

90  
201-



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA  
TETRAMERICA (LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO  
Y ALTO CONTENIDO DE AGUA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**  
P R E S E N T A :  
**SALVADOR MEJIA GUERRERO**



MEXICO, D. F.,

1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



---

## INDICE

I. Introducción	6
II. Antecedentes.	
2.1. Breve Repaso acerca de la Estructura Proteica	20
2.2. La Deshidrogenasa Láctica.	
2.2.1 Función	29
2.2.2 Estructura	33
2.2.3 Algunos estudios previos	39
2.3 Desnaturalización	
2.3.1 Generalidades	44
2.3.2 Tipos de desnaturalizantes	49
2.3.2.1 Desnaturalización por temperatura	50
2.3.2.2 Desnaturalización por pH	54
2.3.2.3 Desnaturalización por sales	56
2.4. El Sistema de Bajo Contenido de Agua	
2.4.1 Introducción	58
2.4.2 Tipos de sistemas de bajo contenido de agua	59
2.4.2.1 Micelas invertidas	61
2.4.2.2 Enzimas "secas" suspendidas	70





---

2.4.2.3 Mezclas de agua y solventes orgánicos 71

III. Objetivos.	73
IV. Materiales y Métodos.	
4.1 Medición de proteína	77
4.2 Actividad en medio acuoso	78
4.3 Marcaje de la enzima con <sup>125</sup> I	80
4.4 Actividad en micelas invertidas	80
4.5 Recuperación a medio acuoso	81
4.6 Lavado del detergente de la enzima recuperada	81
V. Resultados y Discusión.	
5.1 Efectos observados en el sistema 100% acuoso	85
5.2 Efectos observados en el medio micelar	97
5.3 Observaciones en la enzima devuelta a medio 100% acuoso	104
VI. Conclusiones	125
VII. Bibliografía	129
Apéndices	140





## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Representación de un aminoácido, el enlace peptídico y las dos estructuras secundarias regulares.
- Figura 2. Representación de algunos de los motivos más comunes.
- Figura 3. Reacción catalizada por la LDH.
- Figura 4. Efecto de la acción de la LDH sobre la vía glucolítica.
- Figura 5. Secuencia de las cadenas H y M de la LDH de cerdo.
- Figura 6. Micela común.
- Figura 7. Representación de una micela invertida.
- Figura 8. Medición de la actividad de la LDH.
- Figura 9. Empleo del tubo concentrador Centricón-10.
- Figura 10. Efecto de la guanidina sobre la actividad de la LDH-M<sub>2</sub> de cerdo en 100% de agua.
- Figura 11. Cálculo de la  $K_M$  y la  $V_{max}$  para piruvato.
- Figura 12. Renaturalización de la LDH en medio 100% acuoso (1).
- Figura 13. Renaturalización de la LDH en medio 100% acuoso (2).
- Figura 14. Efecto de la concentración del GndHCl sobre la actividad de la LDH en las micelas invertidas.
- Figura 15. Efecto del volumen de las micelas sobre el porcentaje de recuperación de la LDH al medio acuoso.
- Figura 16. Efecto de la concentración de proteína en las





---

micelas invertidas.

Figura 17. Influencia de la concentración de proteína en las micelas invertidas sobre la recuperación a medio 100% acuoso.

Figura 18. Comparación de actividad de la proteína en un medio 100% acuoso, en micelas y de vuelta a 100% de agua.

Figura 19. Estructura de los componentes del medio denominado CHO.





---

## INTRODUCCION

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-N4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## INTRODUCCION

Desde hace mucho tiempo ha surgido un gran interés por estudiar a las proteínas, ya que desempeñan papeles fundamentales en el desarrollo y metabolismo de un organismo vivo:

- a) Forman parte de las estructuras de sostén que permiten el alto grado de organización de los mismos;
- b) llevan a cabo funciones de degradación y síntesis de compuestos;
- c) permiten aprovechar la energía de algunos de éstos;
- d) funcionan como mensajeros químicos encargados de mediar la comunicación celular; etc.

Ello hace que el interés por el estudio de las mismas no sólo se haya enfocado a tratar de establecer cuántas proteínas funcionales existen, sino también a

---







---

conocer sus estructuras, el modo como llevan a cabo su función y también poder desentrañar los mecanismos que les permiten adquirir su estructura final.

Con respecto al último punto, es relativamente reciente la época en que se despertó el interés en su estudio. Los resultados han mostrado que son todavía muchas las interrogantes que es necesario contestar antes de poder entender qué es lo que permite a una proteína alcanzar una conformación determinada entre todas aquellas posibles.

Un gran avance lo representa el hecho de poder predecir teóricamente (aunque todavía de forma muy rudimentaria), la estructura secundaria de un péptido a partir de su estructura primaria, ya que se ha establecido que ciertas combinaciones de restos aminoacídicos favorecen más una estructura que otra<sup>15</sup>. Aquí se puede incluir la predicción del tipo estructural de una proteína y de las proporciones en ella de los diferentes tipos de estructura secundaria conocidos<sup>16,33,70</sup>.





Sin embargo, hasta ahora son pocos los resultados significativos. Esto ha conducido al desarrollo de nuevos métodos para seguir avanzando en el conocimiento de las directrices que gobiernan el plegado de las proteínas. La desnaturalización (que será definida más adelante) casi siempre se encuentra presente en los métodos desarrollados con este objetivo. Ello es debido a que se cree que si se pueden definir las estructuras y características de los posibles intermediarios de desnaturalización de una proteína, tal vez sea posible conocer algunas de las reglas que dirigen su plegamiento hasta su estado nativo. Obviamente, por comparación con los patrones de comportamiento, secuencias y estructuras de otras proteínas, existe la posibilidad de poder establecer reglas generales de plegamiento.

La desnaturalización puede ser inducida mediante agentes físicos o químicos. Esto, junto con los nuevos métodos que nos permiten estabilizar los posibles intermediarios, ofrece la posibilidad de determinar los pasos que sigue una proteína al ir perdiendo su estructura. Realmente, en la actualidad es mucho más





---

frecuente el tratar de observar los pasos que ocurren en el proceso inverso (renaturalización).

A últimas fechas se acepta generalmente que la transición de una proteína nativa a un estado desnaturalizado no es un proceso irreversible de un solo paso. Se cree que muchas de las proteínas, al ser sintetizadas, adquieren sus conformaciones secundaria y terciaria al tiempo que adquieren su estructura primaria (El caso de las que necesitan cofactores o son intramembranales es diferente). Por ello se pensaba que una proteína, cuando perdía su estructura final, no podía recuperarla porque carecía de un factor externo que la dirigiera. Sin embargo, como mostró Anfinsen (para una revisión consultar Anfinsen, 1973) en su teoría sobre los principios que rigen el plegamiento de la ribonucleasa, la desnaturalización es reversible si se da a la proteína el tratamiento y condiciones adecuados para su renaturalización. Las más comunes de estas condiciones son diluir a la proteína para eliminar al máximo la posibilidad de agregación y situarla en un medio con sus condiciones de temperatura y pH óptimos. Por supuesto,





---

todas las proteínas son diferentes y sus condiciones de renaturalización varían grandemente entre sí.

La demostración de que una proteína puede plegarse hasta su estado nativo partiendo exclusivamente de la información contenida en su estructura primaria<sup>4</sup> abrió nuevos campos. Se pensó que, tanto la desnaturalización como la renaturalización se llevaban a cabo en más de un paso. Previamente se había postulado que existía la posibilidad de que la renaturalización fuera dirigida por la formación rápida de regiones de nucleación (Revisar *Branden y Tooze*, 1991). Posteriormente se observó que las reactivaciones en diversos casos obedecían a cinéticas de segundo orden o eran trifásicas<sup>10,11</sup>. Tal vez un ejemplo ilustrativo lo proporcionen las enzimas poliméricas: antes de producirse la unión de los monómeros de la enzima éstos deben alcanzar un estado de plegamiento adecuado. Esto constituiría una secuencia de reactivación de dos pasos. Si además aceptamos que, después de unirse los monómeros, éstos van a reorganizarse por la interacción que sufren unos con otros, la cinética de recuperación se convierte en trifásica. El razonamiento anterior también muestra que

---





no es posible intuir el límite en el número de pasos que debe seguir un péptido para alcanzar su conformación final a partir de su estructura primaria. Además, no deseo implicar con este ejemplo que los pasos seguidos por una proteína monomérica sean menores en número o más sencillos que los de las poliméricas.

En las reactivaciones es muy frecuente que no se obtengan rendimientos del 100% de la actividad inicial de la enzima. Esto permite ver, *grosso modo*, dos razones para explicar la pérdida de actividad:

a) Se está devolviendo sólo a cierta cantidad de la enzima a su conformación inicial y la proteína restante no logra salir del estado desnaturalizado, o:

b) la mayor parte o casi toda la proteína está alcanzando un estado conformacional distinto al nativo. Por eso la proteína cambiaría sus características, entre ellas su velocidad de catálisis.

La segunda razón podría parecer la más viable, pues péptidos iguales deberían comportarse igual. Sin embargo,





se debe tomar en cuenta que un gran inconveniente al desplegar una proteína es que se exponen sus zonas hidrófobas (en los antecedentes se explicará la hidrofobicidad). La exposición de estas regiones sólo se logra aumentando la energía del sistema. Al eliminar aquella, todos los residuos hidrófobos tienden a interaccionar unos con otros. Si dos cadenas proteicas se encuentran cercanas, es muy fácil que los residuos de una interaccionen con los de la otra. Cuando esto ocurre, se produce el fenómeno conocido como agregación, que de ser muy acusado reduciría en gran medida el rendimiento de renaturalización.

Entre los primeros en tratar de distinguir entre una posibilidad o la otra se encuentran Rudolph y Jaenicke. En 1976, tras de desnaturalizar totalmente a la deshidrogenasa láctica (LDH) vieron que, al parecer, existían dos poblaciones proteicas cuando la renaturalizaban. Separaron la proteína activa de la que consideraban inactiva y demostraron que las propiedades de la primera la hacen indiferenciable de la enzima nativa<sup>76</sup>. Posteriormente se realizaron más estudios y todos ellos



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



confirman que la proteína es devuelta a su estado inicial<sup>80,81,84</sup>. El mejoramiento de las técnicas ha permitido un mayor rendimiento en la renaturalización<sup>82,85</sup>. Sin embargo, éstas no siempre son aplicables al estudio que se desea hacer o en ocasiones no se cuenta con los recursos para implantarlas en un laboratorio. Ello hace que los resultados reportados para la renaturalización de una proteína específica dependan del procedimiento empleado. Como consecuencia directa de esto, los resultados son muy variables<sup>6,20,47,78,84</sup>

Aparte de estas consideraciones respecto al plegado de las proteínas, es claro que los eventos necesarios que le permiten a los péptidos alcanzar su estructura nativa ocurren en presencia del agua. Esto es demostrado por el hecho de que nunca se menciona la importancia que puede tener el disolvente por sí mismo en los experimentos. Es por eso que, a fines de los años 70's y a principios de la década de los 80's, surge un nuevo enfoque para estudiar a las enzimas. Este considera el hecho de que no sabemos cuanta agua necesita una proteína para funcionar, ni tampoco cómo se las arregla para excluirla de su interior





o de la interfase proteína-ligando. Si recordamos, las proteínas se sintetizan en ausencia de agua, pero al ir abandonando el ribosoma inmediatamente son rodeadas por ella. Tienen entonces que excluirla de su interior. En la desnaturalización (*in vitro*) ocurre un proceso análogo: aumenta la superficie expuesta al agua, y al renaturalizarse se necesita volver a excluirla. Este último evento es llevado a cabo por la proteína sola, pues ya no hay agentes externos que la ayuden. Además una proteína, para reconocer a una molécula, tiene que interaccionar con ella, y el reconocimiento se da en presencia de la menor cantidad de agua posible.

De hecho, el punto importante de este enfoque es que una proteína "soluble" nunca pierde el contacto con el disolvente. Incluso las proteínas de membrana o aquellas que son solubles en lípidos tienen zonas de exposición al agua. Aparte, muchos de los compuestos que interaccionan con los diferentes tipos de proteínas (como son enzimas, canales, acarreadores, receptores, etc.) también están rodeados por agua. Por ello deben deshacerse de sus últimas capas de hidratación si se desea que puedan entrar







en contacto con el sitio de reconocimiento. Lo mismo ocurre con los inhibidores solubles sin importar su tipo: por fuerza deben deshacerse del disolvente que los rodea para poder interactuar con su proteína blanco. Estos y otros razonamientos han llevado a desarrollar métodos (los más comunes de los cuáles serán descritos en los antecedentes) que permitan estudiar el papel que juega el disolvente en la función proteica. También se han tratado de usar para ayudar a determinar la forma de adquisición de la estructura necesaria para llevar a cabo dicha función.

Así el trabajo desarrollado en la presente tesis se encuentra enfocado a llevar a cabo una renaturalización en un sistema que limita la cantidad de agua que puede entrar en contacto con la deshidrogenasa láctica de músculo de cerdo (LDH-M<sub>1</sub>). La familia de las deshidrogenasas lácticas es una de las más ampliamente estudiadas (para una revisión consultar *Holbrook, 1975*). Aparte, en nuestro laboratorio se ha caracterizado el comportamiento que presenta en un medio totalmente acuoso en presencia de agentes caotrópicos en condiciones de desnaturalización





muy suaves<sup>27</sup>. Se conoce su comportamiento en un medio limitante de agua (micelas invertidas)<sup>27,31</sup> y también cuando ha sido sometida a diversas condiciones desnaturalizantes además de las empleadas en nuestro laboratorio<sup>31,34,35</sup>.

El medio elegido para el ensayo está compuesto por: agua; bromuro de cetiltrimetilamonio y hexanol, como cosurfactantes, y; octano, como disolvente orgánico (de aquí en adelante, nos referiremos a él como CHO, por las siglas de sus componentes). La mezcla de éstos en las proporciones adecuadas da origen a un sistema de micelas invertidas cuyas características serán descritas posteriormente. Se decidió usar este sistema porque:

- a) Es uno de los métodos limitantes de agua más sencillos de manejar;
- b) recientemente se ha caracterizado el comportamiento de la LDH-M<sub>1</sub> en este sistema<sup>27,31</sup>;
- c) también recientemente se ha postulado que en micelas invertidas se pueden aislar los monómeros de una enzima multimérica y se propone como un sistema que permita estudiarlos<sup>47</sup>;





---

d) se ha renaturalizado en el CHO una proteína dimérica<sup>39</sup>. El análisis de los resultados abre la posibilidad de aislar intermediarios de renaturalización susceptibles de estudiarse;

e) surge la interrogante de si se podrá restituir en este sistema la actividad de una enzima que conste de más subunidades.





---

## ANTECEDENTES

---



---

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## BREVE REPASO ACERCA DE LA ESTRUCTURA PROTEICA

¿A qué nos referimos al hablar de estructura proteica? Cuando hablamos de desnaturalización damos por sentado que se ha alterado la estructura de la proteína. Sin embargo existen varios niveles estructurales proteicos. El alterar alguno de estos niveles no implica necesariamente una desnaturalización. Tampoco dicha alteración afecta necesariamente todos los niveles, como podremos ver al definirlos.

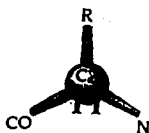
El primer nivel o estructura primaria de una proteína se refiere a la secuencia aminoacídica de ésta. Existiendo 20 aminoácidos diferentes que pueden formar péptidos que van desde tres restos aminoacídicos hasta varios cientos de ellos el número de combinaciones diferentes que pueden obtenerse es casi ilimitado. Los aminoácidos (Figura 1a) se unen entre sí por sus extremos carboxilo y amino



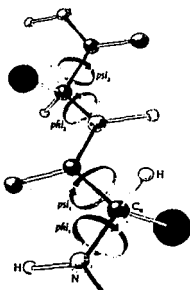
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



a)



b)



c)

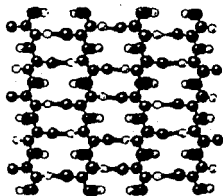
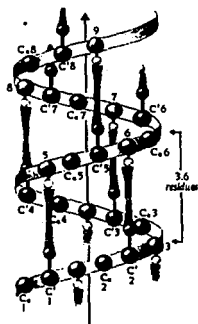


FIGURA 1. Representación de: (a) la estructura general de los aminoácidos; (b) el enlace peptídico, y; (c) las dos estructuras secundarias regulares ( $\alpha$ -hélice y lámina  $\beta$ , respectivamente).



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M<sub>4</sub>) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



terminal dando lugar a un enlace amídico, mejor conocido como enlace peptídico (Figura 1b). Este es rígido y no puede girar sobre sí mismo debido a la deslocalización electrónica que sufre. Las características polares que le proporciona le permiten dar origen a los niveles más altos de estructura. La rigidez del enlace peptídico sólo permite la posibilidad de giro sobre los enlaces  $\phi$  ( $\phi$ ) y  $\psi$  ( $\psi$ ). Ello, aunado al impedimento estérico y electrónico producido por los radicales de los aminoácidos, limita mucho incluso esta libertad de movimiento'. Como se puede ver también en esta parte de la figura, arbitrariamente se considera que cualquier cadena polipeptídica comienza por su extremo amino terminal y que su término es su grupo carboxilo libre.

El siguiente nivel es más complejo (estructura secundaria) debido a que implica el plegamiento de la secuencia lineal de aminoácidos sobre sí misma. La clave para lograr que la cadena se doble sobre sí misma la proporciona la polaridad del esqueleto peptídico, ya que cuenta con un grupo con una densidad electrónica positiva (amino,  $-NH-$ ) y uno con una negativa (carbonilo,  $-CO-$ ) que





pueden atraerse y neutralizarse entre sí. El acercamiento entre ellos se logra fácilmente por dos tipos de estructuras secundarias principales: el  $\alpha$ -hélice y la lámina beta (Figura 1c). En ellas interactúan principalmente estos dos grupos, aunque los radicales de los aminoácidos contribuyen e incluso determinan la estructura final.

La hélice  $\alpha$  se forma cuando la cadena gira sobre sí misma y el grupo carbonilo de un residuo es capaz de interactuar con el amino de un grupo que se encuentre más adelante (exactamente cuatro lugares en el caso de la hélice  $3_{10}$ , que es el tipo de hélice principal de las proteínas). Esto hace que los grupos siguientes tiendan también a interactuar entre sí y comience a formarse una especie de tubo o hélice, que casi siempre gira a la derecha (en el sentido de las manecillas del reloj) si se toma como referencia su inicio'. En caso de que el giro se produzca a la izquierda, el radical de cada aminoácido quedará demasiado cercano a su propio grupo carbonilo y se producirá repulsión electrónica entre ellos. Lo anterior da como resultado que las pocas hélices que giran a la







---

izquierda existentes sean extremadamente cortas y su presencia en las proteínas sea rara<sup>77</sup>.

En una lámina beta el caso es diferente, pues aquí el esqueleto peptídico tiende a formar una hoja plegada (que recuerda una lámina acanalada) debido a los ángulos existentes entre sus átomos. En esta forma interactúa con otra parte del esqueleto que secuencialmente puede estar muy alejada o cercana (figura 1c). Al igual que en la hélice aquí todos los grupos polares del esqueleto peptídico se neutralizan entre lámina y lámina excepto en sus extremos, lo que da como resultado una estructura interna apolar. Una cadena de la lámina beta puede ser paralela o antiparalela a la siguiente. Son paralelas cuando dos cadenas adyacentes comienzan del mismo lado de la lámina y antiparalelas cuando el extremo amino de una se encuentra adyacente al carboxilo de la siguiente. Las láminas tienden a tener cadenas que sean todas paralelas o todas antiparalelas entre sí. El resultado es que es bajo el porcentaje de láminas constituidas por cadenas mixtas<sup>7</sup>.

Lo que conecta a una estructura secundaria con otra

---



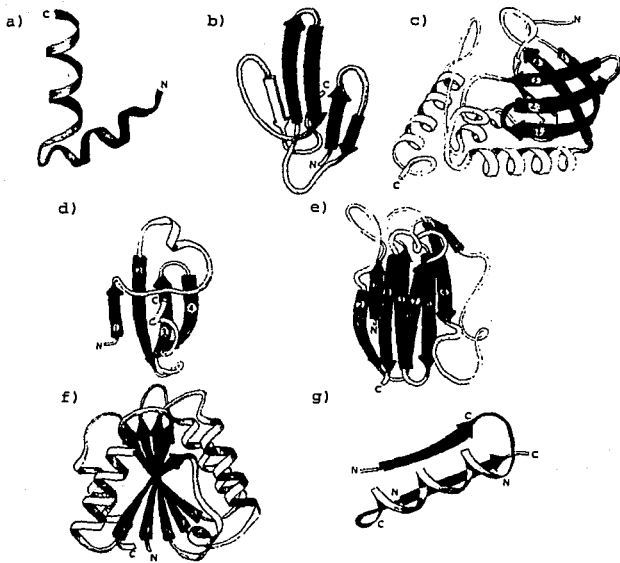


es llamado asa y puede ir desde dos aminoácidos (que serían los estrictamente necesarios para que la cadena de un giro de 180 grados e interaccione consigo misma) hasta más de 20. Lo más frecuente es que se formen asas de diez a doce residuos<sup>7,73,76</sup>. De hecho, se considera a las asas como estructuras secundarias no regulares aunque bien definidas, e incluso se ha propuesto otro tipo de estructura secundaria; el asa omega<sup>55</sup>. Este tipo de estructura recibe su nombre debido a su semejanza con la letra griega que la denomina.

Actualmente se sabe que a veces se asocian cierto número de estructuras secundarias para producir otra con una geometría específica y que puede presentarse en proteínas diferentes. A estas estructuras se les ha llamado supersecundarias o motivos, muchos de los cuáles tienen funciones específicas conocidas<sup>8,14,29</sup> (Figura 2).

A la asociación independiente de varios motivos para producir una estructura terciaria estable se le conoce como dominio. Dependiendo de su tamaño, una proteína puede constar de un solo dominio o de varios. El hecho de tener





**FIGURA 2.** Representación de algunos de los motivos proteicos más comunes: (a) hélice-asa-hélice; (b) horquilla; (c) greca; (d) hoja beta antiparalela; (e) estructura  $\alpha/\beta$  de giro abierto; (f) barril antiparalelo, y; (g) motivo  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ .





dos o más dominios no implica que todos ellos tengan la misma función, ya que es más frecuente que cada uno tenga una función diferente a los demás<sup>7</sup>. El término usado anteriormente (estructura terciaria) se refiere al arreglo tridimensional de la proteína independientemente de que ésta conste de uno o de varios dominios. En el primer caso, dominio y estructura terciaria podrían considerarse sinónimos.

Una clasificación reciente muy aceptada nos dice que existen tres grandes grupos de proteínas dependiendo del tipo de dominios que las conforman: dominios  $\alpha$ , dominios  $\beta$  y dominios  $\alpha/\beta$ . El nombre del dominio indica claramente el tipo de estructura secundaria que lo constituye y en el caso de los  $\alpha/\beta$  casi siempre se trata de motivos  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  agrupados unos al lado de otros. En estos grupos no se incluye a las proteínas que ligan metales, a las que tienen puentes disulfuro o las que están formadas por motivos  $\alpha$  y motivos  $\beta$  (estas últimas se consideran como pertenecientes a un cuarto grupo más pequeño: el de las proteínas  $\alpha+\beta$ )<sup>7,14</sup>.





---

Gran parte de las proteínas conocidas son oligoméricas, lo que quiere decir que se encuentran formadas por dos o más cadenas polipeptídicas separadas (subunidades). Este tipo de estructura se denomina como cuaternaria<sup>54</sup>.



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA HEMINA TETRAMERICA  
(LDH-M<sub>4</sub>) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## LA DESHIDROGENASA LACTICA

### FUNCION

La lactato deshidrogenasa (L-lactato:NAD<sup>+</sup> óxido-reductasa, E.C. 1.1.1.27) es una enzima globular y que, por lo tanto, es soluble en el citoplasma. Su función es catalizar la reducción de piruvato a lactato al tiempo que oxida el NADH a NAD<sup>+</sup> (éste funciona como coenzima)<sup>55</sup> (Figura 3).

En condiciones aerobias esta reacción no es requerida y procede en forma muy lenta. Ello es debido a que su función es regenerar el NAD<sup>+</sup> para permitir que la ruta glucolítica pueda seguir llevándose a cabo. En presencia de oxígeno lo que ocurre es que el NADH se oxida donando sus electrones a los diferentes acarreadores de la cadena respiratoria. Esto permite además sintetizar tres



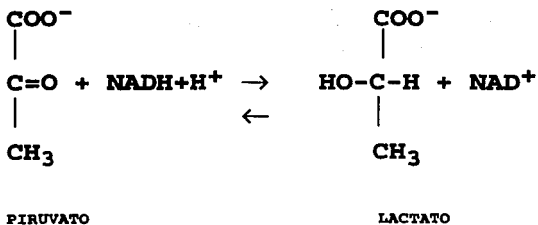


FIGURA 3. Reacción catalizada por la LDH. El piruvato es reducido a lactato gracias a que el NADH dona un par de electrones al tiempo que se oxida a  $\text{NAD}^+$





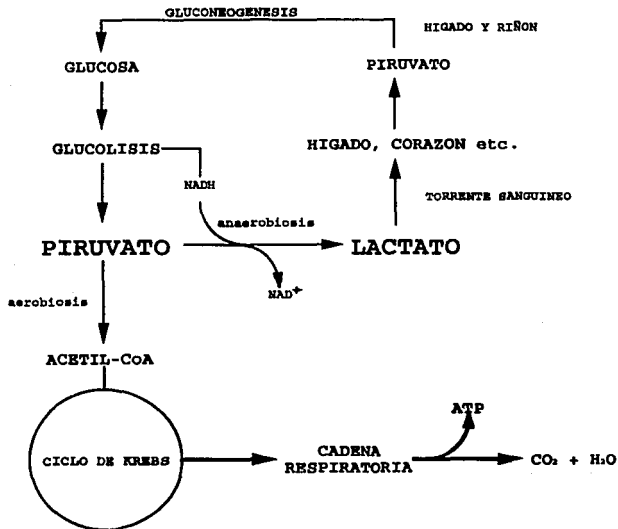
moléculas de ATP por una de NADH oxidado y formar una molécula de agua a partir de oxígeno molecular. Sin embargo, en ciertos tejidos (ej. músculo estriado) puede presentarse una demanda excesiva e inmediata de energía por parte del organismo (por ejemplo, al realizar un ejercicio intenso). En este caso, el flujo de la cadena respiratoria se satura dado que el oxígeno disponible no es suficiente. En consecuencia el  $\text{NAD}^+$  no puede ser regenerado a la velocidad necesaria; es entonces cuando la LDH actúa sobre el piruvato en exceso formando lactato y permitiendo disponer de  $\text{NAD}^+$  para una obtención rápida de energía (Figura 4).

Al lactato se le conoce como un punto muerto en el metabolismo porque no se le puede degradar y a partir de él no se puede sintetizar compuesto alguno. Es necesario exportarlo a otros tejidos para reoxidarlo a piruvato y entonces poder eliminarlo a través de las diferentes rutas a las que puede ingresar.

Respecto a la estructura del lactato, éste se encuentra en dos formas diasteroméricas que son reconocidas como tales por la proteína. En efecto, la







**FIGURA 4.** Intervención de la LDH en el metabolismo de carbohidratos. En condiciones anaerobias la reacción no es requerida y el piruvato es usado para sintetizar Acetil-CoA para ser usado en obtención de energía y síntesis de otras moléculas. En condiciones anaerobias la reacción de reducción se requiere para regenerar el  $NAD^+$  y obtener energía de la glucólisis.





enzima es específica para el L-lactato en casi todos los organismos en que se ha detectado. Sólo se encuentra especificidad para D-lactato en las enzimas de ciertos organismos inferiores. En ningún organismo, ya sea superior o inferior, se encuentran ambos tipos de enzimas<sup>66</sup>.

### **ESTRUCTURA**

En la década de los 50's ya había sido observado que existían diferentes especies celulares de la enzima y no fue sino hasta finales de la misma que se pudo saber que la proteína responsable de esta reacción era un tetrámero. En efecto, el trabajo de *Markert* describe que las diferentes combinaciones de dos cadenas polipeptídicas para formar una enzima cuaternaria es lo que origina el patrón electroforético de cinco bandas que ya había sido descrito<sup>66,72</sup>.

Ahora se sabe que existen dos genes homólogos, el M y el H, que codifican para las cadenas peptídicas que conforman las subunidades de la LDH, y que se expresan a





diferentes niveles dependiendo del tejido de que se trate. Las isoenzimas, producto de la combinación de estas dos cadenas, muestran ser, entre especies, consistentemente distintas entre sí en el número de recambio y la constante de Michaelis<sup>71</sup>. Esto resulta mucho más evidente entre los homotetrámeros M<sub>4</sub> y H<sub>4</sub><sup>28</sup>.

Por ejemplo, la velocidad máxima de catálisis del homotetrámero M de una especie tiende a ser mayor a la de el homotetrámero H de la misma especie (en el cerdo la actividad específica de cada enzima es de 753  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  y 305  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  respectivamente), pero su K<sub>m</sub> es mucho más alta (240±50  $\mu\text{M}$  contra 92±13  $\mu\text{M}$  respectivamente, también en cerdo)<sup>27,28</sup>. La enzima de cuatro subunidades H forma, *in vivo* e *in vitro*, un complejo ternario abortivo con el piruvato y el NADH cuando se encuentra en presencia de un exceso del primero. En cambio, la enzima M<sub>4</sub> no lo hace sino hasta alcanzar concentraciones de piruvato que rebasan el intervalo fisiológico (en sangre humana normal los niveles de piruvato son de 2-4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o 23-45  $\mu\text{M}$ )<sup>24</sup>.

---

En el músculo esquelético e hígado se expresa

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M<sub>4</sub>) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



preferentemente el gen M (muscle, músculo) sobre el H (heart, corazón). El resultado es que en estos tejidos predomina la isoenzima con cuatro subunidades M (LDH-M<sub>4</sub>) y las otras isoenzimas se encuentran en menor cantidad. En cambio, en tejido cardiaco predomina la expresión de H, y por tanto la isoforma que predomina en este tejido es la LDH-H<sub>4</sub>.

Las otras tres isoformas son heterotetrámeros de composición M<sub>3</sub>H<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>H<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>H<sub>3</sub>, y sus niveles también varían dependiendo del tejido en que se encuentren, aunque al igual que las otras dos, están presentes en casi todos los tejidos animales. La enzima, sin embargo, no es exclusiva de ellos, ya que se encuentra también en plantas y microorganismos (citado por Holbrook y cols., 1975).

La cadena H de la lactato deshidrogenasa porcina consta de 333 residuos, mientras que la cadena M es dos residuos más corta, pues ha sufrido deleciones en la posición 16 y 332. 250 residuos (el equivalente al 75%) son idénticos en ambas cadenas<sup>22</sup>. El peso molecular de cada protómero por separado es de 35,000Da, mientras que el del





tetrámero es de 144kDa<sup>32</sup> y tiene un coeficiente de sedimentación de 7.7S<sup>40</sup>. La secuencia polipeptídica de las cadenas H y M de la LDH de cerdo (Figura 5) ilustran el alto grado de homología que existe entre éstas. Esta homología no sólo se manifiesta como una coincidencia aminoacídica secuencial, sino que también lo hace en su estructura secundaria. Cada protómero consta de la misma cantidad de hélices  $\alpha$  (designadas como  $\alpha A, \alpha B \dots \alpha H$ ) y de cadenas  $\beta$  (designadas  $\beta A, \beta B \dots \beta H$ )<sup>44</sup>, arregladas de forma tal que tridimensionalmente se manifiestan como una típica proteína  $\alpha/\beta$ . Algo interesante respecto a los productos de los genes H y M es que un suero polivalente, dirigido por ejemplo hacia H, cruza antigénicamente con proteínas H de diferentes especies en vez de hacerlo con la M de la misma especie<sup>45</sup>. Tal vez la razón de este tipo de reconocimiento antigénico es que las regiones que presentan menor homología son el extremo carboxilo terminal y el brazo que cubre el sitio catalítico de la enzima. Debido a que ambas secuencias se encuentran expuestas en la superficie de la proteína serían lugares de fácil reconocimiento antigénico.



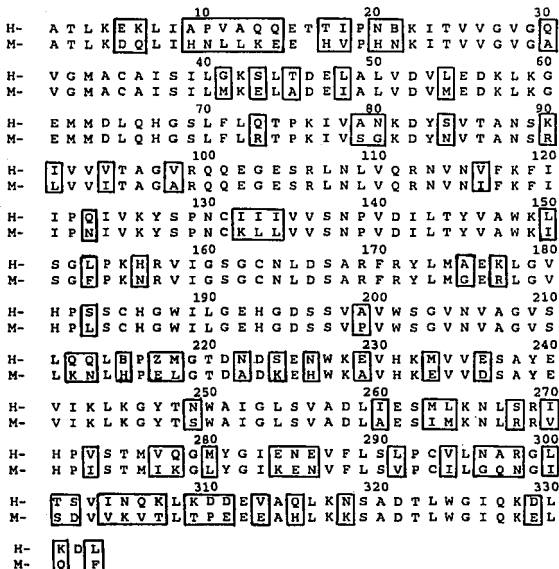


FIGURA 5. Secuencia aminoacídica de las dos cadenas de los genes mayores, H (corazón) y M (músculo) de la lactato deshidrogenasa porcina. Se muestran encuadrados los restos que difieren entre una cadena y la otra (Tomado de Kiltz y cols., 1977).





El que existan dos genes de la homología secuencial descrita es un indicio de que, en algún momento, a partir de un solo gen original de la LDH hubo una divergencia que dio origen a dos genes parálogos que siguen estando presentes en nuestros días. De hecho, se ha propuesto que las deshidrogenasas en general podrían descender de un gen ancestral común<sup>6</sup>. Otra cosa que debe llamar la atención es que (además de las diferencias ya mencionadas en sus propiedades catalíticas y antigénicas) su comportamiento ante la exposición a diversos agentes físicos y químicos es también muy diferente<sup>23,27</sup>.

Además de los dos genes mayores de la LDH, desde mediados de los años 60's se había descrito la existencia de una cadena X que se encuentra presente en mamíferos y cuya expresión es regulada hormonalmente. A principios de los 70's se describieron también otros dos locus de LDH: el E y el F, pero sólo se encuentran en un tipo de peces y, al igual que la cadena X, han carecido de interés práctico debido a su misma rareza<sup>6</sup>.





---

## ALGUNOS ESTUDIOS PREVIOS

Con el establecimiento de que la LDH específica para L-lactato es, en casi todos los organismos estudiados, una enzima tetramérica<sup>54, 61, 62</sup> surgió un gran interés en conocer el resto de sus características estructurales (se ha observado que las enzimas específicas para D-lactato tienen un peso molecular de la mitad del de los tetrameros, por lo que seguramente se trata de dímeros<sup>62</sup>). Paralelamente a los estudios realizados con respecto a sus propiedades antigénicas<sup>5, 9</sup> se hicieron experimentos que permitieran saber si los monómeros de la enzima se pueden disociar y asociar entre sí. Así, Markert y Chilson realizan experimentos de hibridación con la lactato deshidrogenasa de los tejidos de rumiantes<sup>61</sup> y de pollo<sup>61</sup>. Estos muestran que se pueden lograr condiciones en las cuáles, si se mezclan las isoformas M<sub>4</sub> y H<sub>4</sub> puras de la misma especie o de algunas especies diferentes, se producen las cinco isoformas de la enzima con una distribución muy cercana a la binomial. Esto es evidencia adicional que confirma la estructura cuaternaria de la enzima.







Posteriormente, *Salthe*<sup>43</sup> reprodujo los resultados de *Markert* y *Chilson*, pero ahora realizando las hibridaciones con enzimas procedentes de más especies animales. Los ensayos fueron realizados tanto *in vitro* como *in vivo*. De sus observaciones propuso que:

(a) Es muy posible que, en la célula, la asociación de los protómeros para formar la estructura cuaternaria nativa de la enzima sea un evento producido al azar, y;

(b) Las secuencias responsables de la asociación deben poseer características estructurales altamente conservadas entre los diferentes organismos vivos.

Solamente un año después *Markert* vuelve a observar lo anterior y además concluye que en el proceso de hibridación hay iones que pueden involucrarse y promoverla (sales de halógenos, tiocinato, nitratos y arsenatos) o evitarla (sulfato de amonio y algunos polioles)<sup>42</sup>. Muestra que no hay una clara correlación entre este fenómeno y el aumento en la resistencia a la inactivación por temperatura que se produce con algunas moléculas,





(específicamente con el sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). También demuestra y concluye, por primera vez, que la disociación y asociación de la enzima por efectos de dilución/concentración no es posible, ya que la inactivación producida es irreversible. Al mismo tiempo *Di Sabato* y *Kaplan*<sup>21</sup> ven la protección que ofrecen las sales, principalmente trianiónicas (citratos, fosfatos) y dianiónicas (succinatos, sulfatos) contra la desnaturalización por urea.

En 1969 *Adams*<sup>1</sup> obtiene una de las primeras estructuras del cristal de la LDH (la de la especie *Squalus acantis*) a una resolución de 4Å, pero todavía no se conoce su estructura secundaria. Cuatro años después su grupo apoya la idea de que debe de existir un orden obligatorio de unión de la coenzima seguida por el sustrato; además hacen un análisis de los grupos que intervienen en el sitio de unión a coenzima y a sustrato<sup>3</sup>. Por su parte *Ohlsson* compara los sitios de unión de coenzima de la lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, encontrando gran similitud en estos dominios y propone que las tres





---

enzimas son originadas por un solo gen ancestral<sup>66</sup>.

Rudolph y Jaenicke llevan a cabo una de las primeras renaturalizaciones donde se estudian y comparan las propiedades del producto de renaturalización<sup>70</sup>. Proponen que la LDH de cerdo no se desnaturalizó totalmente, sino que se monomerizó y el monómero es inactivo. Esto llevó a una serie de estudios del mismo grupo donde se desnaturaliza y renaturaliza a la LDH para determinar el efecto que tienen los desnaturalizantes sobre el rendimiento final. Además realizan un análisis de la cinética de reactivación<sup>79,80,81,84,85</sup>. En todos sus estudios consideran inactivos a los monómeros. Kabanov, utilizando un sistema micelar, reportó que los monómeros y dímeros son totalmente activos<sup>87</sup>.

En 1981 se describe que se pueden aislar dímeros estables controlando las condiciones de desnaturalización<sup>88</sup>. Años más tarde ya se maneja la idea de que la enzima es un "dímero de dímeros" y se propone que por proteólisis se puede disociar en sus dímeros componentes, los cuales son parcialmente activos en

---





---

condiciones donde se preservan la estructura<sup>99</sup>. En 1991 se usa la chaperonina GroEL para renaturalizar a la LDH de *B. stearothermophilus* y se propone que no sólo favorece el regreso al estado nativo de la proteína, sino que además el curso de reactivación permite identificar varios intermediarios de ésta<sup>1</sup>. Cabe destacar que, a pesar de que la LDH es una de las enzimas más estudiadas, hasta el momento no está claro si realmente se pueden tener dímeros o monómeros aislados de este tipo de proteínas ni si éstos son activos.





---

## DES NATURALIZACION

### GENERALIDADES

Conocemos como desnaturalización a la pérdida de la estructura superior o nativa de una proteína. Una estructura nativa está altamente organizada: en su interior todos los grupos interaccionan entre sí; en su exterior interaccionan también entre sí y con el disolvente (principalmente con este último). En el caso de las proteínas que involucren funciones de reconocimiento, la interacción con la molécula apropiada desencadena el movimiento dirigido de un grupo específico de restos aminoacídicos. Estos conllevan a una secuencia ordenada de movimientos de otros grupos que dan como resultado un ciclo catalítico, la transmisión de una señal, etc.

En cambio, muchas veces se habla de que una proteína desnaturalizada se encuentra totalmente desorganizada en

---





cuanto a su estructura porque no hay interacciones entre sus restos aminoacídicos. Como consecuencia, todos los enlaces entre los átomos que la conforman pueden girar al azar. Sin embargo, este punto de vista corresponde a la estructura de configuración aleatoria, que sólo se logra en presencia de concentraciones muy altas de compuestos que perturban en gran medida la estructura proteica.

Muchas de las veces se somete a la proteína a condiciones desnaturizantes y luego éstas son eliminadas para realizar los experimentos deseados. En estos casos, la estructura desnaturizada obtenida es muy compacta, ya que la proteína se vuelve a plegar cuando sus grupos son dejados en libertad de interactuar unos con otros. Lo importante es que no siempre vuelven a ordenarse en la forma original; es entonces cuando la proteína pierde en mayor o menor grado sus características estructurales.

Cuando se realizan determinaciones estructurales sin eliminar las condiciones desnaturizantes algunos datos parecen indicar que la proteína sólo existe en dos conformaciones (activa y desnaturizada)<sup>74,83</sup>. Esto





contrasta con el hecho de que en otras condiciones parecen existir varias conformaciones distintas<sup>46,49</sup>. Por ello se ha postulado que existen diferentes grados de desnaturalización. Estos van desde la configuración aleatoria mencionada, que sería el grado extremo de desnaturalización, hasta perturbaciones menores que sólo se detectan como pérdida, parcial o total, de la actividad de una enzima. Pero, ¿qué es lo que hace que los restos aminoacídicos de un polipéptido vuelvan a interactuar entre sí una vez que se han roto las uniones entre ellos? ¿por qué no se conforman con mezclarse con las moléculas del disolvente?. El efecto hidrófobo nos ofrece una buena respuesta: para que un grupo atómico de una proteína interactúe con el disolvente debe ser capaz de formar contactos de *Van der Waals* con las moléculas del agua. Esto no ocurre con la mayor parte de los restos aminoacídicos de una proteína porque los enlaces entre sus átomos son covalentes y no tienen cargas electrostáticas ni forman dipolos. El resultado es que los grupos de este tipo tienden a "enterrarse" en el interior de la proteína e interactúan unos con otros. En efecto, *Nozaki y Tanford*<sup>46,47</sup> mostraron que la solubilidad de los aminoácidos





en agua tiende a ser menor conforme sus radicales son más grandes y carecen de grupos capaces de ionizarse o de formar dipolos. Estas cualidades se reflejan en sus energías libres de transferencia al agua desde un disolvente orgánico.

También de aquí surgió el concepto de área de superficie accesible. Esta es el área de la superficie de una esfera de radio  $R$ , en cada punto de la cuál el centro de una molécula de disolvente puede entrar en contacto con el átomo sin penetrar ningún otro átomo de la molécula<sup>23</sup>. Entonces esta área en muchos casos es mucho menor a la de la superficie total de la macromolécula, pues siempre habrá grupos tan cercanos unos a otros que el disolvente no puede penetrar entre ellos. Expresándolo de otra forma, esa superficie no es accesible al agua. En el caso de los aminoácidos hidrófobos, su acercamiento, y como consecuencia la reducción de la superficie accesible, reducirá la energía libre del sistema y por lo tanto aumentará la estabilidad de la proteína.

Con base en los puntos mencionados, se ha llamado







efecto hidrófobo al aumento en la energía libre que ocurre cuando se transfiere un aminoácido o una molécula desde un disolvente orgánico al agua. Se ha propuesto que éste es la fuerza principal que dirige el plegado de las proteínas<sup>57</sup>. Además, cada vez existen más pruebas de que el contenido interno de aminoácidos hidrófobos tiene gran influencia en la estabilidad final de una proteína nativa: la carencia de uno de ellos o su substitución por otro de hidrofobicidad menor se refleja como pérdida de la estabilidad frente a condiciones adversas en el medio<sup>58</sup>.

Tomando en cuenta lo anterior, se puede entender fácilmente que la hidrofobicidad esté claramente relacionada con la carga electrostática, la capacidad de formar uniones de hidrógeno y el área de superficie de grupos aromáticos y alifáticos<sup>57</sup>. Es ella la que muchas veces conduce a una desnaturalización "irreversible", ya que al exponerse los grupos más hidrófobos y desaparecer las condiciones desnaturalizantes pueden asociarse unos con otros al azar y formar agregados con otras moléculas. Lo anterior los hace difíciles de separar, pues al dejarlos interaccionar de esta forma es fácil que



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

encuentren el camino a estados conformacionales con menor energía libre que el nativo.

Sin embargo, debemos reconocer que no sabemos con certeza qué es la hidrofobicidad. Sabemos que está relacionada a diversos factores y podemos predecir si una molécula cualquiera es o no hidrófoba, pero no podemos definir en qué consiste este efecto. De lo mencionado anteriormente parece desprenderse que la hidrofobicidad es una fuerza que promueve la asociación de moléculas apolares entre sí. Lo que realmente sucede es que las moléculas de agua son las que rechazan a aquellas moléculas no hidrofílicas y las obligan a juntarse unas con otras<sup>17</sup>. Diciéndolo de otra manera, las moléculas de los compuestos hidrófobos no tienden a juntarse por atracción entre sí, sino que son obligadas a hacerlo.

#### **TIPOS DE DESNATURALIZANTES**

A lo largo del tiempo se han usado diferentes agentes para lograr desnaturizar a las proteínas. Obviamente, al existir muchos tipos de proteínas, éstas presentan gran

---



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.**



cantidad de factores que afectan en mayor o menor grado su estabilidad frente a condiciones desnaturalizantes.

Los agentes más usados a través del tiempo son el calor, el pH, las altas concentraciones de sales y los compuestos caotrópicos, como son la guanidina y la urea. En años recientes se han logrado sistemas de renaturalización en frío haciendo uso de criodisolventes que, al parecer, ofrecen resultados más limpios y reproducibles<sup>38</sup>. Además de esto, se obtiene una mayor estabilidad de los intermediarios de desnaturalización-renaturalización y la posibilidad de incrementar el rendimiento de reactivación hasta el 100%. Esto es debido a que, al parecer, el péptido sólo se desdobra hasta alcanzar una conformación que le permite regenerar su estructura nativa con toda efectividad<sup>39,41,58</sup>.

#### **DESNATURALIZACION POR TEMPERATURA**

Las perturbaciones del estado nativo de una proteína por medio de la temperatura han sido una de las armas favoritas para el estudio de los aspectos termodinámicos y



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.**



cinéticos del plegamiento de las proteínas. Se ha determinado que la estabilidad del estado nativo es sólo ligeramente más grande a la del desnaturalizado (consultar la revisión de Privalov, 1979). Esto podría deberse a que, a temperaturas cercanas a 37°C, las fuerzas estabilizantes (interacciones hidrófobas principalmente) deben encontrarse en equilibrio con otras desestabilizantes (la entropía conformacional). Es entonces que el aumento de energía cinética provocado por el incremento de temperatura alcanza un punto en que se rompe dicho equilibrio y la proteína se desnaturaliza.

De las observaciones realizadas al llevar a cabo la desnaturalización térmica fue que surgió el concepto inicial de que el proceso de inactivación proteica ocurría en un solo paso. Las curvas obtenidas al llevarla a cabo mostraban un aumento progresivo de actividad de las enzimas conforme aumentaba la temperatura hasta alcanzar un máximo. Pasado este punto la actividad caía rápidamente con un gran parecido a una curva de fusión. Este tipo de comportamiento hablaba de un proceso altamente cooperativo en el que la desestabilización de una pequeña parte de la





---

estructura desencadena el desdoblamiento inmediato de la estructura remanente hasta el estado desnaturalizado<sup>54, 55</sup>.

De hecho, esta observación parece aplicarse a proteínas globulares pequeñas independientemente del proceso de desnaturalización sufrido<sup>74</sup> ya que en el proceso térmico ésta parece depender únicamente de la temperatura. En cualquier método usado se define perfectamente un pequeño intervalo de temperaturas desnaturalizantes. Este intervalo es precedido por una zona de temperatura donde aparentemente no hay cambios substanciales de la estructura proteica (zona predesnaturalizante) y seguido de otra zona de temperatura (postdesnaturalizante) donde tampoco se observan más cambios estructurales.

Sin embargo, aunque Privalov no lo trata con profundidad, también menciona que el caso es diferente para proteínas mayores, pues en ellas parece haber intermediarios de desnaturalización más estables<sup>74</sup>. En prótidos pequeños no se niega que existan intermediarios, pero sí se hace énfasis en que son extremadamente





inestables. Además su concentración nunca es significativa y por ello no es posible caracterizarlos. Más recientemente se ha aceptado que es posible alcanzar un estado inactivo cuya desnaturalización es reversible y que es diferente del estado inactivo final<sup>74, 75</sup>.

Es necesario aclarar que, cuando se habla de la desnaturalización térmica irreversible, nos referimos a que no se revierte simplemente disminuyendo nuevamente la temperatura del sistema o calentándolo de nuevo después del enfriamiento. Zale y Klibanov proponen que es muy posible que las observaciones realizadas por ellos sean una regla para la desnaturalización irreversible por calor. Afirman que la proteína sufre  $\beta$ -eliminación de cisteínas, desamidación de asparagina y glutamina, ruptura de algunos enlaces peptídicos e intercambio de puentes disulfuro<sup>76</sup>. Por su parte Wigley y cols. dicen que se puede aumentar la termoestabilidad de una enzima reduciendo el área hidrófoba que aquella expone al disolvente<sup>77</sup>. Independientemente de estas observaciones, algo que queda claro es que la desnaturalización térmica no es reversible y que el modelo  $N \rightarrow D$  propuesto para este tipo de





---

inactivación parece ser el más concordante con los datos a nuestra disposición.

### **DES NATURALIZACION POR pH**

Otra de las formas más usadas para observar la desnaturalización proteica es la variación del pH del medio en que se encuentra la enzima. Para la mayoría de las proteínas existe un pH óptimo de funcionamiento, por encima o por debajo del cual su actividad decrece. La razón de esta pérdida de actividad es que la carga neta de la proteína se vuelve mayor conforme se aumenta o disminuye el pH.

Recordemos que las proteínas globulares tienen gran cantidad de grupos ionizables en su superficie. Entonces, a pH cercanos a 7.0, la carga de los cationes estará cercana o será aproximadamente igual a la de los aniones. El resultado es una carga neta molecular pequeña. Si, por ejemplo, se comienza a reducir el pH del medio, los aniones (los grupos carboxilo,  $-\text{COO}^-$ ) comenzarán a protonarse, dando como consecuencia que la carga neta de

---





la proteína sea más positiva. Ello llevará a un aumento de la energía electrostática de la molécula conforme la repulsión de cargas aumenta. La proteína entonces reduce esta energía por medio de la desnaturalización, ya que al separar las cargas la repulsión entre ellas se reduce. Esto acaba traducándose en un volumen molecular mayor. Este estado de desnaturalización es conocido como estado A<sup>22</sup>. En el caso del aumento del pH el efecto sería el mismo independientemente de que la carga ganada sea de signo negativo.

El estado A se caracteriza porque la proteína conserva una gran cantidad de estructura secundaria, ha perdido su actividad y muestra fluctuaciones estructurales grandes pero lentas. Aunque se habla de desnaturalización por pH, se ha visto que existe una gran influencia sobre los resultados por parte de las sales empleadas en el sistema. Las concentraciones de éstas también influyen, así como la temperatura y la presencia de otros agentes desnaturalizantes. En general, no es raro que se combinen diversas formas de alteración de la estructura proteica (principalmente el pH y el cambio de temperatura) en un







estudio en particular.

### DES NATURALIZACION POR SALES Y AGENTES CAOTROPICOS

El efecto producido por algunas sales sobre la estabilidad de la estructura proteica es conocido desde hace más de 30 años, mientras que la desnaturalización por urea y guanidina es conocida todavía desde mucho antes. En 1964 *von Hippel* reunió los datos de varios autores al respecto y además realizó experimentos conductivos a establecer que tanto influencia cada ion a la estructura de la proteína. En principio, se dio cuenta que los datos de desestabilización o estabilización no sólo se aplicaban a las proteínas, sino incluso al DNA y al incremento o decremento de la solubilidad del ácido benzóico. Por otro lado, se dio cuenta que éste es debido a la suma de los efectos individuales de los iones integrantes de la sal usada. Así pudo corroborar que, mientras que en general los iones  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{NH}_4^+$  (y en menor grado  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ) tienden a estabilizar la conformación proteica, los iones  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  tienden a desestabilizarla. Incluso se ve una gran influencia del



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

anión acompañante en la efectividad de la desnaturalización inducida por la guanidina, cosa que no puede hacerse con la urea, pues ésta no es una sal<sup>14</sup>.

Posteriormente se hicieron estudios acerca de la efectividad real de la urea y la guanidina como desnaturalizantes. Estos consistieron en dar condiciones para que el experimento con urea fuese aproximadamente a la misma fuerza iónica que el realizado con  $\text{GndHCl}^{15}$ , o en realizar un tratamiento termodinámico que tomase en cuenta el efecto hidrófobo y la entropía conformacional<sup>3</sup>. Con esto se confirmó que, independientemente de la proteína estudiada, guanidina y urea la desnaturalizan hasta un estado final muy semejante. Sin embargo, la primera es más efectiva y ejerce su efecto a concentraciones menores.

A pesar de que desde 1973 se postuló que guanidina y urea desnaturalizan porque aumentan la solubilidad de los grupos hidrófobos de las proteínas<sup>17</sup>, los estudios de desnaturalización con estos agentes todavía no permiten explicar cómo es que se produce el efecto.





---

## EL SISTEMA DE BAJO CONTENIDO DE AGUA

### INTRODUCCION

El saber si una proteina puede realizar sus funciones encontrándose en una situación que limite el agua que entra en contacto con ella fue sólo una de las cuestiones que llevaron a tratar de desarrollar métodos de estudio que permitieran contestar esta pregunta. Tal vez la cuestión se enfoca más a saber cuánto es el mínimo de agua requerida para que una enzima pueda llevar a cabo catálisis. Ya se había tomado en cuenta que una proteina "soluble" en realidad es parte del sistema citoplásmico y que en el interior celular el agua se encuentra altamente compartamentalizada<sup>17</sup>. Por ello la difusión de compuestos o moléculas a través del citosol es mucho más lenta que en una disolución llevada a cabo *in vitro*<sup>17,44,46</sup>. Todo esto, junto con el deseo de tratar de mimetizar una membrana





---

celular y la posibilidad de aislar posibles intermediarios de desnaturalización proteica, fue lo que impulsó a diversos grupos hacia la creación de un sistema que permitiera de alguna manera obtener dicho mimetismo.

#### **TIPOS DE SISTEMAS DE BAJO CONTENIDO DE AGUA**

Algunas estrategias ya conocidas antes de surgir estas preguntas fueron la formación de monocapas lipídicas en las interfases agua/aire, agua/aceite o agua/cuerpo sólido<sup>24</sup>. Posteriormente, la formación de bicapas lipídicas o los liposomas ofrecieron la posibilidad de realizar microencapsulamientos de enzimas. Estos permitieron además que en ellos se estudiara el comportamiento de algunas enzimas solubles (referirse a Martinek y cols, 1986). Estas estrategias han sido de gran ayuda en membranología, pero en la enzimología clásica siempre ha existido una gran preferencia por llevar a cabo estudios en una fase o sistema homogéneo.

Es por ello que se ha tratado de desarrollar modelos que permitan controlar la cantidad de agua que entra en

---





contacto con la enzima y que ofrezcan ventajas sobre los anteriores. Idealmente se desea:

a) medición de la actividad enzimática por métodos convencionales;

b) estudio de la influencia de diversos agentes sobre la proteína en un medio homogéneo;

c) análisis, directamente en el sistema, de la estructura proteica y las alteraciones que pueda sufrir como consecuencia del punto anterior, y;

d) el estudio de la posibilidad de cambiar algunas de las características específicas de la enzima para su aplicación a nivel experimental y/o industrial.

Algunos de los modelos empleados para reducir el agua con la que entran en contacto las proteínas se basan en la inclusión de éstas en micelas invertidas. Otras estrategias surgidas son: a) suspender a las enzimas en disoluciones concentradas de sustratos<sup>72</sup>; b) adsorberlas en partículas de soporte sólidas<sup>77,78</sup> c) suspensión de enzimas inmovilizadas en disolventes orgánicos<sup>80</sup>, y; d) enzimas en polvo suspendidas en disolventes orgánicos<sup>81,82</sup>.





Aquí se debe aclarar que son pocos los sistemas que ofrecen todas las ventajas mencionadas como deseables y que pueden considerarse propiamente como homogéneos. Uno de ellos (y por lo que para nuestros propósitos es el método de elección) lo constituyen las micelas invertidas. Aunque se mencionará brevemente la técnica de suspensión de enzimas en polvo y en mezclas de agua con disolventes orgánicos. La razón de detenernos un poco en ellos es que hasta cierto punto alcanzan la homogeneidad, pero sufren de graves inconvenientes.

#### **ATRAPAMIENTO EN MICELAS INVERTIDAS.**

Se define como sustancias hidrófobas a aquellas que son solubles en disolventes no polares y que son muy poco solubles en agua. En 1973 *Tanford* postuló que las atracciones de los grupos no polares no son las principales causas que dan origen al efecto hidrófobo, sino que éste se debe en primera instancia a la gran fuerza atractiva que existe entre las moléculas del agua. El efecto se da por la imposibilidad de formar puentes de hidrógeno entre las moléculas del agua y las no polares<sup>19</sup>.

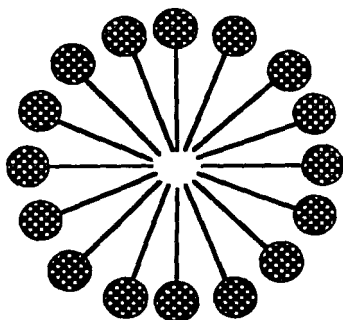




Para entender en qué consiste el modelo de micelas necesitamos primero entender qué las forma. Sus componentes esenciales son agua (componente altamente polar), un disolvente orgánico (componente apolar) y moléculas anfipáticas. Una molécula anfipática es aquella que consta de un extremo con un grupo polar (que puede ser o no ionizable) y de una cadena hidrófoba en su otro extremo. Si se coloca a una de estas moléculas en un medio acuoso (Figura 6), el grupo polar tenderá a disolverse en el agua por su hidrofiliidad, mientras que su cadena hidrófoba tratará de segregarse del agua juntándose con las colas de otras moléculas. Esto da origen a las comúnmente llamadas micelas<sup>87</sup>.

El mismo principio puede aplicarse si se trata ahora de introducir a una molécula anfipática a un disolvente orgánico, sólo que en este caso se producirá el efecto inverso: la cola hidrófoba tenderá a interactuar con el disolvente mientras que las cabezas hidrofílicas se segregarán de éste y se juntarán unas con otras. Sin embargo, la formación de las micelas dependerá del tipo de molécula anfipática de que se trate. Existen aquellas que





**MICELA COMUN**



**MOLECULA  
ANFIPATICA**

**FIGURA 6.** Representación de una micela común y como se constituye una molécula anfipática. La 'cabeza' polar puede estar o no carga, mientras que la 'cola' es completamente hidrófoba.



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.**





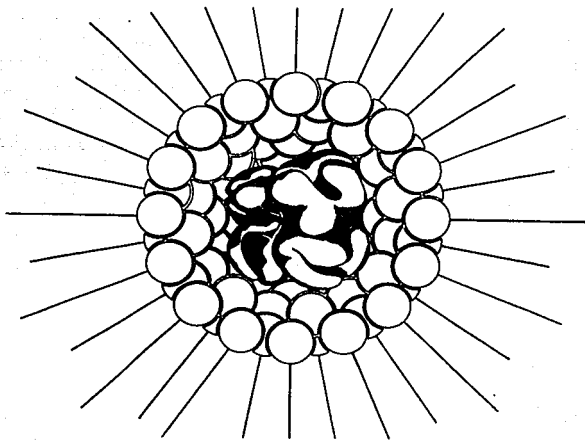
---

forman las micelas espontáneamente al ser introducidas en el disolvente, como el detergente AOT (sal de sodio del bis[2-etilhexil]sulfosuccinato), mientras que otras necesitan la presencia de una cantidad de agua muy definida para poder darles origen, como el detergente CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio). Tomando en cuenta lo anterior, se puede definir a un medio micelar invertido como un sistema multifásico que consiste de pequeñas gotas de agua estabilizadas por surfactantes en el seno de un disolvente orgánico inmiscible con el agua (Figura 7).

Observando con cuidado, nos daremos cuenta de que en el interior de una micela invertida existe una cantidad limitada de agua. Esta tiende a ser agua ligada precisamente por su poca cantidad con respecto a las cabezas del detergente, que en última instancia funciona como surfactante. Si ahora introducimos al sistema una molécula soluble en agua, aquella tenderá a particionarse a la fase acuosa. Igualmente, si se tratara de una molécula anfipática, tendería a quedarse en la interfase y una molécula apolar se particionaría preferencialmente al disolvente. La molécula puede ser grande o pequeña y en el

---





**FIGURA 7.** Representación de una micela invertida. La fase acuosa se encuentra en el interior micelar rodeada por las cabezas polares del surfactante. En el exterior de la micela se encuentra el disolvente orgánico, que es altamente apolar. Una proteína soluble se encontraría disuelta en la fase acuosa sin entrar en contacto con el disolvente.





---

caso de las proteínas solubles también se asume que se disuelven en la fase acuosa. Quedarían así protegidas de la interacción con el disolvente orgánico y conservando su estructura.

Comúnmente se usa el término  $w_0$  para indicar el contenido de agua del sistema. Este es simplemente la relación molar entre el agua y el surfactante, o sea, cuántas moléculas de agua hay por molécula de surfactante<sup>57</sup>.

Desde que se inició el uso de sistemas que forman micelas invertidas el más popular ha sido el compuesto por AOT/isooctano (al mencionar los componentes siempre se respetará el orden surfactante(s)/disolvente orgánico y se dará por hecho que el agua también participa). Actualmente existe una mayor variedad, como el CTAB/hexanol/octano, tritón/fosfolípidos/tolueno, etc. Inclusive se han usado algunos poco comunes, como el compuesto por octil- $\beta$ -D-glucósido/octanol, diseñado para caracterizar el efecto de una enzima que puede actuar sobre el surfactante (la  $\beta$ -D-glucosidasa) y como consecuencia, puede sacar al sistema

---





de fase<sup>12</sup>. Un sistema todavía más reciente, hace uso de un polímero, el CEPEI (poli[etileneimina] modificada por bromuro de cetilo y bromuro de etilo), para producir micelas más resistentes al intercambio de moléculas del surfactante. Como consecuencia, ofrece una separación de producto más limpia, ya que estas micelas tienen la particularidad de ser lo suficientemente rígidas como para ser retenidas por una membrana semipermeable<sup>11</sup>. En general cada sistema tiene un comportamiento característico. Este es debido a las propiedades de sus componentes: carga o polaridad del surfactante, hidrofobicidad del disolvente orgánico, fuerza iónica del medio, pH del agua en el sistema, etc. Por ello se debe determinar el diagrama de fases de cada nuevo sistema para saber en qué intervalos de concentración de sus componentes se podrá dar origen a las micelas, ya que coexisten diversas formas en equilibrio (lamelas, liposomas, monocapas, etc.)<sup>13</sup>. Aun cuando pueden existir todas estas estructuras, una característica propia de las micelas invertidas que la diferencia de las otras es su transparencia total a la luz incidente.





Haciendo uso de esta metodología se han llevado a cabo estudios tanto en enzimas solubles (por mencionar algunas: lisozima<sup>44</sup>, hidrogenasa<sup>45</sup>, lactato deshidrogenasa<sup>46,48</sup>, alcohol deshidrogenasa<sup>44</sup>,  $\gamma$ -glutamil transferasa<sup>46,47</sup> como en enzimas que muestran afinidad por el agua interfacial unida (mielina básica<sup>45</sup>) o en proteínas transmembranales (citocromo oxidasa<sup>24</sup>).

Los resultados obtenidos en los diversos sistemas y con diferentes proteínas han llevado a establecer un patrón de comportamiento que podría aplicarse a la mayoría de las enzimas estudiadas (Para una revisión consultar Gupta, 1992):

a) Una enzima atrapada en las micelas invertidas tiende a conservar su actividad y su estructura. Aunque la primera tiende a verse disminuida, depende de la proteína el que se conserve o incluso aumente;

b) tienden a aumentar su rigidez conformacional normal. Se acepta comúnmente que ésta se produce por la limitación de espacio que impone el interior de la micela;

c) la actividad con respecto al  $w_0$  presenta un máximo





---

cuando se promueve la formación de micelas de tamaño igual al de la proteína, y;

d) La resistencia de la proteína a la temperatura o diversos agentes químicos, en algunos casos aumenta con respecto a la observada en un medio 100% acuoso. La explicación propuesta es: i) la proteína se encuentra encerrada en un espacio limitado, por ello el desdoblamiento molecular necesitará más energía, y; ii) las modificaciones que reducen o eliminan la actividad (desamidación, hidrólisis peptídica y descomposición de cisteínas) encuentran dificultad para producirse, debido a que el agua necesaria para poder llevarlas a cabo se encuentra sumamente limitada.

Debido a las observaciones anteriores y, a la facilidad de preparación de este tipo de micelas, el uso de las mismas en el análisis del papel que juega el agua en el movimiento proteico se ha popularizado. El sistema también ofrece la posibilidad de aislar intermedios de desnaturalización-renaturalización (incluyendo separación de las subunidades de las proteínas oligoméricas como propone Kabanov<sup>46, 47, 48</sup>) y aplicar el sistema en forma





industrial<sup>39,51</sup>.

### **ENZINAS "SECAS" SUSPENDIDAS**

El tomar una enzima a la que se le ha reducido su hidratación al mínimo y colocarla en un sistema anhidro podría considerarse la más burda de las formas de limitar el agua con la que entra en contacto. La técnica consiste en suspender directamente la enzima liofilizada en un disolvente orgánico totalmente apolar y mantenerlo en agitación constante durante el tiempo de ensayo, pues la enzima es insoluble en éste.

Debe tomarse en cuenta que los substratos de la enzima deben ser perfectamente miscibles con el disolvente. Este requisito limita mucho el número de enzimas que se pueden ensayar en este sistema. Además, las concentraciones de substratos necesarias para llevar a cabo la catálisis enzimática son extremadamente altas<sup>52</sup>.



**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDM-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.**



---

## MEZCLAS DE AGUA Y DISOLVENTES ORGANICOS

También se han descrito modelos en los que se hace uso de enzimas en mezclas de agua y disolventes orgánicos miscibles en ésta. Este tipo de mezclas son poco prácticas cuando se utilizan substratos altamente insolubles en agua. La actividad enzimática observada en estos medios usualmente se pierde en mayor o menor grado. Además, en algunos casos, la especificidad para el substrato desaparece cuando el porcentaje de disolvente orgánico excede del 10%<sup>43</sup>.

Tal vez este tipo de sistemas resulte más útil en el caso de las enzimas de organismos termorresistentes, ya que se observa un efecto inverso al producido en las enzimas procedentes de organismos que viven a temperaturas menos extremosas. En efecto, no resulta raro que los disolventes orgánicos aumenten la actividad enzimática y hagan decrecer su resistencia a condiciones desnaturalizantes. Una explicación ofrecida es que la rigidez natural de este tipo de proteínas es lo que las estabiliza en condiciones adversas. Por tanto, al







---

colocarlas en un sistema donde puedan ser más solubles, perderán dicha rigidez y con ella su resistencia a la desnaturalización<sup>18</sup>.



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M<sub>4</sub>) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

---

## OBJETIVOS

---

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-N4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## OBJETIVOS

Tomando como base la renaturalización exitosa de la triosafosfato isomerasa (TPI) en un sistema de micelas invertidas, la pregunta que surge es: ¿podrá renaturalizarse en un medio de bajo contenido de agua a una enzima globular que conste de más subunidades que la TPI? Para tratar de responder a ella, el objetivo general que se planteó es el siguiente:

- Determinar si también se puede renaturalizar la LDH-M<sub>4</sub> de cerdo en un sistema de este tipo haciendo uso de la metodología empleada para la TPI.

Los objetivos específicos que son necesarios para poder llevar a cabo esta investigación son los siguientes:

- a. Determinar el efecto que tiene el desnaturalizante





---

elegido sobre la actividad de la LDH-M<sub>4</sub> en un sistema 100% acuoso;

b. Establecer el patrón de comportamiento que sigue ésta al ser transferida a un sistema de bajo contenido de agua tanto en presencia como en ausencia de agente desnaturizante (microcloruro de guanidinio). En caso de que los métodos de renaturalización empleados para la TPI no resulten exitosos, implementar una técnica que nos ofrezca un perfil, tan confiable como sea posible, del comportamiento de la LDH-M<sub>4</sub> en el sistema elegido, y;

c. Establecer un método de recuperación de la enzima desde el sistema micelar a un medio acuoso y tratar de estandarizarlo para saber si el efecto del agente desnaturizante en las micelas es irreversible.





---

## MATERIALES Y METODOS

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



## MATERIALES Y METODOS

### Medición de proteína:

Calcular la concentración de proteína en una muestra de la disolución madre por medio de su absorbencia a 280nm con ayuda de la fórmula:

$$P = \frac{A_{280,LDH} - A_{280,bco}}{A_{280}}$$

donde  $A_{280,LDH}$  es la absorbencia (a 280nm) de una celda con la enzima suspendida en amortiguador de fosfatos,  $A_{280,bco}$  se refiere a la absorbencia a esa longitud de onda de una celda que contiene solamente amortiguador y  $A_{280}$  es el coeficiente de extinción de la LDH-M<sub>4</sub> a 280nm (su valor es  $1,400\text{cm}^2\text{g}^{-1}$ )<sup>44</sup>. No se hace corrección por volumen dado que la medición se hizo en una celda de 1ml. Para concentraciones menores de enzima la determinación se realizará con ayuda del método de Lowry (Apéndice C).





---

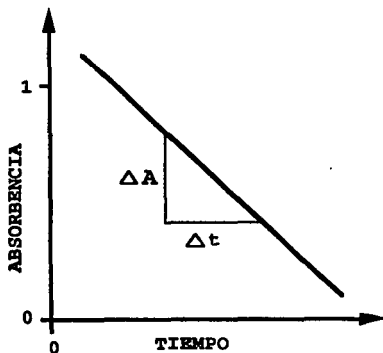
**Actividad de la LDH en medio acuoso:**

Se diluye la proteína hasta una concentración aproximada de 10 µg/ml o, si se toma el peso molecular del monómero como 35,000 Da, 290 nM. Se mide el decremento de absorbencia a 340 nm con respecto al tiempo (Figura 8) producido con aproximadamente 100 ng (10 µl) de enzima en una celda de 1 ml de capacidad con un paso óptico de 1 cm que contiene 1 ml de amortiguador de fosfatos (Apéndice B), piruvato 2 mM y NADH 200 nmol. Se registra el ΔA/min, que es la diferencia en absorbencia por minuto transcurrido hasta antes de que el decremento de la misma pierda su linealidad con respecto al tiempo (Apéndice A). Se calcula la actividad específica de la enzima con ayuda de la fórmula:

$$\text{Act. Esp.} = \frac{\Delta A/\text{min}}{6.22 * \text{mg proteína}}$$

donde 6.22 es el coeficiente de extinción del NADH ( $A_{340, \text{NADH}}$ ) ( $1 \text{ cm}^2 \mu\text{Mol}^{-1}$ ). Por tanto, la actividad específica se reporta en µMol/mg/min.





**FIGURA 8.** Determinación de la actividad de la LDH-M<sub>4</sub>. La absorbancia de 200 nmol de NADH debe ser igual a 1 a 340 nm. La reacción es iniciada por adición de la enzima a un volumen de 1 ml de amortiguador de fosfatos 100 mM, piruvato 2 mM y la cantidad mencionada de NADH pH 7.6. Se agita inmediatamente y se mide el decremento de absorbancia, que es lineal hasta antes de alcanza aproximadamente 0.5 de absorbancia.







---

#### **Marcaje de la enzima con $^{125}\text{I}$ :**

En nuestras condiciones el marcaje debe hacerse con al menos unos 100  $\mu\text{g}$  de proteína para obtener un buen resultado. Además, es necesario eliminar el DTT del amortiguador usual de fosfatos, pues aquél interferiría en la reacción de  $^{125}\text{I}$ iodinación. El procedimiento seguido fue el sugerido por la *Pierce Chemical Company* en su boletín técnico de bioproductos para investigación.

#### **Actividad de la LDH en micelas invertidas:**

Diluir el amortiguador de fosfatos común (apéndice B) hasta una concentración de 40 mM. Añadir el porcentaje deseado (v/v) con respecto a la mezcla CTAB/hexanol/octano (Apéndice D) junto con la cantidad necesaria de piruvato para obtener una concentración final 10 mM en la fase acuosa y 200 nmol de NADH. Mezclar hasta obtener un sistema transparente (la transparencia total debe alcanzarse en unos cuantos segundos a temperatura ambiente). La actividad se mide en 1ml de esta mezcla con 300-500ng de proteína dializada (Apéndice E) y se realizan los mismos cálculos que en el sistema acuoso. Cuando se realicen mediciones en presencia de desnaturizante





---

calcular su concentración en base al volumen acuoso final en la mezcla y no en base al volumen total de ésta.

**Recuperación a medio acuoso:**

Colocar el volumen deseado del sistema CHO que contiene a la enzima sobre el amortiguador de fosfatos (siempre se debe conservar la relación 1:20 en v/v) en un tubo de centrífuga de 5 ml. Centrifugar a diferentes velocidades y tiempos, siempre entre 18 y 24°C. Al término de la centrifugación retirar cuidadosamente los tubos del rotor y coleccionar la fase orgánica con ayuda de una pipeta automática o de una bomba de vacío evitando así mezclarla con la fase acuosa. Calcular la cantidad teórica de proteína que debe haber en esta última y medir la actividad que presenta. En base a la actividad detectada asumir la cantidad de enzima recuperada. Con los datos obtenidos variar diferentes condiciones del procedimiento hasta determinar las condiciones óptimas de recuperación de la proteína.

**Lavado del CTAB de la enzima recuperada:**

En nuestro caso existen dos posibles métodos de

---



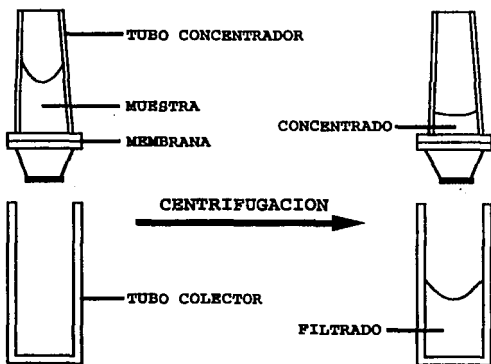
ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



lavado del detergente contaminante que se particiona al agua junto con la enzima durante la centrifugación. El primero consiste en colocar la fase acuosa en un tubo concentrador Centricón-10 (éste sólo retiene compuestos con peso molecular superior a 10 kDa) (Figura 9). Se centrifuga por debajo de 3,500 rpm en una centrífuga clínica hasta reducir el contenido del tubo al mínimo y se vuelve a llenar con amortiguador fresco. Se repiten los lavados 3-4 veces para lograr la mayor eliminación posible del detergente.

El segundo método hace uso de la alta solubilidad del detergente en alcohol isoamílico. Consiste en colocar cinco volúmenes de alcohol isoamílico por cada volumen de medio acuoso en un tubo de ensayo y agitar vigorosamente durante 5-10 min para lograr la partición del CTAB desde el agua al alcohol. Se dejan separar las fases, se retira el alcohol y se recupera el amortiguador con la enzima prácticamente libre de detergente.





**FIGURA 9.** Método de empleo del tubo concentrador Centricón-10. La muestra (máximo 2 ml) se coloca en el tubo concentrador y se centrifuga en centrífuga clínica hasta alcanzar la reducción deseada del volumen. El concentrado se recupera con ayuda de una pipeta automática teniendo cuidado de no tocar la membrana o por inversión sobre un vial de plástico.





---

## RESULTADOS Y DISCUSION

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



## RESULTADOS Y DISCUSION

### A) EFECTO DEL HIDROCLORURO DE GUANIDINIO EN UN SISTEMA 100% ACUOSO

El primer paso fue conocer el comportamiento de la deshidrogenasa láctica de músculo de cerdo (LDH-M<sub>1</sub>) en el agua en nuestras condiciones experimentales. Los experimentos se enfocaron a evaluar el efecto del hidrocloreuro de guanidinio (GndHCl) únicamente sobre la actividad de la enzima. La finalidad de obtener resultados confiables en una fase acuosa obedece a la necesidad de establecer un patrón de comparación para el sistema de bajo contenido de agua. Estos datos son imprescindibles porque en los diferentes reportes que evalúan el efecto de la guanidina no hay un consenso claro sobre la concentración en que la guanidina comienza a afectar a la enzima<sup>27,31,68,95</sup>. Además, se ha descrito que el GndHCl puede llegar a activar a la LDH a bajas concentraciones<sup>27,31</sup>.





aunque Ma y Tsou (1991) no han observado esto en grado alguno.

Hasta después de realizado lo anterior se pudo intentar repetir los experimentos realizados con la triosafosfato isomerasa (TPI) en el sistema de micelas invertidas, pero utilizando a la LDH<sup>33</sup>.

Como se ha mencionado, en muchos de los experimentos llevados a cabo en condiciones desnaturizantes éstas se eliminan antes de hacer las mediciones deseadas. Sin embargo, en nuestro caso es necesario tomar en cuenta que en el sistema de micelas invertidas, debido a su bajo volumen acuoso, es difícil llevar a cabo una dilución importante.

Para ello existen dos opciones. La primera es diluir la LDH incubada en GndHCl antes de introducirla a las micelas. Esto no es posible porque entre dicha dilución y la inyección de la enzima a las micelas transcurre tiempo suficiente para que se produzca agregación proteica. Otro inconveniente es que no sólo se reduciría la concentración





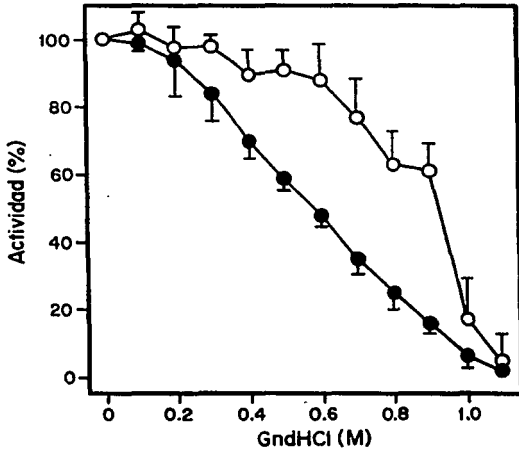
---

del desnaturalizante, sino también la de la enzima. Esto haría que las lecturas de actividad sean poco confiables, pues además se ha observado que la actividad de la LDH disminuye alrededor de un 80% cuando se transfiere al sistema. Por tanto, la enzima debe incubarse concentrada en GndHCl (Sol.A) para llevar a cabo la dilución en las micelas (Sol.A + medio con micelas).

Los resultados de actividad de LDH en medio 100% acuoso y bajas concentraciones de guanidina se muestran en la Figura 10. En los dos casos la enzima se incubó en presencia de la concentración indicada de GndHCl. En uno de ellos se midió la catálisis diluyendo el desnaturalizante a concentraciones que teóricamente no deben afectarla ( $<2$  mM). En el otro se evaluó la actividad conservando a la proteína en la misma concentración de guanidina en la que se incubó. Cuando se mide la actividad diluyendo la guanidina se observa claramente que la inactivación se vuelve aparente hasta alcanzar una concentración de 0.6 M de guanidina. Pasado este punto la inactivación es sumamente rápida y total en la enzima que estuvo en presencia de una concentración 1.1 M del







**FIGURA 10.** Efecto del hidrocloreuro de guanidinio (GndHCl) sobre la actividad de la deshidrogenasa láctica. La actividad de la enzima se midió sin diluir (círculos oscuros) y diluyendo el desnaturalizante (círculos claros) por decremento de la absorbencia a 340 nm de NADH 200 nmol con 25 a 50 ng de proteína en presencia de piruvato 2 mM en un medio acuoso con amortiguador de fosfatos 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM a 24°C y pH 7.6.





desnaturalizante.

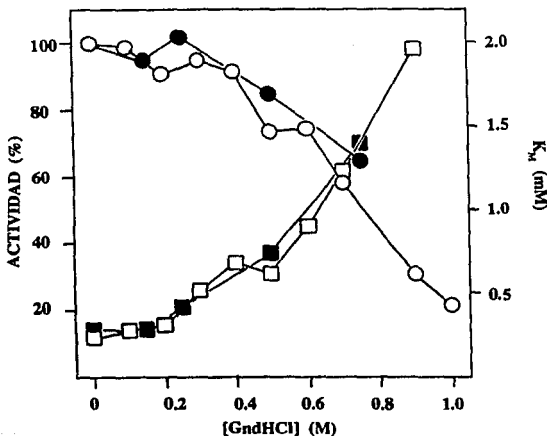
Cuando se evalúa la actividad sin diluir el GndHCl desde las concentraciones más bajas se puede apreciar una clara disminución de ésta. A diferencia de la otra curva (círculos oscuros), la pérdida es gradual y sólo se vuelve total al alcanzar una concentración 1 M de guanidina. Es claro que, en el intervalo de 0.3 a 0.9 M de desnaturalizante, hay diferencia en la actividad de la proteína. En primera instancia ésta podría ser tomada como renaturalización. Sin embargo, Fernández-Velazco reporta que aun a pequeñas concentraciones de guanidina se observa disminución de la  $V_{max}$  de las deshidrogenasas lácticas homólogas de cerdo, así como el aumento gradual de sus  $K_m$  para piruvato<sup>27</sup>. Sugiere que la guanidina, a bajas concentraciones, produce inhibición competitiva. Tomando en cuenta que las mediciones de actividad se hicieron con piruvato 2 mM, la reducción de actividad en presencia de guanidina (comparadas con la presentada cuando se diluye ésta), podría deberse a que el substrato ha dejado de ser saturante. Por tanto, la velocidad de catálisis puede estar lejana de ser máxima.





Para determinar si ésta era la causa del efecto se repitió el experimento en presencia de  $\text{GndHCl}$ , sólo que en esta ocasión se midió la actividad en cada punto con diferentes concentraciones de piruvato. La finalidad de este experimento fue calcular, para cada concentración de guanidina, la  $K_M$  y la  $V_{max}$  por medio del análisis de las dobles recíprocas de *Lineweaver-Burk*. Los datos obtenidos se muestran en la Figura 11. En ésta se graficaron además, con fines comparativos, los datos reportados por Fernández-Velazco<sup>37</sup> para las concentraciones de guanidina evaluadas por él. Se puede apreciar claramente que, junto con la disminución de la  $V_{max}$ , va apareciendo un incremento gradual de la  $K_M$  para piruvato. Estos datos tienen una buena correlación con los reportados. Además, por comparación con la gráfica obtenida en ausencia de  $\text{GndHCl}$  (Figura 10) se puede ver que ambas curvas de actividad se superponen. Esto sugiere que el efecto provocado por el desnaturalizante es del tipo inhibitorio, específicamente competitivo si se analizan las primeras concentraciones. Esto elimina la posibilidad de que hubiese ocurrido renaturalización por simple dilución del desnaturalizante.





**FIGURA 11.** Cálculo de la  $K_m$  y la  $V_{máx}$  de la LDH-M<sub>4</sub> para piruvato en presencia de GndHCl. Los cálculos de las variables  $K_m$  y  $V_{máx}$  se hicieron por medio del análisis de las gráficas de Lineweaver-Burk (no mostradas) para cada concentración de desnaturalizante (símbolos vacíos) con 30ng de enzima. Para fines de comparación con los datos reportados por Fernández-Velazco y cols también se incluyen en la gráfica<sup>27</sup> (símbolos llenos). Las condiciones de catálisis son las mismas que las reportadas en la figura 2.

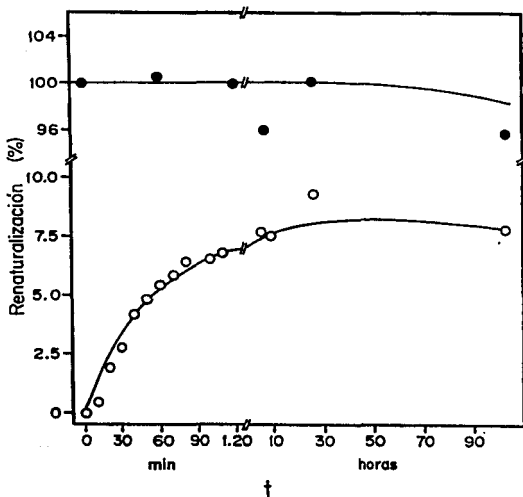




En el intervalo de concentraciones de 1.2 a 5 M no se midió el efecto producido por el desnaturalizante, pues la inactivación a esas concentraciones es total. Por ello, el siguiente paso fue llevar a cabo la reproducción de la renaturalización en medio acuoso realizada por el grupo de Zettlmeissl y cols<sup>29,30</sup>. El método consiste en incubar a la LDH en presencia de GndHCl 6 M y posteriormente diluir a la enzima a concentraciones inferiores a 100 ng/ml (A concentraciones mayores a ésta existe una fuerte competencia de la agregación, que resulta en un abatimiento drástico del rendimiento de reactivación). Las condiciones de reactivación son a 24°C en amortiguador de fosfatos 100 mM, EDTA 1 mM, DTT 10 mM pH 7.4. El grado máximo de renaturalización con esta técnica es de 25±5% de la proteína original y ocurre en forma gradual.

Un inconveniente para nuestro modelo fue que la enzima se diluyó sólo hasta 1.5 µg/ml debido a la dificultad de seguir su actividad a concentraciones menores. En la Figura 12 se muestra un experimento representativo. Se observa que a las 2 h se alcanza más del 90% de la reactivación final que, en nuestras





**FIGURA 12.** Renaturalización de la LDH-M4 de cerdo en medio acuoso. La proteína se incubó durante una hora a 24°C en presencia de las concentraciones indicadas de GndHCl y una concentración de enzima de 300 µg/ml. Terminado el tiempo de incubación se diluyó 1:200 en amortiguador de fosfatos y se registró la recuperación de la actividad (círculos vacíos) con respecto al tiempo en las mismas condiciones que en la figura 2. Junto con ella se midió la actividad de una enzima control que nunca estuvo en contacto con el GndHCl (círculos oscuros).





condiciones, es de  $9 \pm 2\%$  con respecto al control. Además de la desnaturalización con GndHCl 6 M a pH 7.6 se llevó a cabo desnaturalización con GndHCl 6 M a pH 2.3 y con glicina 1 M tanto a pH 7.6 como a pH 2.3. El objetivo fue comprobar si estas condiciones, que fueron reportadas por los mismos autores, mejoraban el rendimiento de reactivación. Los resultados (no mostrados) no fueron satisfactorios, pues las reactivaciones logradas fueron menores al 5% y se decidió abandonar esta estrategia.

La no obtención del mismo grado de reactivación reportado por Zettlmeissl y Rudolph<sup>22,24,25</sup> se debe en parte a que no se diluyó la enzima a la concentración reportada como óptima. La razón de no realizarla fue debido a que los  $\Delta A$  obtenidos al medir la actividad enzimática hubieran resultado poco confiables. Además una parte de la técnica incluye un aislamiento de los agregados por centrifugación y éstos son los que se reactivan. Este paso no fue seguido en nuestro caso. Otro factor que debe haber afectado el rendimiento es el hecho de que es necesario usar DTT (ditioeritritol) 1mM para evitar modificación química; en los experimentos llevados a cabo el amortiguador de



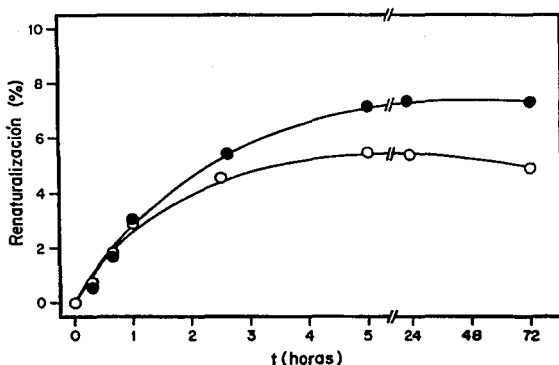


fosfatos contenía esa concentración de DTT al ser preparado, pero no se dio importancia a que éste es sumamente volátil y por tanto no se preparó inmediatamente antes de los experimentos, sino que se utilizó un amortiguador refrigerado por varios días. Esto puede haber reducido la concentración de este reactivo a un nivel suficiente como para no producir el efecto deseado.

Otra variante realizada fue el llevar a cabo la renaturalización en presencia de un amortiguador de fosfatos 200 mM. Como ya se dijo, las sales de fosfato son estabilizadoras de la estructura proteica. En la Figura 13 se puede apreciar que, aunque el rendimiento de reactivación fue superior al obtenido en el amortiguador 100 mM, la diferencia no es muy significativa. A pesar de ello, los rendimientos finales de reactivación en uno u otro amortiguador son bastante consistentes entre sí y no se consideró necesario para nuestros fines seguir investigando condiciones que los mejoraran debido a que esto no forma parte de nuestro objetivo.







**FIGURA 13.** Renaturalización de la LDH-M4 de cerdo en medio acuoso. El experimento se realizó en las mismas condiciones que en la Fig. 4. La renaturalización se llevó a cabo en amortiguador de fosfatos 100 mM (círculos claros) y en amortiguador de fosfatos 200 mM (círculos oscuros), ambos con EDTA 1 mM y DTT 1 mM.





---

**b. PATRON DE COMPORTAMIENTO DE LA LDH EN UN SISTEMA DE  
BAJO CONTENIDO DE AGUA.**

Habiendo establecido el patrón de comportamiento de la LDH de músculo de cerdo frente a un desnaturalizante, se decidió realizar los experimentos en las micelas invertidas. El hecho de escoger la desnaturalización llevada a cabo por la guanidina es que se ha reportado que ésta, a una concentración de 6 M, hace que la estructura de la enzima sea prácticamente la de una cadena al azar<sup>29</sup>. El otro agente que tiene un efecto similar al de la guanidina (la urea) no se usó debido a que se necesitan concentraciones más altas de ella (dos o más unidades de concentración mayoresa con respecto a la guanidina) para obtener la misma proporción de desnaturalización<sup>3,33</sup> y al llevar a cabo la dilución del agente en las micelas no se alcanzaría una concentración tan baja como con el GndHCl. La desnaturalización producida por calor, pH o altas concentraciones de otras sales no es factible en este sistema debido a que lo que se deseaba era desnaturalizar totalmente a la enzima y luego, partiendo de los péptidos





resultantes, renaturalizarla. Esto no es posible con los agentes mencionados, pues los agregados producidos por ellos no se separan a menos que se usen las concentraciones descritas de urea o guanidina, y no es factible pensar que las proteínas agregadas puedan separarse por simple introducción en las micelas.

La actividad de la LDH-M<sub>1</sub> en las micelas disminuye grandemente a medida que la concentración final de agua en el medio disminuye<sup>27</sup>. Debido a esto se decidió el uso de micelas con 6% de volumen final de agua en el sistema cetiltrimetilamonio/hexanol/octano (CHO), ya que a esta concentración se obtiene el máximo de actividad. Por encima del 6% de agua muchas veces es difícil y tardado que se aclare el sistema, además de que tiende a romperse con facilidad, ya que está cerca del límite máximo de concentración de agua del sistema.

En ausencia de desnaturalizante y a 24°C la actividad de la LDH-M<sub>4</sub> en micelas con un 6% de agua (v/v) es sólo un 23.7±3.3% (125.61 µmol/mg/min de la observada en 100% de agua (530 µmol/mg/min). Tomando en cuenta el modelo de la





TPI<sup>32</sup> se procedió a introducir la enzima incubada en diferentes concentraciones de GndHCl al sistema micelar sin GndHCl. La dilución del desnaturizante da una concentración final en la fase acuosa mayor a 60 mM. Si se observa la curva de efecto de la guanidina en medio con 100% de agua la actividad no debería verse afectada a esta concentración. En la Tabla 1 pueden observarse los resultados de la actividad medidos inmediatamente después de la transferencia.

Conforme a lo esperado, en las micelas no existe actividad registrable en el intervalo de 1 a 5 M de guanidina. En la enzima que entró en contacto con 6 M de GndHCl nunca se observó recuperación alguna de la actividad. La variación de la cantidad de proteína añadida al medio no influyó en los resultados, pues no se ve aumento de actividad con el paso del tiempo en las micelas con mucha o poca proteína (la concentración de proteína pudo haber sido crítica, pues si los monómeros se plegaran pero presentaran poca afinidad unos por otros, el aumento de su concentración en el medio debería haberse traducido forzosamente en su unión). Lo que es de llamar la atención





GndHCl (M)	Act. Inicial	Act. 48h
0.0	119	109
0.5	1.8	5.0
1.0	3.6	6.0
1.5	0.0	0.0
6.0	0.0	0.0

Tabla 1. Actividad de la LDH en micelas invertidas. La enzima fue transferida a micelas invertidas con 6% de agua. El medio acuoso contiene amortiguador de fosfatos 40 mM, piruvato 10 mM y NADH 200 nmol. La incubación de la enzima en agua fue durante 1 h a 24°C a las concentraciones indicadas de GndHCl. Las condiciones de incubación en las micelas son las mismas que en 100% de agua. La actividad inicial en agua fue 568  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . La actividad en micelas se reporta en las mismas unidades.



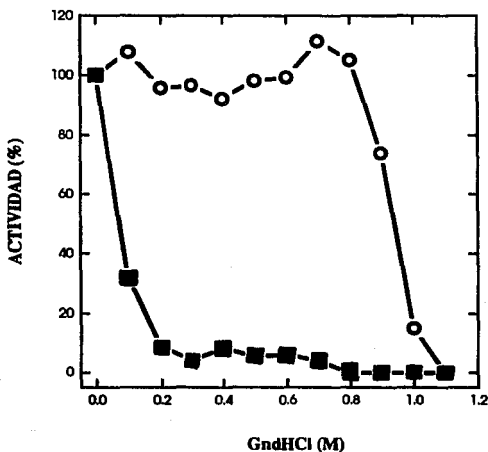


es el abatimiento casi total de la catálisis realizada por la enzima que estuvo en presencia de 0.5 M de GndHCl y que no era de esperarse, pues en medio 100% acuoso el efecto de esa concentración de guanidina es mínimo (se conserva el 91% de la actividad original) (comparar los datos de la Tabla 1 con los de la Figura 10).

En vista de estos resultados, se decidió realizar una curva del efecto de GndHCl en las micelas desde una concentración de 0.1 M hasta 1 M para conocer el comportamiento de la enzima en esas condiciones. El procedimiento usual es inyectar 1  $\mu$ l de enzima a 1ml de las micelas. Con esto se practica una dilución 1:60 del desnaturalizante inicial. Si la concentración inicial de éste era 6 M, su concentración final debe ser 0.1 M. Por tanto, se hace necesario, además de la repetición en ausencia de guanidina, realizar la curva en micelas que contienen la misma concentración del desnaturalizante que aquella en la que fue incubada la proteína.

La Figura 14 muestra que el GndHCl afecta la actividad en las micelas. A concentraciones de 0.1 M la





**FIGURA 14.** Efecto de la concentración de GndHCl sobre la actividad de la LDH-M4 en las micelas invertidas. Se muestra la curva normal de actividad en ausencia de GndHCl en medio 100% acuoso en condiciones idénticas a las de la fig. 2 (círculos claros) y la curva de actividad en las micelas en amortiguador de fosfatos 40 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, piruvato 10 mM y NADH 200 nmol en presencia de la misma concentración de GndHCl en que se incubó a la enzima durante 1h a 24°C y pH 7.5 (cuadros oscuros).





---

actividad disminuye a sólo 30% del control. En el intervalo de 0.2 a 0.7 M queda un 5-10% de la actividad control. Arriba de esa concentración la inactivación de la enzima es total. Se realizó además una curva con micelas que en su fase acuosa contenían la misma concentración de guanidina que aquella en la que se incubó a la enzima en 100% de agua. El resultado es exactamente igual en ambos casos (Figura 14).

Hasta este momento los intentos por llevar a cabo la reactivación de la LDH-M<sub>4</sub> de cerdo en el sistema de micelas invertidas no arrojaron resultado alguno que permitiera pensar que la variación de condiciones fuera a favorecer en algo la recuperación de la actividad. Esto nos llevó a proponer, con un alto grado de seguridad, que esta enzima tetramérica no es susceptible de renaturalizarse en el sistema micelar. Sin embargo, resulta muy interesante el punto de que la guanidina afecta fuertemente la actividad enzimática en las micelas a concentraciones que en agua no la disminuyen.







---

**c. ESTABLECIMIENTO DEL METODO DE RECUPERACION DE LA LDH  
DESDE LAS MICELAS A 100% DE AGUA.**

Para tratar de determinar hasta qué grado es irreversible la desactivación de la enzima en las micelas se implementó un método de recuperación de ésta a un medio 100% acuoso. Estas pueden recuperarse por ultracentrifugación colocando a las micelas invertidas sobre un determinado volumen de amortiguador en condiciones de pH, temperatura y componentes óptimos para la catálisis de la enzima en cuestión. Se lleva a cabo la centrifugación, posteriormente se elimina la fase orgánica y se mide la actividad en una alícuota del medio acuoso.

Los primeros resultados mostraron un dato totalmente inesperado. Como se puede ver en la Tabla 2, en las micelas existe una pérdida casi total de la actividad. Sin embargo, después de la centrifugación se recupera casi un 50% (con respecto al control) de la actividad de la enzima que estuvo en presencia de GndHCl 1 M. No se registró actividad alguna por parte de la enzima que se





GndHCl (M)	Act. Micelas	Act. Regreso a Agua
0.0	74.0	136.0
1.0	2.3	59.0
2.0	0.0	0.0
6.0	0.0	0.0

**Tabla 2.** Actividad de la LDH recuperada a medio 100% acuoso. La enzima fue incubada 1 h a 24°C en presencia de las concentraciones indicadas de desnaturalizante. Al término de la incubación se transfirió a micelas invertidas y se midió su actividad. A las 24 h se centrifugaron (40,000rpm/45min a 20°C) (ver Apéndice A para las condiciones de centrifugación) 50 µl del medio orgánico sobre 1ml de amortiguador de fosfatos. Se recuperó la fase acuosa y se midió la actividad de la enzima en ésta. La actividad inicial fue 523 µmol/mg/min. Las actividades en micelas y de vuelta al agua se reportan en las mismas unidades.





---

desnaturalizó con  $\text{GndHCl}$  6 M.

La actividad se midió lo más pronto posible después de terminada la centrifugación debido que la fase acuosa recuperada se contamina con el detergente usado como surfactante (CTAB). Este inactiva totalmente a la enzima después de 24 h, además de que presenta el problema de que precipita durante varias horas después de la centrifugación para solubilizarse posteriormente. Esto hace variar en forma impredecible la absorbencia de la mezcla usada y le resta confiabilidad a las mediciones, pues cada tubo se contamina en grado diferente y no se pueden establecer comparaciones entre unos y otros. Otra característica del protocolo es que la concentración de enzima recuperada es pequeña y sólo se puede establecer un porcentaje de recuperación en base a la actividad medida, ya que ningún método de medición de proteínas es lo suficientemente sensible para determinar en forma confiable el porcentaje de proteína devuelta al agua.

Una técnica que permitiría medir cuantitativamente la cantidad de proteína recuperada a la fase acuosa es su

---





marcaje con  $^{125}\text{I}$ . Ello es debido a que este método posee una sensibilidad que proporcionará en forma confiable la cantidad de LDH utilizada en cada ensayo (resolución del orden de ng). Terminada la yodación se realizó una prueba de precipitación, que confirmó que el 95% del marcaje estaba unido covalentemente a la proteína. Una medición de la actividad reveló que la enzima no resultó afectada en sus propiedades catalíticas. La LDH yodada no se utilizó directamente para el experimento sino que se tomó como un marcador para poder seguir a la proteína nativa a lo largo del proceso. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

Como se puede observar, la proteína que estuvo en presencia de  $\text{GndHCl}$  0.5 M vuelve a perder su actividad. El cálculo de actividad con base a la marca recuperada indica que la proteína yodada se comporta de forma diferente a la proteína nativa (Tabla 3), pues se recupera en mayor proporción que esta última. La velocidad de catálisis obtenida (suponiendo que se recuperó el 100% de la enzima), muestra que la enzima incubada hasta una concentración 1 M de guanidina recupera al menos parte de





GndHCl (M)	Act. Micelas	A1	A2
0.0	101	1,553	113
0.5	4.0	1,640	167
1.0	5.0	1,763	175
6.0	0.0	0.0	0.0

**Tabla 3.** Medición de la actividad de LDH devuelta a agua. Se colocaron 250 $\mu$ l de fase orgánica sobre 5ml de amortiguador de fosfatos y se centrifugó a 15,000rpm/40min a 20°C. La actividad se reporta en  $\mu$ mol/mg/min (Actividad inicial: 515 $\mu$ mol/mg/min). La columna A1 reporta la actividad tomando como base de cálculo la recuperación de marca ( $^{125}$ I) a la fase acuosa. La columna A2 muestra la actividad devuelta a agua tomando como base de cálculo la suposición arbitraria de que se recuperó la proteína en su totalidad.





la actividad perdida en las micelas. Un inconveniente de calcular la actividad recuperada al agua en base al porcentaje de actividad es que ésta es sólo de un 20% con respecto a la esperada. Esto no permitió evaluarla de forma cuantitativa. Sin embargo, si nos muestra que no es posible recuperar a la enzima incubada en las concentraciones más altas de guanidina.

Haciendo una comparación de la actividad del control recuperado a agua en los dos tipos de experimentos (Tablas 2 y 3), se puede apreciar que, a pesar de que las condiciones de recuperación son diferentes (condiciones Tablas 2 y 3), se obtuvo aproximadamente la misma cantidad de enzima. Como no se recuperó la actividad total esperada, se presentan dos posibilidades:

1. Que se esté recuperando toda o una gran parte de la enzima, pero que parte de ella se haya inactivado, o;
2. que sólo se haya recuperado el 20% de proteína y toda o casi toda es activa.

La primera posibilidad es la menos probable debido a





que ya se ha mostrado que una proteína considerada como totalmente desnaturalizada no es capaz de recuperarse a agua (Tabla 3). La segunda posibilidad lleva a tratar de evaluar como influye el tiempo, velocidad y proporciones de los dos sistemas al llevar a cabo la centrifugación. La determinación de la influencia de estos factores ofrece la posibilidad de aumentar la cantidad de enzima recuperada al agua.

Con respecto a la relación (v/v) que debe existir entre el sistema acuoso y las micelas, estudios previos han reportado<sup>37</sup> que la óptima es de 1/20 (micelas/amortiguador). Además, nuestros resultados (no mostrados) parecían indicar que conforme mayor fuera el volumen utilizado, sin alterar la relación entre los volúmenes, mayor era la cantidad de proteína recuperada.

Se debe tomar en cuenta que incubar a la proteína a concentraciones elevadas de desnaturalizante obliga a diluirla en gran medida. Dado que no se recupera proteína alguna incubada en concentraciones elevadas de guanidina (6 M), y no tiene caso incubarla entre 1.2 y 5 M, también



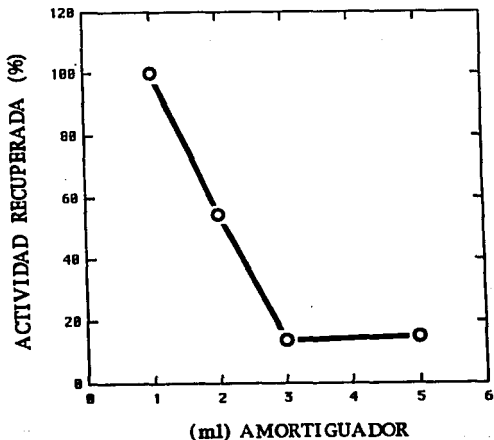


se presenta la posibilidad de añadir a la proteína concentrada sólo el volumen necesario de  $\text{GndHCl}$  8 M para obtener la concentración deseada. Esto reduciría al mínimo la dilución que sufre la proteína en agua. Como consecuencia aumenta la cantidad de proteína en las micelas y la que se puede recuperar posteriormente. Usando enzima que no fue incubada en guanidina se repitió el experimento de recuperación. Se escogieron las condiciones indicadas en la figura 2 debido a que, como se especificó anteriormente, habían sido utilizadas con proteína que llevaba demasiado tiempo en las micelas. Estas fueron: centrifugación a 45,000 rpm/20°C aumentando el tiempo a 1h, se usaron 50  $\mu\text{l}$  del sistema de micelas con 1ml de amortiguador de fosfatos. La actividad recuperada usando volúmenes diferentes se muestra en la Figura 15 (como se ve, siempre se respetó la relación 1/20 en micelas/amortiguador).

Comparando los resultados de ésta con los de la Tabla 2 claramente se puede observar que el tiempo transcurrido en las micelas si fue un factor importante, pues en este experimento (Figura 15) se recuperó cerca de un 100% de la







**FIGURA 15.** Efecto del volumen del sistema micelar sobre el porcentaje de recuperación de actividad al medio acuoso. Las micelas siempre se colocaron sobre la fase acuosa y se centrifugó 90 min a 45,000 rpm con un rotor 50Ti (Apéndice A). El 100% equivale a la actividad esperada en caso de que se recuperara el 100% de la proteína.

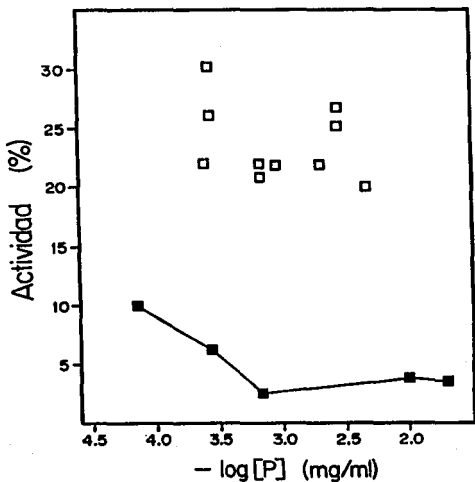




actividad esperada cuando se usó una cantidad de 50 $\mu$ l/1ml. Esta recuperación disminuyó drásticamente conforme se incrementó el volumen de las dos fases, lo cual hace pensar que como se utilizaron tubos del mismo diámetro, el área de interfase disminuyó también en las muestras de mayor volumen siendo la reducción en esta última la probable responsable de la recuperación deficiente.

Se contempló la posibilidad de aumentar la cantidad de proteína en las micelas debido al problema (que siempre habíamos enfrentado) de que las diferencias de absorbencia producidas por la actividad enzimática eran extremadamente bajas. La Figura 16 sugiere que la cantidad de proteína en las micelas no tiene efecto sobre su actividad en éstas. El experimento se realizó utilizando proteína control (sin guanidina) y proteína que se incubó en 0.2 M de desnaturizante. La razón de usar proteína en presencia de guanidina fue comprobar que el efecto de pérdida de actividad tampoco debía variar con respecto a la cantidad de LDH. Trabajamos con una concentración de 0.2 M de GndHCl, ya que es la concentración mínima en que dicho efecto es completo. En la Figura 16 llama la atención que





**FIGURA 16.** Influencia de la concentración de proteína (P) introducida al sistema de bajo contenido de agua sobre su actividad. Se midió la actividad de la LDH-M<sub>4</sub> en el medio micelar con 0.2 M de GndHCl y 6% de agua utilizando diferentes concentraciones de proteína (cuadros oscuros). Asimismo se muestran las actividades de diez controles (cuadros claros) con respecto a su concentración en las micelas.



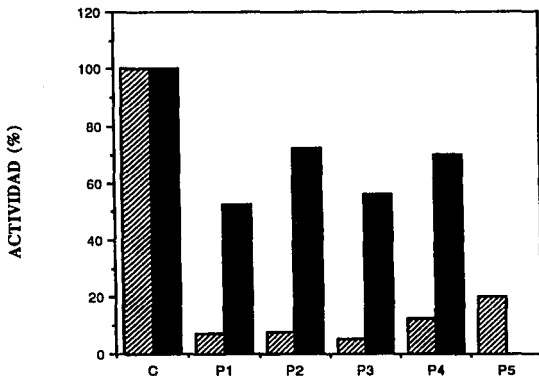


---

las micelas con menor concentración de proteína presentan una actividad superior a las otras. Sin embargo, la medida de la actividad enzimática a dichas concentraciones de proteína no es confiable.

El siguiente paso consistió en evaluar el efecto de la concentración de proteína con respecto a la actividad recuperada a agua. Para ello introdujimos a las micelas diferentes cantidades de proteína incubada en  $\text{GndHCl}$  0.2M, y se centrifugaron a 45,000 rpm/90 min. Los resultados se graficaron en la Figura 17. El análisis de las actividades muestra que no existe una diferencia importante en las variaciones de actividad cuando la proteína sufre el proceso agua→micelas→agua. Para el problema 5 no se pudo evaluar la recuperación a agua debido a que la cantidad de enzima es tan poca (70 ng/ml) que su actividad se encuentra enmascarada por el ruido del aparato. Las diferencias en actividad recuperada al agua (aproximadamente 20% entre la mayor y la menor) pueden deberse a: el medio siempre se contamina con CTAB que, como ya se dijo, antes de 24 h inactiva totalmente a la enzima. La diferencia fue que a este tiempo de





**FIGURA 17.** Influencia de la concentración de proteína en las micelas invertidas sobre la recuperación a medio acuoso. Las barras claras muestran la actividad de la enzima en las micelas con 0.2 M de GndHCl y 6% de agua con respecto al control. Las barras oscuras muestran la actividad recuperada al agua también con respecto al control. La concentración de proteína en el control (C) fue de 680 ng/ml. En los problemas fue de: P1=20 µg/ml, P2=10 µg/ml, P3=680 ng/ml, P4=270 ng/ml, P5=70 ng/ml. No se midió la actividad de vuelta a agua de P5 debido a que la concentración de proteína recuperada fue demasiado baja.





---

centrifugación la contaminación fue más pronunciada, lo que puede haber inactivado a la enzima más rápidamente. Experimentos posteriores indicaron que la mayor recuperación de actividad enzimática con la menor contaminación posible del detergente fue centrifugando a 45,000rpm durante 1h a 20°C. Con estas condiciones la recuperación del control siempre se encontró entre el 80 y el 100%.

Para tratar de eliminar o disminuir lo más posible la interferencia del detergente en la medición se ensayaron dos técnicas. La primera fue la centrifugación haciendo uso del tubo Centricón-10 (ver materiales y métodos). La proteína "lavada" demostró perder su actividad en un tiempo similar a la que nunca se encontró en su presencia. El problema del método es que es muy tardado y los tubos son caros, aunque pueden usarse varias veces.

La otra técnica fue hacer un curso temporal del efecto del CTAB sobre la enzima contaminada con éste. La finalidad era ver si su precipitación o solubilización se estabilizaba lo suficiente para dar medidas de actividad

---





confiables antes de que la enzima fuera inactivada en una proporción importante. Un experimento representativo se muestra en la Tabla 4. Este experimento se combinó con el método de extracción de detergente con alcohol isoamílico ensayado para la TPI<sup>22</sup>. Cuando se realizó la extracción con agitación el alcohol inactivó inmediata y totalmente a la enzima, por ello en este experimento el alcohol sólo se situó sobre la fase acuosa para ver si la partición del detergente a éste era lo suficientemente rápida como para evitar inactivarla. Los resultados no tienen una diferencia importante, pero muestran que todavía a las tres horas después de recuperada, la enzima casi no ha perdido actividad. Además, a este tiempo, el sistema se ha estabilizado lo suficiente para que el detergente no influya en las diferencias de absorbencia producidas por la actividad enzimática real. Por ello, en adelante la medición de actividad se realizó de dos a tres horas después de la recuperación a agua sin lavar a la enzima del detergente.

Para terminar de caracterizar el comportamiento de la LDH en el medio micelar y en su regreso a 100% de agua





Tiempo (h)	Actividad s/AI	Actividad c/AI
0	100	100
3	93	86
6	85	78
24	5	0

**Tabla 4.** Efecto de la contaminación por CTAB sobre la actividad enzimática recuperada a agua con respecto al tiempo. El tiempo reportado se refiere al lapso transcurrido desde que se terminó la centrifugación hasta que se determinó la actividad. (La actividad del control fue 327  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . Las actividades de la tabla se reportan como % del control a tiempo cero tanto en presencia [c/AI] como en ausencia [s/AI] de alcohol isoamílico [AI]). Para descripción del experimento consultar la discusión.







sólo falta evaluar la influencia que tiene el tiempo de incubación en presencia de  $GnHCl$  (en agua) sobre la pérdida de actividad en las micelas y de regreso a agua. La necesidad de este experimento partió de que siempre ha existido controversia con respecto al tiempo en que se alcanza el equilibrio del sistema. Anteriormente se determinó que en el intervalo de 1 a 24 h la pérdida de actividad en las micelas no es afectada. Para tiempos menores a 1 h los resultados se muestran en la tabla 5. Como se puede ver claramente, no existe diferencia alguna de pérdida de actividad en las micelas con respecto al tiempo de incubación en presencia del desnaturalizante. La actividad tampoco varía si se mide desde el momento de la introducción a las micelas hasta al menos 4 h después, aunque la enzima control tiende a disminuirla gradualmente (este efecto ya había sido observado). La actividad recuperada a agua sigue siendo elevada y tampoco muestra variación apreciable con respecto al tiempo, aunque aparentemente se recupera menos de la enzima que estuvo menos tiempo en presencia de guanidina. Las diferencias entre los tubos que tuvieron 10 y 60 min de incubación no se consideran reales, ya que en otros experimentos con





Tiempo en GndHCl 2M	Actividad en micelas (%)					Actividad Rec. al Agua
	T <sub>0</sub>	1h	2h	3h	4h	
Control	100	87	85	-	68	100
10 min	5	7	7	6	5	70
30 min	8	7	7	6	7	75
45 min	8	6	7	7	5	80
60 min	6	6	7	7	6	93

**Tabla 5.** Influencia del tiempo de incubación en agua en presencia de 0.2 M GndHCl sobre la actividad de la enzima en las micelas. En este experimento también se evaluó la influencia del tiempo sobre la actividad en las micelas desde el tiempo de inyección de la enzima en éstas. La actividad inicial en agua fue 521  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ . El control en micelas presentó 113  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$  de actividad. La última columna se refiere a la actividad recuperada a agua centrifugando en las condiciones de la tabla 2 y sus unidades se reportan como % de la recuperación de la actividad del control (se recuperó una actividad de 389  $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ ).





---

diferentes tiempos de incubación la recuperación siempre da entre 80 y 100%.

La Figura 18 compara la actividad (con respecto a la concentración de desnaturante en que se incubó a la proteína) de la LDH-M<sub>1</sub> de cerdo en un medio 100% acuoso, en micelas de CHO con un 6% de agua y de regreso a agua después de centrifugar a 45,000 rpm/1h a 20°C. El comportamiento en agua antes de introducir la proteína a las micelas es el ya caracterizado (ver Figura 10), así como el comportamiento en las micelas (Figura 14). Sin embargo, completamos la curva de actividad de proteína devuelta a 100% de agua. En ella se puede apreciar que una enzima que prácticamente se había inactivado en las micelas puede recuperar su actividad en condiciones óptimas. Este tipo de comportamiento la hace claramente distinta a la nativa.

Esto hace muy atractiva la idea de que en las micelas el efecto del desnaturante (desde 0.1 a 0.3 M) haya sido lo suficientemente fuerte como para promover una separación de subunidades (a dímeros o a monómeros), pero



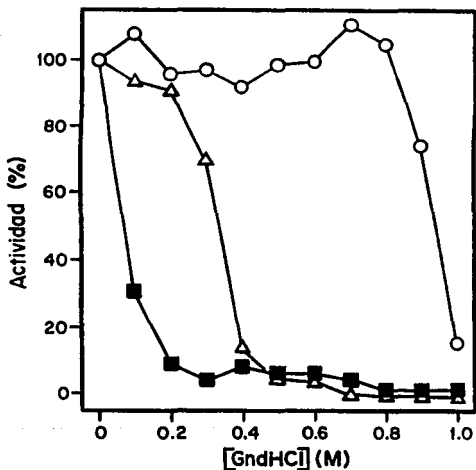


FIGURA 18. Comparación de la actividad de la LDH-M4 en un sistema acuoso después de diluir el GndHCl (círculos claros), en micelas invertidas en presencia de la cantidad indicada del agente desnaturante (cuadros oscuros) y después de recuperar al amortiguador de fosfatos sin GndHCl (triángulos claros).





---

también lo suficientemente benigno como para no alterar la estructura de forma que le impida a las subunidades volver a formar el tetrámero. A concentraciones más altas el efecto es irreversible, posiblemente porque ya se ha superado el máximo de alteración estructural reversible para esta proteína en particular.





---

---

## CONCLUSIONES

---

---



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDM-M<sub>6</sub>) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## CONCLUSIONES

La LDH no se renaturaliza en medio acuoso cuando se expone a concentraciones menores a 6 M de GndHCl. Por el contrario, cuando se renaturaliza después de haberse expuesto en GndHCl 6 M, en nuestras condiciones óptimas se logra recuperar el 9.2% de la actividad enzimática inicial.

En el medio micelar la enzima muestra sólo el 23% de la actividad que presenta en agua. Cuando la enzima se expone previamente al desnaturalizante, la pérdida de actividad (con respecto al control en agua) es de un 98%. El efecto es muy interesante, pues la actividad se pierde incluso a concentraciones que en agua no la afectan en lo más mínimo (desde 0.1 M).

La pérdida de actividad observada en las micelas no depende del tiempo de incubación de la proteína en

---





---

presencia del desnaturalizante. También es independiente de la cantidad de proteína transferida a las micelas y del tiempo de permanencia en ellas.

En el sistema ensayado y sus condiciones la respuesta al objetivo final planteado es que la LDH-M<sub>4</sub> no es susceptible de renaturalizarse en este tipo de micelas. Sin embargo, resulta interesante observar que sí se renaturaliza al ser recuperada a un medio 100% acuoso.

Esta observación llevó a diseñar un método que permita caracterizar, a futuro, a la proteína cuando ha sido devuelta a agua. Los puntos principales del método desarrollado son:

- La recuperación óptima de actividad y menor contaminación por detergente se logra centrifugando a 45.000 rpm durante 1 h a 20°C 50 µl de micelas sobre 1ml de amortiguador de fosfatos 100 mM. Estas condiciones permiten la recuperación de una enzima estable, susceptible de ser concentrada y así se amplían las posibilidades de realizar estudios posteriores con ella;







---

La comparación de actividades de la enzima en agua, en micelas y de vuelta a agua permiten apreciar que se ha logrado aislar al menos una proteína cuya conformación es distinta a la nativa y que puede recuperar sus características iniciales si se le regresa a 100% de agua.





---

---

## BIBLIOGRAFIA

---

---



---

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



## BIBLIOGRAFIA

- 1 - Adams, M.J., Haas, D.J., Jeffery, B.A., McPherson, Jr., A., Mermall, H.L., Rossman, M.G., Schevitz, R.W. y Wonacott, A.J. (1969) *J. Mol. Biol.* **41**, 159-188.
- 2 - Adams, M.J., Buehner, M., Chandrasekhar, K., Ford, G.C., Hackert, M.L., Liljas, A., Rossman, M.G., Smiley, I.E., Allison W.S., Everse, J., Kaplan, N.O. y Taylor, S.S. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 1968-1972.
- 3 - Alonso, D.O.V. y Dill, K.A. (1991) *Biochemistry* **30**, 5974-5985.
- 4 - Anfinsen, C.B. (1973) *Science* **181**, 223-230.
- 5 - Avrameas, S. y Rajewsky, K. (1964) *Nature* **201**, 405-407.
- 6 - Badcoe, I.G., Smith, C.J., Wood, S., Halsall, D.J., Holbrook, J.J., Lund, P y Clarke, A.R. (1991) *Biochemistry* **30**, 9195-9200.
- 7 - Branden, C., y Tooze, J. (1991) en *Introduction to*





---

*Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., N.Y.

- 8 - Brennan, R.G. y Matthews, B.W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 1903-1906.
- 9 - Burd, J.F. y Usategui-Gómez, M. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* **310**, 238-247.
- 10 - Cambou y Klibanov, A.M. (1984) *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 1449-1454.
- 11 - Chilson, (1964)
- 12 - Chopineau, J., Thomas, D. y Legoy, M.-D. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 459-463.
- 13 - Chotia, C. (1974) *Nature* **248**, 338-339.
- 14 - Chotia, C. (1984) *Ann. Rev. Biochem.* **53**, 537-572.
- 15 - Chou, P.Y. y Fasman, G.D. (1978) *Ann. Rev. Biochem.* **47**, 251-276.
- 16 - Chou, K.-C. y Zhang, C.-T. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 429-433.
- 17 - Clegg, J.S. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 167s-171s.
- 18 - Compton, P.D., Coll, R.J. y Fink, A.L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 1248-1252.
- 19 - Creighton, T.E. (1984) En *Proteins. Structures and Molecular Principles*, W.H. Freeman & Co., N.Y.
- 20 - Das, B., Chattopadhyay, S. y Das Gupta, C. (1992)
- 



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMÉRICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



- 
- Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 774-780.
- 21** - Di Sabato, G. y Kaplan, N.O. (1965) *J. Biol. Chem.* **240**, 1072-1076.
- 22** - Dill, K.A. y Shortle, D. (1991) *Ann. Rev. Biochem.* **60**, 795-825.
- 23** - Emery, A.E.H. (1967) *Biochem. J.* **105**, 599-604.
- 24** - Escamilla, E., Ayala, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A., Millán, L. y Darszon, A. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* **272**, 332-343.
- 25** - Eventoff, W., Rossmann, M.G., Taylor, S.S., Torff, H.-J., Meyer, H., Keil, W. y Kiltz, H.-H. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 2677-2681.
- 26** - Eytan, G.D. (1982) *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 185-202.
- 27** - Fernández-Velazco, D.A., Garza-Ramos, G., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **205**, 501-508.
- 28** - Franks, F., Hatley, R.H.M. y Friedman, H.L. (1988) *Biophys. Chem.* **31**, 307-315.
- 29** - Garrell, J. y Campuzano, S. (1991) *BioEssays* **13**, 493-498.
- 30** - Garza-Ramos, G., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou,
- 





- 
- M. y Gómez-Puyou, A. (1990) *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **172**, 830-834.
- 31 - Garza-Ramos, G., Fernández-Velazco, D.A., Ramírez, L., Shoshani, L., Darszon, A., Tuena de Gómez-Puyou, M. y Gómez-Puyou, A. (1992a) *Eur. J. Biochem.* **205**, 509-517.
- 32 - Garza-Ramos, G., Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. y Gracy, R.W. (1992b) *Eur. J. Biochem.* **208**, 389-395.
- 33 - Genfa, Z., Xinhua, X. y Chun-Ting, Z. (1992) *Eur. J. Biochem.* **210**, 747-749.
- 34 - Grandi, C., Smith, R.E. y Luis, P.L. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 837-843.
- 35 - Greene, R.F., Jr. y Pace, C.N. (1974) *J. Biol. Chem.* **249**, 5388-5393.
- 36 - Griffin, B.E., Haslam, J. y Reese, C.B. (1964) *J. Mol. Biol.* **10**, 349-352.
- 37 - Grunwald, J., Wirz, B., Scollar, M.P. y Klibanov, A.M. (1986) *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6732-6734.
- 38 - Guagliardi, A., Manco, G., Rossi, M. y Bartolucci, S. (1989) *Eur. J. Biochem.* **183**, 25-30.
- 39 - Gupta, M.N. (1992) *Eur. J. Biochem.* **203**, 25-32.
- 40 - Hathaway, K.G. y Criddle, R.S. (1966) *Biochemistry* **56**,
- 





680-685.

- 41 - Hatley, R.H.M. y Franks, F. (1989) *Eur. J. Biochem.* **184**, 237-240.
- 42 - Hilhorst, R., Laane, C. y Veeger, C. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 3927-3930.
- 43 - Hilhorst, R., Spruijt, R., Laane, C. y Veeger, C. (1984) *Eur. J. Biochem.* **144**, 459-466.
- 44 - Holbrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J. y Rossmann, M.G. (1975) en *The Enzymes*, 3a. Edición, Vol. 11 (Ed. P.D. Boyer) pp. 191-292, Academic Press, N.Y.
- 45 - Jaenicke, R., Vogel, W. y Rudolph, R. (1981) *Eur. J. Biochem.* **114**, 525-531.
- 46 - Kabanov, A.V., Nametkin, S.N., Evtushenko, G.N., Chernov, N.N., Klyachko, N.L., Levashov, A.V. y Martinek, K. (1989) *Biochim. Biophys. Acta* **996**, 147-152.
- 47 - Kabanov, A.V., Klyachko, N.L., Nametkin, S.N., Merker, S., Zaroza, A.V., Bunik, V.I., Ivanov, M.V. y Levashov, A.V. (1991a) *Protein Engng.* **4**, 1009-1017.
- 48 - Kabanov, A.V., Nametkin, S.N., Chernov, N.N., Klyachko, N.L. y Levashov, A.V. (1991b) *FEBS Lett.* **295**, 73-76.
- 49 - Katiyar, S.S., Awasthi, A.K. y Kumar, A. (1988)





- 
- Biochem. Int.* **17**, 1165-1170.
- 50** - Kellis, J.T., Jr., Nyberg, K., Sali, D. y Fersht, A.R. (1988) *Nature* **333**, 784-786.
- 51** - Khmelnitsky, Y.L., Gladilin, A.K., Roubailo, V.L., Martinek, K. y Levashov, A.V. (1992) *Eur. J. Biochem.* **206**, 737-745.
- 52** - Kiltz, H.H., Keil, W., Griesbach, M., Petry, K. y Meyer, H. (1977) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **358**, 123-127.
- 53** - Klyachko, N.L., Levashov, A.V., Pshezhetsky, A.V., Bogdanova, N.G., Berezin, I.V. y Martinek, K. (1986) *Eur. J. Biochem.* **161**, 149-154.
- 54** - Lehninger, A.L. (1975) en "*Biochemistry*", 2nd. Edition, Worth Publishers Inc., N.Y.
- 55** - Leszczynski, J.F. y Rose, G.D. (1986) *Science* **234**, 849-855.
- 56** - Long, G.L. y Kaplan, N.O. (1968) *Science* **162**, 685-686.
- 57** - Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P. y Robinson, B.H. (1988) *Biochim. Biophys. Acta* **947**, 209-246.
- 58** - Lustig, B. y Fink, A.L. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 229-233.
- 







- 
- 59 - Ma, Y.-Z. y Tsou, C.-L. (1991) *Biochem. J.* **277**, 207-211.
- 60 - Markert, C.L. y Møller, F. (1959) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **6**, 753.
- 61 - Markert, C.L. (1963) *Science* **140**, 1329-1330.
- 62 - Markert, C.L. y Massaro, E.J. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* **115**, 417-426.
- 63 - Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N., Khmel'nitsky, Y.L. y Berezin, I. (1986) *Eur. J. Biochem.* **155**, 453-468.
- 64 - Mastro, A.D. y Keith, A.D. (1984) *J. Cell Biol.* **99**, 180s-187s.
- 65 - Nicot, C., Vacher, M., Vincent, M., Gallay, J. y Waks, M. (1985) *Biochemistry* **24**, 7024-7032.
- 66 - Nozaki, Y. y Tanford, C. (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 4074-4081.
- 67 - Nozaki, Y. y Tanford, C. (1970) *J. Biol. Chem.* **245**, 1648-1652.
- 68 - Ohlsson, I., Nördström, B. y Brändén, C.-I. (1974) *J. Mol. Biol.* **89**, 339-354.
- 69 - Opitz, U., Rudolph, R., Jaenicke, R., Ericsson, L. y Neurath, H. (1987) *Biochemistry* **26**, 1399-1406.
- 





- 
- 70 - Perczel, A., Park, K. y Fasman, G.D. (1992) *Proteins* **13**, 57-69.
- 71 - Pesce, A., Fondy, T.P., Stolzenbach, F., Castillo, F. y Kaplan, N.O. (1967) *J. Biol. Chem.* **242**, 2151-2167.
- 72 - Plagemann, P.G., Gregory, K.F., Wroblewski, F. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 2288.
- 73 - Presta, L.G. y Rose, G.D. (1988) *Science* **240**, 1632-1641.
- 74 - Privalov, P.L. (1979) en "*Advances in Protein Chemistry*", vol. 33, Academic Press Inc., N.Y.
- 75 - Reslow, M., Adlercreutz, P. Y Mattiasson, B. (1988) *Eur. J. Biochem.* **172**, 573-578
- 76 - Richardson, J.S. y Richardson, D.C. (1988) *Science* **240**, 1648-1652.
- 77 - Richardson, J.S. y Richardson, D.C. (1989). En "*Prediction of protein Structure and the Principles of Protein Conformation*", G.D. Fasman, Ed. Plenum Press, N.Y.
- 78 - Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1976) *Eur. J. Biochem.* **63**, 409-417.
- 79 - Rudolph, R., Heider, I., Westhof, E. y Jaenicke, R. (1977a) *Biochemistry* **16**, 3384-3340.
- 





- 
- 80 - Rudolph, R., Heider, I. y Jaenicke, R. (1977b) *Biochemistry* **16**, 5527-5531.
- 81 - Rudolph, R., Zettlmeissl, G. y Jaenicke, R. (1979) *Biochemistry* **18**, 5572-5575.
- 82 - Salthe, S.N., Chilson, O.P. y Kaplan, N.O. (1965) *Nature* **207**, 723-726.
- 83 - Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M. y Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry* **27**, 1648-1652.
- 84 - Strambini, G.B. y Gonnelli, M. (1988) *J. Phys. Chem.* **92**, 2850-2853.
- 85 - Stryer, L. (1988) En *Biochemistry*, 3a. Edición, W.H. Freeman and Co., N.Y.
- 86 - Tanaka, A. y Kawamoto, T. (1991) en *Protein immobilization: fundamentals and applications* (Taylor, R.F. Ed), Marcel Dekker, New York.
- 87 - Tanford, C. (1973) En *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley & Sons Inc., N.Y.
- 88 - von Hippel, P.H. y Wong, K.-Y. (1964) *Science* **145**, 577-580.
- 89 - Wigley, D.B., Clarke, A.R., Dunn, C.R., Barstow, D.A., Atkinson, T., Chia, W.N., Muirhead, H. y Holbrook,
- 





- 
- J.J. (1987) *Biochim. Biophys. Acta* **916**, 145-148.
- 90 - Wojcieszyn, J.W., Schlegel, R.A., Wu, E.-S. y Jacobson, K. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4407-4410.
- 91 - Yamane, T. (1988) *Biocatalysis* **2**, 1-9
- 92 - Zaks, A. y Klibanov, A.M. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 3194-3201.
- 93 - Zale, S.E. y Klibanov, A.M. (1986) *Biochemistry* **25**, 5432-5444.
- 94 - Zettlmeißl, G., Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1979a) *Biochemistry* **18**, 5567-5571.
- 95 - Zettlmeißl, G., Rudolph, R. y Jaenicke, R. (1979b) *Eur. J. Biochem.* **100**, 593-598.
- 96 - Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.





---

**APENDICE**

---



---

ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## APENDICE A

En cuanto a las mediciones espectrofotométricas realizadas, se hizo uso de tres aparatos distintos: un espectrofotómetro *Beckman* Mod. 35 conectado a un graficador también de la marca *Beckman*; un espectrofotómetro de la misma marca, del modelo DU-64 automático, equipado con el programa *Kinetics* para el cálculo de los datos necesarios, y; un espectrofotómetro *Hewlett Packard* modelo 8452, manejado por el programa HP8452 para procesamiento de los datos. Los dos últimos aparatos constan de un baño de temperatura constante acoplado.

La centrifuga usada a velocidades menores a 15,000rpm fue una *Beckman* Mod. J2-21 con un rotor de ángulo fijo tipo JA-20. Para velocidades mayores se usó una ultracentrifuga *Beckman* Mod. L7-55 con un rotor de tipo 50Ti, también de ángulo fijo.



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.



---

## APENDICE B

La composición de los medios usados es la siguiente:

### Amortiguador de fosfatos:

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .....	100mM
EDTA.....	1mM
DTT.....	1mM

Ajustar a pH 7.6 con KOH<sub>conc.</sub> usando un electrodo de calomel.

### Disolución madre de hidrocloreuro de guanidinio (GndHCl):

GndHCl.....8M

Disolver en el mínimo volumen de amortiguador de fosfatos y ajustar a pH 7.6 con cristales de Tris.





---

**Disolución madre de piruvato:**

Piruvato.....100mM

Disolver en agua destilada y usar fresco.

**Disolución madre de NADH:**

NADH.....100mM

Disolver en amortiguador de fosfatos 2:5 (40mM) y ajustar  
a pH 7.4







---

## APENDICE C

### Método de Lowry para medición cuantitativa de proteína:

La ventaja de este método de medición de proteína sobre el del cálculo por absorbencia a 280 nm es que es más sensible, aunque, como depende del contenido de ciertos aminoácidos en la proteína, puede dar resultados distintos para la misma cantidad de proteínas diferentes. El mecanismo exacto de la reacción de Lowry es desconocido, pero se sabe que los complejos de cobre-proteína formados en medio alcalino reducen al ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico (reactivo de Folin Ciocalteau), dando como resultado un complejo colorido con un máximo de absorbencia a 750 nm.

### Reactivos empleados:

A -  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , al 2% en NaOH 0.1 N.

B -  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1% - Tartrato de sodio-potasio al 2% en NaOH 0.1 N.





C - Mezclar 100 ml de A con 2 ml de B el mismo día que se vaya a realizar la medición.

D - Reactivo de Folin diluido 1:2 con agua momentos antes de usarse.

E - Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/ml.

Hacer una curva estándar de 5-100  $\mu\text{g}$  de proteína. La curva es lineal hasta 60  $\mu\text{g}$ .

**Procedimiento:**

1. Tubo blanco: 0.8 ml del medio original en que se suspendió la enzima; tubos de la curva patrón: la alícuota necesaria de solución estándar de BSA para tener varios puntos (de 4 a 5 puntos) entre 5 a 100  $\mu\text{g}$  en y llevarlos a 0.8 ml con el mismo medio usado para el blanco.

2. Tomar una muestra de la disolución que se desee determinar y que sea probable contenga entre 10 a 60  $\mu\text{g}$  de proteína; llevar a 0.8 ml con el medio original de suspensión.

3. Adicionar a cada tubo 2 ml de reactivo C, mezclar y dejar reposar a temperatura ambiente por 10min.

4. Adicionar 0.2 ml de reactivo de Folin recién





preparado y mezclar vigorosamente en forma inmediata para evitar descomposición del reactivo.

5. Dejar reposar a temperatura ambiente por 20-30 min y leer a 560, 660 o 750 nm (la longitud de onda que se considere más apropiada para la medición del momento).

El color desarrollado es estable por 45-60 min después de finalizada la incubación (Lowry y cols, 1951).





---

## APENDICE D

### Preparación del medio de micelas invertidas:

El sistema de bajo contenido de agua usado se encuentra formado por *n*-octano, hexanol y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El protocolo siguiente fue usado en todos los casos: a una mezcla de 0.8 g de CTAB y 9.6 ml de *n*-octano se añadió un volumen de 1.1 ml de hexanol. Seguidamente se adicionó 672  $\mu$ l de amortiguador de fosfatos 40 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, piruvato 10 mM, 200 nMol de NADH y la concentración deseada de GndHCl en caso de que se quiera medir actividad en su presencia.

Después de esta última adición agitar vigorosamente hasta obtener un sistema transparente. La reacción se inicia añadiendo 1  $\mu$ l de LDH-M<sub>4</sub> (100-500 ng de proteína) a 1 ml de la mezcla anterior; después de agitar vigorosa y rápidamente la actividad se midió por registro de la disminución de absorbencia del NADH a 340nm. En este protocolo la concentración final de agua fue de 6% (v/v).





---

## APENDICE E

### Diálisis de la LDH-M<sub>4</sub>.

Debido a que la enzima utilizada se encuentra suspendida en una solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  su dilución en las micelas no bastará para asegurar que no interferirá con las mediciones observada tanto sin como con desnaturalizante. Por ello nos vimos obligados a retirarlo de la enzima realizando la diálisis de la misma.

El procedimiento fue el siguiente: se colocan en una membrana de celulosa para diálisis con capacidad de retención de proteínas de 12,000 Da entre 150 y 200  $\mu\text{l}$  de una dilución de LDH-M<sub>4</sub> de 10 mg/ml en sulfato de amonio. Se cierra y se coloca en 1 L de amortiguador de fosfatos 100 mM, EDTA 1 mM y DTT 1 mM en cuarto frío con agitación constante. El amortiguador de diálisis se cambia a las 24, 48 y 60 h, dándose por terminada ésta a las 72 h.

Cumplido el tiempo de diálisis, se recupera a la enzima de la membrana y se centrifuga en centrífuga

---





---

*Eppendorf* durante 10 min para eliminar los agregados de protefna que pudiesen haberse formado. Se recupera el sobrenadante y se lleva a cabo la medición de protefna y de actividad en la forma descrita anteriormente.



ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE UNA ENZIMA TETRAMERICA  
(LDH-M4) EN SISTEMAS CON BAJO Y ALTO CONTENIDO DE  
AGUA.

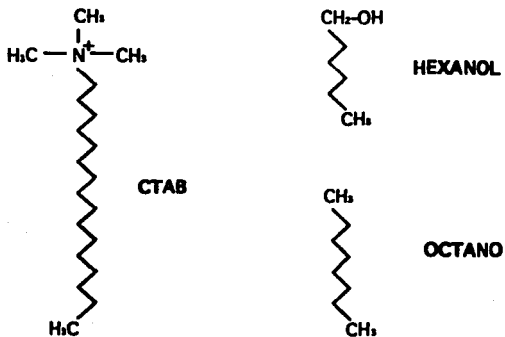


FIGURA 19. Estructura de los componentes del medio conocido como CHO.

