

171
zej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS EN EL ESTADO DE AGREGACION DE LA 17 BETA-ESTRADIOL
DESHIDROGENASA DURANTE LA DESNATURALIZACION INDUCIDA POR UREA.**



T E S I S

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

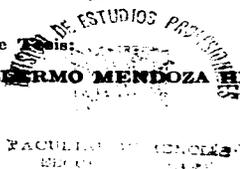
P r e s e n t a :

JUAN FERNANDO MINAURO SANMIGUEL



Director de Tesis:

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNANDEZ



MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACION VARIA

COMPLETA LA INFORMACION

Fe de erratas

El pie de figura en la página 43 se lee: "carriles 16-18....." Y debe decir ... carriles 6-8, fracciones 12-16 correspondientes a la 17β -HSD, en un pH alrededor de 5.1.

En la página 37 se lee 1×10^3 Y debe decir 1×10^3 ...

En la página 20, tabla 2 se lee g24 donde no debe decir nada.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Cambios en el estado de agregación de la 17 beta-estradiol deshidrogenasa durante la desnaturalización inducida por urea realizado por Juan Fernando Minauro Sanmiguel

con número de cuenta 8922930-5 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. Guillermo Mendoza Hernández.
Propietario M en IBB Jorge Alberto Pérez León.
Propietario M en C Víctor Manuel Valdés López.
Suplente Dra. Claudia González Espinosa.
Suplente Biol. Ernesto Maldonado Olvera.

[Handwritten signatures]

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

[Handwritten signature]
C. en C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

Dedicada:

A los pocos que me quieren y a los que quiero, a los que sienten mas que a los que piensan, a los soñadores y a los que depositan su fe en los sueños como únicas realidades, ofrezco este libro de verdad, no como anunciador de verdad sino por la belleza que en su verdad abunda. A ellos ofrezco esta creación

(Edgar Allan Poe)

A mi familia y particularmente a mis padres, unicos responsables de que me encuentre aquí.

Al Dr. Guillermo Mendoza, por darme cabida en su laboratorio y permitirme trabajar ahí.

A la UNAM, por haberme dado la oportunidad de formarme en sus aulas y a los profesores, amigos y compañeros que lo hicieron posible.

A los miembros del jurado por su disposición a revisar y enriquecer con su participación este trabajo.

A lo(s) demás por venir.....

A todos ellos:

¡Gracias!

Índice.

Resumen	1
Introducción	1
Elementos estructurales.....	2
Plegamiento de proteínas.....	7
Las 17-hidroxiesteroide deshidrogenasas.....	10
Química de los esteroides.....	10
La 17 β -estradiol deshidrogenasa.....	17
Objetivos	25
Materiales y métodos	26
Descripción de los experimentos.....	26
Protocolos.....	31
-Purificación.....	31
-Homogenización.....	31
-Precipitación con sulfato de amonio.....	31
-Tratamiento con calor.....	31
-Segunda precipitación con sulfato de amonio.....	32
-Cromatografía de intercambio iónico.....	32
-Cromatografía de afinidad.....	34
-Electroenfoque preparativo.....	36
-Desnaturalización de la enzima por urea.....	36
-Reversibilidad de la desnaturalización.....	37
-Filtración molecular.....	37
-Entrecruzamiento.....	38
Resultados	38
Purificación.....	38
Electroenfoque.....	40
Filtración molecular.....	40
Entrecruzamiento.....	47
Discusión	51
Conclusiones	57
Referencias	58

Resumen.

La 17 β -estradiol deshidrogenasa está constituida por dos subunidades idénticas que interactúan de manera no covalente, cada una con 327 residuos de aminoácidos y una masa molecular de 34 854 Da. en este trabajo se estudió la transición de la proteína del estado nativo al desnaturizado inducido por urea. Los cambios fueron examinados por actividad catalítica, filtración cromatográfica, y entrecruzamiento con glutaraldehído seguido de electroforesis en SDS. Los resultados muestran que a concentraciones relativamente bajas de urea (menores de 3M), los cambios se relacionan con un estado expandido de la enzima, que coincide con su inactivación y la formación de especies poliméricas, en este nivel estos cambios son reversibles. A concentraciones de urea de entre 3-5 M la enzima es agregada e inactivada irreversiblemente. Finalmente a concentraciones mayores de 5 M de urea, se lleva se obtiene el monómero desnaturizado resultado de la disociación.

El hecho de que la desnaturización por urea de la 17 β -estradiol deshidrogenasa promueva la transición de un dímero nativo a un estado agregado y finalmente al monómero desnaturizado, sugiere que el estado nativo de la proteína es estabilizado casi exclusivamente por interacciones hidrofóbicas en la interfase de las subunidades y no por fuerzas de naturaleza covalente.

Introducción.

Las propiedades funcionales de las proteínas dependen de su estructura tridimensional, es decir, la estructura y arreglo espacial del esqueleto polipeptídico en su estado nativo funcional. Todas estas estructuras se construyen de secuencias de residuos de aminoácidos particulares en cadenas polipeptídicas que se pliegan para alcanzar dicho estado.

El plegamiento de proteínas se refiere a la capacidad de generar, de secuencias lineales, dominios compactos con estructuras tridimensionales específicas. Los dominios así plegados pueden servir como módulos para construir estructuras mas complejas(1).

Para abordar el problema de plegamiento en proteínas es necesario conocer los principios de estructura y los requerimientos del plegamiento que hacen que lleguen a sus estados nativos funcionales. Esto se debe principalmente a que la vía por la cual se pliega una cadena polipeptídica y llega a su estado final, refleja la jerarquía estructural: dada una secuencia de residuos de aminoácidos, y las interacciones que sufre, puede dar lugar a los elementos estructurales secundarios y super secundarios, los que a su vez darán dominios estructurales que se pliegan independientemente; y la unión de estos dominios formarán la estructura terciaria. En el caso de la formación de una estructura cuaternaria, los monómeros, ya estructurados con la estructura terciaria nativa, adquieren su estado final de menor energía por diversas reacciones de asociación(1).

Elementos Estructurales.

Linderstrom-Lang y sus colaboradores fueron los primeros en reconocer los niveles estructurales de organización en primaria, secundaria, y terciaria en una proteína (2), dichos elementos se pueden, definir de la siguiente manera:

Estructura primaria. Este nivel estructural se refiere a la secuencia de residuos de aminoácidos, y sus características. El esqueleto polipeptídico consiste de una serie de enlaces transplanares con una disposición específica mostrada en la figura 1.

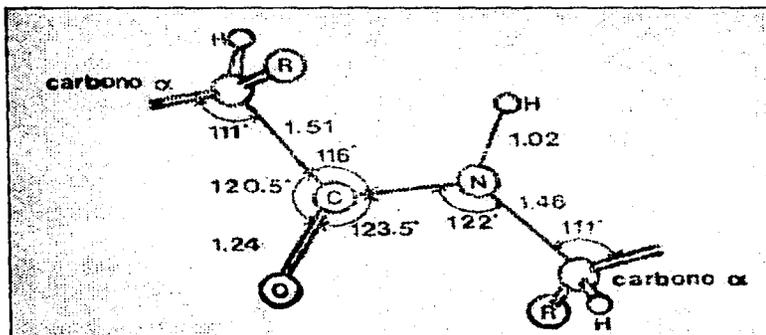


Figura 1. Disposición del enlace peptídico

Las longitudes y ángulos de estos enlaces se han obtenido a partir de estudios de cristalografía en oligopéptidos pequeños; la nomenclatura de los ángulos dihedros, es decir donde es posible la torsión entre las uniones en el enlace peptídico es mostrado en la figura 2 (2-4).

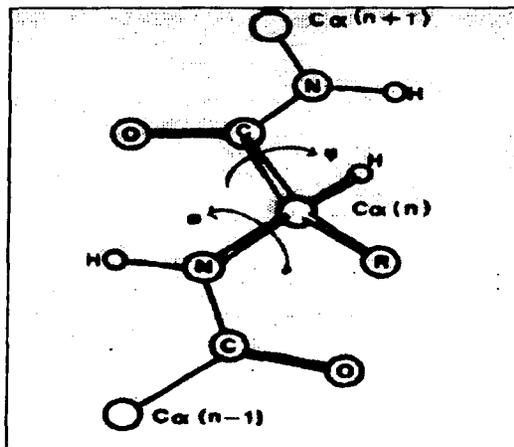


Figura 2. Nomenclatura de los ángulos dihedros en péptidos.

Debido al carácter parcial de doble enlace del enlace peptídico, sólo es posible la torsión de las uniones $N-C_{\alpha}$ y $C_{\alpha}-C$: los ángulos ψ y ϕ ; que representan giros con respecto a las uniones sencillas y son mantenidos por impedimento estérico. Así, las estructuras regulares en las proteínas están

caracterizadas por la torsión de estos ángulos y pueden involucrar un número variable de residuos para la formación de los diferentes motivos estructurales.

La interacción de la estructura del esqueleto y la secuencia de residuos de aminoácidos es vital en la determinación del plegamiento, pues hay aminoácidos que pueden participar en la formación de motivos estructurales precisos; tal parece ser el caso de la prolina, que esta involucrada en algunos giros de la cadena polipeptídica.

Estructura secundaria. En este nivel, la formación de los motivos estructurales recae principalmente en la formación de los puentes de hidrógeno, la existencia de tales entidades es generalmente inferida de las posiciones de los átomos de Oxígeno y Nitrógeno, en general un puente de hidrógeno es lineal y de 2.8 a 3 Å de longitud. En ausencia de estos puentes las interacciones electrostáticas pueden dar un efecto estabilizador significativo. Conforme la estructura tridimensional se va adquiriendo, se asume que las porciones de la cadena polipeptídica naciente (estructura secundaria) pueden servir como sitios núcleo para el plegamiento; así la estructura secundaria se puede definir como la conformación local del esqueleto polipeptídico en patrones regulares de plegamiento; como, las α -hélice, y las estructuras β (2).

Sin embargo, examinando las estructuras ya conocidas, es claro que las distorsiones de las hélices- α y las cadenas- β se dan con frecuencia, debido a la tendencia de formar una estructura compacta con un mínimo de espacio vacío. Estas irregularidades no interfieren con el problema de plegamiento, ya que, no afectan las características relevantes de los elementos de la estructura secundaria; a saber: la naturaleza dipolo de las hélices; la complementaridad anfipática y el empaque

de arreglos regulares de la cadena polipeptídica; y su papel como "semillas" en la formación de la estructura(1).

Hay otras estructuras "no repetitivas" que conectan hélices α y cadenas β ; pueden ser altamente organizadas, extensiones irregulares bien definidas, ó, regiones muy desordenadas causadas por la flexibilidad de las conformaciones alternativas tomadas por la proteína en solución o en cristal. Además de los extremos N- y C-terminales de la cadena polipeptídica, las cuales casi siempre muestran una gran movilidad (1).

Estructura terciaria. La estructura terciaria de una proteína esta básicamente determinada por la localización de segmentos estructurales α y β a lo largo de la cadena polipeptídica; por su arreglo topológico en el espacio, por ejemplo la formación de la estructura I) super secundaria; y por el ensamblaje de estos motivos, generando así los II) dominios(1,2,4).

I) Estructura super secundaria. En el proceso para alcanzar la estructura tridimensional final, de una cadena polipeptídica, las extensiones de estructura secundaria se asumen como sitios de nucleación en el plegamiento de las proteínas; así el siguiente nivel de complejidad será la estructura supersecundaria, a la cual podemos definir como plegamientos recurrentes que consisten de una serie de elementos de estructura secundaria, que aún no comprenden la estructura terciaria completa o el dominio. Como las interacciones gruesas son las responsables de la formación de estos elementos, las estructuras super secundarias son difíciles de predecir. Obviamente están favorecidas por razones cinéticas durante el proceso de plegamiento, y por razones energéticas en la proteína plegada,

especialmente debido a la distribución anfipática de las cadenas laterales hidrofóbicas y cargadas a lo largo de los elementos estructurales simples (1,2).

II) **Dominios.** Los dominios son subestructuras compactas en las proteínas, en general se asume que representan unidades autónomas de plegamiento con una relación mínima de superficie/volumen resultando en glóbulos con la mayoría de las interacciones (1). Los dominios son de gran importancia funcional; ya que los sitios activos de muchas enzimas pueden residir en diferentes dominios o en las interfases entre estos. Desde el punto de vista del plegamiento los dominios son considerados como unidades cooperativas; basados en esta idea pueden ser considerados como los principales intermediarios en el proceso de plegamiento. Los dominios en un polipéptido están especialmente separados uno del otro o al menos forman un glóbulo compacto o corazón de residuos; y tienen alguna función específica, como la unión de un nucleótido o de algún polisacárido. El sitio activo de una molécula puede ser la interfase entre dominios, lo cual permite la función simple de cada uno para juntarse y formar una molécula más compleja (1,2).

Estructura cuaternaria. La estructura cuaternaria se refiere a la disposición de las unidades polipeptídicas en una proteína; describe la estequiometría y geometría del ensamblaje macromolecular de monómeros, es decir, en este nivel la asociación, puede ser considerada como un principio estructural general (1,4).

El plegamiento de proteínas.

La adquisición espontánea de la estructura tridimensional y la capacidad para formar estructuras de mayor complejidad, son características primarias de la cadena polipeptídica. El mecanismo detallado de estos procesos, aún no está bien entendido. Las proteínas son sintetizadas por un proceso en el cual los aminoácidos son añadidos, uno por uno, por el amino terminal de las cadenas. El plegamiento de tales cadenas puede ocurrir espontáneamente, sin la necesidad de información adicional que la contenida en la secuencia de aminoácidos y sus alrededores; así podemos referirnos al plegamiento de proteínas, como el proceso involucrado en la conversión de una cadena polipeptídica recién sintetizada (o desnaturalizada), a la conformación tridimensional de la proteína nativa(5).

De esta manera podemos referirnos al problema del plegamiento en términos de cómo es que una proteína adopta su conformación nativa. En teoría una secuencia podría adoptar miles de conformaciones posibles, sin embargo, de todas esas opciones sólo elige una: esto se conoce como la paradoja de Levinthal, quien postula que hay un número astronómico de conformaciones disponibles en un estado desnaturalizado de proteínas, una búsqueda por todas estas conformaciones tomaría una eternidad, de este modo se sugiere que hay un número limitado de vías por las que puede pasar una proteína antes de alcanzar su estructura nativa, ¿Qué es lo que determina que ocurra de esta manera? ¿Qué mecanismos dirigen la relación entre una secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional?(6).

Ciertos pasos del plegamiento son catalizados *in vivo* por enzimas y otras proteínas (como las chaperonas moleculares); sin embargo la transición entre la conformación nativa y la desnaturalizada puede llevarse a cabo *in vitro*; por tanto se puede decir que la adquisición y la estabilidad de estas estructuras está entonces sujeta a la secuencia lineal de residuos de aminoácidos (5) y a las condiciones del disolvente mas que a aspectos ajenos a ella, sin embargo, el mecanismo por el cual se adquiere la estructura nativa deja aún muchas interrogantes. Por otro lado hay evidencias que indican que las proteínas no se pliegan al azar, sino que pasan por un número limitado de estados conformacionales que finalmente desembocarán en la estructura tridimensional definitiva; establecer las vías comunes de plegamiento, de tal manera que se contara con una especie de código de plegamiento, es un problema que no se podido resolver (1).

Para responder cómo una estructura de "una dimensión", representada por la secuencia de residuos de aminoácidos genera la estructura tridimensional correspondiente, hay que tomar en cuenta: 1) la determinación de un "código de plegamiento", 2) la elucidación de la relación estructura-función, y 3) el plegamiento y reconocimiento de las subunidades que forman la molécula(1).

Una de las metodologías que se ha aplicado en el estudio del plegamiento es la desnaturalización(6,7-9), que persigue el fin de encontrar transiciones cruciales en las vías de este proceso. La desnaturalización se propone como un fenómeno que se lleva a cabo cooperativamente, es decir, al aumentar la concentración del desnaturalizante, cambia la proporción de proteínas en estado nativo y desnaturalizadas. (7). Además se ha encontrado que en muchas proteínas la estructura y la función cambian de manera simultánea.

De esta manera, podemos definir a la desnaturalización como el deterioro cooperativo y generalizado de la estructura nativa, sin cambios significativos en la estructura covalente (a excepción de los puentes disulfuro). El número de conforméromos posibles en este estado es muy alto y el replegamiento en muchas ocasiones, aunque no siempre, es posible.

El plegamiento de la cadena polipeptídica naciente y la renaturalización de las proteínas desnaturalizadas comienzan de estados iniciales poco o nada definidos, esto puede ser muy importante con respecto al plegamiento debido a que la vía de formación de la estructura (a partir de la cadena polipeptídica naciente) puede depender de un estado como el desnaturalizado (hebra al azar).

La proteína desnaturalizada representa una parte de conforméromos rápidamente convertibles en otros de energía similar, aunque es importante subrayar que casi todos los intermediarios son inestables con relación al estado nativo, por lo que uno de los modelos más aceptados en el plegamiento de proteínas es el que postula únicamente dos estados: el nativo y el desnaturalizado(1,6); sin embargo hay la existencia de otros modelos en donde se postula la existencia de conformaciones estructurales más o menos precisas durante el plegamiento.

El plegamiento de proteínas constituye uno de los problemas centrales de la Biología: se sabe que la secuencia de residuos de aminoácidos determina la estructura tridimensional y que el cambio conformacional del estado desnaturalizado al nativo puede ocurrir de forma espontánea. Cuando se comprenda la relación entre la secuencia y la estructura tridimensional se podrían diseñar proteínas nuevas que realicen funciones de interés industrial o terapéutico. Conviene también señalar que la mayoría de los estudios de esta índole están hechos en proteínas monoméricas, a pesar de que la mayoría de ellas son oligoméricas lo que aconseja equilibrar el balance antes de generalizar las

conclusiones. Entender los factores que determinan el plegamiento de proteínas tiene, por consiguiente, una gran importancia científica, básica y aplicada.

Las 17-Hidroxiesteroide deshidrogenasas.

Las 17-Hidroxiesteroide deshidrogenasas son un grupo de enzimas dependientes de nucleótidos de piridina, que catalizan la interconversión estereoespecífica de los grupos hidroxilo y carbonilo de ciertos esteroides. Debido a que la modificación química en el C-17 de los estrógenos y andrógenos puede afectar su actividad biológica, estas enzimas juegan un papel muy importante en la acción de los esteroides, motivo por el cual son muy estudiadas.

La actividad de estas enzimas está ampliamente distribuida en tejidos humanos, de hecho no sólo esta presente en tejidos esteroideogénicos como ovarios, testículos, placenta, o a tejidos sensibles a hormonas como útero o próstata; su actividad se ha encontrado en hígado, riñón, piel, y sangre de muchas especies(10,11). La especificidad al nucleótido de piridina puede variar entre los tejidos de una misma especie y entre los mismos tejidos de diferentes especies.

Química de los Esteroides.

Los esteroides son un grupo de lípidos que tienen como base de su estructura química un hidrocarburo cíclico llamado ciclopentanoperhidrofenantreno (o anillo esteroide) que consta de 17 átomos de carbono dispuestos en forma de tres ciclohexanos y un ciclopentano. Los anillos se

nombran de la A a la D (fig.3). La designación α indica que uno de los sustituyentes esta orientado hacia abajo del plano del anillo, y β indica una orientación por encima del mismo plano. Las diferencias conformacionales les confieren diferentes actividades biológicas a los esteroides.

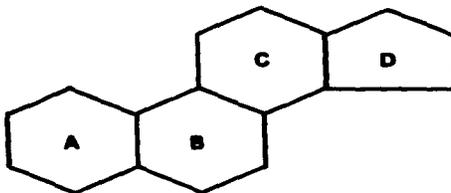


Figura 3. Estructura del ciclohexanoperhidrofenantreno.

Las hormonas esteroides pueden ser clasificadas conforme a su estructura química o a su actividad biológica principal. Con base en su actividad biológica, las hormonas esteroides se clasifican en seis grupos: Estrógenos (esteroides sexuales femeninos), andrógenos (esteroides sexuales masculinos), progestinas (progesterona), mineralocorticoides (aldosterona), glucocorticoides (cortisol), y la vitamina D y algunos metabolitos derivados esta(1,25-Dihidroxivitamina D₃). Los ácidos biliares también están relacionados estructuralmente con el colesterol, y constituyen así, un séptimo miembro de la familia de los esteroides (12).

Las hormonas esteroideas naturales tienen una función esencial en la regulación de muchas funciones biológicas; su síntesis se lleva a cabo en algunas glándulas de secreción interna. Tanto los precursores esteroideos como los intermediarios son secretados por estas glándulas y convertidos a su forma activa en diversos tejidos .

Las hormonas esteroideas son producidas a partir del colesterol, por medio de una serie de reacciones enzimáticas. El colesterol se obtiene de varias fuentes: Tomado de la circulación sanguínea, tomado a partir de reservas intracelulares o formando parte de membranas celulares, ó, sintetizado *de novo* a partir del metabolismo celular. La utilización de estas diversas fuentes depende del tipo celular y de las condiciones fisiológicas prevaletientes. Los anillos básicos de su estructura pueden estar sujetos a un amplio espectro de modificaciones estructurales (introducción de sustituyentes hidroxilo o carbonilo, insaturación, sustitución de algún anillo, etc). De hecho para que se realice la biosíntesis de estas hormonas, se requiere de la presencia de algunas enzimas esenciales, que realizan tales modificaciones (12).

La biosíntesis de hormonas esteroideas requiere de un paso básico que es la conversión del colesterol a pregnenolona, estructura de 21 carbonos; consiste en la ruptura de la unión entre los carbonos 20 y 22 eliminándose así la cadena lateral. La pregnenolona es el intermediario fundamental de todas las clases de esteroideos hormonales producidas en tejidos esteroideogénicos, con esta hormona se inician las vías básicas a través de las cuales se sintetizan todos los esteroideos hormonalmente activos.

Los andrógenos son esteroides de 19 carbonos (C_{19}), son producidos, en el hombre en los testículos, y por la mujer en ovarios y placenta. En su biosíntesis la pregnenolona puede ser transformada a progesterona por la enzima 3β -HSD; si se utiliza esta última se origina la vía denominada Δ^4 (ó 4-en) , y la utilización de la pregnenolona la vía denominada Δ^5 (ó 5-en), que finalmente pueden dar lugar a la testosterona (12,13)(fig.4).

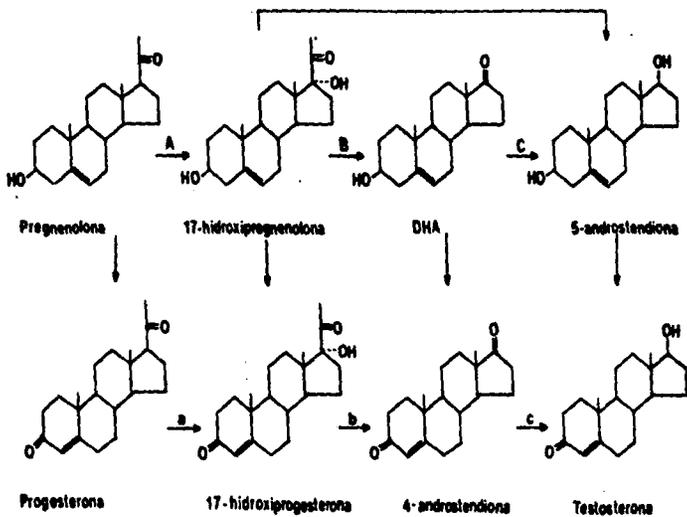
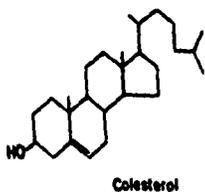


Figura 4. Biosíntesis de andrógenos; Las letras A, B, y C indican la ruta Δ^5 ; y la letras a, b, y c la ruta Δ^4

Los estrógenos son esteroides de 18 carbonos (C₁₈), en hombres se produce en testículos y en la mujer en ovarios (folículo y cuerpo lúteo) y placenta (unidad fetal). Se ha visto que la biosíntesis de estrógenos ocurre de 4-androstendiona y testosterona, por medio de intermediarios 19- hidroxilados, a estrona y estradiol (fig.5).

Hay bastante evidencia que indica que los niveles relativos de hormonas esteroides de la forma C-18 y C-19 son reguladas *in situ* por la oxidoreducción reversible en el oxígeno de C-17. Estas reacciones son catalizadas por una o mas enzimas piridín-nucleótido dependientes(14), como la 17β-estradiol deshidrogenasa. Otro complejo enzimático importante en estas reacciones es la aromatasas, una oxidasa que tiene como función principal la de hidroxilar sustratos liposolubles haciéndolos mas solubles, también rompe la uniones C-C y tiene la capacidad de hidroxilar en C-19, eliminar el grupo metilo unido a C-10 y conferirle al anillo A una estructura aromática.

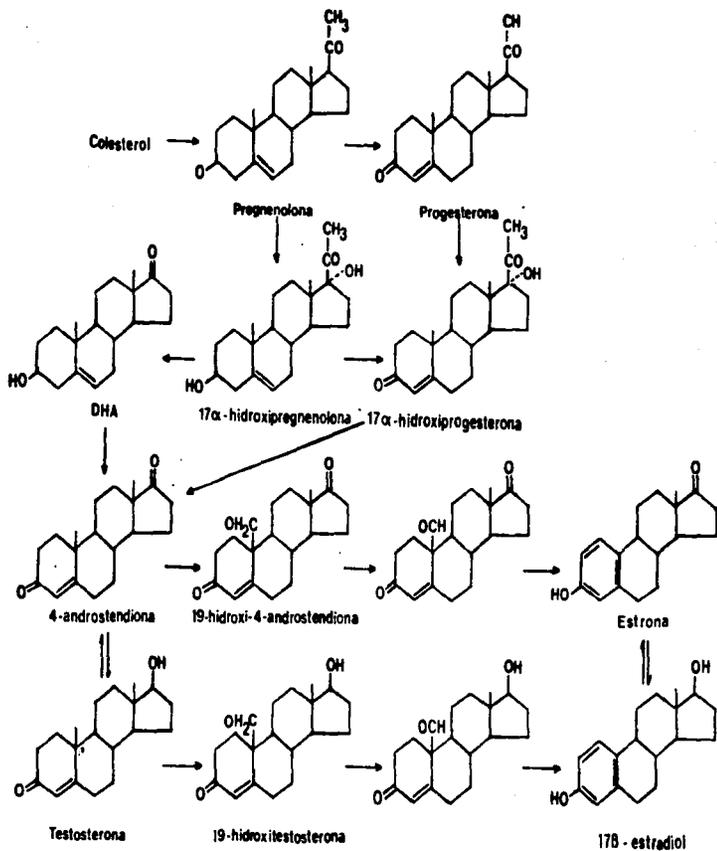


Figura 5. Biosíntesis de estrógenos.

La 17 β - estradiol deshidrogenasa.

La 17 β -estradiol deshidrogenasa (17 β -HSD) es una enzima soluble que se encuentra en la placenta humana; cataliza la interconversión de 17 β - estradiol y estrona (fig.5), y fue descrita por Langer y Engel en 1958(15).

Se ha postulado que tiene un papel fundamental en la regulación de la concentración tisular del estradiol, mediante la conversión de estrona a estradiol o el metabolismo de estradiol a estrona.

Actualmente, se han identificado cuatro tipos de 17 β -HSD (14,16,17). La 17 β -HSD tipo I, originalmente hallada en placenta, se encuentra también expresada en ovario y glándula mamaria, es una enzima soluble con 327 aminoácidos, tiene una ligera preferencia por la reducción, puede utilizar NAD(H) ó NADP(H) como cofactor, y es más afín a los estrógenos que a los andrógenos (tabla 3). La 17 β -HSD tipo II, fue obtenida de placenta y próstata, se expresa también en hígado, intestino delgado, endometrio, riñón, páncreas y colon; es una enzima microsomal de 387 aminoácidos, cataliza su reacción principalmente hacia la vía oxidativa, y utiliza preferencialmente NAD⁺ como cofactor. La 17 β -HSD III, por otro lado, sólo ha sido detectada en testículo, es una enzima de 310 aminoácidos, cataliza su reacción principalmente en sentido reductivo, usa preferentemente NADP(H) como cofactor y puede actuar sobre andrógenos. Más recientemente se ha propuesto una 17 β -HSD IV(17), homóloga a la 17 β -HSD de endometrio de porcino, consta de 736 aminoácidos, se cree que tiene una estructura multidominio con similitudes a enzimas que catalizan la β -oxidación de los ácidos grasos (la trifuncional hidratasa-deshidrogenasa-epimerasa de *Candida tropicalis*) y la proteína FOX2 de *Sacharomyces cerevisiae* (Tabla 1).

Enzima	Tamaño(a.a)	Masa molecular		Localización tisular	Localización subcelular	Mejor sustrato	Km (μ M)	Mejor cofactor	Reacción
		(kDa)							
17 β -HSD I	327	34		Ovario, placenta	Citosol	Estrona, estradiol	8.6, 5.9	NADPH	Oxidación = reducción
17 β -HSD II	367	43		Endometrio, placenta, hígado	Microsomas	Testosterona, estradiol	0.4, 0.2	NAD ⁺	Oxidación = reducción
17 β -HSD III	310	35		Testículo	Microsomas	Androstendiona, estrona	-	NADPH	Oxidación (reducción)
17 β -HSD IV	736	80 y 32		Ubicua	Peroxisomas	Estradiol	0.2, 0.4	NAD ⁺	Solo oxidación

Tabla 1. 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasas Humanas.

El descubrimiento de similitudes, por el alineamiento de la secuencia de aminoácidos con otras enzimas (como la 11 β -HSD)(18,19) han llevado a la ubicación de esta enzima dentro de una superfamilia de proteínas, cuyo sitio de reconocimiento pudo haber evolucionado de otro dominio ancestral con reconocimiento a polioles como ribitol o glucitol(18).

Así pues, la 17 β - estradiol deshidrogenasa (17 β -HSD I), es un miembro de la superfamilia, recientemente propuesta, de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SCAD)(19-21); cuyos miembros actúan sobre diversos sustratos, y la característica común parece ser la conversión de ciertas moléculas a un estado activo o inactivo. Esta superfamilia integra enzimas con alrededor de 250 residuos de aminoácidos que funcionan independientemente de iones metal (Tabla 2). Al parecer todas las enzimas de esta familia poseen cinco dominios mas o menos bien conservados, de los cuales sólo dos se reconocen funcionalmente: El dominio que se une al cofactor y otro que es parte del sitio activo. En la 17 β -HSD I, uno de los tres dominios restantes no se encuentra, sin embargo la parte correspondiente parece formar parte del sitio activo; la carencia de este se puede deber a divergencias evolutivas (fig.6)(19,20).

La 17 β -HSD I es una proteína dimerica compuesta de dos subunidades idénticas (Tabla 3), cuya estructura primaria ha sido deducida completamente a partir de cDNA (22), cataliza la interconversión de 17 β -estradiol y estrona (fig.5) (Tabla 4, A); puede utilizar al NAD y/o NADP como cofactor(23) pero, muestra diferencias en las velocidades de reducción de estos nucleótidos (Tabla 4, B), además varios esteroides pueden funcionar como sustratos(24-26), la enzima tiene una absoluta

Característica	Alcohol deshidrogenasas de cadena corta	Alcohol deshidrogenasas de cadena media.
Tamaño de la subunidad	250 a.a aprox.	350 a.a aprox.
Orden de los dominios	Coenzima-Catalítico	g24 Catalítico-Coenzima
Sitio activo con Zn	-	+

Tabla 2. Principales diferencias entre la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta y media.

Familia.	Alcohol deshidrogenasas.
Superfamilia.	Alcohol deshidrogenasas de cadena corta.
Estructura secundaria.	Proteína α/β.
Estructura oligomérica.	Dímero con subunidades idénticas.
Punto isoelectrico (pI).	5.1
Aminoácidos por subunidad.	327
Masa molecular por subunidad.	34, 853
Volumen específico parcial (cc/g).	0.736
Coefficiente de sedimentación ($S_{20,w}$).	5.24 S
Radio de Stokes (nm).	3.46
Triptofanos por subunidad.	1
A_{280} 1mg/ml.	0.4

Tabla 3. Propiedades de la 17 β -estradiol deshidrogenasa.

A)

Esteroides (variable)	Cosustrato(constante)	Km (μM)	Actividad especifica(U mg⁻¹)
17β-estradiol	NAD	7.0	7.2
17β-estradiol	NADP	2.0	2.9
Estrona	NADH	6.2	7.0
Estrona	NADPH	0.71	

B)

Cosustrato (variable)	Esteroides (Constante)	Km (μM)
NAD	Estradiol	30
NADP	Estradiol	1
NADH	Estrona	8
NADPH	Estrona	0.8

Tabla 4. Constantes cinéticas de sustratos (A) y cosustratos(B) de la 17 β -estradiol deshidrogenasa.

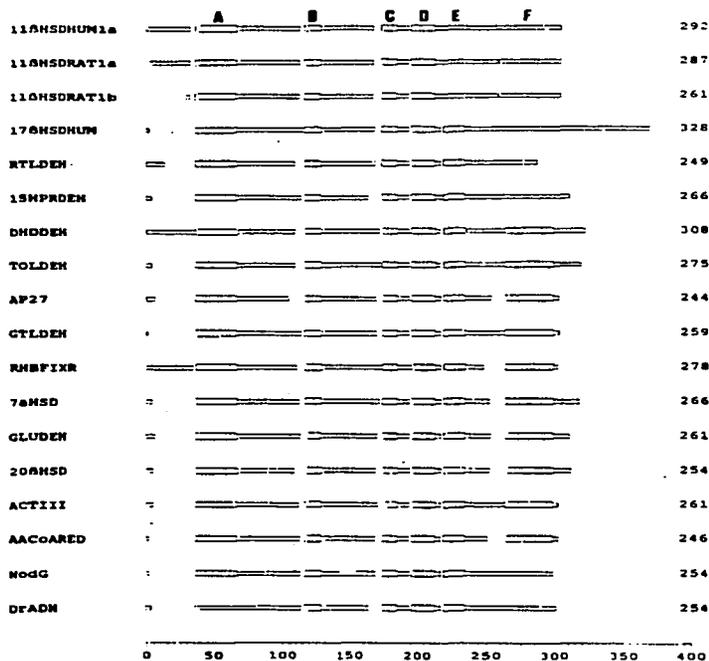


Figura 6. Representación esquemática de los dominios conservados (A-F) en la familia de las alcohol deshidrogenasas de cadena corta. Los dominios están representados por ensanchamientos en el esquema. Los números a la derecha se refieren a la longitud de las secuencias individuales. Las abreviaciones utilizadas fueron: 11βHSDHUM1a, 11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa de humano; 11βHSDRAT1a, 11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa de rata; 11βHSDRAT1b, forma corta de la 11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa de rata; 17βHSDHUM, 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa de humano; RTLDEH, ribitol deshidrogenasa; 15HPRDEH, 15-Hidroxi prostaglandina deshidrogenasa; DHDDEH, dihidrodiol deshidrogenasa; TOLDEH, cis-tolueno dihidrodiol deshidrogenasa; AP27, proteína de adipocito sin función conocida; GTLDEH, glucitol deshidrogenasa; RMBFIXR, proteína fixR de *Bradyrhizobium japonicum*; 7αHSD, 7α-Hidroxiesteroide deshidrogenasa; GLUDEH, glucosa deshidrogenasa; 20βHSD, 20β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa; ACTIII, producto genico de *Streptomyces coelicolor*; AACoARED, acetoacetyl coenzima A reductasa; NodG, Producto genico de la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium meliloti*; DrADH, alcohol deshidrogenasa de *Drosophila*.

especificidad estereoquímica por el grupo 17 β -hidroxilo. Los sustratos más reactivos son aquellos que tienen un anillo aromático A o B.



Hasta ahora, es la única enzima, involucrada en el metabolismo de esteroides de origen humano, que puede ser obtenida en cantidades suficientes para llevar a cabo estudios estructurales. Recientemente, su estructura tridimensional ha sido resuelta por cristalografía de rayos X a una resolución de 2.20Å (27,28) (fig.7).

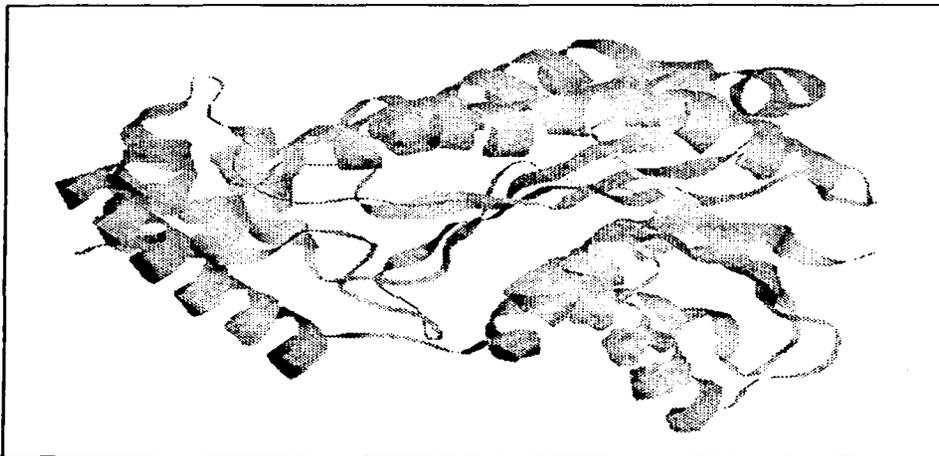


Figura 7. Estructura de la 17 β -estradiol deshidrogenasa.

En cuanto a su estabilidad. Los primeros trabajos de Jarabak *et al* (23), mostraron que esta enzima es rápidamente inactivada a temperaturas menores de 11°C en soluciones acuosas. Según este estudio, la inactivación en frío de la 17β-HSD se previene parcialmente con la adición de NAD⁺, NADP⁺, otros piridín nucleótidos, 17β-estradiol, altas concentraciones de aniones polivalentes (fosfato y sulfato), y ciertos alcoholes. El glicerol a concentraciones mayores del 20%, previene la pérdida de actividad por mucho tiempo. Además, esta desnaturalización parece involucrar cambios en la forma de la enzima y en su estado de agregación(16,24).

A pesar de ser una enzima estudiada se carece de estudios de plegamiento en esta enzima, por lo cual un estudio de esta índole resulta francamente enriquecedor en su conocimiento y al problema de plegamiento.

Objetivos.

Objetivo general.

-Estudiar los cambios del estado de agregación de la 17β- estradiol deshidrogenasa (17β- hidroxisteroide deshidrogenasa tipo I) durante la desnaturalización inducida por urea.

Objetivos particulares.

- Determinar si hay reversibilidad en la desnaturalización de la 17β- estradiol deshidrogenasa.
- Establecer un esquema tentativo de la desnaturalización seguida por esta enzima.

Materiales y Métodos.

Descripción de los Experimentos.

Para obtener más información acerca de la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas de la 17β-HSD de placenta humana, se estudió la conducta de desnaturalización por urea, a través de los cambios en la actividad enzimática, comportamiento hidrodinámico en cromatografía de filtración, y electroforesis de geles de poliacrilamida.

Para nuestra purificación, empleamos las siguientes técnicas:

-Precipitación con Sulfato de Amonio $[(NH_4)_2 SO_4]$. Cuando las sales se presentan a altas concentraciones inducen la precipitación de muchas proteínas. La precipitación ocurre por la neutralización de las cargas superficiales de una proteína por la sal, reduciendo así la efectividad química de esta y disminuyendo la concentración efectiva del agua. Así la concentración necesaria de sal, para causar la precipitación de una proteína, esta relacionada al número y distribución de cargas, y de grupos polares no iónicos en la superficie de la proteína, y a los residuos hidrofóbicos expuestos(30).

La precipitación con $(NH_4)_2SO_4$ presenta varias ventajas: a saturación tiene la suficiente molaridad para causar la precipitación de la mayoría de las proteínas, y presenta una densidad (1.235 gcm^{-3}) que no interfiere con la sedimentación de las proteínas precipitadas por centrifugación. Concentrado previene o limita el crecimiento de bacterias y hongos, y en solución protege a la mayoría de las proteínas de la desnaturalización (30,31).

-Tratamiento con calor. El calentamiento es un proceso de desnaturalización selectiva; en este tipo de técnicas, se hace uso de condiciones extremas con el fin de desnaturalizar proteínas no deseadas; el objetivo de estas técnicas es elegir una condición que no afecte significativamente a la proteína de interés, pero si a las no deseadas.

-Cromatografía de intercambio iónico. Esta técnica esta diseñada específicamente para la separación de compuestos iónicos o ionizables. El intercambio iónico supone dos eventos separados: La unión de la proteína a las cargas fijas de la resina y la elución o desplazamiento de la proteína de estos grupos. El primer evento involucra una interacción electrostática entre los grupos cargados de la resina y los de la proteína, la unión implica el reemplazo de iones no fijos por la proteína. La elución, en cambio involucra el desplazamiento de la proteína de los grupos fijos cargados por un nuevo "agente" con mayor afinidad por las cargas fijas que las proteínas, la cual se vuelve entonces un "ion" no fijo. La afinidad con la cual una proteína se une a un intercambiador iónico depende de la naturaleza y concentración de otros iones presentes en la solución. Debido a la competencia entre estos iones por los sitios de unión del intercambiador, estas uniones son también altamente dependientes de pH (por la variación de las cargas netas debidas a este).

-Cromatografía de afinidad. Esta técnica toma ventaja de una o mas propiedades de la molécula a purificar, principalmente las interacciones reversibles específicas entre macromoléculas. En esta técnica, una molécula específica llamada ligando, tiene alta afinidad por una proteína a la cual se une, dando un muy alto grado de selectividad en la separación y purificación de moléculas biológicas(4,30-31).

Para determinar la pureza de la enzima se utilizaron las siguientes técnicas:

-Electrofoque. El electrofoque es un proceso basado en la movilidad de una proteína dentro de un campo eléctrico, debido a su punto isoelectrico. Todas las proteínas tienen un pH que depende de la carga neta; la carga neta está determinada por la secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína y el pH del medio. Cuando la proteína es electrofocada a través de un gradiente de pH establecido, migrará, hasta alcanzar el pH donde la carga neta de la proteína es cero, ahí se detendrá y se dice que está enfocada. Los anfólitos (pequeñas moléculas cargadas) se utilizan para establecer el gradiente de pH. Cuando el voltaje es aplicado a un sistema de anfólitos y proteínas, todos los componentes migran a sus respectivos puntos isoelectricos; los anfólitos establecen rápidamente el gradiente de pH y lo mantienen por bastante tiempo, permitiendo que las proteínas se enfoquen lentamente en el gradiente.

Para tratar de determinar los estados de agregación de la proteína en presencia de urea se emplearon las siguientes técnicas:

-Desnaturalización. La urea es un agente caotrópico cuyo mecanismo de acción todavía no es bien conocido, sin embargo, es uno de los agentes más utilizados en los estudios estructurales por desnaturalización. La evidencia señala a una mejor solubilización de los residuos de aminoácidos no polares por parte del agua, es decir, se debilitan las interacciones hidrofóbicas(32).

Otro efecto que tiene este agente a altas concentraciones, es la casi total desnaturalización de las proteínas, pues sólo permanece estructura secundaria residual; con base en esto los estados desnaturalizados se asumen como conformaciones de hebras al azar, y se considera que este estado es ideal, ya que los ángulos de rotación alrededor de cada enlace del esqueleto polipéptico, y las cadenas laterales tiene completa e igual libertad de plegamiento.

-Renaturalización. Generalmente, la actividad biológica requiere de la estructura tridimensional en estado nativo, en el caso de las enzimas esta actividad se refiere a la capacidad catalítica. Esta característica ha sido ampliamente explotada para caracterizar los estados de plegamiento en dos direcciones: 1) la comparación de la estructura nativa y el producto de la reconstitución después de los experimentos de desnaturalización-renaturalización, y 2) la determinación del tiempo para la formación de la estructura.

En el caso de este tipo de desnaturalización (donde el agente se va agregando) la reactivación de la enzima se evalúa después de la dilución o diálisis del mismo, en nuestro caso empleamos el primer método.

Filtración molecular. La filtración molecular es una técnica en la que el fraccionamiento está basada en el tamaño relativo de las moléculas. El principio básico es sencillo: la resina consiste de pequeñas esferas entrecruzadas que actúan como redes de distinto tamaño, y por las cuales sólo pasan cierto elementos. Así el movimiento de un soluto que pasa por la resina depende del flujo de la fase móvil y del movimiento Browniano de las moléculas del soluto el cual causa la difusión dentro y fuera de la fase estacionaria (resina). La separación en la columna de filtración depende de la

Técnicas.

Purificación:

-Homogenización. En este paso se utilizan placentas frescas, las cuales son inmediatamente disectadas de los principales vasos, tejido conectivo y membranas fetales. La porción restante, correspondiente al trofoblasto, se mezcla en un amortiguador de fosfatos 5mM, pH 7, 20% (v/v) de glicerol, 1mM de EDTA, y 0.01% de azida de sodio (medio A); en una relación de 2:1. Esta mezcla se homogeniza en un polytron. El homogenizado así preparado se centrifuga a 10 000 xg durante 30 minutos, en una centrifuga Sorvall RC-5B y un rotor GSA; una vez hecho esto el sobrenadante se colecta y el precipitado se desecha.

-Precipitación con Sulfato de Amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). En la precipitación de la 17β -HSD se utiliza $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, esta sal se agrega lentamente a la solución con la enzima, obtenida en el punto anterior hasta alcanzar un 50% de saturación. Durante este proceso el pH debe ser mantenido en 7, agregando hidróxido de amonio. Ya agregada la sal, se deja que la precipitación se lleve a cabo aproximadamente dos horas, entonces se centrifuga a 10 000 xg durante 30 min, utilizando el mismo equipo que en el punto anterior. El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende en un amortiguador de fosfatos 5 mM, pH 7, 50% (v/v) de glicerol (medio B), en el que se puede almacenar.

-Tratamiento con calor. En el caso de la 17β -HSD es recomendable, para este punto, obtener unas cinco placentas procesadas hasta el paso anterior, una vez que se tienen así se colocan en

bolsas de diálisis y se dializan contra cuatro litros de medio B, esta diálisis se hace a la par del calentamiento a 67-68°C, manteniendo una agitación constante, durante unas tres horas aproximadamente. Después de que el calentamiento se termina, se continúa la diálisis contra medio A a 2-5°C durante 16-24 horas, con dos cambios de amortiguador. Finalmente el contenido de las bolsas se centrifuga a 10 000 xg durante 30 minutos. El precipitado se desecha y el sobrenadante se utiliza en el siguiente paso.

-Segunda precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Esta segunda precipitación, se hace como se describió para la primera, sólo que en esta se resuspende en medio A y se dializa contra este, el producto se centrifuga a 40 000 xg durante 60 minutos en una centrifuga Beckman XL-90 y en un rotor 60 ti; de esta centrifugación se recupera el sobrenadante.

-Cromatografía de intercambio iónico. Para la 17 β -HSD, el sobrenadante obtenido en el punto anterior se pasa por una columna de 2.6 x 30 cm de DEAE-sephacel equilibrada con medio A. Una vez que la proteína se ha unido a la columna, se eluye con un gradiente lineal de KCl de 0- 0.4 M, y se colecta en fracciones de 15 ml. El perfil de elución de la enzima se obtiene mediante el registro continuo de absorbencia a 276 nm, las fracciones que contienen a la enzima se localizan mediante medidas de actividad (fig.9).

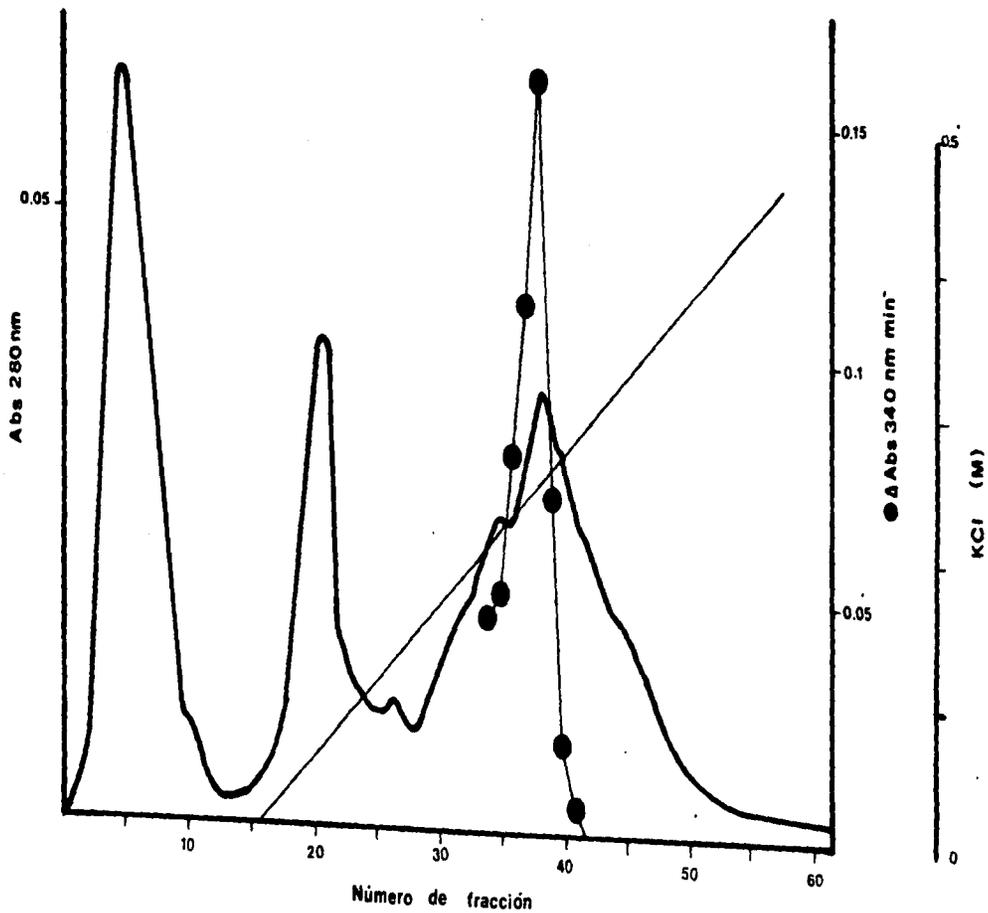


Figura 9. Perfil de elución de la columna de DEAE-saphacel. Los puntos (●), indican las fracciones donde eluye la 17β-HSD, detectada por actividad, medida a 340 nm

-Cromatografía de afinidad. Para la 17 β - HSD. Las fracciones con enzima obtenidas de la columna de intercambio iónico, se precipitan con (NH₄)₂SO₄ y se dializan como ya se describió. Se centrifugan a 10 000 xg durante 15 minutos en la centrifuga Sorvall y en el rotor SS34. El sobrenadante se pasa por una columna de 2.6 x 5 cm de azul de cibacrom previamente equilibrada con medio A, y se colecta en fracciones de aprox. 7.5 ml. Para la elución se practica un gradiente con NADP (0-30 μ M) de donde se obtiene la enzima pura(34g). El perfil de la elución de la enzima se puede obtener por el registro continuo de absorbencia de 276 nm, las fracciones con enzima se localizan por actividad. (fig.10).

Para el ensayo de actividad, se mide la reducción de NAD por el 17 β -estradiol siguiendo el incremento lineal inicial de la absorbencia a 340 nm en un espectrofotómetro Cecil 5000 de doble rayo. El medio de reacción fue preparado a un volumen final de 1 ml, con 0.5 mM de NAD y 50 μ M de 17 β -estradiol en un amortiguador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7, y 1 mM de EDTA.

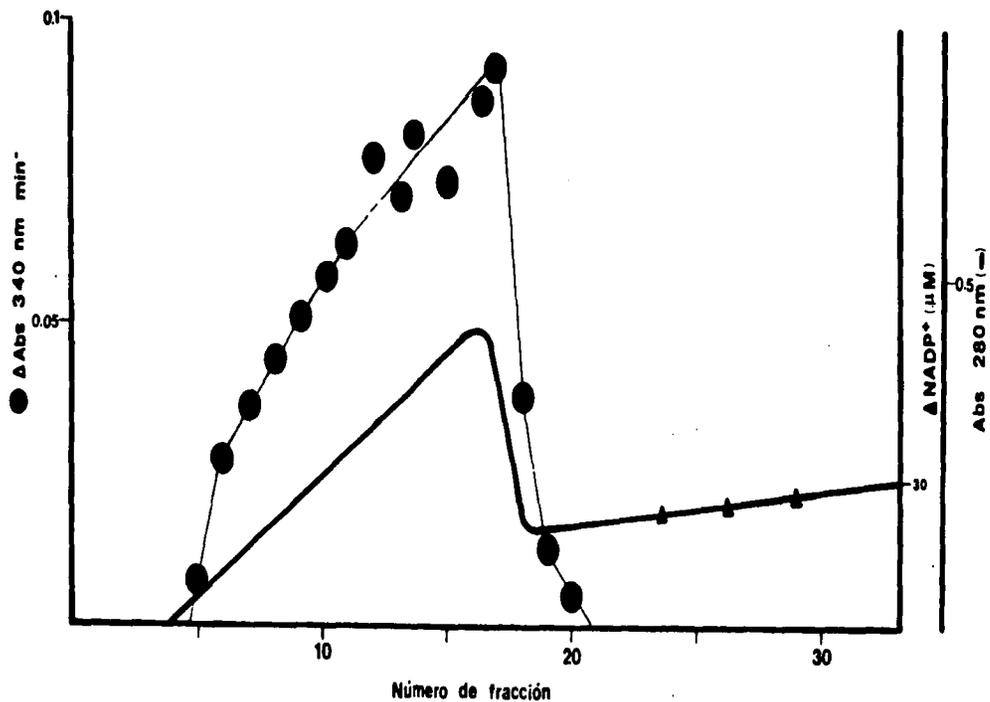


Figura 10. Perfil de elución de la columna de azul de cibacrom, los puntos (●) indican las fracciones en que eluye la 17β-HSD, detectadas por actividad medida a 340 nm.

La determinación de la concentración de la proteína se hizo de acuerdo al método de Lowry(35).

Para evaluar la pureza de la enzima, se hicieron electroforesis en PAGE- SDS en condiciones desnaturizantes, electroenfoque, y filtración molecular. Para la electroforesis se utilizó el sistema de buffer discontinuo (36), en el cual se elaboran dos geles: el empacador con poliacrilamida al 4% y el separador con poliacrilamida al 11%.

-Electroenfoque preparativo. Para el electroenfoque se utilizó una mezcla de anfolitos en un intervalo de pH de 3.3 a 7.28, para su elaboración se mezclaron 300 μ l de anfolitos(Bio-Lyte de Bio-Rad) de pH 3-5, 300 μ l de anfolitos(Bio-Lyte de Bio-Rad) pH 4.5-5.4, y 4 ml de glicerol, llevados a un volumen final de 18 ml. Una vez formado el gradiente de pH, se corrió una muestra (1 ml) de la enzima durante 6 hrs, en un Rotofor preparative IEF cell de Bio Rad. Para detectar la fracción donde se obtuvo la proteína se practicaron geles de poliacrilamida en gradiente de poro (4-20%) en presencia de SDS en condiciones desnaturizantes y se midió el pH de las mismas.

-Desnaturalización de la enzima por urea. Para los experimentos de inactivación, se tomaron muestras de la enzima (48 nM) y se incubaron en soluciones de urea a diferentes concentraciones (de 0.5 a 8M) en un volumen final de 1 ml completado con el amortiguador de fosfatos 50mM pH7, 1mM de EDTA, durante 12 horas y a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se midió la actividad residual agregando 30 μ l de una

solución que contenía NAD y estradiol a una concentración cercana a la saturación (10 Km) de la enzima.

-Reversibilidad de la desnaturalización. La reversibilidad de la inactivación se siguió de la siguiente manera: Se incubó a la enzima bajo las mismas condiciones que en los experimentos de inactivación, pero ahora a un volumen final de 30 μ l; después de las 12 horas, las soluciones fueron diluidas agregando 1 ml del amortiguador de fosfatos 50 mM pH7: Las soluciones diluidas fueron incubadas ahí 24 horas mas, transcurridas las cuales se midió la actividad de la enzima.

Filtración Molecular. Para determinar el estado de agregación y la modificación de los radios de Stokes de la 17 β -HSD, se utiliza una columna de sephacryll S-300 HR (con un intervalo de separación de peso molecular de 1×10^3 - 1.5×10^6) de 5 x 200 mm, equilibrada con un amortiguador de 50 mM de fosfato de sodio pH 7, la concentración requerida de urea en el intervalo de 0.5 a 8 M y 0.5M de NaCl. Las muestras de enzima (0.2 mg/ml) fueron incubadas por 12 horas en el amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7, con la concentración correspondiente de urea; de estas soluciones se aplicaron alicuotas de 50 μ l y fueron eluidas a una velocidad de flujo de 10 ml/h a temperatura ambiente. El perfil cromatográfico de la proteína fue registrado continuamente a una absorbencia de 276 nm. Para la calibración de la columna se emplearon proteínas de peso molecular y radio de Stokes conocidos, como marcadores(37,38).

-Entrecruzamiento. El estado de agregación de la 17 β -HSD en presencia de varias concentraciones de urea fue también determinada por entrecruzamiento con glutaraldehído, seguido por el análisis en geles en gradiente de poliacrilamida de 4-20% en presencia de SDS en condiciones desnaturalizantes. La enzima se incubó de 0 a 8M de urea a intervalos de 1.

El entrecruzamiento fue hecho mezclando 10 μ g de la proteína, incubada a las concentraciones requeridas de urea como ya se describió, con glutaraldehído (25% p/v) a una concentración final del 1% en el amortiguador de fosfato de sodio 50mM pH7, en este medio se deja en incubación durante 2 minutos, transcurridos los cuales se agrega NaBH₄ para reducir la base de Schiff formada y dar un cociente molar final de NaBH₄/glutaraldehído de 2. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente la proteína fue precipitada con desoxicolato de sodio y ácido tricloroacético, rediseuelto en 20 μ l de amortiguador 0.15 M de Tris-HCl pH 8.8, con 1% de SDS y 50 mM de DTT, y analizados con electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Resultados.

-Purificación. La purificación hecha como se describe en el protocolo de este trabajo, da una muestra de 10.08 mg de enzima pura que es estable por varios meses guardada a 4°C; registra una actividad de 7.01 U mg⁻¹ y un rendimiento del 18 %; comparada con el extracto inicial, la enzima se purificó en un factor de 3 450 veces (Tabla 5).

Proceso	mg/ml	ml	Unidades	U/mg	Purificación	Rendimiento %
Homogenización	29	6280	369	0.00203	1	100
Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	35	770	260	0.00950	4.6	70
Calentamiento	9.7	640	202	0.0325	16	55
2ª Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	41	78	143	0.0450	23	35
Elución DEAE	4.3	80	123	0.359	177	33
Elución gel azul	0.21	48	72	7.01	3450	18

Tabla 5. Purificación de la 17 β -estradiol deshidrogenasa

La enzima fue monitoreada continuamente después de cada paso, por actividad catalítica y electroforesis en PAGE-SDS en condiciones desnaturalizantes (fig. 11).

Los criterios de pureza utilizados fueron: geles de electroforesis en PAGE- SDS, filtración molecular, y el electroenfoque de la enzima, los cuales mostraron los siguientes resultados:

En los geles de electroforesis en PAGE-SDS, se obtuvo un peso molecular de 38 459 Da por subunidad de la enzima, esta determinación se hizo con la ayuda de los estándares de peso molecular utilizados en cada corrida del gel. Estos estándares son polipéptidos de peso molecular que cubren el intervalo de 10 000 a 200 000 Da (fig.12).

-Electroenfoque. En esta técnica la enzima se detectó en una región correspondiente a un pH de 5.125, en las fracciones 14 y 15 de nuestro ensayo, lo que corresponde al punto isoelectrico de la enzima pura (Fig. 13)

Así mismo el espectro de absorción de la enzima pura se muestra en la figura 14.

-Filtración molecular. En la columna de filtración, se obtuvo un pico en la zona de los 70 000 Da, y un radio de Stokes de 3.46 nm, correspondientes con el dímero de la enzima pura; esta determinación se hizo con base en las calibraciones previas con proteínas de peso molecular y radios de Stokes bien conocidos.

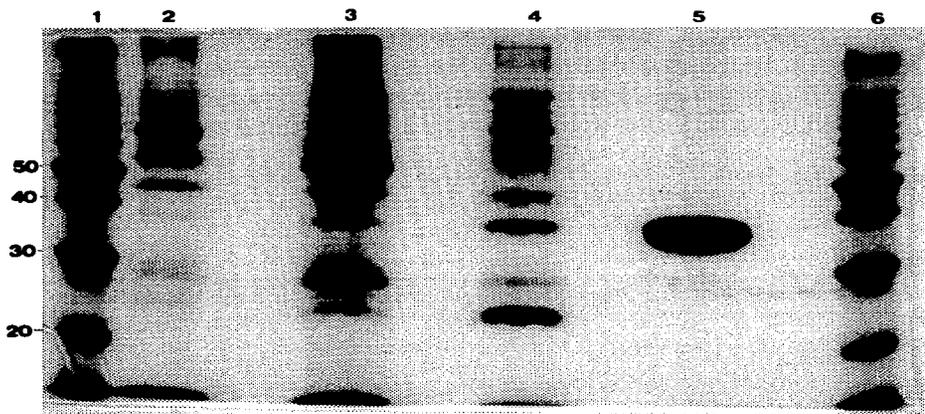


Figura 11. Purificación de la 17 β -HSD, durante los distintos procesos de purificación. Carril 1 y 6, marcadores de peso molecular; carril 2, extracto crudo de la placenta; carril 3, muestra de ingreso a la columna de DEAE; carril 4, muestra de ingreso a la columna de azul de cibacrom; y carril 5, enzima pura. Todos los carriles corrieron con una cantidad de proteína de 5 μ g en cada carril.

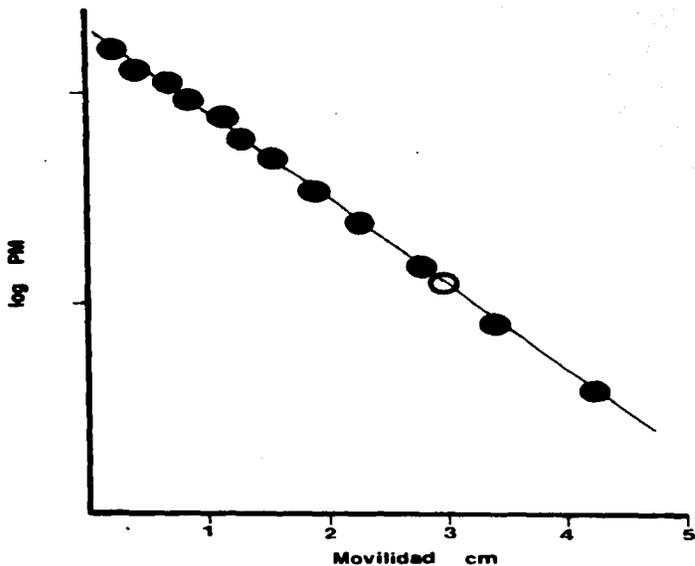


Figura 12. Determinación del peso molecular de la subunidad en el gel de poliacrilamida en presencia de SDS. (O), es la posición a la que migra la 17 β -HSD y su correspondiente peso molecular.

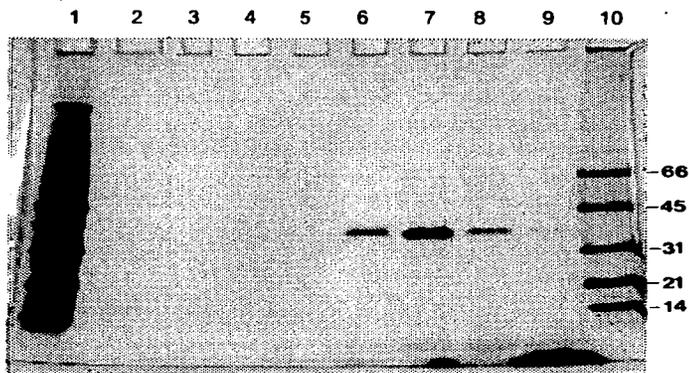
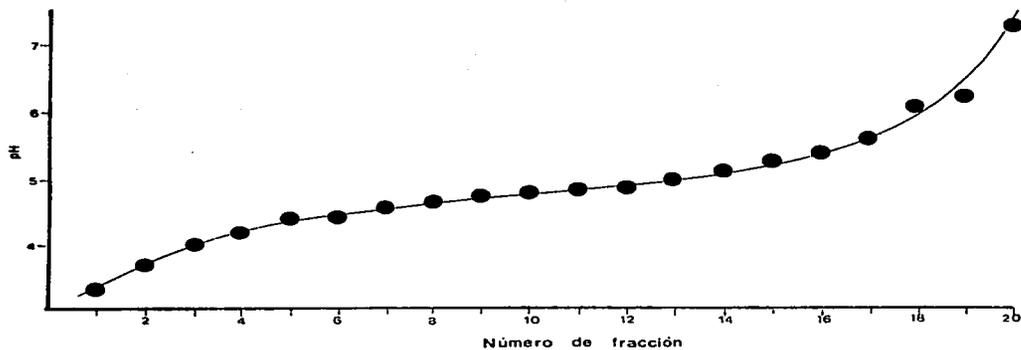


Figura 13. Electroenfoque de la 17β -HSD; A, gradiente de pH; B, carriles 1 y 10 marcadores de peso molecular, carriles 16-18 bandas correspondientes a la 17β -HSD, en un pH alrededor de 5.1.

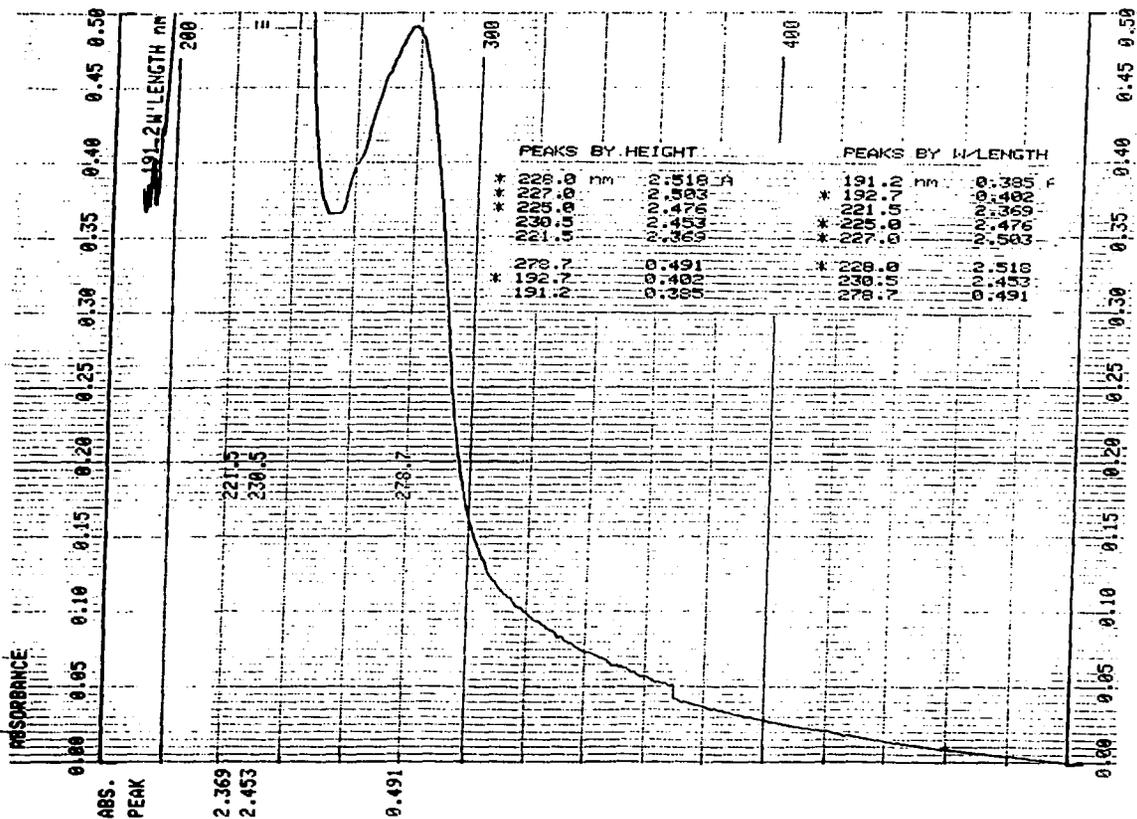
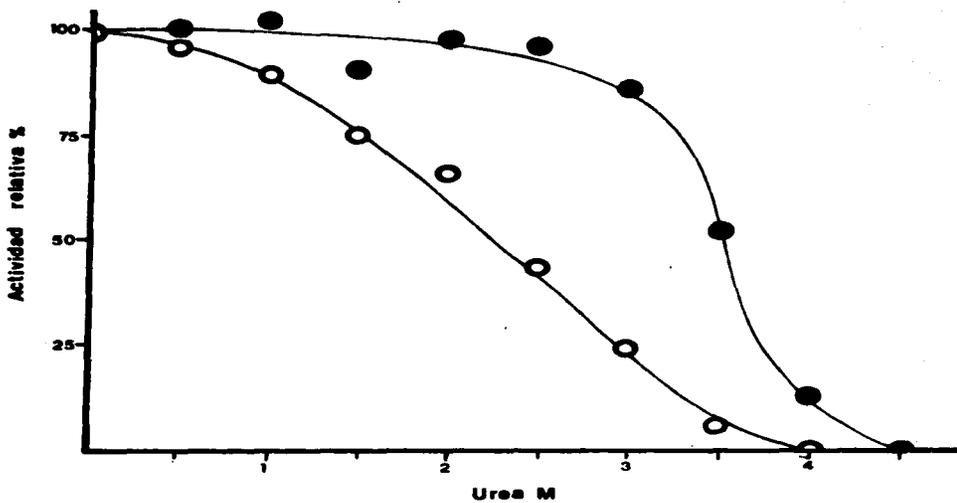


Figura 14. Espectro de absorción de la 17β-HSD.

-Inactivación de la enzima con urea y su reversibilidad. La incubación de la enzima en urea, muestra un decremento en la actividad residual conforme la concentración del desnaturizante aumenta. Esto ocurre hasta 4M, después de esta valor la actividad se pierde completamente y ya no se recupera a mayores concentraciones. Por otro lado, cuando las concentraciones de urea se diluyen (35 veces) con amortiguador la actividad se recobra enteramente hasta aproximadamente 2.8M de urea; a concentraciones mayores una pérdida gradual e irreversible en la actividad de la enzima es observada hasta 4.5 M de desnaturizante, a partir de entonces ya no se vuelve a observar actividad alguna (fig.15).

-Filtración molecular. Los perfiles de elución obtenidos de las muestras de enzima nativa y las tratadas con urea muestran un patrón de desnaturización semejante al reportado por otros investigadores en presencia de otros agentes y/o características(8,9,20). En este caso la enzima nativa muestra un sólo pico cromatográfico que eluye en la zona correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 69 000 Da y un radio de Stokes de 3.46 nm. Con 0.5 M de urea este pico se mueve hacia el área correspondiente a un peso molecular y radio de Stokes mayores (fig.16, A) , además aparece un nuevo pico que eluye con el volumen muerto o parte excluida de la columna, lo que sugiere la formación de especies poliméricas a causa de la urea, con los incrementos de esta, se observan cambios en la proporción de estos dos picos, y el pico de la enzima nativa disminuye notablemente hacia 3M (fig.16,B), donde sólo se observa un pico en la zona correspondiente a la exclusión de la columna, este fenómeno se observa hasta 5M; la forma asimétrica del pico habla de la inclusión de proteína en diferentes estados de agregación. A partir de 6M de desnaturizante, aparece un nuevo pico que da un radio de Stokes de 4.2 nm, que probablemente corresponde al monómero desnaturizado, de acuerdo con los experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído.



- Reactivación
- Actividad residual

Figura 15. Los cambios de la actividad de la 17β -HSD, en función de diferentes concentraciones de urea. Los resultados están expresados en términos de actividad de una muestra de enzima a una concentración de 48 nM. Cada punto es el promedio de cuatro determinaciones.

-Entrecruzamiento. El entrecruzamiento con glutaraldehído como agente bifuncional permite la detección y evaluación del estado oligomérico de la proteína. La enzima nativa entrecruzada muestra sólo una banda, correspondiente a un peso de alrededor de 70 000 D en la electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, peso que corresponde al dímero, es decir, la enzima en estado nativo. El análisis de los geles en gradiente mostró la presencia del dímero hasta 4M de urea, aunque se comienza a agregar desde 1 M y en 4M ya casi ha desaparecido. Hasta 6 M la presencia de agregados es predominante, y es a partir de esta concentración que aparece una banda que migra a una zona correspondiente a aproximadamente 33 000 D, muy parecido al correspondiente al monómero de la proteína, esta banda predomina hasta 8M de urea. Hay que mencionar que los geles en estas concentraciones de urea (a partir de 6M) muestran otra banda que podría ser el dímero, pero que no muestra actividad (fig.17).

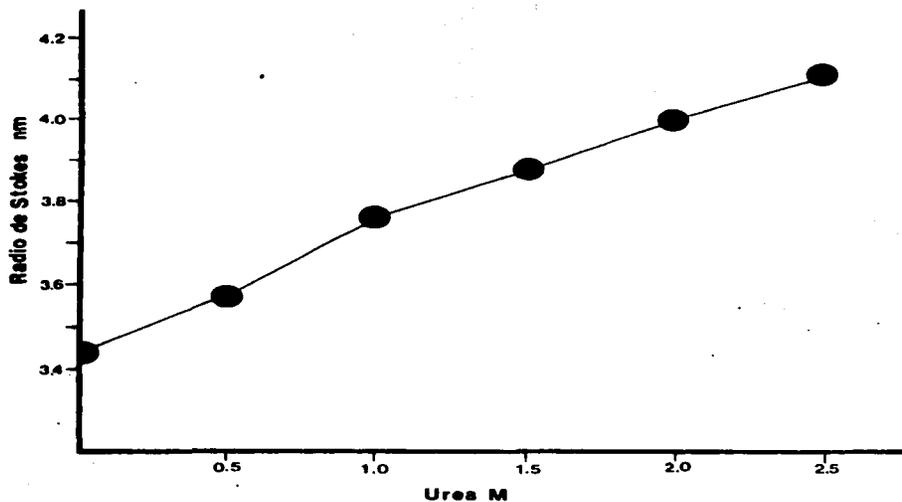


Figura 16. A) Cambio de los radios de Stokes correspondientes al dímero a distintas concentraciones de urea.

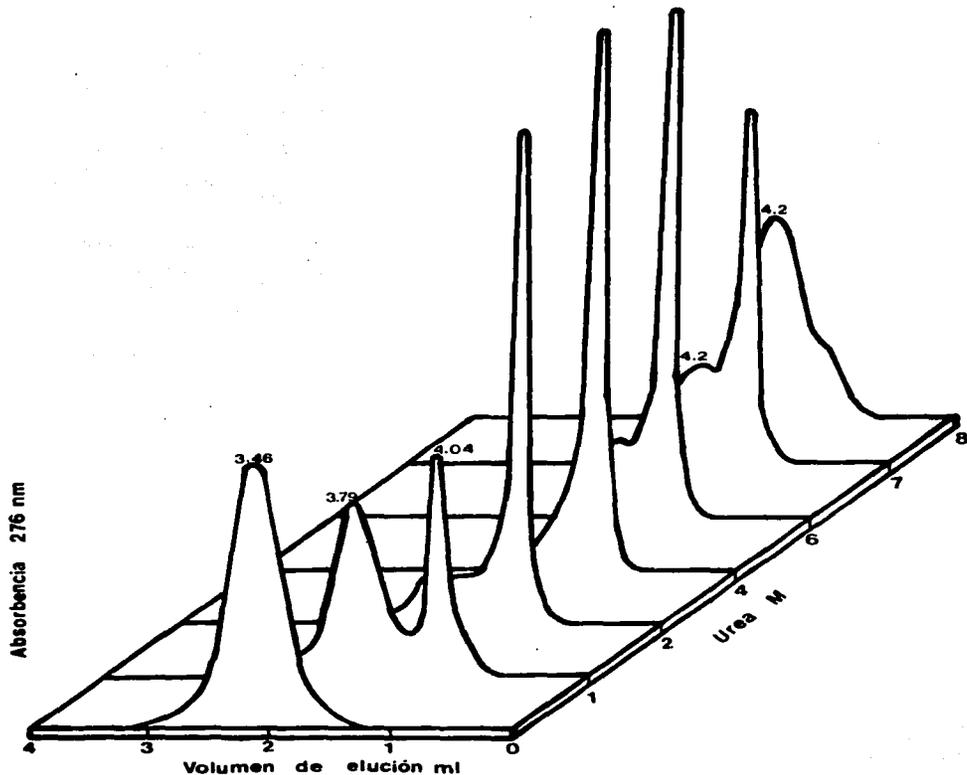


Figura 16. B) Perfiles de elución, de la columna de filtración, de la 17 β -HSD a distintas concentraciones de urea. Los números arriba de los picos indican los radios de Stokes.

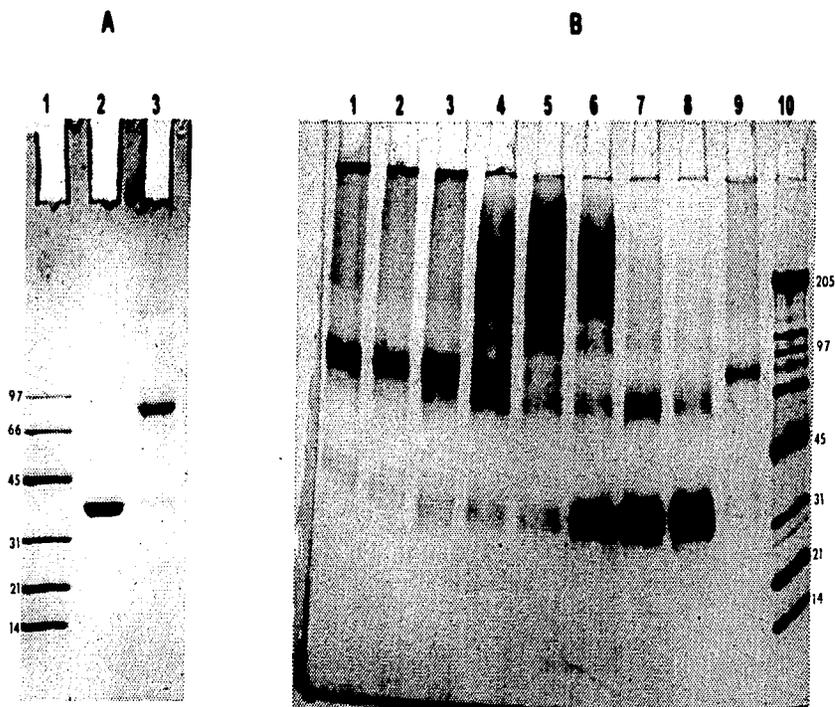


Figura 17. Patrón electroforetico de la 17 β -HSD en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, después del entrecruzamiento con glutaraldehído. (A) Marcadores de peso molecular (carril 1); enzima nativa (carril 2); enzima después del entrecruzamiento (carril 3). (B) 17 β -HSD incubada en urea 1-8 M (carriles 1-8, respectivamente) y entrecruzada con glutaraldehído; enzima nativa (carril 9); marcadores de peso molecular (carril 10).

Discusión.

La purificación de la 17 β -HSD de placenta humana se hizo en cinco pasos relativamente sencillos, que incluyen el uso de una columna de intercambio iónico y el de una columna de afinidad, este método permite obtener cantidades suficientes de enzima que permiten realizar los estudios estructurales que se trataron en este trabajo.

El uso de agentes desnaturizantes en los estudios de plegamiento de proteínas es un proceso bien documentado, sin embargo, en el caso de la urea el mecanismo de acción no es bien conocido, aunque muy probablemente su poder de desnaturalización resulta de una combinación de efectos. Por ejemplo, dos características generales están bien establecidas: este reactivo disminuye las interacciones hidrófobas que mantienen junta la estructura, y además, interactúa directamente con la proteína. En el caso de muchas proteínas oligoméricas, los resultados de estos estudios han mostrado que los cambios en la estructura durante la transición enzima nativa/ enzima desnaturalizada están acompañados, primero, por la disociación de sus subunidades.

En este trabajo se obtuvieron algunos datos que nos permiten profundizar en la conducta de desnaturalización de la 17 β -HSD de placenta humana inducida por urea (tabla 5).

El análisis hecho muestra que la desnaturalización sigue un patrón bastante complejo, como es de esperarse para una proteína oligomérica. Durante este estudio se observan principalmente los cambios en la estructura cuaternaria, pues la naturaleza de esta es dependiente de la concentración de urea, ya que, la enzima tiene un delicado balance de fuerzas no covalentes que, a la exposición de

[Urea]	1	2	3	4	5	6	7	8
Reversibilidad	+	+	+	-	-	+	+	+
Estado de agregación	Dímero	Dímero	Agregados	Agregados	Monómero	Monómero	Monómero	Monómero
Radio de Stokes	3.79	3.9	-	-	-	-	4.2	4.2

Tabla 5. Principales cambios durante la desnaturalización de la 17 β - estradiol deshidrogenasa.

ciertas concentraciones del agente desnaturizante se debilitan y rompen, logrando que la enzima se abra al menos parcialmente, lo que provoca la transición a conformaciones menos ordenadas que alteran el sitio activo de la enzima y causan la inactivación que, en muchos casos, puede ser reversible.

De esta manera, con la evidencia que se obtuvo en los experimentos, se pueden encontrar los siguientes cambios conformacionales: En el intervalo que va de 0.5 a 3M de urea, donde la actividad de la enzima es inhibida gradual pero reversiblemente, una transición conformacional es simultánea con la presencia de una serie de especies oligoméricas de mayor peso molecular que el dímero. Estas especies eluyen en el volumen de exclusión de la columna de filtración (sephacryl s-300), es decir son tan grandes que la columna no alcanza a resolverlas. Además, las medidas hidrodinámicas de las muestras de enzima en este intervalo de concentraciones de urea muestra un incremento gradual en los radios de Stokes de las especies diméricas, hecho que sugiere un estado en el cual la 17β -HSD se expande. Una hipótesis alternativa, que explique este incremento en los radios de Stokes, podría ser la existencia de un equilibrio rápido entre el dímero y el tetrámero, en el que se favorece este último por el incremento en las concentraciones de urea; sin embargo, esta explicación se puede desechar con la evidencia en los experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído, donde el tetrámero no aparece como forma predominante.

Además de estos cambios conformacionales y oligoméricos, la actividad de la enzima se puede recuperar completamente hasta 2.8M de urea aproximadamente, por medio de la dilución de este agente, hecho que sugiere que estos cambios son reversibles. Es interesante notar que la pérdida de actividad residual no coincide con el decremento en la abundancia de la enzima dimérica, lo que podría

indicar que algunos de los intermediarios poliméricos son al menos parcialmente activos, hecho que podría sugerir la presencia de un intermediario estable tipo glóbulo fundido.

La siguiente etapa en la desnaturalización de la 17 β -HSD, coincide con la inactivación irreversible de la enzima; que ocurre en el intervalo que va de 3 a 5M de urea. Esta transición no está acompañada de cambios conformacionales muy grandes. De hecho, en estas concentraciones el perfil de filtración (sephacryl S-300) de la enzima esta caracterizada por un pico asimétrico que eluye en el volumen muerto de la columna, y las especies diméricas no se detectan mas. Además la enzima entrecruzada muestra que en este intervalo la abundancia de agregados está al máximo. La actividad de las muestras a estas concentraciones es nula y ya no se recupera, lo que indica que a este nivel el sitio activo está irreversiblemente alterado y no funcional.

Por último un nuevo estado se observa a concentraciones de urea mayores a 5M. En este estado una conformación completamente abierta es alcanzada, y se observa la disociación de las moléculas de alto peso molecular, como se puede ver en los experimentos de filtración y entrecruzamiento. De tal manera, se puede apreciar que a 6M de urea una nueva especie, con un radio de Stokes de 4.2, aparece. Su abundancia relativa se va incrementando gradualmente hacia 8M de urea; simultáneamente, en los perfiles de filtración, el pico correspondiente a los agregados va disminuyendo aunque no desaparece completamente. Esta nueva especie corresponde al monómero desnaturalizado, hecho que se basa en la evidencia mostrada en la electroforesis en SDS-PAGE, y después del entrecruzamiento, donde se encuentra una banda de proteína que da un peso molecular de $33\ 000 \pm 2\ 800$, de aquí es evidente que la proteína en este estado esta completamente abierta y monomérica.

En general sobre la desnaturalización de la enzima, se puede destacar primero: la presencia de varios intermediarios de desnaturalización, heterogeneidad similar a la obtenida en otros estudios (30). Y segundo, la existencia de un paso limitante en la reversibilidad de la reacción de desnaturalización, pues aunque el monómero obtenido por la incubación en 8M de urea podría recuperar algo de su estructura secundaria y terciaria después de la dilución de la urea, el estado nativo nunca es recuperado, ya que, en un experimento adicional, se hizo la recromatografía en la columna de filtración y el resultado mostró un pico asimétrico que eluye en el volumen de exclusión, similar al pico obtenido con menores concentraciones del desnaturalizante y correspondiente a la enzima agregada.

El efecto de la urea en la estructura cuaternaria de la 17β -HSD es contrastante con el reportado para otras enzimas (38-41), donde la disociación de subunidades y la posterior desnaturalización de estas parece ser el principal esquema de desnaturalización. Un modelo alternativo a este esquema puede armarse si se toman en cuenta los cambios de hidrofobicidad en el medio debidos a la urea. De esta manera a bajas concentraciones de urea (hasta 2.8M aproximadamente) hay un incremento moderado en la hidrofobicidad del medio que induce la pérdida parcial de la estructura nativa, exponiendo más área hidrofóbica y residuos de aminoácidos normalmente encubiertos; las especies resultantes son inestables bajo estas condiciones, lo que provoca la formación de los distintos oligómeros, como podemos ver con el entrecruzamiento y los perfiles de elución de la cromatografía donde parece haber una expansión de la enzima y comienza a aparecer el pico correspondiente a los agregados.

A concentraciones altas de urea, el incremento de la hidrofobicidad es muy grande y resulta en la disociación y apertura de la enzima, en este intervalo de concentraciones del desnaturizante, el monómero abierto parece ser la especie más estable.

El hecho de que la agregación de la estradiol deshidrogenasa fue revertido sólo con el aumento de las concentraciones de urea, habla de la carencia de fuerzas covalentes en este esquema (a excepción de la estructura primaria). Así, las interacciones hidrofóbicas deben ser el eje principal durante la agregación de la enzima. El rendimiento y velocidad de la reconstitución dependen de la desnaturalización así como de las condiciones de los disolventes durante la renaturalización. La principal reacción paralela que tiene que ver con la reconstitución es la formación de agregados generados por las interacciones moleculares débiles de los grupos que en la molécula nativa están involucrados en los contactos intramoleculares o interdominios.

Con respecto a la causa del paso de irreversibilidad en este esquema, se debe buscar en la incapacidad de los agregados para regresar a la estructura del dímero nativo; en este sentido, se realizó un experimento adicional en donde una muestra de la enzima incubada a 8M de urea como se describió en los métodos, se dializó exhaustivamente, y mostró un perfil de elución, en la columna de filtración, donde sólo se muestra un pico en el volumen excluido, similar al mostrado por la enzima agregada.

Para profundizar en los resultados obtenidos en este trabajo se podrían determinar los cambios en la estructura secundaria y terciaria utilizando técnicas como. dicroísmo circular, fluorescencia intrínseca, y medidas de hidrofobicidad con ácido-1-anilino-naftaleno-8-sulfónico (ANS), a fin de correlacionar estos cambios con los ocurridos en el estado de agregación.

Conclusiones.

Basados en la evidencia experimental, la transición enzima nativa/ enzima desnaturalizada de la 17 β -HSD en urea se puede resumir de la siguiente manera.



Urea: 0-3M 3-5M 5-8M

Donde N es la enzima nativa en su estado dimérico; y A, la enzima agregada, estos dos estados son reversibles, tanto que por la simple dilución de la urea se puede recuperar la estructura nativa y su actividad; A*, es la enzima agregada a concentraciones de urea de 3-5M, en este estado la enzima se inactiva irreversiblemente. Así aunque A y A* sean estados poliméricos de la enzima, el estado conformacional debe de ser distinto. M, es el monómero completamente desnaturalizado, resultado de la disociación.

El hecho de que la desnaturalización por urea de la 17 β -HSD de placenta humana promueva la transición de un dímero nativo a un estado agregado y finalmente al monómero desnaturalizado, sugiere que el estado nativo de la proteína es estabilizado casi exclusivamente por interacciones hidrofóbicas en la interfase de las subunidades y no por fuerzas de naturaleza covalente.

Bibliografía.

- 1.-Jaenicke, R. 1987. Folding and association of proteins. Prog. Biophys. Molec.Biol. 49:117-237.
- 2.-Rossman, M. G., y Argos, P. 1981. Protein folding. Ann. Rev. Biochem. 50: 497-532.
- 3-Richardson, J., Richardson, D. (1989) en Prediction of protein structure and the principles of protein conformation (Fasman, G.D, Ed) pp.1-98, Plenum Press New York y London.
- 4- Voet, D.,y Voet, J.(1990) Biochemistry. 1223p. Wiley & sons.
- 5-Anfinsen, C.B., y Scheraga, H.A. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. Adv. Protein Chem. 29: 205-300.
- 6-Creighton, T. E. 1990. Protein folding. Biochem. J. 270: 1-16.
- 7-Dill, K. A. 1991. Denatured states of proteins. Annu. Rev. Biochem. 60: 795-825.
- 8-Jaenicke, R., y Rudolph, R. 1986. Refolding and association of oligomeric proteins. Methods. Enzymol. 131: 218-251.
- 9-Jaenicke, R., y Rudolph, R. (1989). Folding proteins, en Protein structure: A practical approach (Creighton T.E., Ed.) pp.191-224, IRL press, Oxford, New York, Tokyo.
- 10-Williamson, D.G.(198). Biochemistry of steroid 17-Hidroxyteroid dehydrogenases, en Steroid biochemistry (Hobkirk, R., Ed.) pp. 83-110.CRC.
- 11-Martel,C., Rheaume,E., Takahashi,M., Trudel,C., Couët,J., Luu-The, V.,Simard,J., y, Labrie, F. 1992. Distribution of 17 β -hidroxysteroid dehydrogenase, gene expression and activity in rat and human tissue. J.Steroid. Biochem. Molec. Biol. 41: 597-603.
- 12-Gower, D.B. (1988) en Hormones and their action, part I (Cooke, B.A., King, R.J., y van der Molen, H.J., Eds.)pp. 3-29. Elsevier Amsterdam, New York, Oxford.
- 13- Norman, W.A., y Litwack G., 1987. Hormones. Academic Press Inc. 806 pp.

- 14-Blomquist, C. H. 1995. Kinetic analysis of enzymic activities: prediction of multiple forms of 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 55: 515-524.
- 15- Langer, L. J., y Engel, L. L. 1958. Human placental estradiol -17 β -dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 233: 583-588.
- 16-Jarabak, J., 19. Soluble 17 β -hydroxysteroid dehydrogenas of human placenta. *Methods Enzymol.* 39:746-752.
- 17-Reed, M. J. 1991. Oestradiol-17 β hydroxysteroid dehydrogenase: its family and finction. *J. Endocrinol.* 129: 163-165.
- 18-Luu-The, V., Zhang, Y., Poirer, D., y Labrie F. 1995. Characteritics of human type 1, 2 and 3 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activities: Oxidation/reduction and inhibition. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 55: 581-587.
- 19-Adamski, J., Normand, T., Leenders, F., Monté, D., Begue, A., Stéhelin, D., Jungblut, P. W., y launoit, Y. 1995. Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem. J.* 311: 437-443.
- 20-Krosowski, Z. 1992. 11 β -Hydroxysteroid dehidrogenase and short-chain alcohol dehydrogenase (SCAD) superfamily. *Molec. Cell. Endocrinol.* 84: C25-C31.
- 21-Krozowski, Z. 1994. The short-chain alcohol dehydrogenases superfamily: variations on a common theme *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 51: 125-130.
- 22-Persson, B., Krook, M., y Jörnvall, H. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzyymes. *Eur. J. Biochem.* 200:537-543.
- 23-Petoteko, H., Isomaa, V., Mäentausta, O., y Vihko, R. 1988. Complete aminoacid sequence of human placental 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett.* 239: 73-77.
- 24-Engel, L. L., y Groman, E. V. 1974. *Recent. Prog. Horm. Res.* 30: 139-169.

- 25-Strickler,R.C., y Tobias, B. 1980. *Steroids*, 36:243-253.
- 26-Mendoza-Hernández,G., Calcagno,M.,Sánchez-Nuncio,H.R, y Díaz-Zagoya, J.C. 1984. Dehydroepiandrosterone is a substrate for estradiol 17 β -dehydrogenase from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 119: 83-87.
- 27-Ghosh, D., Pietnev, V.Z., Zhu, D.-W.,Wawrzak,Z., Duax,W.L., Pangborn,W., Labrie,F., y Lin,S.-X. 1995. Structure of human estrogenic 17 β - Hydroxysteroid dehydrogenase at 2.20 Å resolution. *Structure*.3: 503-513.
- 28-Breton R.,Housset D., Mazza C., y Fontecilla-Camps J.C. 1996. the structure of a complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADP⁺ identifies two principal targets for de design of inhibitors.*Structure*. 4: 905-915.
- 29-Jarabak, J., Seeds A. E., y Talalay P. 1966. Reversible cold inactivation of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase of human placenta: protective effect of glycerol. *Biochemistry*. 5: 1269-1278.
- 30-Janson, J.-CH., Rydén, J.(Eds.): 1989. Protein purification. 502 pp. VCH.
- 31-Scopes R.(1982). Protein purification: Principles and practice. 282 pp. Springer-Verlag, New York, Heidelberg Bertin.
- 32-Volkin, D. B., y Klibonov, A. M.(1990) en Protein function: A practical approach (Creighton, T.E., Ed.) pp.1-24, IRL press, Oxford, New York, Tokyo.
- 33-Wong, S.S.1991. Chemistry of protein conjugation and cross-linking. CRC-Press. 340 pp.
- 34- Mendoza, H. G., Rendón, J.L., y Díaz, Z. J.C.1985. A single step procedure for purification of estradiol 17 β -dehydrogenase from human placenta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 477-481.
- 35-Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., y Randall, R.J. 1951. protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- 36-Laemmli, U.K.1970.Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T4. *Nature*.227: 680-685.
- 37-Siegel L. M., y Monty J. K.1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hidrxylamine reductases. *Biochim. Biophys. Acta*. 112: 346-362.
- 38-Erichman, J.,Rubin,Ch.S.,y Rosen, M.O. 1973. Physical properties of a purified cycle Adenosine 3': 5' monophosphate dependent protein kinase from bovine heart muscle. 248: 7607-7609.
- 39-Liu, D., Feinman, R.D., y Wang, D. 1987. *Biochemistry*. 26: 5221-5226.
- 40-Findlay, W.A., y Mackenzie, R.E. 1987. Dissociation of octameric bifunctional enzyme Forminotransferase-cyclodeaminasa in urea. Isolation of two monofunctional dimers.*Biochemistry*. 26: 1948-1954.
- 41-Le Bras, G., Teschner, W., Deville-Bonne, D., y Garel J.-R. 1989. *Biochemistry*. Urea induced inactivation, dissociation, and unfolding of allosteric phosphofrutokinase from *Escherichia coli*. 28: 6836-6841.