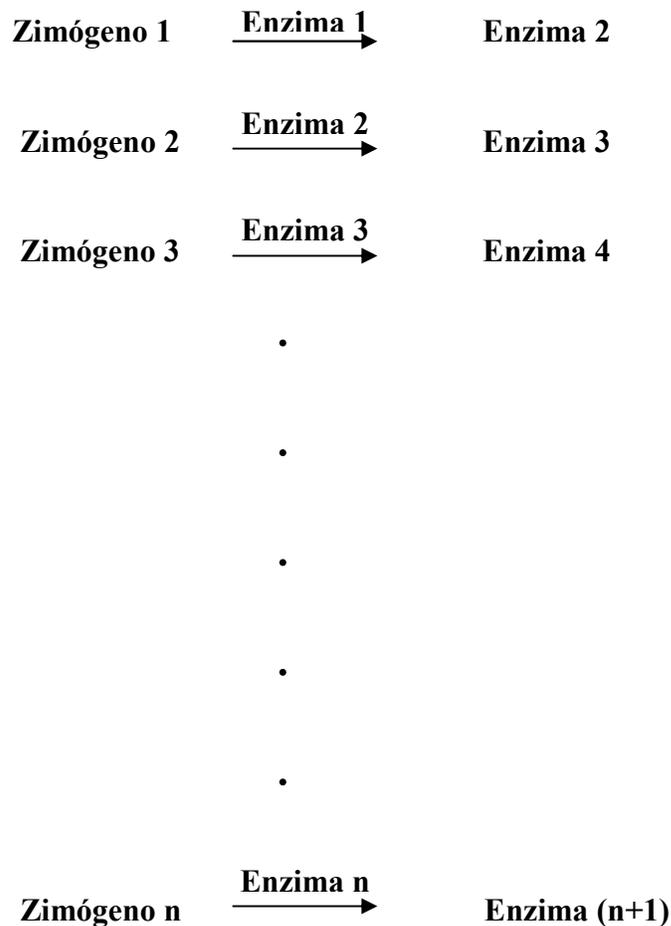
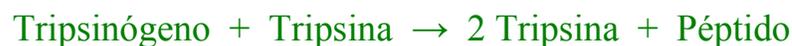


Figura 1.6. Representación esquemática de una reacción de activación de zimógenos en cascada. La conversión del zimógeno 1 en la enzima 2 tiene lugar mediante la enzima 1, a su vez, la enzima 2 transforma el zimógeno 2 en la enzima 3, ésta última transforma el zimógeno 3 en la enzima 4 y así sucesivamente.

1.3.2 Procesos autocatalíticos

La activación de zimógenos por rotura proteolítica de uno o varios enlaces peptídicos es un proceso enzimático que requiere la presencia de una enzima activante. Generalmente, la enzima activante es distinta a la enzima activa resultante de la activación, dando lugar a un proceso de activación intermolecular sobre el precursor o zimógeno. Se pueden dar casos de activación recíproca, como ocurre cuando calicreína activa el factor XII acoplado a la activación de precalicreína por el factor XIIa (Smith y col., 2002).

En aquellos casos en los que la enzima activante coincide con la activada el proceso de activación de zimógenos es autocatalítico. Ejemplos fisiológicos incluyen la activación de tripsinógeno a tripsina (Brunger y col., 1987; Manjabacas y col., 1995; Liu y Wang, 2004), la conversión de pepsinógeno a pepsina (Al-Janabi y col., 1972; Auer y Glick, 1984; Kageyama y Takahashi, 1987; Kageyama, 1988; Kageyama y col., 1989; Nielsen y Foltmann, 1993; Richter y col., 1998), y de precalicreína a calicreína (Tans y col., 1987; Magklara y col., 2003; Shariat-Madar y col., 2004). Por ejemplo:

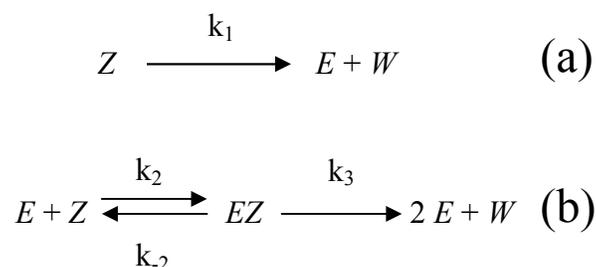


En estas reacciones, la propia enzima activa puede actuar en una reacción de autocatálisis sobre su precursor o zimógeno (Hadorn, 1974). En otros casos sin embargo, los zimógenos muestran bajos niveles de capacidad proteolítica que puede contribuir a la activación de otras moléculas distintas del propio zimógeno (Gertler y col., 1974; Kerr y col., 1975). El proceso de autoactivación que acabamos de describir tiene carácter intermolecular (Silverberg y col., 1980). Aunque la eficacia catalítica de la autoactivación es baja, la naturaleza exponencial de la autocatálisis favorece que pueda llegar a representar un factor importante en el proceso global de activación de zimógenos. Algunos zimógenos, como el pepsinógeno, sufren autoactivación intermolecular e intramolecular (Al-Janabi y col., 1972; Karlson, 1988):

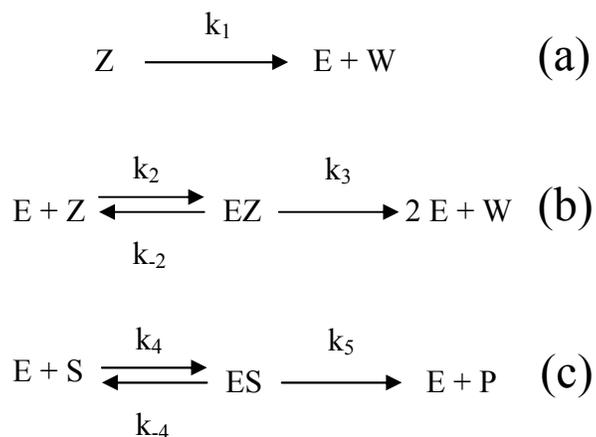


En este caso, la activación del pepsinógeno sucede de forma espontánea a pH inferior a 5. La etapa clave concretamente en el pepsinógeno porcino es la rotura del enlace peptídico entre los aminoácidos Leu 16 e Ile 17 (James y Sielecki, 1986).

En esta memoria se va a estudiar un Modelo general de autoactivación de zimógenos de proteasas aspárticas en el que el zimógeno sufre activación intramolecular e intermolecular. Se realizará un seguimiento experimental del modelo general propuesto en discontinuo (Esquema 1.3) y en continuo (Esquema 1.4).



Esquema 1.3. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos que incluye una etapa intramolecular (ruta (a)) y otra intermolecular (ruta (b)). *Z* es el zimógeno, *E* es tanto la proteasa activante como la enzima activada, *EZ* es el complejo enzima-sustrato intermedio de la reacción, y *W* es uno o más péptidos liberados de *Z* durante la formación de *E*.



Esquema 1.4. Mecanismo general propuesto para la autoactivación de zimógenos incluyendo las etapas intramolecular (ruta (a)) e intermolecular (ruta (b)), y la hidrólisis de un sustrato de la enzima activa (ruta (c)). *Z* es el zimógeno, *E* es tanto la proteasa activante como la enzima activada, *EZ* es el complejo intermedio enzima activa-zimógeno, *W* es

uno o más péptidos liberados de Z durante la formación de E , S es un sustrato cromogénico de la enzima activa, ES es un complejo intermedio enzima-sustrato y P es el producto de la hidrólisis del sustrato S .

El Esquema 1.3 es una modificación del mecanismo previamente propuesto para este tipo de procesos (Koga y Hayashi, 1976), el cual se trató únicamente por integración numérica. La principal innovación de este trabajo es que el comportamiento cinético del sistema se ha analizado por ambas vías, analítica y numérica, mostrando así la bondad del análisis. Hasta ahora el análisis analítico no se había llevado a cabo por la complejidad matemática que incluye la formación de un intermedio enzima-sustrato en la etapa intramolecular. Además, también se va a estudiar el mismo proceso autocatalítico pero incluyendo un sustrato cromogénico del enzima activa en el medio de reacción (Esquema 1.4), lo que permite monitorizar en continuo el progreso de la reacción. Dicho proceso autocatalítico se va a ilustrar experimentalmente mediante la activación de pepsinógeno-pepsina, que es un interesante sistema enzimático fisiológico.

En esta memoria también se van a sugerir parámetros adimensionales que proporcionen la contribución al proceso de activación, a cualquier tiempo de reacción, de ambas rutas de activación, es decir, las rutas intramolecular y la intermolecular para el Modelo general de autoactivación de zimógenos propuesto.

1.3.3 Ejemplos fisiológicos

En el metabolismo se encuentran numerosos ejemplos de procesos de activación de zimógenos. La digestión de las proteínas en el duodeno requiere la acción coordinada de varias enzimas proteolíticas, puesto que cada una es específica para un número limitado de cadenas laterales. Por ello, los zimógenos deben ser activados de uno en uno. El control coordinado se consigue por la acción de la tripsina como el activador común de todos los zimógenos pancreáticos: tripsinógeno, quimotripsinógeno, proelastasa y procarboxipeptidasas. Las células que tapizan el duodeno producen una enzima, la enteropeptidasa (enteroquinasa), que hidroliza un determinado enlace peptídico lisina-isoleucina del tripsinógeno cuando entra en el duodeno. La pequeña cantidad de tripsina

producida de esta forma activa el tripsinógeno y los otros zimógenos. En la Figura 1.7 se esquematiza este proceso de activación.

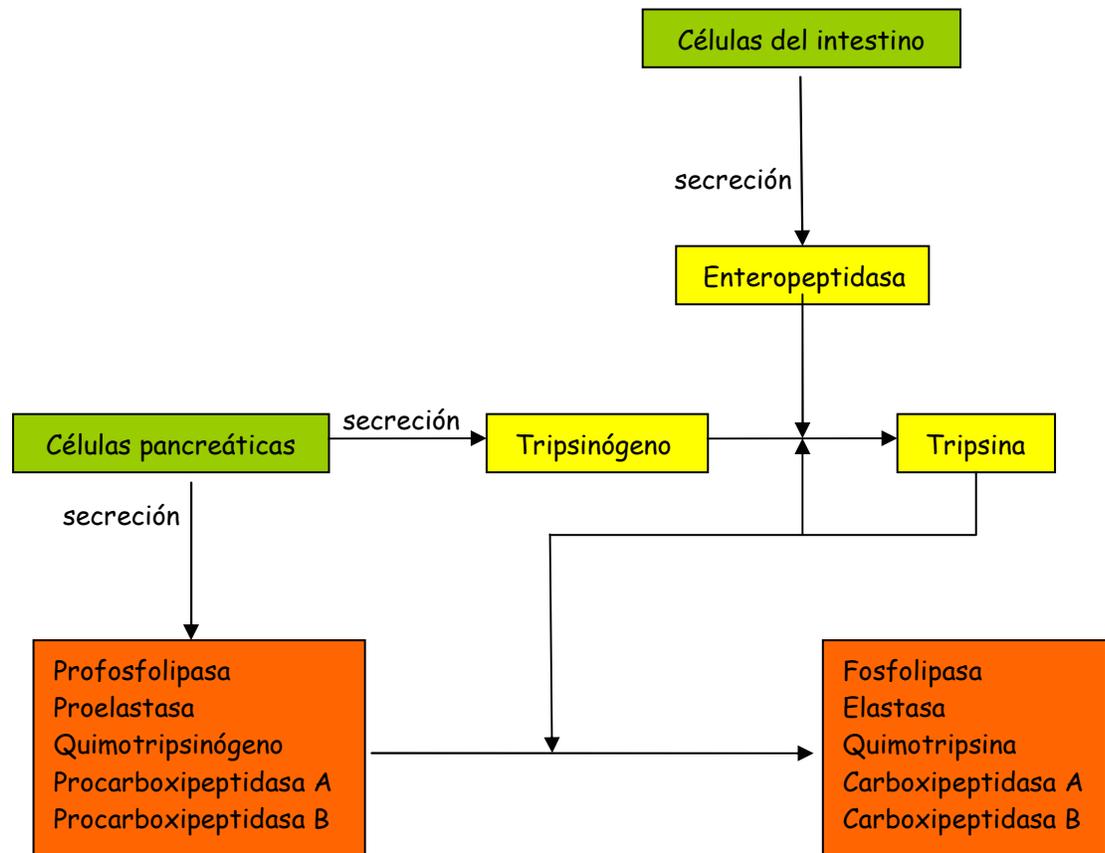


Figura 1.7. Esquema simplificado de la activación de zimógenos en el duodeno.

Otro ejemplo más complejo de activación de zimógenos en cascada se presenta en la coagulación de la sangre (Holzer y Heinrich, 1980; Wohl y col., 1980; Tankersley y Finlayson, 1984; Mann y col., 1988). Así, el fibrinógeno, para cumplir su misión formadora de coágulos que taponen las heridas, debe transformarse proteolíticamente en fibrina. En la cascada de la coagulación sanguínea participan numerosos factores, la mayor parte de los cuales son proteasas (Tabla 1.2). La existencia de esa cascada de coagulación permite que la activación de unas pocas moléculas de factores iniciales engendre miles de moléculas de fibrina en el momento de producirse la herida.

Tabla 1.2. Factores que participan en la coagulación sanguínea

Factor	Nombre
I	Fibrinógeno
II	Protrombina (II) Trombina (IIa)
III	Factor tisular o tromboplastina
IV	Iones calcio
V	Proacelerina (V) Acelerina (Va)
VII	Proconvertina
VIII	Factor antihemofílico
IX	Factor Christmas
X	Factor Stuart
XI	Tromboplastina plasmática
XII	Factor Hageman
XIII	Transglutaminasa

En la Figura 1.8 aparecen las vías intrínseca y extrínseca de la coagulación sanguínea, que convergen en las etapas finales para la formación del coágulo.

Los factores de la coagulación se indican por números romanos y la forma activa de los mismos se designa por la letra *a*. Las etapas que requieren Ca^{2+} se cree que ocurren en las superficies fosfolipídicas *in vivo*. Las formas precursoras de estos factores y de otras proteasas reguladoras son de cadena más larga y presentan estructuras más complejas que las de las proteasas digestivas.

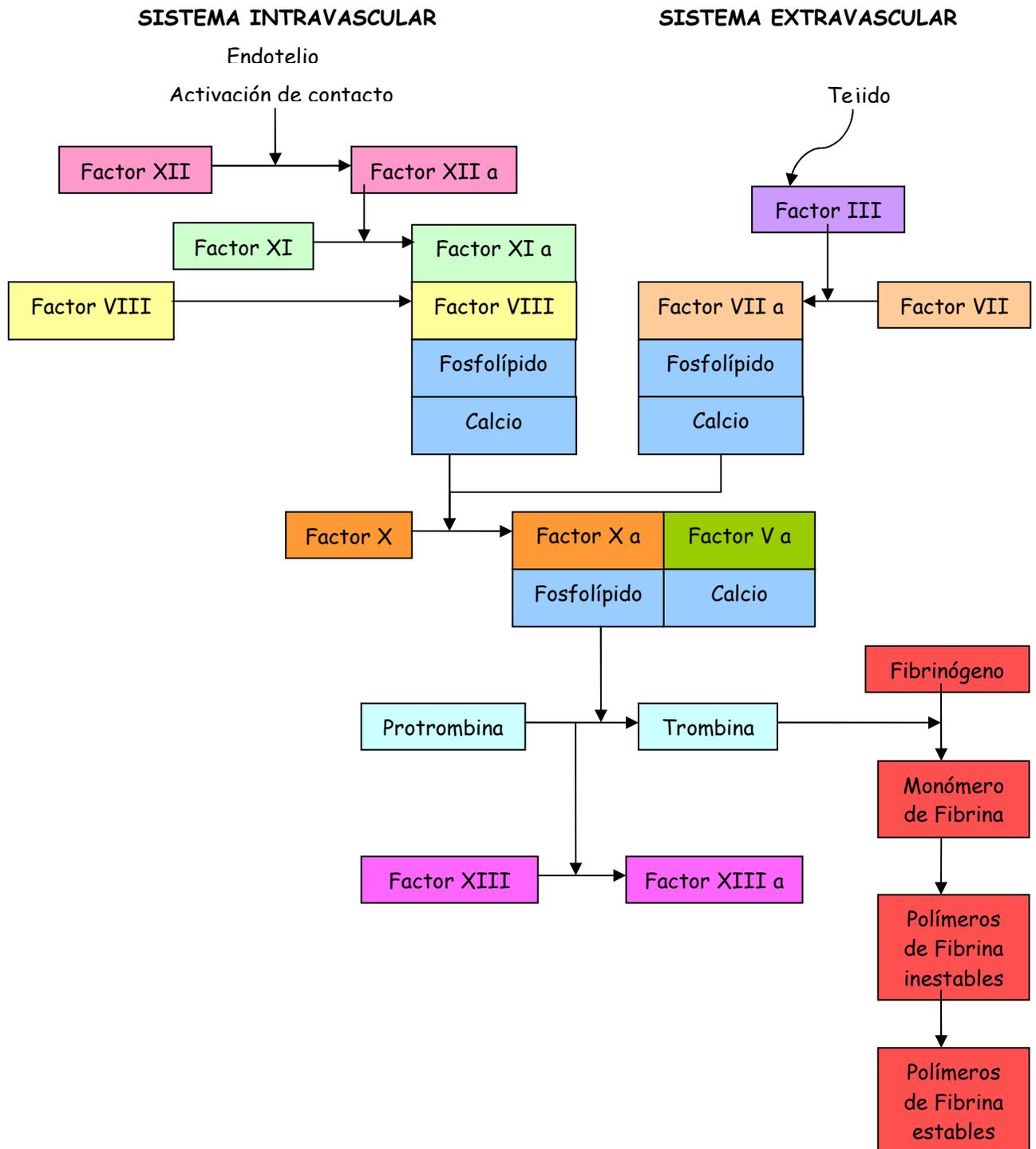


Figura 1.8. Reacciones de activación de zimógenos en cascada que se presentan en la coagulación de la sangre (Löffler y Petrides, 1988).

La fibrinólisis, otro mecanismo complejo de activación de zimógenos es el mecanismo compensatorio de la coagulación sanguínea. Consiste en la disolución, catalizada por plasmina, del coágulo de fibrina. En la Figura 1.9 se representa la cascada de activación de zimógenos en la fibrinólisis.

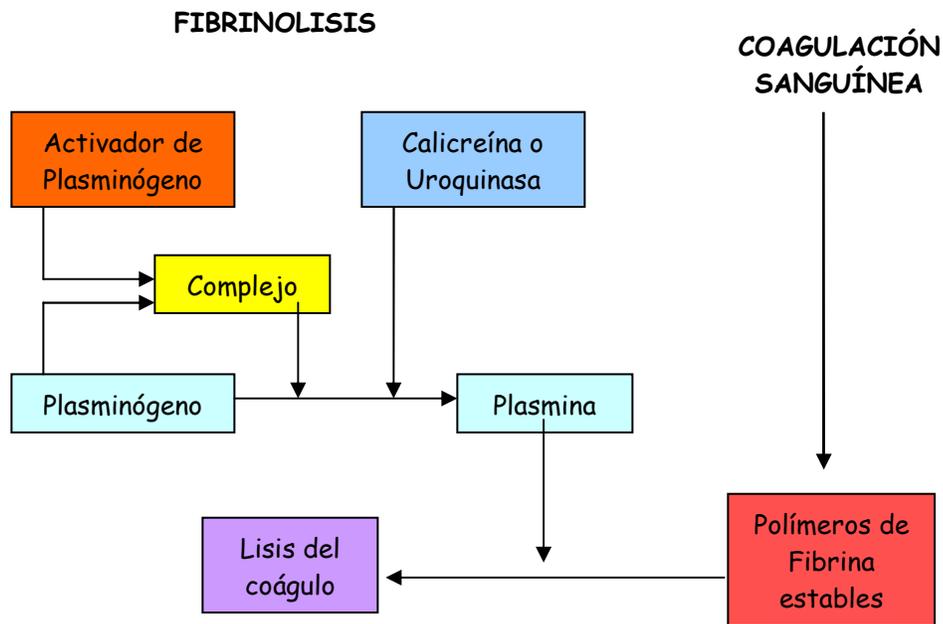


Figura 1.9. Esquema simplificado de la fibrinólisis.

En esta memoria se va a estudiar también un *Modelo de activación de zimógenos concreto que corresponde a la activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa*. El mecanismo a estudiar (Esquema 1.5) fue propuesto por Boxrud y col. (2004) y Boxrud y Bock (2004). Estos autores obtuvieron las ecuaciones de progreso con el tiempo del producto de la reacción bajo suposiciones muy exigentes. En la presente contribución hemos analizado el mecanismo del Esquema 1.5 bajo condiciones menos restrictivas y hemos obtenido las ecuaciones de progreso con el tiempo de las especies que intervienen en el sistema, válidas tanto para la fase de transición como para el estado estacionario.

11 proteínas en el sistema del complemento que se designan con la letra C y un número: C1, C2, C3 y así sucesivamente hasta C9. La proteína C1 es en realidad un conjunto de subunidades designadas por C1q, C1r y C1s. En el sistema del complemento (Hemker y Hemker, 1969; Klein, 1982; Wetsel y col., 1987; Müller-Eberhard, 1988; Havsteen y Varón, 1990), la cascada consecutiva de activación de zimógenos produce la histólisis de células bacterianas y tumorales.

En la Tabla 1.3 se ilustran ejemplos de fenómenos fisiológicos en los que participan los zimógenos. Como puede observarse, las proteasas cumplen también una función destacada en la replicación vírica. En retrovirus (el del SIDA incluido), rinovirus (el del catarro común, entre ellos), enterovirus (por ejemplo, los de la polio y la hepatitis A), y en diversos virus de plantas, se ha demostrado que las proteínas de la cápside se sintetizan en forma de poliproteínas precursoras y que, previamente, deben escindir-se en sus unidades mediante degradación limitada a cargo de proteasas.

Otros procesos biológicos donde también está implicada la activación de zimógenos son: la conversión de proinsulina en insulina (Mihalyi, 1972; Holzer y Heinrich, 1980); la transformación de angiotensinógeno en angiotensina (Holzer y Heirich, 1980) y la de protirosinasa en tirosinasa (Galindo y col., 1983). La activación de zimógenos presenta también aplicaciones en la terapia farmacológica, así por ejemplo, la administración del activador tisular de plasminógeno (t-PA) a un enfermo después de la formación de un trombo sanguíneo en una arteria coronaria aumenta la probabilidad de sobrevivir a un ataque cardíaco (Van de Werf y col., 1984).

Tabla 1.3. Ejemplos de zimógenos fisiológicos y fenómenos concretos afectados (Avilés y col., 1994).

FUNCION BIOLÓGICA	FAMILIA DE ZIMÓGENOS O FENÓMENO CONCRETO AFECTADO	EJEMPLOS DE ZIMÓGENOS INVOLUCRADOS O DE SU ACTIVADOR
Transporte proteico	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas. 	<ul style="list-style-type: none"> • La mayoría de las proteínas de segregación celular externa o de localización en membranas o en orgánulos celulares (muchas de ellas pre-proteínas.
Estructuración celular y tisular	<ul style="list-style-type: none"> • Ensamblaje del tejido conectivo. • Modelado del citoesqueleto y aparato contráctil. • Proteolisis limitada de proteínas unidas a membranas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procolágeno, proelastina. • Precursor de la proteasa dependiente del Ca (CANP o calpaína). • Proteasas de membrana de microorganismos.
Comunicación intercelular y regulación metabólica	<ul style="list-style-type: none"> • Prohormonas y productos vasoconstrictores. • Proneuropéptidos . • Proenzimas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Proinsulina, proglucagón, quinínogeno, angiotensínogeno. • Proopiomelanocortina. • Protirosinasa, profenoxidasa.
Control del desarrollo celular y de la fecundación	<ul style="list-style-type: none"> • Metamorfosis de anfibios y regeneración uterina. • Crecimiento neuronal (y tisular, en general). • Precursores de factores de crecimiento. • Oncogénesis. • Reumatismo. • Replicación vírica. • Formación de esporas. • Fecundación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Procolagenasa. • Acetilcolinesterasa→Proteasa. • Precursor del factor de crecimiento nervioso. • Estromielisina, activador plasminógeno. • Metaloendopeptidasas. • Poliproteína precursora de la proteasa VIH-1 del SIDA. • Proteasas A y B de levaduras. • Proacrosina.
Defensa	<ul style="list-style-type: none"> • Coagulación sanguínea. • Sistema inmunitario/sistema complemento. • Sistema inmunitario/mastocitos-anafilaxis local. • Venenos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Factores de coagulación (XII, XI, IX, X, etc). • Complejo oligomérico C1 del sistema del complemento. • Serina y metalproteasas de mastocitos. • Prometilina de abejas.
Degradación y recambio proteico	<ul style="list-style-type: none"> • Sistema digestivo de vertebrados. • Degradación intracelular. 	<ul style="list-style-type: none"> • Pepsinógeno, tripsinógenos, procarboxipeptidasas, etc. • Precursores de proteasas de membranas.

1.4 SISTEMA ENZIMÁTICO PEPSINÓGENO-PEPSINA

La pepsina se forma a partir del pepsinógeno mediante la proteólisis de 44 residuos del extremo N-terminal. El zimógeno es estable a pH neutro, pero por debajo de pH 5 se activa rápida y espontáneamente. El proceso de activación se lleva a cabo por dos rutas separadas, un proceso catalizado por la pepsina y otro catalizado intramolecularmente. Existen muchas pruebas de que el pepsinógeno se puede autoactivar por un proceso unimolecular en el que el sitio activo rompe el extremo N-terminal de su propia cadena polipeptídica (Al-Janabi y col., 1972; Dykes y Kay, 1976; Richter y col., 1998). Quizás la demostración más elegante de este intrigante fenómeno es la autoactivación del pepsinógeno unido covalentemente a una resina de sefarosa (Bustin y Conway-Jacobs, 1971). Las moléculas están inmovilizadas y, en general, no están en contacto entre ellas y sin embargo, al exponerlas a pH 2 el pepsinógeno se activa espontáneamente. Existe una competencia entre las dos rutas de activación, dominando la activación bimolecular a concentraciones de zimógeno elevadas y por encima de pH 2.5, mientras que la activación intramolecular es dominante a pH bajo y concentraciones de zimógeno menores de 1 mg/ml. El resultado de esta activación espontánea del zimógeno puro es que la mayoría de moléculas de pepsinógeno serán activas 10 segundos después de que se produzca la mezcla con el ácido clorhídrico en el estómago.

El proceso de activación de las proteinasas aspárticas, grupo al que pertenecen el pepsinógeno y la pepsina, ha sido estudiado ampliamente mediante técnicas bioquímicas y biofísicas. Los estudios cinéticos llevados a cabo por Roger Herriott a finales de los años 1930 mostraron que la conversión de pepsinógeno a pepsina a pH bajo es una reacción autocatalítica que involucra la formación de intermedios (Herriott, 1939). Estudios posteriores utilizando técnicas espectrofotométricas en los años 1970 establecieron que tienen lugar cambios conformacionales durante la conversión. Bajo una exposición inicial del zimógeno a ácido ocurre un cambio conformacional sin la ruptura proteolítica en la escala de tiempos de 5 ms a 2 s (Auer y Glick, 1984).

El sitio activo de las proteinasas aspárticas está compuesto por dos residuos de aspartato (Asp32 y Asp215 en pepsina; Asp32 y Asp217 en gastricsina). Una molécula de agua está unida por enlace de hidrógeno a los dos sitios activos del residuo Asp. Durante la catálisis el agua es desprotonada y seguidamente ataca al carbono carbonílico del enlace a

susceptible de ataque del sustrato formando un intermedio tetraédrico (Davies, 1990; James y col., 1992). A diferencia de las serina proteinasas, el residuo catalítico de Asp no forma complejos covalentes con sus sustratos.

Mientras que las estructuras de las enzimas activas son conocidas para muchos organismos, las únicas estructuras de zimógenos que han sido determinadas son las de pepsinógeno de especie humana y de cerdo, así como progastricsina (Khan y James, 1998). Las secuencias identificadas contienen entre el 50% de las formas maduras de esas enzimas, pepsina y gastricsina. Por último, se ha determinado la estructura cristalográfica de rayos X de la forma del intermedio de gastricsina humana, probándose así los detalles moleculares de varias etapas en el mecanismo de activación. (Khan y col., 1997).

En el pepsinógeno humano el péptido señal está constituido por los aminoácidos 1 al 15. La activación tiene lugar mediante un segundo corte proteolítico, que elimina el péptido de 16 al 62. La pepsina A humana madura tiene 326 aminoácidos (del 63 al 388). La secuencia o estructura primaria del precursor tal como se sintetiza en el ribosoma es (www.expasy.org; SWISS-PROT: P00790):

10	20	30	40	50	60	70	80
MKLLLLLGLV	ALSECIMYKV	PLIRKKSRLR	TLSEGLLKD	FLKKNLNPA	RKYFPQWEAP	TLVDEQPLEN	YLDMEYFGTI
90	100	110	120	130	140	150	160
GIGTPAQDFT	VVFDTGSSNL	WVPSVYCSSL	ACTNHNRFNP	EDSSTYQSTS	ETVSITYGTG	SMTGILGYDT	VQVGGISDTN
170	180	190	200	210	220	230	240
QIFGLSETEP	GSFLYYAPFD	GILGLAYPSI	SSSGATPVFD	NIWNQGLVSQ	DLFSVYLSAD	DQSGSVVIFG	GIDSSYYTGS
250	260	270	280	290	300	310	320
LNWVPTVEG	YWQITVDSIT	MNGEAIACAE	GCQAIVDTGT	SLLTGPTSPI	ANIQSDIGAS	ENSDGDMVVS	CSAISSLPDI
330	340	350	360	370	380	388	
VFTINGVQYP	VPPSAYILQS	EGSCISGFQG	MNLPTESGEL	WILGDVFIRQ	YFTVFD RANN	QVGLAPVA	

En las siguientes figuras se presentan las estructuras tridimensionales del pepsinógeno A y de la pepsina humanos:

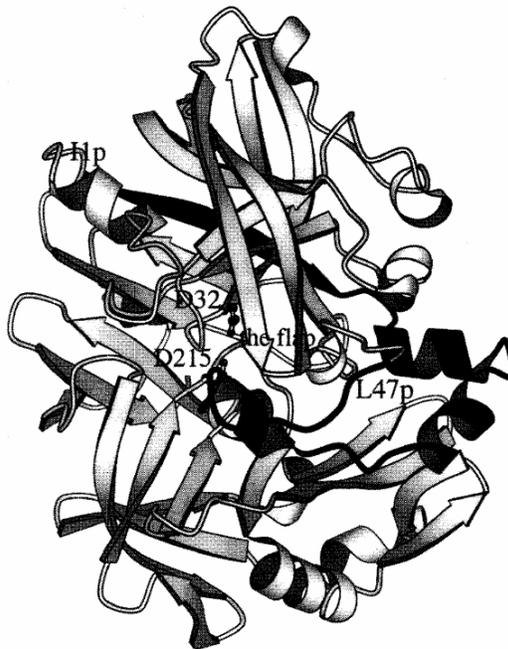


Figura 1.10. Estructura tridimensional del pepsinógeno A humano. La parte remanente de pepsina de la molécula se ha dibujado en gris (Bateman, 1998).

En la siguiente figura se presenta la estructura de la pepsina humana

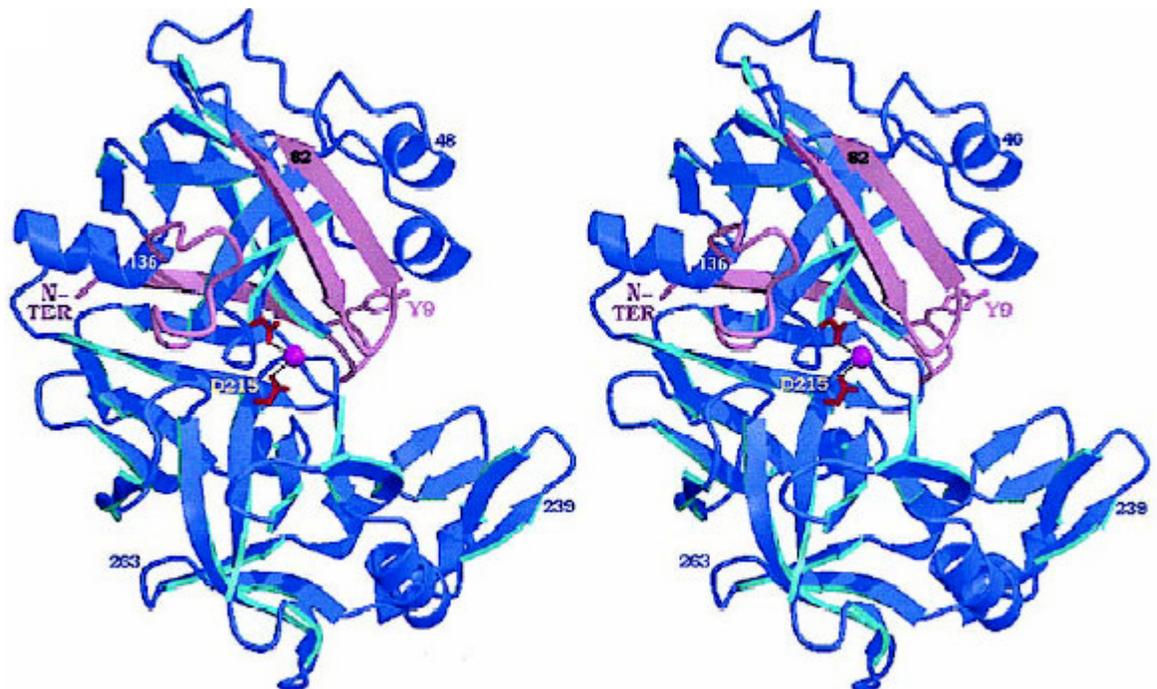


Figura 1.11. Estructura de la pepsina humana. Los aspartatos del sitio activo con su unión catalítica a la molécula de agua se han coloreado en rojo. (Fujinaga y col., 1995).

La pepsina es la principal enzima del jugo gástrico, es una endopeptidasa, un término que se refiere al hecho que hidroliza los enlaces peptídicos interiores de una proteína. Al igual que en otras proteasas, el sitio activo es un área extensa que puede acomodar como mínimo cuatro o cinco, y quizás hasta siete, restos aminoácidos. Presenta una preferencia por los aminoácidos hidrofóbicos en cualquiera de los lados del enlace escindible. Una inspección estadística de las roturas de enlaces en las proteínas demuestra que hay una especificidad por la leucina, fenilalanina, triptófano y glutamato en el sitio S_1 y por triptófano, tirosina, isoleucina y fenilalanina en el sitio S_1' (Fersht, 1980).

1.5 SISTEMA ENZIMÁTICO PLASMINÓGENO-PLASMINA

El plasminógeno se sintetiza en el hígado y se secreta dentro del plasma. La activación de plasminógeno a plasmina es el evento central en la lisis de coágulos de sangre por el sistema fibrinolítico. Mientras que diferentes proteasas son capaces de activar plasminógeno *in vitro*, incluyendo el factor XIIa (Goldmith y col., 1978), factor XIa (Mandle y Kaplan, 1979), calicreína de plasma (Colman, 1980) y también tripsina (Kocholaty y col., 1952), los activadores de plasminógeno más ampliamente estudiados *in vivo* son el activador de plasminógeno de tipo tisular (t-PA) y el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (u-PA), que se emplean clínicamente para la terapia trombolítica. Los activadores de plasminógeno bacteriano (estreptoquinasa y estafiloquinasa) son también muy importantes a causa de su potencial trombolítico *in vivo* (Barrett y col., 2004). Cada activador genera una forma diferente de plasmina.

La molécula madura de plasminógeno humano consiste en 791 residuos de aminoácidos en una cadena polipeptídica simple (Robbins et al. 1967; Groskipf y col., 1969; Wiman, 1973; Forsgren y col., 1987). t-PA y u-PA, activan plasminógeno por ruptura del enlace Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶² en el dominio catalítico del zimógeno, iniciando de este modo la degradación de fibrina por plasmina (revisado en Henkin y col., (1991) y Poting y col. (1992)). La estreptoquinasa activa al plasminógeno por un mecanismo diferente al de t-PA y u-PA (Bock y col., 1996). La estreptoquinasa no posee actividad catalítica intrínseca pero interacciona con plasminógeno y plasmina, convirtiendo ambos, el zimógeno y proteinasa activa en activadores proteolíticos específicos de plasminógeno (McClintock y Bell 1971; Wohl y col., 1978; Reddy y Markus 1972; Schick y Castellino 1974; Bajaj y Castellino 1977; Davidson y col., 1990).

En el mecanismo de activación del plasminógeno por estreptoquinasa, de la unión de estreptoquinasa a plasminógeno resulta una expresión conformacional del sitio activo catalítico en el zimógeno sin la requerida ruptura del enlace peptídico (McClintock y Bell 1971; Reddy y Markus 1972; Schick y Castellino 1974; Boxrud y Bock, 2004). A la activación conformacional le siguen la conversión proteolítica del plasminógeno a plasmina por ruptura del enlace Arg⁵⁶¹-Val⁵⁶², y la unión de estreptoquinasa a plasmina propaga la

activación proteolítica del plasminógeno (Wang, y col., 1998; Boxrud y col., 2000; Boxrud y Bock, 2004).

La plasmina es una serina proteasa de dos cadenas derivada a partir del plasminógeno. Dos uniones de péptidos en plasminógeno se rompen para formar la plasmina, uno en Arg 561+Val562 (numeración de plasminógeno humano), catalizada por activadores de plasminógeno (Robbins y col., 1967), y un segundo, Lys+Lys78, catalizada sólo por la plasmina formada durante la activación (Sodetz y Castellano, 1975; Violand y Castllino, 1976). Las cadenas peptídicas están unidas por dos puentes disulfuro, Cys548-Cys666 y Cys558-Cys566 (Wiman, 1977; Sottrup-Jensen y col., 1978).

La plasmina es una enzima clave en la lisis de coágulos de sangre, y sus sustratos fisiológicos más importantes son fibrinógeno y fibrina. La plasmina cataliza la ruptura de enlaces Lys+ y Arg+, con una especificidad similar a la de tripsina. Sin embargo, la plasmina es una enzima mucho menos eficiente que la tripsina y rompe sólo algunos de esos enlaces en proteínas. Muchos inhibidores de tripsina también inhiben a plasmina, como los inhibidores de serina proteasas.

Las diferentes formas moleculares de la plasmina interaccionan con los mismos sustratos e inhibidores, pero en diferentes extensiones (Robbins y col., 1981). Se nota una mayor diferencia en comparación con plasmina, en la especificidad enzimática del complejo estreptoquinasa-plasmina. Plasmina sola no cataliza la activación de plasminógeno, pero el complejo estreptoquinasa-plasmina, aunque posee la actividad proteolítica general disminuida, sirve como un eficiente activador de plasminógeno (Schick y Castellano, 1974).

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Cuando algunos miembros de nuestro grupo comenzaron a estudiar la cinética de la activación de zimógenos, los únicos estudios existentes sobre la materia se limitaban a esquemas de reacción muy simplificados (Kosow, 1975; Wohl y col., 1978, 1980) y en todos los casos el análisis se reducía únicamente al estado estacionario de la reacción. En 1983, que sepamos, se publicó el primer análisis de la cinética de la fase de transición de un sistema enzimático de activación de zimógenos: el caso de la activación de la protirosinasa por tripsina (Galindo y col., 1983). A partir de ahí han sido numerosos los sistemas enzimáticos de activación de zimógenos cuya cinética de la fase de transición ha sido abordada. Ejemplos de estas contribuciones son: el estudio de la cinética de la fase de transición de la activación del plasminógeno (Varón y col., 1986; 1993), la cinética de activación del tripsinógeno a tripsina por enteroquinasa y tripsina (Varón y col., 1990d), la cinética de activación de zimógenos a través de proteólisis limitada (Varón y col., 1987), la activación de zimógenos en presencia de altas concentraciones de enzima activante (Varón y col., 1988), la activación de protrombina catalizada por protrombinasa (Krishnaswamy y col., 1987), la activación de Glu-plasminógeno y de Lys-plasminógeno por pro-uroquinasa (Liu y col., 1992), la cinética de inactivación térmica de catepsina D bovina (Hayes y col., 2001), la activación del factor XI en el plasma y su dependencia sobre el factor XII (Brunée y col., 1993), la influencia de la caseína para estimular la velocidad de activación del plasminógeno (Markus, y col., 1993), el efecto de la modulación de la heparina sobre la activación del plasminógeno por t-PA (Young y col., 1992), etc.

Las contribuciones anteriores, que se refieren a sistemas enzimáticos concretos de interés fisiológico, eran abordadas de modo individualizado, planteando el correspondiente sistema de ecuaciones diferenciales que describe el comportamiento cinético del sistema y, después de determinadas suposiciones razonables que linealizaban el sistema, se integraba analíticamente el mismo para obtener las correspondientes soluciones aproximadas. Una alternativa a este procedimiento fue estudiar cinéticamente modelos generales de mecanismos de activación de zimógenos, que no respondiendo en principio a ningún sistema real concreto, incluían, como casos particulares, muchos de estos sistemas. La particularización del modelo general al caso particular de interés fisiológico es inmediata. Esta forma de proceder es práctica y ahorra mucho esfuerzo en el análisis cinético de un sistema concreto. La generalidad de estos modelos será tanto mayor, evidentemente, cuantos más mecanismos diferentes puedan considerarse casos particulares del modelo propuesto. En 1993 Havsteen y

col., (1993) llevaron a cabo el análisis cinético de un modelo general de mecanismo de reacción de activación de zimógenos que incluye prácticamente todos los sistemas reales de activación de zimógenos, con la única salvedad de que no exista ninguna etapa de autoactivación. Sin embargo, esta limitación es importante, pues la mayoría de los sistemas complejos de activación de zimógenos tales como las cascadas de activación de las enzimas involucradas en la hemostasis (coagulación sanguínea y fibrinólisis) y en la digestión involucran etapas de autoactivación, tales como por ejemplo la activación de tripsinógeno a tripsina por tripsina, la activación de precalicreína a calicreína por calicreína, etc.

Aunque la autoactivación de zimógenos es un tópico clásico en Bioquímica y se ha estudiado cuidadosamente desde un punto de vista estructural, el análisis cinético de este tipo de reacciones se encuentra todavía en un estado preliminar, en el cual sólo se han determinado parámetros globales (McPhie, 1972; Tans y col., 1983, 1987; Wu y col., 2001). Uno de los ejemplos de autoactivación mejor estudiados ha sido la activación de la precalicreína del plasma humano (Tans y col., 1987). Varón et al. (1992) realizaron un análisis cinético global de un proceso autocatalítico en presencia de una reacción acoplada y un análisis de datos cinéticos para la determinación de los parámetros cinéticos experimentales. A nivel experimental se ha estudiado el mecanismo de activación de tripsinógeno por tripsina bajo condiciones de equilibrio rápido (García-Moreno y col., 1991) y en presencia de un inhibidor reversible (Manjabacas y col., 1995, 2002). En estos estudios se analizan las condiciones experimentales en que la ruta de activación predomina sobre la de inhibición o viceversa. El conocimiento de las condiciones en que una ruta prevalece sobre la otra es fundamental para el control de este tipo de procesos.

También se ha publicado un artículo en el que se realiza un análisis cinético de un esquema muy simplificado de activación autocatalítica de zimógenos (Wu y col., 2001), que tiene como principal novedad la introducción de un nuevo procedimiento que no requiere la suposición habitual de exceso de zimógeno, pero que es únicamente válido para el esquema simplificado al que se ha aplicado. El modelo es demasiado sencillo y no contempla la inhibición simultánea.

En todas esas contribuciones se consideró al zimógeno sin actividad enzimática. De cualquier forma, las referencias que incluyen la actividad enzimática del zimógeno están

aumentando frecuentemente (Lin y col., 1992; Tanaka y Yada, 1997; Richter y col., 1999; Liu y Wang, 2004).

Existe un modelo que permite analizar los sistemas enzimáticos de activación de zimógenos como casos particulares del mismo que se ha mencionado anteriormente (Havsteen y col., 1993), pero tiene la considerable limitación de que no acepta mecanismos de reacción que involucren una o más etapas de autoactivación, aunque estas etapas están presentes en la mayoría de los sistemas complejos de cascadas de activación enzimática, tales como las que participan en los procesos digestivos y de coagulación.

Uno de los últimos modelos más completos que incluyen etapas de autoactivación de zimógenos así como inhibición reversible fue propuesto y estudiado en 2002 por Manjabacas y col., (2002), obteniendo también las ecuaciones cinéticas para casos particulares del modelo general estudiado. Posteriormente este modelo ha sido utilizado por otros autores para hacer un análisis en el estado estacionario de las reacciones autocatalíticas inducidas por ligando (Liu y Wang, 2004) y también de la autoactivación de zimógenos en presencia de un inhibidor reversible (Wang y col., 2004), que es un caso particular del modelo previamente estudiado por nuestro grupo. Sin embargo estos modelos no consideran tampoco la autoactivación intramolecular de los zimógenos.

Hay modelos en la bibliografía donde sí se considera la autoactivación intramolecular de zimógenos, como ya se ha mencionado anteriormente (Lin y col., 1992; Tanaka y Yada, 1997; Richter y col., 1999; Liu y Wang, 2004), pero no tienen en cuenta la formación de un complejo intermedio enzima activa-zimógeno en la etapa de activación intermolecular, debido a la complejidad matemática que este hecho implica, ya que el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente no es lineal y por tanto no tiene solución analítica para el curso completo de la reacción. Sin embargo la formación de dicho intermedio debe ser considerada, ya que puede afectar a la cinética del proceso.

En la contribución de Al-Janabi y col. (1972) que trata la activación de zimógenos incluyendo rutas de activación intra- e intermolecular, el objetivo principal del análisis cinético fue la determinación de los parámetros cinéticos implicados en el mecanismo de reacción propuesto, y no se realizó un análisis teórico del grado de participación en el proceso de cada una de las rutas de activación del zimógeno, la intramolecular y la intermolecular,

válida para todo el curso de la reacción. Tampoco se tuvo en cuenta la participación de un complejo enzima-sustrato en la ruta de activación intermolecular ya que ello conlleva una mayor complejidad matemática en la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente al mecanismo.

Respecto al sistema enzimático plasminógeno-plasmina, y concretamente a la activación del plasminógeno por estreptoquinasa, los primeros modelos estudiados fueron realizados por Wohl y col. (1978, 1980). Sin embargo los resultados obtenidos por esos autores tienen algunas limitaciones, ya que obtuvieron una ecuación para la formación de producto asumiendo equilibrio rápido, que únicamente es válida para el estado estacionario. Ranby (1982) realizó un estudio cinético en presencia y ausencia de fibrina, pero también restringido al estado estacionario de la reacción, mientras que Galindo y col. (1983) consideraron despreciable la fase de transición de la enzima activada comparada con la duración de la fase de transición de la enzima activante. Varón y col. (1986) obtuvieron la variación de las concentraciones con el tiempo de todas las especies que intervienen en el mecanismo de activación de plasminógeno humano propuesto por Wohl y col. (1980), válidas para todo el curso de la reacción, es decir, para la fase de transición y el estado estacionario. Más recientemente Boxrud y col. (2004) propusieron un nuevo mecanismo cinético de activación del plasminógeno por estreptoquinasa en el que caracterizaron la etapa de activación conformacional. Seguidamente Boxrud y Bock (2004) definieron el acoplamiento de la activación conformacional del plasminógeno con el mecanismo de activación proteolítica de formación de plasmina inducida por estreptoquinasa. Estas contribuciones han contribuido significativamente al estudio cinético experimental de la activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa. Sin embargo, en ambas contribuciones las ecuaciones de progreso con el tiempo del producto de la reacción se obtuvieron bajo suposiciones muy exigentes para linealizar el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente. Concretamente estos autores separaron el mecanismo en dos partes y supusieron que en el instante inicial, es decir, a $t = 0$, una de las partes ya se encontraba en estado estacionario. En nuestra opinión, se pueden obtener las ecuaciones que describen la variación de las concentraciones de las especies implicadas en el mecanismo bajo condiciones menos limitadas, válidas para todo el curso de la reacción, es decir, para la fase de transición y el estado estacionario.

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, y la situación actual del tema, en esta memoria pretendemos realizar el análisis cinético de dos Modelos de activación de zimógenos, uno de los cuales será aplicado al estudio experimental de la autoactivación de pepsinógeno a pepsina y el otro a la activación de plasminógeno a plasmina catalizado por estreptoquinasa.

El primero de los modelos que se pretende estudiar es un modelo general que corresponde a la autoactivación de zimógenos de proteasas aspárticas, en el que se incluyen las etapas de activación intramolecular e intermolecular, teniendo en cuenta además la formación de un complejo enzima activa-zimógeno en la etapa bimolecular. Así mismo, se pretende sugerir parámetros adimensionales que permitan conocer la contribución relativa al proceso de activación de ambas rutas de activación, la intramolecular y la intermolecular. Se realizará el estudio para dos formas diferentes de seguimiento experimental de la reacción: en discontinuo y en continuo mediante una reacción cromogénica acoplada. Todo ello se ilustrará mediante el seguimiento experimental de la autoactivación del pepsinógeno a pepsina.

El segundo de los modelos que se pretende estudiar corresponde al análisis cinético del mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa, sugerido por Boxrud y col. (2004) y Boxrud y Bock (2004), cuyo seguimiento experimental se realiza en continuo mediante el acoplamiento de un sustrato cromogénico. Pretendemos obtener las ecuaciones de progreso con el tiempo del producto de la reacción, bajo condiciones menos restrictivas y más razonables que las utilizadas por estos autores.

Para ello los objetivos concretos son los siguientes:

1. Obtener las ecuaciones generales aproximadas concentración-tiempo, mediante linealización del sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente a cada uno de los Modelos a estudiar.
2. Verificar la validez de las ecuaciones concentración-tiempo obtenidas mediante simulación de curvas de progreso.

3. Obtener otras soluciones aproximadas para los mecanismos generales estudiados, en condiciones simplificadas, obteniendo las correspondientes ecuaciones cinéticas.
4. Proponer un diseño experimental y un análisis de datos cinéticos para evaluar los parámetros cinéticos que intervienen en el sistema, los cuales serían inmediatamente aplicables a correspondientes simplificaciones de éste.
5. Aplicar los procedimientos sugeridos anteriormente al estudio experimental de la cinética de autoactivación del pepsinógeno a pepsina en ausencia y en presencia de un sustrato cromogénico, así como al estudio de la cinética de activación del plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa.
6. Obtener parámetros adimensionales que proporcionen la contribución relativa, para un proceso de activación autocatalítica que se ajuste al modelo general propuesto y a cualquier tiempo de reacción, de cada una de las rutas implicadas en el proceso, la intramolecular y la intermolecular.
7. Extender el procedimiento sugerido en el objetivo anterior a cualquier proceso de activación de zimógenos que se pueda obtener como simplificación del Modelo general propuesto.
8. Estudiar el efecto de las concentraciones iniciales de las especies implicadas en el mecanismo de reacción sobre los parámetros adimensionales obtenidos.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

Pepsinógeno de estómago porcino (3300 unidades/mg proteína), purificado cromatográficamente y libre de actividad pepsina, hemoglobina de sangre bovina, pepsina de la mucosa de estómago porcino (994 unidades/mg proteína), pepstatina A, formato de sodio, citrato de sodio, ácido tricloroacético, plasminógeno de plasma humano (6.6 unidades/mg proteína), plasmina de plasma humano (3-6 unidades x mg protein⁻¹), disolución acuosa tamponada de estreptoquinasa (73,520 unidades x mg protein⁻¹), D-Val-Leu-Lys-Nan·2HCl, Tris (hydroximetil)-aminometano, cloruro sódico y L-Lisina fueron suministrados por Sigma (Madrid, España). H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-nitro-Phe-Arg-Leu-OH fue suministrado por Bachem (Bubendorf, Switzerland). El resto de tampones y reactivos fueron de grado analítico y utilizados sin purificación posterior. Todas las soluciones se prepararon en agua ultrapura desionizada y no pirogénica (Milli Q, Millipore Ibérica, S.A., Barcelona, España).

Diariamente se prepararon soluciones stock de pepsinógeno a la concentración requerida disolviéndolo en tampón Tris/HCL 0.02 M, pH 7.5. La concentración de pepsinógeno (previamente activado a pepsina por incubación a pH 2.0 en tampón citrato de sodio 0.2 M durante 30 minutos) se determinó por valoración del sitio activo con pepstatina A como inhibidor “tight-binding” (Henderson, 1972). El grado de pureza del pepsinógeno obtenido de esta manera fue 60.75 ± 10.92 % (w/w), calculado teniendo en cuenta una masa molecular de 41.000 D para el pepsinógeno (Wang y Edelman, 1971). La concentración de pepsina se determinó de la misma manera.

Diariamente se prepararon soluciones stock de plasminógeno a la concentración requerida disolviéndolo en tampón Tris/HCl 0.05 M, 0.1M NaCl, 20 mM L-Lisina, pH 7.4.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Ensayos espectrofotométricos

Las lecturas espectrofotométricas se obtuvieron en dos espectrofotómetros: Uvikon XS de Bio-Tek Instruments (Basilea, Suiza) y Uvikon 940 de Kontron Instrumentos (Zurich, Suiza). Los ensayos a 5 °C se desarrollaron utilizando un baño Hetrofrig Selecta equipado con criostato usando un anticongelante comercial y comprobando la temperatura utilizando un termómetro digital Cole-Parmer con una precisión de ± 0.1 °C. Para los experimentos a 25 °C y 37 °C se utilizó un baño de agua Precistern Selecta.

Ensayos de activación del pepsinógeno

El esquema general de los experimentos en el caso del seguimiento experimental *en discontinuo* del modelo general de activación de zimógenos fue el descrito con anterioridad (Al-Janabi y col., 1972). Para ello se enfriaron a 5 °C alícuotas de 100 μ l de la solución stock de pepsinógeno. En primer lugar se añadieron a esas disoluciones 100 μ l de tampón citrato de sodio/HCl 0.1 M, pH 2.0, también a 5 °C, agitando, y después del intervalo de tiempo apropiado, se añadieron 300 μ l de tampón Tris/HCl 0.5 M, pH 8.5. Estas adiciones se hicieron tan rápido como fue posible con ayuda de una jeringa. Los tubos a analizar fueron introducidos en un baño de agua a 37 °C durante 20 minutos y después de ese tiempo se analizó la actividad del pepsinógeno que quedaba sin reaccionar en el medio de reacción. Para ello, se añadieron ahora 100 μ l de dichas soluciones a 1 ml de tampón citrato de sodio/HCl 0.2 M, pH 2.0, y se les permitió que se activaran durante 20 minutos. Entonces, se añadió a cada tubo 1 ml de solución de hemoglobina y, después de exactamente 10 min, se añadió 1 ml de solución de ácido tricloroacético del 5%. Se filtró la mezcla a través de un filtro de papel de poli(difluoruro de vinilideno) (tamaño de poro = 0.45 μ m, diámetro= 13 mm) y se leyó la absorbancia del filtrado a 280 nm contra un blanco que no contenía enzima. Todos los ensayos se realizaron en tubos de polipropileno (Rich y col., 1985). Se ensayaron también otras concentraciones de pepsinógeno activado por la dilución apropiada de la solución stock en tampón Tris/HCl 0.02 M, pH 7.5. En la figura 4.1 se puede observar el proceso seguido.

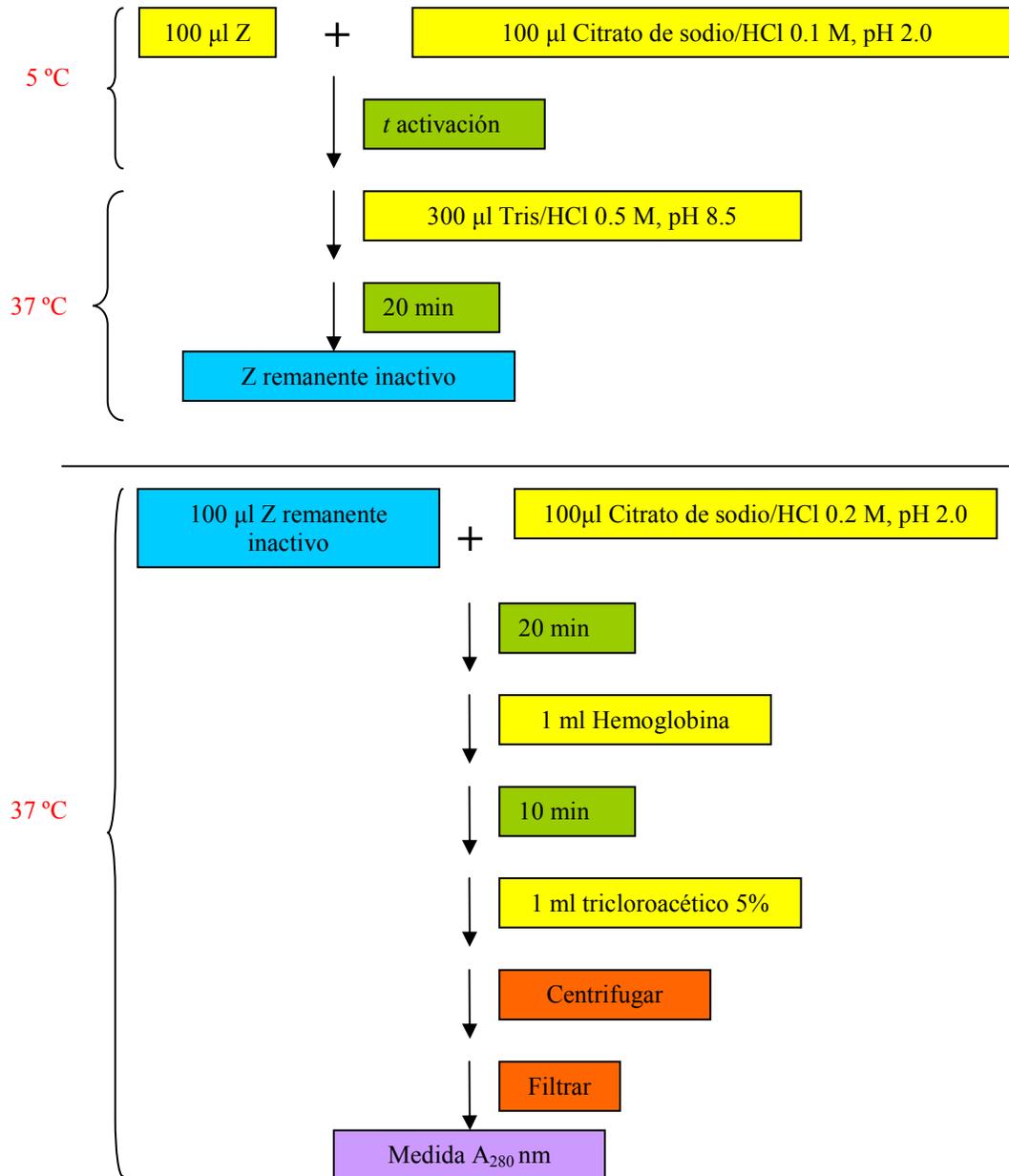


Figura 4.1. Esquema general del experimento.

Para el seguimiento *en continuo* del modelo general de activación de zimógenos, la mezcla de reacción estándar consistió en diferentes cantidades de sustrato peptídico (H-Pro-Thr-Glu-Phe-*p*-nitro-Phe-Arg-Leu-OH), tampón formato de sodio/HCl $0.1\ \text{M}$, pH 3.0 y

diferentes volúmenes de soluciones stock de pepsinógeno, siendo el volumen final de 1 ml. La reacción fue iniciada por adición del zimógeno. En todos los casos, la velocidad de hidrólisis se monitorizó observando el decrecimiento en absorbancia a 300 nm debido al consumo de sustrato, a 25 °C. Previamente se realizaron experimentos en presencia de concentraciones similares de pepsina en lugar de pepsinógeno bajo las mismas condiciones para asegurar una relación lineal entre la cantidad de pepsina formada en el medio de reacción y el nivel de actividad expresada. La constante de Michaelis-Menten para el sustrato peptídico con respecto a la pepsina (K_m^S) se calculó bajo las mismas condiciones experimentales realizando una serie de experimentos, variando la concentración inicial de sustrato entre 7.0 y 385.1 μM a una concentración fija de pepsina (31.42 ± 4.71 nM). Los datos de velocidad resultante frente a la concentración de sustrato se ajustaron por regresión no lineal a la ecuación de Michaelis-Menten, obteniendo los siguientes parámetros cinéticos: $K_m^S = 83.93 (\pm 4.28)$ μM y $V_{max} = 7.24 (\pm 0.12) \times 10^{-1}$ $\mu\text{M s}^{-1}$. Este valor de K_m^S es muy similar al publicado por otros autores (Dunn y Kay, 1985). S_0 se determinó en cada caso midiendo la absorbancia de un blanco en ausencia de zimógeno, bajo las mismas condiciones experimentales. De este modo se evaluó también el coeficiente de extinción molar a 300 nm para el sustrato peptídico ($\epsilon_{300} = 5.134 \times 10^3$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), así como su estabilidad durante el tiempo de reacción fue también evaluada del mismo modo. También se realizaron ensayos blanco a cada concentración de zimógeno utilizada, en ausencia de sustrato, siguiendo el cambio en la absorbancia a 300 nm debido a la conversión de pepsinógeno a pepsina. Estas curvas blanco se restaron a las curvas de progreso correspondientes a la autoactivación del zimógeno en presencia del sustrato cromogénico, previamente al ajuste por regresión no lineal.

Ensayo de activación del plasminógeno

La activación cinética de plasminógeno se monitorizó espectrofotométricamente a 37 °C y 405 nm, midiendo la aparición del producto de la reacción *p*-nitroanilida ($\epsilon = 1 \times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) (Wohl y col., 1980).

4.2.2 Determinación de la concentración de pepsinógeno

Se determinó por valoración del sitio activo con el inhibidor “tight-binding” de la pepsina, pepstatina A. Estos inhibidores actúan a una concentración similar a la de la enzima. Henderson (1972), proporcionó la siguiente ecuación para el estudio cinético de este tipo de inhibidores que, como se puede observar, permite estimar la concentración de enzima en el medio de reacción:

$$\frac{I_t}{\left(1 - \frac{v_i}{v_0}\right)} = E_t + \left(\frac{S + K_m}{\frac{K_m}{K_{is}} + \frac{S}{K_{ii}}} \right) \frac{v_0}{v_i} \quad (4.24)$$

donde I_t es la concentración total de inhibidor, E_t es la concentración total de enzima, v_0 y v_i son la velocidad de reacción del enzima en ausencia de inhibidor y en presencia de inhibidor, respectivamente, K_m es la constante de Michaelis para el sustrato correspondiente, K_i es la constante de inhibición y K_{is} y K_{ii} son las constantes de disociación de los complejos EI y ESI (ó EIS) respectivamente.

Para obtener E_t se utilizó la ecuación anterior variando experimentalmente la concentración de inhibidor a diferentes concentraciones de sustrato y de enzima constantes.

4.2.3 Ajuste de los datos experimentales

Las curvas de progreso experimentales obtenidas se ajustaron por regresión no lineal a las ecuación obtenidas en cada uno de los artículos utilizando el software SigmaPlot Scientific Graphing System, versión 8.02 (2002, SPSS Inc).

4.2.4 Integración numérica

Las curvas de progreso simuladas se obtuvieron por integración numérica del sistema de ecuaciones diferenciales que describen el comportamiento cinético de la reacción de acuerdo con el mecanismo a estudiar en cada caso, utilizando valores tanto publicados en bibliografía como arbitrarios de las constantes de velocidad y de las concentraciones iniciales.

Esta solución numérica se obtuvo utilizando la fórmula de Runge-Kutta de cuarto orden, pero aplicando un control adaptativo del paso de integración inventado por Fehlberg (Fehlberg, 1970; Mathews y Fink, 1999) utilizando un programa de ordenador implementado en Visual C++ 6.0 (García-Sevilla y col., 2000). Este programa se ejecutó en un ordenador PC compatible basado en un procesador Pentium IV/2 GHz con 512 Mb de RAM.

4.2.5 Transformada de Laplace

Hemos utilizado el método de la Transformada de Laplace (Darvey, 1977) para resolver los sistemas de ecuaciones diferenciales que describen cada uno de los mecanismos en estudio, una vez linealizados. Este método transforma un sistema de ecuaciones diferenciales, ordinario, lineal, de coeficientes constantes en un sistema de ecuaciones algebraicas, que puede ser resuelto por cualquier método clásico, como puede ser utilizando la regla de Cramer.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

**5.1 “KINETICS OF INTRA- AND INTERMOLECULAR ZYMOGEN
ACTIVATION WITH FORMATION OF AN ENZYME-ZYMOGEN
COMPLEX”**

KINETICS OF INTRA- AND INTERMOLECULAR ZYMOGEN ACTIVATION WITH FORMATION OF AN ENZYME-ZYMOGEN COMPLEX

ABSTRACT

Se ha hecho una descripción matemática de un mecanismo de activación autocatalítica de un zimógeno que incluye tanto la ruta intramolecular como la intermolecular. Se ha incluido la formación reversible de un complejo intermedio enzima-zimógeno en la ruta de activación intermolecular, lo que permite definir una constante de Michaelis-Menten para la activación del zimógeno al enzima activa. También se han obtenido las ecuaciones de progreso tiempo-concentración que describen la evolución de las especies que participan en el sistema. Además, se han derivado las correspondientes ecuaciones cinéticas para casos particulares del modelo general estudiado. Se ha sugerido un diseño experimental y un procedimiento de análisis cinético de datos para evaluar los parámetros cinéticos, basado en las ecuaciones cinéticas derivadas. La validez de los resultados obtenidos se chequeó utilizando curvas de progreso simuladas de las especies involucradas. El modelo es suficientemente bueno en general para ser aplicado al estudio cinético experimental de la activación de diferentes zimógenos de interés fisiológico. El sistema se ha ilustrado mediante la transformación cinética de pepsinógeno a pepsina.

**5.2 “KINETICS OF AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION
MEASURED BY A COUPLED REACTION: PEPSINOGEN
AUTOACTIVATION”**

KINETICS OF AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION MEASURED BY A COUPLED REACTION: PEPSINOGEN AUTOACTIVATION

ABSTRACT

Se ha realizado un estudio cinético de un modelo para el proceso de activación autocatalítica de zimógenos incluyendo la etapa intramolecular y la intermolecular, a las que se ha acoplado una reacción cromogénica en la que la enzima activa actúa sobre uno de sus sustratos para medir en continuo el progreso de la reacción. Se han obtenido las ecuaciones cinéticas que describen la evolución con el tiempo de las especies implicadas en el sistema. Estas ecuaciones son válidas para cualquier proceso de activación autocatalítica de zimógenos bajo las mismas condiciones iniciales. Se ha sugerido un diseño experimental y un procedimiento de análisis de datos cinéticos para evaluar los parámetros cinéticos, basado en las ecuaciones cinéticas derivadas. Además, se ha definido un coeficiente de distribución adimensional, que muestra matemáticamente si prevalece la ruta intramolecular o la intermolecular una vez se conocen los parámetros cinéticos del sistema. La validez de los resultados obtenidos se ha comprobado mediante curvas de progreso simuladas de las especies implicadas. Como ejemplo de aplicación de este método, se ha ilustrado el sistema experimentalmente mediante la medida en continuo de la cinética de transformación de pepsinógeno a pepsina.

**5.3 “CONTRIBUTION OF THE INTRA- AND INTERMOLECULAR
ROUTES IN AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION:
APPLICATION TO PEPSINOGEN ACTIVATION”**

NOTA: Se incluyen las pruebas de imprenta del artículo junto con las correcciones de las mismas enviadas a la revista Acta Biochimica Polonica.

**CONTRIBUTION OF THE INTRA- AND INTERMOLECULAR ROUTES IN
AUTOCATALYTIC ZYMOGEN ACTIVATION: APPLICATION TO
PEPSINOGEN ACTIVATION**

ABSTRACT

Tomando como punto de partida un esquema de reacción sugerido recientemente para la activación de zimógenos incluyendo las rutas de activación intra- e intermolecular y el complejo enzima-zimógeno, nosotros hemos realizado un análisis completo de la contribución relativa de ambas rutas en el proceso. Este análisis sugiere la definición de parámetros adimensionales nuevos que permiten la elaboración de las curvas de progreso de la contribución de las dos rutas, a partir de los valores de las constantes de velocidad y de las condiciones iniciales. El procedimiento mencionado anteriormente relacionado con un esquema de reacción concreto se ha extrapolado a cualquier otro modelo de activación autocatalítica de zimógenos incluyendo las rutas intramolecular e intermolecular. Finalmente, hemos deducido la contribución de cada una de las rutas de activación correspondientes al proceso de activación del pepsinógeno a pepsina utilizando los valores de los parámetros cinéticos dados en la literatura.

5.4 “KINETIC ANALYSIS OF THE MECHANISM OF PLASMINOGEN ACTIVATION BY STREPTOKINASE”

NOTA: Se incluyen las pruebas de imprenta del artículo junto con las correcciones de las mismas enviadas a la revista *Journal of Mathematical Chemistry*.

**KINETIC ANALYSIS OF THE MECHANISM OF PLASMINOGEN
ACTIVATION BY STREPTOKINASE**

ABSTRACT

Se ha realizado un estudio cinético de la activación del plasminógeno a plasmina catalizada por estreptoquinasa. El objetivo del presente artículo es la resolución del mecanismo correspondiente al proceso de activación de un modo global, considerando el mecanismo como un todo y bajo consideraciones menos restrictivas que las utilizadas por otros autores. Se han obtenido las ecuaciones cinéticas que describen la evolución con el tiempo de las especies implicadas en el sistema. Estas ecuaciones son válidas para la fase de transición y el estado estacionario de la reacción. Se ha sugerido un diseño experimental y un procedimiento de análisis de datos cinéticos para evaluar los parámetros cinéticos, basado en las ecuaciones cinéticas obtenidas. La validez de los resultados obtenidos se ha comprobado mediante curvas de progreso simuladas de las especies implicadas. Finalmente, hemos demostrado que las ecuaciones de progreso con el tiempo obtenidas pueden ser aplicadas directamente a diferentes mecanismos de activación de zimógenos que puedan ser considerados como casos particulares del mecanismo general estudiado.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

En esta memoria se ha realizado un análisis cinético de dos procesos de activación de zimógenos, los cuales se han aplicado a dos sistemas enzimáticos de interés fisiológico como son el sistema enzimático pepsinógeno-pepsina y el sistema enzimático plasminógeno-plasmina, siendo en nuestra opinión, una herramienta muy útil en el estudio cinético de las reacciones de proteólisis limitada, claves en la regulación del metabolismo.

Con el fin de ofrecer una base teórica para futuros estudios cinéticos, experimentales y teóricos, es importante analizar el comportamiento cinético de los procesos de autoactivación de zimógenos desde un punto de vista general. Para ello, se ha propuesto un modelo general de autoactivación de zimógenos para las proteasas aspárticas, que es suficientemente bueno en general para ser aplicado al estudio cinético experimental de la autoactivación de diferentes zimógenos que incluyan rutas de activación intramolecular e intermolecular. El modelo ha sido estudiado para dos formas diferentes de seguimiento experimental de la reacción: en discontinuo y en continuo gracias al acoplamiento de una reacción cromogénica. Además se han obtenido, por primera vez, parámetros adimensionales que permiten determinar la contribución relativa de las rutas de activación intramolecular e intermolecular al proceso de activación autocatalítica de zimógenos.

Así mismo se ha estudiado un modelo concreto de activación de zimógenos que corresponde al mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa propuesto por Boxrud y col. (2004) y Boxrud y Bock (2004), realizando el estudio bajo limitaciones menos restrictivas y más razonables que las utilizadas por estos autores.

Las conclusiones obtenidas son las siguientes:

1. Es posible obtener ecuaciones concentración-tiempo para los dos Modelos propuestos, bajo suposiciones razonables que permiten la linealización de los sistemas de ecuaciones diferenciales que describen el correspondiente comportamiento cinético. A partir de estas ecuaciones se han obtenido las de sus casos particulares.
2. El análisis cinético del comportamiento de cada uno de los modelos se ha analizado por ambas vías, analítica y numérica. Hay una buena concordancia entre los resultados obtenidos por ambas vías, lo cual indica la bondad de los análisis cinéticos realizados.

3. Es posible proponer un diseño experimental y un análisis cinético de los datos obtenidos en el laboratorio que permita, a partir de las curvas de progreso experimentales y de los resultados teóricos obtenidos, la determinación de los parámetros cinéticos de cualquier reacción de autoactivación de zimógenos que se ajuste al modelo general aquí propuesto. Ello es válido tanto para el mecanismo que permite el seguimiento experimental en discontinuo como para el seguimiento de la reacción en continuo.
4. El hecho de tener en cuenta la formación de un complejo enzima activa-zimógeno en la etapa de activación intermolecular del modelo general de activación autocatalítica de zimógenos, ha permitido determinar, por primera vez, el valor de la constante de Michaelis-Menten del pepsinógeno con respecto a la pepsina.
5. La concentración de zimógeno disminuye de forma exponencial con el tiempo, para el modelo general de autoactivación de zimógenos, pudiéndose considerar este comportamiento de tipo uniexponencial desde aproximadamente el comienzo de la reacción, bajo las suposiciones aquí realizadas.
6. Es posible definir parámetros adimensionales que permiten predecir si prevalece la etapa unimolecular o la bimolecular en el proceso de autoactivación bajo las condiciones experimentales utilizadas, una vez los parámetros cinéticos involucrados en el sistema han sido evaluados.
7. Es posible resolver el sistema de ecuaciones diferenciales correspondiente al mecanismo de activación de plasminógeno a plasmina por estreptoquinasa, bajo suposiciones menos restrictivas que las aparecidas hasta ahora en la literatura científica.
8. Es posible proponer un diseño experimental y un análisis cinético de los datos obtenidos en el laboratorio que permite, a partir de las curvas experimentales de progreso y de los resultados teóricos obtenidos, la determinación de los parámetros cinéticos correspondientes al mecanismo de activación del plasminógeno por estreptoquinasa.
9. La concentración de producto, para el modelo de activación de plasminógeno por estreptoquinasa, aumenta según una ecuación que consiste en la suma de un polinomio

de segundo orden y dos términos exponenciales con argumento negativo, pudiendo considerarse este comportamiento de tipo parabólico desde aproximadamente el comienzo de la reacción, si las condiciones de equilibrio rápido prevalecen.

10. Este estudio contribuye a incrementar los conocimientos sobre los mecanismos de activación irreversible de proenzimas que tienen lugar en los seres vivos, así como constituye una herramienta muy útil para otros científicos que trabajen en temas relacionados.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

La bibliografía aquí incluida contiene las citas correspondientes a los Capítulos de esta memoria exceptuando el Capítulo 5.

-
- Avilés, F.X., A. Guasch, y J. Vendrell. 1994. Activación de precursores de proteínas. *Investigación y Ciencia*, marzo, 74-81
- Al-Janabi, J., J.A. Hartsuck, y J. Tang. 1972. Kinetics and mechanism of pepsinogen activation. *J. Biol. Chem.* 247:4628-4632
- Auer, H.E., y D.M. Glick. 1984. Early events of pepsinogen activation. *Biochemistry* 23:2735-2739
- Bajaj, S.P., y F.J. Castellano. 1977. Activation of human plasminogen by equimolar levels of streptokinase. *J. Biol. Chem.* 252:492-498
- Barrett, A.J., N.D., Rawlings, y J.F. Woessner. 2004. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Elsevier Academic Press, London. England.
- Bateman, K.S., M.M Chernaia, N.I. Tarasova, y M.N James. 1998. Crystal structure of human pepsinogen A. *Adv Exp Med Biol.* 436:259-263
- Beynon, R.J., y J.S. Bond. 1989. En "Proteolytic enzymes: a practical approach". IRL Press at Oxford University Press. Oxford. England.
- Boatright, K.M., y G.S. Salvesen. 2003. Mechanism of caspase activation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15: 725-731
- Bock, P.E., D.E. Day, I.M. Verhamme, M.M. Bernardo, S.T. Olson, y J.D. Shore. 1996. Analogs of human plasminogen that are labelled with fluorescence probes at the catalytic site of the zymogen. *J. Biol. Chem.* 271:1072-1080
- Boxrud, P.D., W.P. Fay, y P.E. Bock. 2000. Streptokinase binds to human plasmin with high affinity, perturbs the plasmin active site, and induces expression of a substrate recognition exosite for plasminogen. *J. Biol. Chem.* 275:14579-14589
- Boxrud, P.D., I.M. Verhamme, y P.E. Bock. 2004. Resolution of conformational activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase. *J Biol Chem.* 279:36633-36641
- Boxrud, P. D. y P. E. Bock. 2004. Coupling of conformational and proteolytic activation in the kinetic mechanism of plasminogen activation by streptokinase. *J. Biol. Chem.* 279:36642-36649
- Brown, A.J. 1902. Enzyme action. *J. Chem. Soc. Trans.* 81:373-386
- Brunée, T., C. La Porta, S.R. Reddigari, V.M. Salerno, A.P. Kaplan, y M. Silverberg. 1993. Activation of factor XI in plasma is dependent on factor XII. *Blood* 81:580-586

-
- Brunger, A.T., R. Huber, y M. Karplus. 1987. Trypsinogen trypsin transition. A molecular-dynamics study of induced conformational change in the activation domain. *Biochemistry* 26:5153-5162
- Bryan, P., M.W. Pantoliano, S.G. Quill, H.Y. Hsiao, y T. Poulos. 1986. Site-directed mutagenesis and the role of the oxyanion hole in subtilisin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:3743-3745
- Burden, R. y J. Faires. 1985. En "Análisis Numérico". Ed. Iberoamericana, México.
- Bustin, M., y A. Conway-Jacobs. 1971. Intramolecular activation of porcine pepsinogen. *J Biol Chem*. 246:615-620
- Butenas, S., y K.G. Mann. 2002. Blood coagulation. *Biochemistry (Mosc)* 67:3-12
- Canela, E.I. 1983. A program for deriving rate equations using small computers. *Int J Biomed Comput*. 14:43-52
- Cha, S. 1968. A simple method for derivation of rate equations for enzyme-catalyzed reactions under the rapid equilibrium assumption or combined assumptions of equilibrium and steady state. *J Biol Chem*. 243:820-825
- Chang, H.Y., y X. Yang. 2000. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev*. 64:821-46
- Chen, J.M., Z. Kukor, C. Le Marechal, M. Coth, L. Tsakiris, C. Raguene, C. Ferec, y M. Sahin-Toth. 2003. Evolution of trypsinogen activation peptides. *Mol. Biol. Evol*. 20:1767-1777
- Chock, P.B., S.G. Rhee, y E.R. Stadtman. 1980. Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Ann. Rev. Biochem*. 49:813-843
- Chou, K.C. 1989. Graphic rules in steady and non-steady state enzyme kinetics. *J Biol Chem*. 264:12074-12079
- Colman, R.W. 1980. Activation of plasminogen by human plasma kallikrein, *Biochem. Biophys. Res Commun*. 35:273-279
- Cornish-Bowden, A. 1977. An automatic method for deriving steady-state rate equations. *Biochem J*. 165:55-59
- Cornish-Bowden, A. 1989. En "Fundamentals of Enzyme Kinetics". Butterworths, London & Boston.
- Craik C.S., C. Largman, T. Fletcher, S. Rocznik, P.J. Barr, R. Fletterick, y W.J. Rutter. 1985. Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science*. 228:291-297

- Darvey, I.G. 1968. Transient phase kinetics of enzyme reactions. *J Theor Biol.* 19:215-231
- Darvey, I.G. 1977. Transient phase kinetics of enzyme reactions where more than one species of enzyme is present at the start of the reaction. *J. Theor. Biol.* 65:465-478
- Davidson, D.J., D.L. Higgins, y F.J. Castellino. 1990. Plasminogen activator activities of equimolar complexes of streptokinase with variant recombinant plasminogens. *Biochemistry* 29:3585-3590
- Davies, D.R. 1990. The structure and function of the aspartic proteinases. *Ann Rev Bioph Chem.* 19:189-215
- DeClerck, Y.A., A.M. Mercurio, M.S. Stack, H.A. Chapman, M.M. Zutter, R.J. Muschel, A. Raz, L.M. Matrisian, B.F. Sloane, A. Noel, M.J. Hendrix, L. Coussens, y M. Padarathsingh. 2004. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. *Am J Pathol.* 164:1131-1139
- Dixon, M., E.C. Webb, C.J.R. Thorne, y K.F. Tipton. 1979. En "Enzymes", 3rd. Ed. London, Longman, p. 300.
- Dobrovolsky, A.B., y E.V. Titaeva. 2002. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiological functions of its main components. *Biochemistry (Mosc)* 67:99-108
- Drenth, J., J.N. Jansonius, R. Koekoek, y B.G. Wolthers. 1971. *Adv Protein Chem.* 25:79-115
- Dunn, B.M., y J. Kay. 1985. Design, synthesis and analysis of new synthetic substrates for the aspartic proteinases. *Biochem. Soc. Trans.* 13:1041-1043
- Dunn, B.M., M.M. Goodenow, A. Gustchina, y A. Wlodawer. 2002. Retroviral proteases. *Genome Biol.* 3:REVIEWS3006.1-3006.7
- Dykes, C.W., y J. Kay. 1976. Conversion of pepsinogen into pepsin is not a one-step process. *Biochem J.* 153:141-144
- Fehlberg, E. 1970. Klassische Runge-Kutta Formeln vierter und niedrigerer Ordnung mit Schrittwerten-Kontrolle und ihre Anwendung auf Wärmeleitungs-probleme. *Computing* 6:61-71
- Fersht, A. 1980. En "Estructura y Mecanismo de los enzimas". Editorial Reverté, S.A.
- Fischer, E. 1894. Einfluss der configuration auf die wirkung der enzyme. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 27:2985-2993

- Forsgren, M., B. Raden, M. Israelsson, K. Larsson, y L.-O. Hedín. 1987. Molecular cloning and characterization of a full-length cDNA clone for human plaminogen. *FEBS Lett.* 213:254-260
- Fromm, H.J. 1979. En "Methods in Enzymology" (Purich, D.L. Ed.) Academic Press. New York, vol. 63, pp. 84-91.
- Fujinaga, M., M.M. Chernaia, N.I. Tarasova, S.C. Mosimann y M.N.G. James. 1995. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Sci.* 4:960-972
- Galindo, J., R. Peñafiel, R. Varón, E. Pedreño, F. García-Carmona, y F. García-Cánovas. 1983. Kinetic study of the activation process of frog epidermis pro-tyrosinase by trypsin. *Int. J. Biochem.* 15:633-637
- Galvez, J., y R. Varón. 1981. I. Transient phase kinetics of enzyme reactions. *J Theor Biol.* 89:1-17
- Gálvez, J., R. Varón, F. García-Canovas, y F. García-Carmona. 1982. IV. Transient phase of the uni-bi mechanisms. *J Theor Biol.* 94:413-420
- Gálvez, J., R. Varón, F. García-Canovas, y F. García-Carmona. 1983. Cinética en fase de transición de un mecanismo de Michaelis-Menten con nucleofilo competidor. *An. Quim.* 79:5-8
- García-Canovas, F., J. Tudela, C. Martinez Madrid, R. Varón, F. García-Carmona, y J.A. Lozano. 1987. Kinetic study on the suicide inactivation of tyrosinase induced by catechol. *Biochim Biophys Acta.* 912:417-423
- García-Moreno, M., F. García-Cánovas, R. Varón, J. Tudela, F. García-Carmona, A. Vázquez y E. Valero. 1987. Kinetic-study of the transient phase of 3-substrate enzyme reaction with ordered ter-ter mechanisms - Kinetic data analysis. *An. Quim.* 83:344-347
- García-Moreno, M., B.H. Havsteen, R. Varón, y H. Rix-Matzen. 1991. Evaluation of the kinetic parameters of the activation of trypsinogen by trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1080:143-147
- García-Sevilla, F., C. Garrido del Solo, R.G. Duggleby, F. García-Cánovas, R. Peyró, y R. Varón. 2000. Use of a windows program for simulation of the progress curves of reactants and intermediates involved in enzyme-catalyzed reactions. *Biosystems* 54:151-164
- Gardell S.J., C.S. Craik, D. Hilvert, M.S. Urdea, y W.J. Rutter. 1985. Site-directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. *Nature.* 317:551-555

- Garfinkel, D., C.B. Marbach, y N.Z. Shapiro. 1977. Stiff differential equations. *Annu Rev Biophys Bioeng.* 6:525-542
- Garrido-del Solo, C., R. Varón y F. García-Cánovas. 1992. Programa de ordenador para simular el comportamiento cinético de las reacciones enzimáticas. *An. Quim.* 88:633-639
- Gear, C.W. 1971. The automatic integration of ordinary differential equations. *Commun. ACM* 14:176-179
- Gerald, C. y P. Wheatley. 1989. En "Applied Numerical Analysis". Addison-Wesley.
- Gentler, A., K.A. Walsh, H. Neurath. 1974. Catalysis by chymotrypsinogen. Demonstration of an acyl-zymogen intermediate. *Biochemistry* 13:1302-1310
- Goldsmith, G.H., H. Saito, y O.D. Ratnoff. 1978. The activation of plasminogen by Hageman factor (factor XII) and Hageman factor fragments. *J. Clin. Invest.* 62:54-60
- Gordon, A.R. y A. Alldridge. 1971. Cytochemical localization of peroxidase A in developing stem tissues of extreme dwarf tomato. *Can. J. Bot.* 49:1487-1971
- Groskopf, W.R., B. Hsieh, L. Summaria, y K.C. Robbins. 1969. Studies on the active center of human plasmin. Partial amino acid sequence of a peptide containing the active center serine residue. *J. Biol. Chem.* 244:359-365
- Hadorn, B. 1974. Pancreatic proteinases; their activation and the disturbances of this mechanism in man. *Med Clin North Am.* 58:1319-1331
- Havsteen, B.H., y R. Varón. 1990. Kinetics of the classical complement activation cascade. *J Theor Biol.* 145:47-64
- Havsteen, B.H., M. García-Moreno, E. Valero, M.C. Manjabacas, y R. Varón. 1993. Kinetic of enzyme systems involving activation of zymogens. *Bull. Math. Biol.* 55:561-583
- Hayashi, K., y N. Sakamoto. 1986. Determination of reaction scheme and kinetic parameters. En "Dynamic analysis of enzyme systems. An Introduction". Japan Scientific Societies Press, Tokyo. pp. 297-303.
- Hayes, M.G., M.J. Hurley, L.W. Larsen, C.W. Heegaard, A.A. Magwoul, J.C. Oliveira, P.L. McSweeney, y A.L. Kelly. 2001. Thermal inactivation kinetic of bovine cathepsin D. *J. Dairy Res.* 68:267-276

- Hemker, H.C., y P.W. Hemker. 1969. H. The kinetics of enzyme cascade systems. *General kinetics of enzyme cascades*. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 173:411-420
- Henderson, P.J.F. 1972. A linear equation that describes the steady-state kinetics of enzymes and subcellular particles interacting with tightly bound inhibitors. *Biochem. J.* 127:321-333
- Henkin, J., P. Marcotte, y H. Yang. 1991. The plasminogen-plasmin system. *Prog. Cardiovasc. Disease* 34:135-164
- Henri, V. 1902. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* 135:916-919
- Herries, D.G. 1984. The computerized derivation of steady-state rate equations for enzyme kinetics. *Biochem J.* 223:551-553
- Herriot, R.M. 1939. Kinetics of the formation of pepsin from swine pepsinogen and identification of an intermediate compound. *J Gen Physiol.* 22:65-78
- Higgins, J. 1961. *Tech. Org. Chem.*, 8, part I, 285.
- Holzer, H., y P.C. Heinrich. 1980. Control of proteolysis. *Annu Rev Biochem.* 49:63-91
- Hommes, F.A. 1962. The integrated Michaelis-Menten equation. *Arch Biochem Biophys.* 96:28-31
- Huang, C.Y. 1979. En "Methods in Enzymology" (Purich, D.L., Ed.) Academic Press. New York. Vol. 63, pp. 54-63.
- Ishikawa, H., T. Maeda, H. Hikita, y K. Miyatake. 1988. The computerized derivation of rate equations for enzyme reactions on the basis of the pseudo-steady-state assumption and the rapid-equilibrium assumption. *Biochem J.* 251:175-181
- James, M.N.G., y A.R. Sielecki. 1986. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 Å resolution. *Nature.* 319:33-38
- James, M.N.G., A.R. Sielecki, K. Hayakawa, y M.H. Gelb. 1992. Crystallographic analysis of transition state mimics bound to pencillopepsin: Difluorostatine and difluorostatone-containing peptides. *Biochemistry.* 31:3872-3886
- Kageyama, T., y K. Takahashi. 1987. Activation mechanism of monkey and porcine pepsinogens A. One-step and stepwise activation pathways and their relation to intramolecular and intermolecular reactions. *Eur. J. Biochem.* 165:483-490

- Kageyama, T. 1988. Analysis of the activation of pepsinogen in the presence of protein substrates and estimation of the intrinsic proteolytic activity of pepsinogen. *Eur. J. Biochem.* 176:543-549
- Kageyama, T., M. Ichinose, K. Miki, S.B. Athauda, M. Tanji, y K. Takahashi. 1989. Difference of activation processes and structure of activation peptides in human pepsinogens A and progastricsin. *J. Biochem.* 105:15-22
- Kanost, M.R., H. Jiang, y X.Q. Yu. 2004. Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunol. Rev.* 198:97-105
- Karlson, P. 1988. En "Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler", 13^a edn., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 160-437.
- Kasserra, H.P. y K.J. Laidler. 1970. Transient-phase studies of a trypsin-catalyzed reaction. *Can. J. Chem.* 48: 1793-1890
- Kerr, M.A., K.A. Walsh, y H. Neurath. 1975. Catalysis by serine proteases and their zymogens. A study of acyl intermediates by circular dichroism. *Biochemistry* 14:5088-5094
- Khan, A.R., M.M. Cherney, N.I. Tarasova, y M.N.G. James. 1997. Structural characterization of activation intermediate 2 on the pathway to human gastricsin. *Nature Struct Biol.* 4:1010-1015
- Khan, A.R. y M.N.J. James. 1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 4:915-836
- Klein, J. 1982. En "Immunology. The Science of Self and Nonself Discrimination" NewYork, Wiley, pp. 313-316.
- Kocholaty, W., W. Ellis, y H. Jensen. 1952. Activation of plasminogen by trypsin and plamin. *Blood* 7:882-890
- Koga, D., y K. Hayashi. 1976. Activation process of pepsinogen. *J. Biochem.* 5:449-476
- Kosow, D.P. 1975. Kinetic mechanism of the activation of human plasminogen by strepto-kinase. *Biochemistry* 14:4459-4465
- Kostka, V. 1985. En "Aspartate proteinase and their inhibitors" De Gruyter, Berlin-New York.
- Kraut, J. 1977. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:331-358

- Krishnaswamy, S., W.R. Church, M.E. Nesheim, y K.G. Mann. 1987. Activation of human prothrombin by human prothrombinase. Influence of factor Va on the reaction mechanism. *J. Biol. Chem.* 262:3291-3299
- Laidler, K.J. 1955. Theory of the transient phase in kinetics, with special reference to enzyme. *Can J Chem.* 33:1614-1624
- Laidler, K.J. y P.S. Bunting. 1973. En "The chemical kinetics of enzyme action" Oxford University Press, London, pp. 163-165.
- Lazure, C. 2002. The peptidase zymogen proregions: nature's way of preventing undesired activation and proteolysis. *Curr Pharm Des.* 8:511-531
- Lin, X., Y. Lin, G. Koelsch, A. Gustchina, A. Wlodawer, y J. Tang. 1992. Enzymic activities of two-chain pepsinogen, two-chain pepsin, and the amino-terminal lobe of pepsinogen. *J. Biol. Chem.* 267:17257-17263
- Liu, J.N., R. Pannell, y V. Gurewich. 1992. A transitional state of pro-urokinase that has a higher catalytic efficiency against glu-plasminogen than urokinase. *J. Biol. Chem.* 267:15289-15292
- Liu, J.H., y Z.X. Wang. 2004. Kinetic analysis of ligand-induced autocatalytic reactions. *Biochem. J.* 379:697-702
- Lluis, F., J. Roma, M. Suelves, M. Parra, G. Anierte, E. Gallardo, I. Illa, L. Rodríguez, S.M. Hughes, P. Carmeliet, M. Roig, y P. Muñoz-Cánoves. 2001. Urokinase-dependent plasminogen activation is required for efficient skeletal muscle regeneration in vivo. *Blood* 97:1703-1711
- Löffler, G. y P.E. Petrides. 1988. En "Physiologische Chemie", 4ª edn., Springer-Verlag, Berlín, pp. 832-843.
- Magklara, A., A.A. Mellati, G.A. Wasney, S.P. Little, G. Sotiropoulou, G.W. Becker, y E.P. Diamandis. 2003. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: Autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307:948-955
- Maguire, R.J. 1974. Transient-phase kinetics of alpha-chymotrypsin and other enzyme systems. *Biochim Biophys Acta.* 341:1-14
- Mandle, R.J., y A.P. Kaplan. 1979. Generation of fibrinolytic activity by the interaction of activated factor XI and plasminogen. *Blood* 54:850

- Manjabacas, M.C., E. Valero, M. García-Moreno, y R. Varón. 1995. Kinetic analysis of an autocatalytic process coupled to a reversible inhibition. The inhibition of the system trypsinogen-trypsin by *p*-aminobenzamidine. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 376:577-580
- Manjabacas, M.C., E. Valero, M. García-Moreno, C. Garrido, y R. Varón. 1996. Kinetics of an autocatalytic zymogen reaction in the presence of an inhibitor coupled to a monitoring reaction. *Bull. Math. Biol.* 58:19-41
- Manjabacas, M.C., E. Valero, M. Moreno-Conesa, M. García-Moreno, M. Molina-Alarcón, y R. Varón. 2002. Linear mixed irreversible inhibition of the autocatalytic activation of zymogens. Kinetic analysis checked by simulated progress curves. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34:358-369
- Mann K.G., R.J. Jenny, y S. Krishnaswamy. 1988. Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem.* 57:915-956
- Marin, F., V. Roldan, y G.Y. Lip. 2003. Fibrinolytic function and atrial fibrillation. *Thromb. Res.* 109:233-240
- Markus, G., S. Hitt, S.R. Harvey, y G.L. Tritsch. 1993. Casein, a powerful enhancer of the rate of plasminogen activation. *Fibrinolysis* 7:229-236
- Mathews, J.H., y K.D. Fink. 1999. Ecuaciones diferenciales ordinarias. En "Métodos Numéricos con MATLAB", 3rd ed. Prentice Hall, Madrid, Spain. pp. 505-509.
- McClintock, D.K., y P.H. Bell. 1971. The mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43:694-702
- McPhie, P. 1972. A spectrophotometric investigation of the pepsinogen-pepsin conversion. *J. Biol. Chem.* 247:4277-4281
- McKay, T.R., S. Bell, T. Tenev, V. Stoll, R. Lopes, N.R. Lemoine, y I.A. McNeish. 2003. Procaspase 3 expression in ovarian carcinoma cells increases surviving transcription which can be countered with a dominant-negative mutant, surviving T34A; a combination gene therapy strategy. *Oncogene* 22:3539-3547
- Michaelis, L y M.L. Menten. 1913. Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49:333-369
- Michavilla, F. y L. Gavete. 1985. En "Programación y Cálculo Numérico". Reverté. Barcelona.
- Mihalyi, E. 1972. En "Application of Proteolytic Enzymes to Protein Structure Studies" CRC Press, Cleveland: CRC Press.

-
- Muller-Eberhard, H.J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. *Annu Rev Biochem.* 57:321-347
- Nesheim, M. 2003. Thrombin and fibrinolysis. *Chest* 124:335-395
- Neurath, H. 1975. En "Proteases and Biological Control". (Ed. Reich; E. Rifkins, D.B. & Shaw, E.) Cold Spring Harbor Laboratory. New York Vol.2, pp. 51-64.
- Neurath, H., y K.A. Walsh. 1976. The role of proteases in biological regulation. In *Proteolysis and Physiological Regulation*. D.W. Ribbons, and K. Brew, editors. Academic Press, NY. 29-42.
- Neurath, H. 1984. Evolution of Proteolytic enzymes. *Science* 224:350-356
- Neurath, H. 1986. The versatility of proteolytic enzymes. *J Cell Biochem.*32:35-49
- Neurath, H. 1999. Proteolytic enzymes, past and future. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:10962-10963
- Newsholme, E.A., R.A.J. Challiss, y B. Crabtree. 1984. Substrate cycles: their role in improving sensitivity in metabolic control. *TIBS* 9:277-280
- Nielsen, F.S., y B. Foltmann. 1993. Activation of porcine pepsinogen A. The stability of two non-covalent activation intermediates at pH 8.5. *Eur. J. Biochem.* 217:137-142
- O'Sullivan, C. y Tompson, F.W. 1890. *J. Chem. Soc. Trans.* 57:834-931
- Ouellet, L. y K.J. Laidler. 1956. Theory of the transient phase in kinetics, with special reference to enzyme systems: II. The case of two enzyme-substrate complexes. *Can. J. Chem.* 34:146-150
- Ouellet, L. y J.A. Stewart. 1959. Theory of the transient phase in an enzyme system involving 2 enzyme-substrate complexes the case of the formation of products from the 1st complex. *Can. J. Chem.*, 37, 737-743
- Pearton, D.J., W. Nirunsuksiri, A. Rehemtulla, S.P. Lewis, R.B. Presland, and B.A. Dale. 2001. Proprotein convertase expression and localization in epidermis: evidence for multiple roles and substrates. *Exp. Dermatol.* 10:193-203
- Ponting, C.P., J.M. Marshall, y S.A. Cederholm-Williams. 1992. Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 3:605-614
- Ranby, M. 1982. Studies on the kinetics of plasminogen activation by tissue plasminogen activator. *Biochim. Biophys. Acta* 704:461-469

- Rawn, D.J. 1989. En "Bioquímica" Mc. Graw Hill Interamericana, Vol. I, pp. 195-215.
- Reddy, K.N., y G. Markus. 1972. Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase-plasminogen complex. J. Biol. Chem. 247:1683-1691
- Rich, D.H., M.S. Bernatowicz, N.S. Agarwal, M. Kawai, y F.G. Salituro. 1985. Inhibition of aspartic proteases by pepstatin and 3-methylstatine derivatives of pepstatin. Evidence for collected-substrate enzyme inhibition. Biochemistry 24:3165-3173
- Richter, C., T. Tanaka, y R.Y. Yada. 1998. Mechanism of activation of the gastric aspartic proteinases: pepsinogen, progastricsin and prochymosin. Biochem. J. 335:481-490
- Richter, C., T. Tanaka, T. Koseki, y R.Y. Yada. 1999. Contribution of a prosegment lysine residue to the function and structure of porcine pepsinogen A and its active form pepsine A. Eur. J. Biochem. 261:746-752
- Robbins, K.C., L. Summaria, B. Hsieh, y R.J. Shah. 1967. The peptide chains of human plasmin. Mechanism of activation of human plasminógeno to plasmin. J. Biol. Chem. 242:2333-2342
- Robbins, K.C., L. Summaria, y R.C. Wohl. 1981. Human plasmin. Methods Enzymol. 80:379-408
- Roughton, F.J.W. 1954. Rapid reactions in biology. Discuss Sco., 17:116-120
- Segel, I.H. 1975. En "Enzyme Kinetics". John Wiley & Sons, Inc., NY.
- Schick, L.A., y F.J. Castellino. 1974. Direct evidence for the generation of an active site in the plasminogen moiety of the streptokinase-human plasminogen activator complex. Biochem. Biophys. Res. Commun. 57:47-54
- Shariat-Madar, Z., F. Mahdi, y A.H. Schmaier. 2004. Recombinant prolylcarboxy-peptidase activates plasma prekallikrein. Blood 103:4554-4561
- Shi, Y. 2004. Caspase activation: revising the induced proximity model. Cell 117:855-858
- Silverberg, M., R. Thompson, G. Miller, y A.P. Kaplan. 1980. En "The Regulation of coagulation", Elsevier/North Holland. New York, pp. 531-541.
- Smith, B.R., C.S. Rinder, y H.M. Rinder. 2002. Interaction of Blood and Artificial Surfaces. Loscalzo J, Schafer AI (eds) En "Thrombosis and Hemorrhage", 3rd Edition (Williams and Wilkins, Baltimore, MD).
- Sodetz, J.M., y F.J. Castellino. 1975. The mechanism of activation of rabbit plasminogen by urokinase. J. Biol. Chem. 250:3041-3049

- Sottrup-Jensen, L., H. Claeys, M. Zajdel, T.E. Petersen, y S Magnusson. 1978. The primary structure of human plasminógeno: isolation of two lysine-binding fragments and one 'mini' plasminógeno (MW, 38000) by elastase-catalyzed-specific limited proteolysis. *Prog. Chem. Fibrinolysis Thrombolysis* 3:191-209
- Spronk, H.M., J.W. Govers-Fiems, y H. ten Cate. 2003. The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* 25:1220-1228
- Stadman, E.R. 1970. En "The Enzymes". Ed. Boyer, P. D. Academic Press. New York, 3rd. Vol. 1, pp. 397-459.
- Tanaka, T., y R.Y. Yada. 1997. Engineered porcine pepsinogen exhibits dominant unimolecular activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 340:355-358
- Tankersley, D.L., y J.S. Finlayson. 1984. Kinetics of activation and autoactivation of human factor XII. *Biochemistry.* 23:273-279
- Tans, G., J. Rosing, y J.H. Griffin. 1983. Sulfatide-dependence autoactivation of human blood coagulation Factor XII (Hageman Factor). *J. Biol. Chem.* 285:8215-8222
- Tans, G., J. Rosing, M. Berrettini, B. Lammler, y J.H. Griffin. 1987. Autoactivation of human plasma prekallikrein. *J. Biol. Chem.* 262:11308-11314
- Valero, E., R. Varón, y F. García-Carmona. 1995. Kinetic study of an enzymic cycling system coupled to an enzymic step: determination of alkaline phosphatase activity. *Biochem. J.* 309:181-185
- Valero, E., R. Varón, y F. García-Carmona. 1997. Mathematical model for the determination of an enzyme activity based on enzymatic amplification by substrate cycling. *Anal. Chim. Acta* 346:215-221
- Valero, E., R. Varón, y F. García-Carmona. 2000. Kinetics of a self-amplifying substrate cycle: ADP-ATP cycling assay. *Biochem. J.* 350:237-243
- Valero, E., R. Varón, y F. García-Carmona. 2004. Kinetic analysis of a Model for Double Substrate Cycling: Highly amplified ADP (and/or ATP) quantification. *Biophys J.* 86:3598-3606
- Valero, E., R. Varón, y F. García-Carmona. 2006. A kinetic study of a ternary cycle between adenine nucleotides. *The FEBS J.* (en prensa)

- Van de Werf, F., P.A. Ludbrook, S.R. Bergmann, A.J. Tiefenbrunn, K.A. Fox, H. De Geest, M. Verstraete, D. Collen, y B.E. Sobel. 1984. Coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator in patients with evolving myocardial infarction. *N Engl J Med.* 310:609-613
- Varón, R., A. Román, F. García-Canovas, y F. García-Carmona. 1986. Transient phase kinetics of activation of human-plasminogen. *Bull. Math. Biol.* 48:149-166
- Varón, R., F. García-Cánovas, F. García-Carmona, J. Tudela, M. García-Moreno, A. Vázquez, y E. Valero. 1987. Kinetics of a general-model for enzyme activation through a limited proteolysis. *Math. Biosci.* 87:31-45
- Varón, R., F. García-Cánovas, F. García-Carmona, J. Tudela, A. Román, y A. Vázquez. 1988. Kinetics of a model for zymogen activation. The case of high activating enzyme concentration. *J. Theor. Biol.* 132:51-59
- Varón, R., F. García-Cánovas, J. Tudela, M. García-Moreno, y A. Vázquez. 1989. A contribution to the derivation of the steady-state rate equation of enzyme-reactions. *An. Quim.* 85:85-92
- Varón, R., M. García-Moreno, F. García-Cánovas, y J. Tudela. 1990a. Transient-phase kinetics of enzyme inactivation induced by suicide substrates: enzymes involving two substrates. *J. Molec. Cat.* 59:97-118
- Varón, R., B.H. Havsteen, M. García-Moreno, F. García-Cánovas, y J. Tudela. 1990b. Computer program for the expression of the kinetic equations of enzyme reactions as functions of the rate constants and the initial concentrations. *Biochem. J.* 270:825-828
- Varón, R., B.H. Havsteen, M. García-Moreno, E. Valero, y F. García-Cánovas. 1990c. Derivation of the transient phase equations of enzyme mechanisms from those of other systems. *J. Theor. Biol.* 143:251-268
- Varón, R., B.H. Havsteen, A. Vázquez, M. García-Moreno, E. Valero, y F. García-Cánovas. 1990d. Kinetics of the trypsinogen activation by enterokinase and trypsin. *J. Theor. Biol.* 145:123-131
- Varón, R., B.H. Havsteen, M. García-Moreno, F. García-Cánovas, y J. Tudela. 1991. Computer program for the kinetic equations of enzyme reactions: the case in which more than one enzyme species is present at the onset of the reaction. *Biochem. J.* 278:91-97
- Varón, R., B.H. Havsteen, M. García-Moreno, y A. Vázquez. 1992. Kinetics of a model of autocatalysis, coupling of a reaction in which the enzyme acts on one of its substrates. *J. Theor. Biol.* 154:261-270

- Varón, R., M.C. Manjabacas, M. García-Moreno, E. Valero, y F. García-Cánovas. 1993. Kinetic behaviour of zymogen activation processes in the presence of an inhibitor. *Biochem. J.* 290:463-470
- Varón, R., B.H. Havsteen, M. Molina, S.E. Szedlacsek, M. García-Moreno, y F. García-Cánovas. 1994a. Kinetic analysis of reversible closed bicyclic enzyme cascades covering the whole course of the reaction. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 26:787-797
- Varón, R., R. Molina, M. García-Moreno, F. García-Sevilla, y E. Valero. 1994b. Kinetic analysis of the opened bicyclic enzyme cascades. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 375:365-371
- Varón, R., F. García-Sevilla, M. García-Moreno, F. García-Cánovas, R. Peyró, y R.G. Duggleby. 1997. Computer program for the equations describing the steady-state of enzyme reactions. *CABIOS* 13:159-167
- Varón, R., M.M. Ruíz-Galea, C. Garrido-del Solo, F. García-Sevilla, M. García-Moreno, F. García-Cánovas, y B.H. Havsteen. 1999. Transient phase of enzyme reactions. Time course equations of the strict and the rapid equilibrium conditions and their computerized derivation. *Biosystems* 50:99-126
- Varón, R., M. García-Moreno, F. García-Molina, M.E. Fuentes, E. Arribas, J.M. Yago, M. Ll. Amosaus y E. Valero. 2005a. Two new regulatory properties arising from the transient phase kinetics of monocyclic enzyme cascades. *J. Math. Chem.* 38:437-450
- Varón, R., B.H. Havsteen, E. Valero, M. Molina, F. García-Cánovas y M. García-Moreno. 2005b. Kinetic analysis of the transient phase and steady state of open multicyclic enzyme cascades. *Acta Biochimica Polonica.* 52:765-780
- Varón, R., E. Valero, M. Molina-Alarcón, F. García-Cánovas, F. García-Molina, M.E. Fuentes and M. García-Moreno. 2005c. Expressions for the fractional modification in different monocyclic enzyme cascades systems: analysis of their validity tested by numerical integration. *Bull. Math. Biol.* (en prensa).
- Violand, B.N., y Castellano, F.J. 1976. Mechanism of urokinase-catalysed activation of human plasminogen. *J. Biol. Chem.* 251:3906-3912
- Walsh, K.A. 1986. En "Methods in Protein Sequence Analysis". KA Walsh ed. Humana Press, Clifton, NY.

- Walter C.F., y M.F. Morales. 1964. An analogue computer investigation of certain issues in enzyme kinetics. *J Biol Chem.* 239:1277-1283
- Walter, C. 1966. Quasi-steady state in a general enzyme system. *J Theor Biol.* 11:181-206
- Wang, J.L., y G.M. Edelman. 1971. Fluorescent probes for conformational states of proteins. IV. The pepsinogen-pepsin conversion. *J. Biol. Chem.* 246:1185-1191
- Wang, X., X. Lin, J.A. Loy, J. Tang, y X.C. Zhang. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase. *Science* 281:1662-1665
- Wang, W.N., X.M. Pan y Z.X. Wang. 2004. Kinetic analysis of zymogen autoactivation in the presence of a reversible inhibitor. *Eur. J. Biolchem.* 271: 4638-4645
- Wetsel, R.A., R.T. Ogata, y B.F. Tack. 1987. Primary structure of the fifth component of murine complement. *Biochemistry* 26:737-743
- Wiman, B. 1973. Primary structure of peptides released during activation of human plasminogen by urokinase. *Eur. J. Biochem.* 39:1-9
- Wiman, B. 1977. Primary structure of the β (light) chain of human plasmin. *Eur. J. Biochem.* 76:129-137
- Wohl, R.C., L. Summaria, J. Arzadon, y K.C. Robbins. 1978. Steady-state kinetics of activation of human and bovine plasminogens by streptokinase and its equimolar complexes with various activated forms of human plasminogen. *J. Biol. Chem.* 253:1402-1407
- Wohl, R.C., L. Summaria, y K.C. Robbins. 1980. Kinetics of activation of human plasminogen by different activator species at pH 7.4 and 37 °C. *J. Biol. Chem.* 255:2005-2013
- Wong, J.T. 1965. On the steady-state method of enzyme kinetics. *J. Am. Chem. Soc.*, 87:1788-1793
- Wong, J.T. 1975. En "Kinetics of enzyme mechanisms". Academic Press, London. pp. 10-13.
- Worthington Manual. Enzymes y related biochemicals. 1988. Worthington biochemical corporation. Freehold, New Jersey, U.S.A.
- Wu, J.W., Y. Wu, y Z.X. Wang. 2001. Kinetic analysis of a simplified scheme of autocatalytic zymogen activation. *Eur. J. Biochem.* 268:1547-1553

Young, T.N., J.M. Edelberg, S. Stack, y S.W. Pizzo. 1992. Ionic modulation of the effects of heparin on plasminogen activation by tissue plasminogen activator: the effects of ionic strength, divalent cations and chloride. *Arch. Biochem. Biophys.* 296:530-538

Zhang, X.Z., A. Strand, y H.D. White. 1989. A general pre-steady-state solution to complex kinetic mechanisms. *Anal Biochem.* 176:427-431

<http://expasy.org>

NOTA: En algunos casos no se ha dispuesto del artículo original por la dificultad de conseguirlo por su antigüedad o al proceder de fuentes poco accesibles, y en esos casos no aparece en la referencia el título del artículo.