

03081

9
21



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

ESTABILIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctor en Investigación Biomédica Básica

p r e s e n t a

JUAN LUIS / RENDON GOMEZ

México, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTABILIDAD DE LA GLUTATION REDUCTASA EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la estabilidad cinética y estructural de la glutatión reductasa (NAD[P]H: GSSG oxido reductasa EC 1.6.4.2.) de la cianobacteria *Spirulina maxima* empleando como agentes desnaturalizantes cloruro de guanidinio (Gdn-Cl), urea y calor.

La incubación de la enzima en soluciones de concentración variable de Gdn-Cl o urea da como resultado la pérdida gradual de la actividad, con los puntos medios de la transición ($C_{1/2}$) localizados en 0.36 M y 4.5 M, respectivamente. La remoción por dilución del compuesto desnaturalizante resulta en la reactivación de la enzima. Sin embargo, mientras que aquellas alícuotas de la enzima preincubadas en la urea se reactivan al 100 %, independientemente de la concentración de esta última, en Gdn-Cl la recuperación de la actividad sólo es total hasta 2.8 M.

El análisis estructural mediante técnicas espectroscópicas de la enzima inactivada puso de manifiesto que la inactivación reversible inducida por ambos compuestos no es debida a la desnaturalización de la proteína, sino a cambios conformacionales sutiles, que muy probablemente involucran al sitio activo. Aunque la inactivación por urea va acompañada de la disociación de la enzima tetramérica en dímeros, no se observó una correlación entre la actividad residual y el porcentaje de la especie tetramérica, lo que sugiere que el dímero también es catalíticamente activo.

En soluciones de Gdn-Cl mayores a 2.8 M la glutatión reductasa es inactivada gradualmente en forma irreversible, con una $C_{1/2}$ en 3.4 M. Dicha inactivación es concomitante con la pérdida de las estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria de la proteína; sin embargo, el análisis hidrodinámico puso de manifiesto la existencia de intermediarios. En Gdn-Cl 4 M la enzima existe como una mezcla de dímeros y monómeros parcialmente desnaturalizados en equilibrio.

La desnaturalización térmica de la glutatión reductasa resultó ser un proceso complejo. En una primera etapa, la proteína tetramérica se disocia en dímeros, y es esta última especie la que sufre la desnaturalización térmica. En este sentido, los estudios calorimétricos revelaron que dicho proceso es irreversible, parcial y acompañado de agregación de la proteína, amén de que la magnitud y posición de la endoterma resultaron ser dependientes de la velocidad de calentamiento. El calentamiento de la enzima en presencia de concentraciones no desnaturalizantes de Gdn-Cl (≤ 2.8 M) permitió observar la desnaturalización completa de la misma. Los resultados anteriores llevaron a proponer un modelo en el que la proteína dimerica sufre un desdoblamiento parcial de su estructura en un proceso controlado cinéticamente, de tal manera que los parámetros termodinámicos dependen de la velocidad de calentamiento.

El calentamiento de la enzima en presencia de NADPH disminuyó considerablemente su termoestabilidad, tanto catalítica como estructural. La $T_{1/2}$, evaluada por la actividad enzimática, se desplaza desde 71°C en ausencia de NADPH hasta 44°C en 500 μ M NADPH. En forma similar, tanto el perfil calorimétrico como la T_m se modifican notablemente en presencia de NADPH. En base a la información cristalográfica disponible, se plantea la hipótesis de que la menor termoestabilidad de la enzima en presencia del nucleótido es resultado del solvente desplazado durante su unión a la proteína.

STABILITY OF GLUTATHIONE REDUCTASE IN THE PRESENCE OF DENATURING AGENTS

SUMMARY

In the present work both the kinetic and the structural stability of glutathione reductase (NAD(P)H: GSSG oxidoreductase EC 1.6.4.2.) from cyanobacterium *Spirulina maxima* was studied by using guanidinium hydrochloride (Gdn-Cl), urea and heat as denaturing agents.

Incubation of the enzyme in solutions of varying concentrations of either Gdn-Cl or urea resulted in a gradual loss of its activity, with the transition midpoints ($C_{1/2}$) located at 0.36 M and 4.5

M, respectively. Removal of denaturing compound by dilution resulted in recovery of enzyme activity. Full reactivation was obtained for enzyme samples preincubated in urea solutions. By contrast, full recovery of activity was only obtained for Gdn-Cl concentrations up to 2.8 M.

Structural analysis of the inactivated enzyme studied by spectroscopic techniques, revealed that reversible inactivation produced by either Gdn-Cl or urea was not due to unfolding, but instead to slight conformational changes, probably involving the active site. Although the urea-dependent inactivation was concomitant with the dissociation of tetrameric enzyme into dimers, a correlation between residual activity and tetramer abundance was not observed, suggesting dimer is catalytically active.

In Gdn-Cl solutions higher than 2.8 M glutathione reductase was irreversibly inactivated, with $C_{1/2}$ located at 3.4 M. Such inactivation was accompanied by the loss of quaternary, tertiary and secondary structures. However, hydrodynamic analysis revealed the presence of intermediaries. At 4 M Gdn-Cl an equilibrium between partially unfolded dimer and monomer exists.

Thermal denaturation of glutathione reductase revealed to be a complex process. In a first step, tetrameric protein was dissociated into dimers, being the latter the species involved in the transition of the thermal unfolding. Calorimetric studies revealed that the process was irreversible, partial and concomitant with the aggregation of the protein. Further, a dependence of both the position and size of the endotherm on heating rate was observed. In the presence of non-denaturing concentrations of Gdn-Cl (≤ 2.8 M) a full thermal unfolding of the enzyme was obtained. Based on the above results, a model in which the dimeric protein is partially denatured in a kinetically controlled process was proposed.

In the presence of NADPH, the enzyme showed a lower thermostability. Based on the kinetic data, $T_{1/2}$ was shifted from 71°C in the absence to 44°C in the presence of 500 μ M NADPH. The calorimetric profile was also modified. Based on the available crystallographic data, a model is proposed in which displacement of solvent from the binding site of the nucleotide results in a more labile species.

La presente tesis se realizó en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina (UNAM) y en el laboratorio de Biofísicoquímica del Departamento de Química (UAM Iztapalapa) bajo la dirección del Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las siguientes personas, sin cuya ayuda no habría sido posible la terminación exitosa de esta tesis:

Al Dr Guillermo Mendoza Hernández, cuyo apoyo en la realización de los experimentos cromatográficos y electroforéticos permitió obtener datos de una gran calidad.

A los Dres. Arturo Rojo Domínguez y Andrés Hernández Arana, del laboratorio de Biofísicoquímica de la UAM (Unidad Iztapalapa), por haber aceptado el realizar trabajo en colaboración y por sus fructíferas sugerencias y discusiones en la interpretación de los datos calorimétricos.

A los Dres. Armando Gomez Puyou y Mario Calcagno, por sus valiosas sugerencias como parte del comité tutorial.

A los miembros del jurado: Dres. Marietta Tuena, Alberto Huberman, Edmundo Chávez, Rogelio Rodríguez, Wilhelm Hansberg y Arturo Rojo, por haber aceptado formar parte del jurado y cuyos comentarios y sugerencias contribuyeron a mejorar el manuscrito final.

Al amigo Oscar Flores Herrera, por su paciencia y ayuda en el manejo adecuado de la computadora.

Finalmente, quiero extender un reconocimiento especial a la Dra. Concepción Agundis mata así como a los Dres. Juan Cuauhtémoc Díaz Zagoya y Federico Martínez Montes, quienes en algún momento de mi carrera me brindaron su apoyo desinteresado. Particularmente quiero agradecer al Dr. Federico Martínez el haberme permitido ocupar un espacio en su laboratorio.

A la memoria de mi padre y a mi madre, quienes me dieron la oportunidad de acceder al más grande tesoro al que puede aspirar un ser humano.

A mis hijos Juan Francisco y Alejandra, por ser la luz de mi vida y permitirme disfrutar de nuevo esa etapa maravillosa de la vida.

A mi esposa Sara, por todos los momentos maravillosos que hemos vivido juntos.

"La técnica y la industria nos imponen por sus realizaciones deslumbrantes, su brillo, su estrépito, sus productos relucientes, lo mismo que un gran río nos impone por los barcos que navegan por él y por los majestuosos puentes que lo atraviesan. ¿Pero de donde vienen esos ríos? De fuentes invisibles, que brotan en lo alto y a lo lejos en las montañas tranquilas y en regiones rara vez transitadas. Así fluyen las fuerzas, las ideas y las fórmulas para todas las ciencias aplicadas y las ramas económicas, la medicina y la higiene, la agricultura y la zootecnia, la construcción de motores y la producción química: de las fuentes de la ciencia pura, que lejos de la vida y sin ninguna finalidad se cultiva por el gusto propio, como el arte. Sus adeptos se dedican a ella como un sacerdocio y no necesitan ningún estímulo. Conocen y saborean el placer único de la investigación. Ella es, como está escrito sobre las universidades de la antigüedad, el *Abraz Mater*, la madre espiritual de la humanidad."

Fritz Kahn

tomado de "El libro de la Naturaleza"

ABREVIATURAS

$C_{1/2}$	Concentración requerida para obtener el 50 % de inhibición
DC	Dicroísmo circular
DTNB	Acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico
ΔH_{cal}	Cambio de entalpía determinado calorimétricamente
ΔG	Cambio de energía libre
EDTA	Acido etilendiamino tetracético
Gdn-Cl	Cloruro de guanidinio
GSSG	Disulfuro de glutatión
I	Intermediario inactivo no desnaturalizado
J	Joule
M_r	Masa molecular relativa
N	Conformación nativa
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
NADPH	Fosfato de nicotinamida adenin dinucleótido (forma reducida)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
R_s	Radio de Stokes
$S_{20,w}$	Coefficiente de sedimentación
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T_m	Temperatura en el máximo de la transición
$T_{1/2}$	Temperatura a la mitad de la transición
Θ	Elipticidad del residuo

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	10
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS	15
DISCUSION	40
CONCLUSIONES	49
REFERENCIAS	50
ANEXOS	53

INTRODUCCION

Las proteínas constituyen, indudablemente, el conjunto de biomoléculas más versátil, ya que desempeñan un gran número de funciones en el metabolismo celular. Tal versatilidad es posible gracias al inmenso número de arreglos tridimensionales que pueden adoptar las cadenas polipeptídicas, lo que a su vez es el resultado de una variedad potencialmente infinita de estructuras primarias. Dentro de dicho conjunto, las enzimas pueden considerarse como el grupo de proteínas más heterogéneo, ya que debido a su alta especificidad en la interacción con uno o unos cuantos tipos de moléculas (sustratos), se hace necesaria la presencia de una enzima particular para catalizar cada una de las múltiples reacciones que constituyen el metabolismo celular.

El conocimiento detallado de la acción química de cada enzima ha requerido del empleo de un gran número de metodologías, tales como las técnicas de purificación de proteínas, modificación química de residuos específicos, difracción de rayos "X", etc. Tales estudios han permitido que, a la fecha, se disponga de un esquema claro y detallado sobre el mecanismo químico y cinético de una gran variedad de enzimas. Concomitante con dichos estudios, se ha recabado una gran cantidad de información sobre la naturaleza y magnitud de las fuerzas responsables de darle estabilidad a moléculas tan complejas como lo son las proteínas. Si bien Anfinsen demostró, en 1957, que la secuencia de aminoácidos contiene la información necesaria para que una cadena polipeptídica adopte la conformación característica del estado nativo [1], no era claro cuáles eran las fuerzas involucradas en conferirle estabilidad a dicho estado.

Desnaturalización Química

Desde el punto de vista de la química de polímeros, las proteínas deben ser consideradas como heteropolímeros [2], dada la naturaleza diversa de los grupos químicos que constituyen las cadenas laterales de los aminoácidos. Esto dificultó, en un principio, el análisis fisicoquímico de la estabilidad global de una proteína, ya que la concurrencia simultánea de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos en la misma cadena, evitó el que ésta pudiera ser analizada simultáneamente como un todo. Debe tenerse presente que la función biológica de las proteínas se lleva a cabo en un ambiente acuoso, por lo que la interacción del agua con los diversos componentes de una cadena polipeptídica desempeña un papel determinante en la estabilidad de tales macromoléculas. Sin embargo, debido a la polaridad heterogénea de las cadenas laterales, no puede decirse que el agua sea un buen solvente para las

proteínas; de hecho, el colapso de la cadena polipeptídica hacia la conformación nativa y la estabilidad de ésta en un medio acuoso, tiene su origen en la repulsión del agua por los residuos no polares (el llamado "efecto hidrofóbico").

Los trabajos pioneros de Kauzmann [3] y Tanford [4,5], sentaron las bases para alcanzar un entendimiento claro, en términos termodinámicos, de las fuerzas involucradas. En este sentido, los estudios con compuestos modelo permitieron obtener información cuantitativa sobre la energía libre asociada a la transferencia de ciertos grupos químicos, desde el agua hacia solventes de composición conocida [6-8]. Entre los solventes utilizados en tales estudios, las soluciones de urea y Gdn-Cl jugaron un papel importante.

Urea y Cloruro de Guanidinio. Desde su descubrimiento como compuestos capaces de perturbar la conformación nativa de las proteínas [9,10], la urea y el Gdn-Cl han sido ampliamente utilizados para investigar la estabilidad de una gran variedad de proteínas [11]. Si bien los dos compuestos mencionados gozan de gran popularidad como agentes desnaturalizantes, no son los únicos que han sido utilizados. Así, también se han empleado otras sales de guanidinio [12] y diversos derivados de la urea [13,14], difiriendo entre sí en cuanto a su poder desnaturalizante.

Aunque los primeros sistemas modelo que se utilizaron en este tipo de estudio fueron proteínas relativamente simples - es decir, proteínas constituidas por una sola cadena polipeptídica formada de un número relativamente pequeño de residuos - posteriormente se incluyeron proteínas más complejas, de tal manera que a la fecha se dispone de una gran cantidad de información acerca de la estabilidad de tales macromoléculas. Llama la atención el hecho de que, pese a su uso extendido como agentes desnaturalizantes efectivos, no existe a la fecha un modelo que permita explicar adecuadamente la acción de tales compuestos sobre la estabilidad de las proteínas. Los modelos disponibles [15,16] se basan en los cálculos de energía libre ligados a la transferencia de las distintas cadenas laterales de los aminoácidos, entre el agua y soluciones acuosas del compuesto desnaturalizante correspondiente. Basado en tal información, y suponiendo que la interacción de la urea o el Gdn-Cl con la proteína involucra sitios de unión semejantes e independientes, Tanford calculó constantes de asociación para ambos compuestos, así como el número de sitios de unión para los estados nativo y desnaturalizado de la proteína [5].

Recientemente se ha cuantificado, mediante calorimetría, el calor liberado como resultado de la interacción entre la urea o el Gdn-Cl y diversas proteínas [17]. Los resultados de dicho estudio

fueron interpretados en términos de un modelo de enlace con sitios de unión similares e independientes, en donde la interacción del compuesto desnaturizante con la proteína se da a través de puentes de hidrógeno con varios grupos polares de la misma. Aunque en dicho trabajo no se profundiza más en la naturaleza de tales interacciones, existen evidencias que sugieren que los mecanismos mediante los cuales actúan la urea y el Gdn-Cl son diferentes. Analizando cristales de quimotripsina previamente expuestos a soluciones de urea o Gdn-Cl, se observó que mientras la urea es capaz de unirse a residuos tanto de la superficie como del interior de la proteína, el Gdn-Cl sólo interactúa a nivel de la superficie [18]. De hecho, se menciona que la urea está involucrada en dos tipos de interacciones, una de las cuales causa cambios estructurales a la proteína.

Es interesante mencionar que, en el caso de algunas proteínas, la incubación con compuestos desnaturizantes conduce a la pérdida de la actividad biológica correspondiente [19-21]. Aunque éste es el resultado esperado *a priori*, lo interesante de dicho fenómeno es que ocurre a concentraciones inferiores a las requeridas para provocar la desnaturización; ello sugiere que la acción de tales compuestos no es homogénea en toda la proteína, sino que pueden actuar con mayor efectividad en regiones localizadas del polipéptido, probablemente en aquellas que poseen un mayor grado de flexibilidad. El hecho de que el sitio donde se localiza la actividad biológica de muchas proteínas presente tal propiedad [22] explica el por qué los compuestos desnaturizantes pueden inhibir completamente la actividad sin provocar cambios conformacionales notables.

Desnaturización Térmica

Además de los compuestos desnaturizantes ya mencionados, el calor también ha sido utilizado en el estudio de la estabilidad de las proteínas [23-25]. La determinación del perfil de desnaturización térmica de una proteína permite evaluar la entalpía de van't Hoff asociada al proceso a través de la dependencia de la constante de equilibrio respecto de la temperatura. Con el desarrollo de la calorimetría diferencial de barrido [26,27], se hizo posible medir directamente la energía correspondiente a la desnaturización térmica de una proteína, lo que permitió cuantificar con precisión, no sólo el calor absorbido durante el proceso (ΔH_{cal}), sino además obtener información sobre la posible existencia de intermediarios en la ruta de desnaturización, gracias al conocimiento de las entalpías calorimétrica y de van't Hoff [28]. En casos excepcionales ha sido posible, incluso, asociar picos calorimétricos con el desdoblamiento de dominios particulares de la proteína [29,30].

Aunque el análisis termodinámico estricto de los datos calorimétricos requiere que durante la desnaturalización de la proteína se mantenga el equilibrio entre las conformaciones nativa y desnaturalizada - lo que se presenta por lo general únicamente en proteínas monoméricas pequeñas - recientemente se han propuesto métodos analíticos que permiten extraer información de los perfiles asociados con transiciones irreversibles [31,32]. Ello ha sido particularmente útil en el estudio de las proteínas oligoméricas, caracterizadas por una desnaturalización térmica esencialmente irreversible.

Se ha demostrado en algunas proteínas que el producto resultante de la acción del calor retiene un contenido significativo de estructuras ordenadas [33-35], contrastando en este sentido con los productos obtenidos por agentes químicos.

Metodologías Utilizadas en el Estudio de la Desnaturalización de las Proteínas.

La transición que sufre una proteína al ser desnaturalizada implica cambios conformacionales considerables, que se traducen en la pérdida total de la estructura tridimensional característica del estado nativo. Tales cambios conformacionales son susceptibles de ser detectados por diversas técnicas, que permiten evaluar los cambios sufridos por una proteína en sus diferentes niveles de organización. A grandes rasgos, dichas técnicas pueden ser agrupadas en dos categorías: hidrodinámicas y espectroscópicas.

1) **Métodos hidrodinámicos.** Estos métodos implican el análisis de una solución de proteína cuando se sujeta a una fuerza externa, de manera que se da un transporte neto de la proteína desde un punto de la solución a otro. Dentro de ésta categoría se incluyen:

- a) Cromatografía de filtración en gel [36].
- b) Ultracentrifugación analítica [37].
- c) Electroforesis en gradientes transversos de urea [38].

Los parámetros hidrodinámicos de una proteína (radio de Stokes, viscosidad intrínseca, coeficiente de sedimentación) se ven alterados a tal grado en presencia de un agente desnaturalizante [39-41], que es posible sacar conclusiones respecto de los cambios estructurales "gruesos" sufridos por la misma, tales como el estado de agregación o el grado de desdoblamiento sufrido por la cadena polipeptídica. Así, la desnaturalización total de una proteína monomérica va acompañada de un aumento considerable en el volumen hidrodinámico, lo que se traduce en un aumento del R_s y $[\eta]$; sin embargo, el mismo proceso implica un incremento en el coeficiente de fricción translacional, por

lo que el coeficiente de sedimentación se ve disminuido [39]. En el caso de las proteínas oligoméricas los cambios son más complejos, ya que se añaden los cambios en la estructura cuaternaria (sea disociación ó agregación).

2) **Métodos espectroscópicos.** El fundamento común a estos métodos radica en la interacción de la proteína con radiación electromagnética de ciertas características, evaluando la modificación que sufre ésta al pasar a través de la solución de proteína. En este conjunto de técnicas se incluyen:

a) Espectroscopia de fluorescencia [42].

b) Dicroísmo circular [43].

c) Espectroscopia de absorción [44].

El nivel de precisión que es posible alcanzar con estos métodos ha permitido su utilización en el análisis cuantitativo del proceso de desnaturalización, a tal grado que incluso se han hecho estimaciones sobre la estabilidad de una gran diversidad de proteínas [11,45-47]. Cabe mencionar que la validez de dicho análisis depende de la reversibilidad total de la transición entre el estado nativo y el estado desnaturalizado. A diferencia de los métodos hidrodinámicos, los métodos espectroscópicos permiten rastrear cambios conformacionales en regiones localizadas de la proteína [48,49].

Generalidades de la Glutatión Reductasa.

La glutatión reductasa (NAD(P)H:GSSG oxido-reductasa EC 1.6.4.2.) es una flavoproteína que pertenece al grupo de las disulfuro reductasas [50]; su función consiste en regenerar el glutatión reducido a través de la reacción:



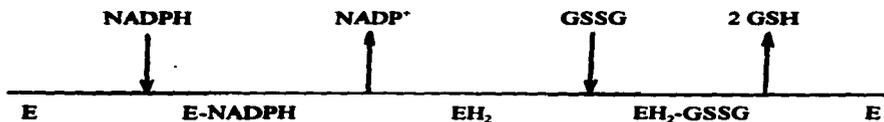
empleando como reductor el NADPH generado en la vía de las pentosas. A pH 7.0, la constante de equilibrio de la reacción es de 2×10^5 mM, por lo que en condiciones fisiológicas es esencialmente irreversible [51]. Descubierta en 1935 por Meldrum y Tarr en extractos de eritrocito [52], esta enzima ha sido purificada desde entonces en una gran variedad de organismos, tanto procariotos [53-55] como eucariotos [56-60]. Destaca su ausencia en el grupo de las Archeobacterias, organismos que por carecer de la enzima glutatión sintetasa, son incapaces de formar el tripéptido [61].

Los trabajos con la glutatión reductasa del eritrocito humano han sido particularmente significativos, ya que la obtención de cristales aptos para estudios de difracción de rayos X [62,63]

ha permitido obtener una gran cantidad de información sobre aspectos estructurales y mecanísticos [64-66]. La enzima es una proteína dimérica que pertenece a la clase α/β , con una masa molecular relativa de 110 kDa; ambas subunidades son idénticas y se encuentran dispuestas en torno a un eje de simetría binario (Fig. 1a). En el caso particular de la glutatión reductasa del eritrocito humano, existen un par de cisteínas (cys 90 y 90') cuyos grupos sulfhidrilo se proyectan hacia la interface de contacto [67], dando como resultado la formación de un puente disulfuro intercatenario; en contraste, la enzima de *Escherichia coli* carece de los residuos mencionados [68], por lo que no existe unión covalente entre ambas subunidades.

En lo que atañe a la estructura de las subunidades, destaca el hecho de que cada cadena polipeptídica se encuentra arreglada en cuatro dominios estructurales [64]; estos son, comenzando por el extremo amino terminal: a) el dominio donde se localiza el grupo prostético FAD (residuos 19 a 157); b) el dominio de unión del NADPH (residuos 158 a 293); c) el dominio central (residuos 294 a 364) y d) el dominio de interface (residuos 365 a 478). Un aspecto interesante de la glutatión reductasa es el hecho de que cada uno de los dos sitios activos de la enzima se ubican en la región de interface, e involucran residuos de ambas subunidades [65,69]. Destacan por su participación en el ciclo catalítico las cisteínas 58 y 63, así como la histidina 467 [66]. Como corolario de lo anterior, los monómeros aislados son catalíticamente inactivos.

En cuanto al mecanismo de la reacción catalizada, la glutatión reductasa sigue típicamente un patrón cinético ping-pong bi bi [70] que se resume en el siguiente esquema:



Dicho modelo implica la reducción del grupo prostético por parte del NADPH para dar lugar a una forma modificada de la enzima (EH₂) que es la involucrada directamente en la reducción del GSSG. Aunque se han descrito algunas variantes del patrón mostrado [71,72], para los fines del presente trabajo es suficiente con el esquema más simple.

Si bien los aspectos estructurales y mecanísticos de la glutatión reductasa han sido

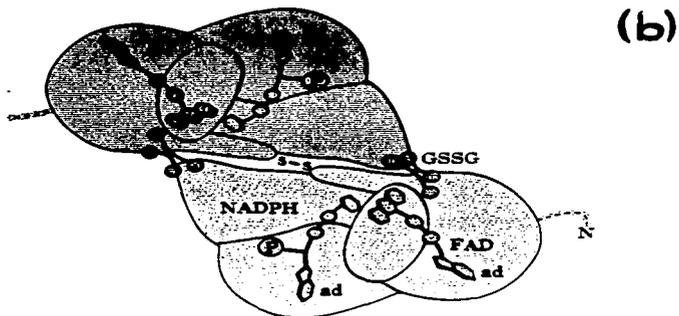


Figura 1. Estructura tridimensional de la glutatión reductasa vista a lo largo del eje de simetría binario. a) Esqueleto polipeptídico de la enzima sin mostrar las cadenas laterales y con las dos subunidades idénticas en diferente color. b) Representación esquemática de la enzima mostrando la organización en dominios así como los sitios de unión del grupo prostético (FAD) y de los sustratos.

extensamente estudiados, existe muy poca información sobre la estabilidad de la enzima. Los datos disponibles en este sentido son escasos y dispersos, limitándose siempre a indagar la estabilidad catalítica de la enzima a una concentración única de desnaturizante. Los resultados publicados sugieren que es una enzima relativamente resistente a la acción de los agentes desnaturizantes. Así, la glutatión reductasa de hígado de conejo retiene el 98 % de la actividad control después de incubarla durante 5 min en urea 8 M [59]; dicho porcentaje disminuye a 21 % si en lugar de urea se utiliza Gdn-Cl 4 M. Utilizando las mismas condiciones, se reportó una estabilidad prácticamente idéntica para la enzima obtenida de *Phycomyces blakesleanus* en presencia de urea 8 M [57]. En este mismo trabajo se reportó que la adición de NADPH a la mezcla de incubación disminuye la estabilidad de la glutatión reductasa frente a la urea; así, la actividad residual cae desde el 100 % hasta el 8 % en presencia de 0.3 mM del nucleótido.

En aquellos casos en los que se ha investigado la termoestabilidad de la actividad catalítica de la glutatión reductasa, también se ha observado una disminución dramática de la misma en presencia del NADPH. Así, la actividad relativa de la enzima de *E. coli* [68], *Pisum sativum* [73] y *P. blakesleanus* [57] se mantiene al 100 % hasta alrededor de los 60°C; sin embargo, cuando el calentamiento se realiza en presencia de NADPH, la enzima se inactiva completamente a 45°C [73,57]. En el caso de la glutatión reductasa de *E. coli*, la disminución en la termoestabilidad catalítica implica una caída de 30°C en presencia de NADPH 5 mM [68].

En lo que respecta a la estabilidad estructural de la glutatión reductasa, los únicos trabajos publicados donde se da información en este sentido se realizaron con la enzima de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* [74,75]. En uno de ellos - que tuvo como objetivo principal determinar la participación de los grupos sulfhidrilo de la enzima en el mecanismo catalítico - se menciona que la incubación de la glutatión reductasa en urea 6 M resultó en una inhibición reversible del 60 %, acompañada de la exposición de un grupo tiol no accesible en la enzima nativa [74]. Sin embargo, la urea a la concentración mencionada no fue capaz de separar el FAD de la proteína. Posteriormente, mediante la técnica de sedimentación en equilibrio, se demostró que la misma glutatión reductasa, en presencia de Gdn-Cl 5 M, se disocia a monómeros [75].

Aunque de la información presentada en ambos trabajos puede deducirse una alteración importante de la estructura nativa de la enzima - tanto por urea como por Gdn-Cl - no se tienen datos cuantitativos acerca del grado de dicha perturbación.

La Glutatión Reductasa de *Spirulina maxima*.

En comparación con la glutatión reductasa de otras fuentes, la enzima de la cianobacteria *Spirulina maxima* destaca por su estructura cuaternaria, ya que la forma principal de la proteína está representada por un tetrámero con una M_r de 192 kDa [76]. A pH 7.0 dicho tetrámero coexiste en equilibrio con la especie dimérica [76,77], si bien esta última solo representa alrededor del 14 % (en peso) de la población total de la enzima. Los estudios de transporte de masas llevados a cabo con esta preparación, revelaron que la cinética de interconversión es lo suficientemente lenta como para que sea posible la separación casi total de ambos oligómeros, sea mediante filtración en gel, electroforesis o ultracentrifugación en gradientes de sacarosa [77].

Por otra parte, el equilibrio es dependiente del pH, la temperatura y concentración de fosfato inorgánico. Así, la alcalinización del medio resulta en la disociación completa del tetrámero en dímeros, si bien el intervalo de pH en el cual se da la transición depende de la temperatura [77]. Finalmente, el fosfato inorgánico, a concentraciones mayores de 0.15 M, favorece la agregación de la enzima, ya que bajo tales condiciones desaparece la especie dimérica; en su lugar, se observa un agregado superior que probablemente corresponde al octámero [78].

Dada su utilización en el presente trabajo, en la Tabla I se resumen los parámetros hidrodinámicos de ambos estados oligoméricos de la glutatión reductasa de *S. maxima* bajo condiciones nativas

Tabla I. Parámetros hidrodinámicos de la glutatión reductasa de *Spirulina maxima*

	DIMERO	TETRAMERO
M_r (kDa)	96	192
$S_{20,w}$ (Svedberg)	5.6	9.3
R_s (nm)	4.1	5.3
$[\eta]$ (cm ³ /g)	4.5	4.9

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

Durante el trabajo de caracterización de la glutatión reductasa de *S. maxima*, se obtuvo un resultado interesante: la reactividad al DTNB de una muestra de enzima, previamente dializada durante 24 h contra urea 8 M, fue prácticamente idéntica a aquella de la proteína nativa. Dicha observación resultó inesperada, especialmente si se considera la concentración elevada que se utilizó y el tiempo de exposición al compuesto. De lo anterior surgieron las siguientes preguntas: ¿Que tan estable es la glutatión reductasa frente a agentes desnaturalizantes? ¿Se comporta esta enzima como aquel grupo de proteínas que, previo a la desnaturalización, son inactivadas sin grandes cambios estructurales? o por el contrario ¿La pérdida de actividad es debida a la desnaturalización de la proteína? ¿Es reversible la desnaturalización de la glutatión reductasa?

La búsqueda en la literatura de una respuesta a dichas preguntas resultó infructuosa. Aparte de aquellos reportes aislados ya citados en la sección introductoria - todos ellos relacionados con la pérdida de la actividad enzimática en presencia de agentes desnaturalizantes - no se encontró ningún trabajo donde se estudiara sistemáticamente la estabilidad estructural de la proteína. Por otra parte, la presencia de dominios estructurales diferentes en las subunidades de la glutatión reductasa, abre la posibilidad de que exhiban una estabilidad diferencial que pudiera traducirse en una conducta compleja frente a la desnaturalización.

De acuerdo con lo anterior, los objetivos del presente trabajo son:

- a) Determinar la estabilidad de la glutatión reductasa. Dicha estabilidad puede ser cuantificada como el ΔG° asociado al equilibrio entre las conformaciones nativa y desnaturalizada de la proteína. Para ello, será necesario analizar el equilibrio mencionado en presencia de agentes desnaturalizantes; los compuestos elegidos para el presente estudio fueron la urea y el Gdn-Cl. La elección de éstos se basó en el hecho de que son los compuestos que mayor uso tienen en este tipo de trabajo, lo que permite comparar los resultados obtenidos con aquellos disponibles en la literatura.
- b) Determinar la naturaleza del o de los probables intermediarios termodinámicos involucrados en la desnaturalización. Dada la estructura compleja de la enzima, es muy probable que la transición del estado nativo al estado desnaturalizado involucre más de dos estados. La caracterización estructural de éstos requerirá del empleo de técnicas hidrodinámicas y espectroscópicas.
- c) Determinar los parámetros termodinámicos asociados con la desnaturalización. Para cumplir con este objetivo, la calorimetría diferencial de barrido es la técnica idónea, ya que suministra información

directa sobre el calor absorbido durante el proceso. La evaluación del ΔC_p permitirá, además, determinar ΔH y ΔS a diferentes temperaturas, abriendo la posibilidad de construir la curva de estabilidad de la proteína en función de la temperatura. El cumplimiento de este objetivo dependerá de que la transición calorimétrica sea reversible.

Elección del Modelo y Justificación

Quando se pretende llevar a cabo un proyecto de investigación como el que se propone en la presente tesis, la elección del "sistema modelo" debe considerar varios factores: a) Accesibilidad y costo de la fuente de enzima; b) Rendimiento de enzima pura por unidad de biomasa; c) Cantidad de información previa disponible sobre el sistema modelo a estudiar y d) Sencillez del protocolo de purificación.

Como se mencionó en la sección introductoria, la única glutatión reductasa que se conoce con un gran detalle estructural es la enzima obtenida de eritrocito humano; parecería lógico entonces que en un estudio como el presente, donde se pretende profundizar en la estabilidad de la enzima, la opción ideal sería la utilización de la glutatión reductasa de eritrocito humano como "sistema modelo". Sin embargo, el protocolo de purificación reportado para la enzima humana es largo [62], sin considerar además que la cantidad de enzima pura por litro de sangre es relativamente bajo (~ 1 mg). Debe tenerse presente que, aún suponiendo que la desnaturalización resultase ser un proceso reversible, un trabajo como el que pretende llevarse a cabo implica la utilización de cantidades considerables de proteína. Así, la elección del eritrocito como fuente de la enzima, haría depender el desarrollo del trabajo del abastecimiento continuo de grandes volúmenes de sangre. En este sentido, deben tenerse presentes las restricciones existentes en los bancos de sangre como consecuencia de la epidemia del SIDA.

Por otra parte, la glutatión reductasa de la cianobacteria *S. maxima* - enzima con la que hemos desarrollado trabajo previo - puede obtenerse en grandes cantidades (~ 10 mg/kg) siguiendo un esquema de purificación simple [76] y a partir de biomasa obtenida de un cultivo natural, donde dicho organismo constituye la biomasa predominante.

En base a los argumentos mencionados, se eligió a la glutatión reductasa de *S. maxima* como la enzima para llevar a cabo el presente trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos. Todos los reactivos bioquímicos, incluyendo las proteínas de calibración para el *Rs*, se obtuvieron de la compañía Sigma Chemical (San Luis, MO). El Gdn-Cl y la urea utilizados fueron de la más alta pureza disponible. El fosfato de potasio, EDTA y glutaraldehído se compraron a Merck de México, S.A. Todos los reactivos fueron utilizados sin purificaciones adicionales. El agua empleada en la elaboración de soluciones se purificó por el proceso de ósmosis reversa.

Enzima. La glutatión reductasa de *S. maxima* se purificó a partir de la biomasa donada por la compañía Sosa Texcoco, S.A. Se siguió el protocolo de purificación descrito previamente [76]. La pureza de las preparaciones obtenidas se evaluó de rutina mediante PAGE en condiciones desnaturalizantes [79,80]. La actividad específica de la enzima purificada fue de 240 ± 10 U/mg. La enzima obtenida de la última etapa de purificación fue dializada en contra de amortiguador de fosfato de potasio 0.1 M (pH 7.0) conteniendo 1 mM de EDTA. El dializado del último cambio de amortiguador se utilizó como blanco para la obtención de la línea de base en los experimentos calorimétricos y de DC. A menos que se indique otra cosa, todos los experimentos se llevaron a cabo en el amortiguador mencionado. En todos aquellos experimentos que involucran a la urea o al Gdn-Cl, la enzima fue previamente incubada durante 24 h en presencia de la concentración correspondiente del compuesto desnaturalizante.

Determinación de Proteína. La concentración de las soluciones madre de la enzima se determinó espectrofotométricamente por su absorbencia a 274 nm a pH neutro. Bajo estas condiciones, el coeficiente de absorbitividad para una solución de glutatión reductasa a 10 mg/ml es de 9.47 [77].

Actividad Enzimática. La actividad reductora del GSSG se determinó en un volumen final de 1 ml, monitoreando el decremento en absorbencia a 340 nm debido a la oxidación del NADPH. Se utilizaron indistintamente espectrofotómetros UV-visibles modelos DU-70 (Beckman) y CE 5505 (Cecil). Cuando fue necesario, se analizaron los datos mediante regresión no lineal con el programa ENZFITTER (Elsevier Biosoft, Cambridge, UK). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de proteína que oxida 1 μ mol de NADPH por minuto a pH 7.

Experimentos de Inactivación y Reactivación. En los experimentos de inactivación, la enzima se incubó a temperatura ambiente en un volumen final de 1 ml del amortiguador "estandar" conteniendo urea ó Gdn-Cl a la concentración correspondiente. Transcurridas 24 h se determinó la actividad residual añadiendo una alícuota pequeña (50 μ l) a una cuveta conteniendo ambos sustratos. La actividad control se determinó mediante un procedimiento idéntico omitiendo el compuesto desnaturalizante de las mezclas de incubación. Para los experimentos de reactivación, las alícuotas de la enzima fueron preincubadas como se mencionó antes, en presencia del compuesto desnaturalizante correspondiente pero en un volumen final de 30 μ l. Después del periodo de incubación, se diluyó la urea o el Gdn-Cl por adición de 1 ml de amortiguador estándar y la solución resultante fue incubada 24 h adicionales antes de determinar la actividad enzimática. Las mezclas control se procesaron de la misma manera en ausencia del compuesto desnaturalizante.

Inactivación Térmica. El efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática se determinó de acuerdo con el siguiente protocolo: se diluyó una alícuota de la glutatión reductasa con el amortiguador estándar a un volumen final de 300 μ l; la solución se colocó en un matraz "Pyrex" de 1 ml con tapón esmerilado y se incubó en un baño de agua. El calentamiento de la solución se llevó a cabo a una velocidad de aproximadamente 1°C/min comenzando desde temperatura ambiente (alrededor de 20°C). A determinadas temperaturas se extrajo una alícuota (20 μ l) de la solución y se añadió a 1 ml del amortiguador a temperatura ambiente conteniendo ambos sustratos, NADPH

(290 μM) y GSSG (2.8 mM). El control correspondiente al 100 % de la actividad nativa se tomó como el promedio de la actividad en el intervalo de temperaturas donde la actividad permaneció aproximadamente constante. El efecto del NADPH sobre la termoestabilidad de la enzima se evaluó por el mismo procedimiento, llevando a cabo el calentamiento en presencia del nucleótido.

Titulación de Grupos Sulfhidrilo. La accesibilidad de los tioles de la glutatión reductasa de *S. maxima* se determinó siguiendo el curso de la reacción con el DTNB de acuerdo con el método de Ellman [81]. Para ello, se incubó a la enzima - en ausencia o en presencia de urea ó Gdn-Cl - a una concentración final de 4.6 μM con DTNB (en un exceso de 310 veces la concentración de la enzima) en un volumen total de 700 μl de amortiguador Tris-HCl 0.1 M (pH 8.0) y se monitoreó el incremento de absorbencia a 412 nm. La reacción fue seguida en un espectrofotómetro de doble haz Cecil 5505. Para el cálculo del número de tioles modificados se utilizó un coeficiente de extinción de 14 140 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ [82].

Calorimetría Diferencial de Barrido. Las endotermas calorimétricas se obtuvieron en un calorímetro de barrido MicroCal MC-2 (MicroCal Inc, Northampton, MA). Antes de cargarlas en la celda del instrumento, las soluciones de proteína se deaeraron bajo vacío durante 15 min. Todas las corridas se llevaron a cabo bajo una atmósfera de nitrógeno a una presión total de 2.2 kg/cm^2 y a velocidades de barrido entre 0.5 y 1.5 K/min. Las líneas de base se registraron bajo las mismas condiciones y se restaron de los trazos obtenidos con la enzima; para la colecta y el análisis de los datos se utilizaron los programas DA-2 y Origin.

Espectroscopía de Dicroísmo Circular. Las medidas de elipticidad se llevaron a cabo en la región ultravioleta en un espectropolarímetro Jasco J-500 y utilizando celdas de 0.1 cm de paso de luz. Cuando fue necesario, se calcularon las elipticidades promedio por residuo de acuerdo con Schmid [83], utilizando una masa promedio por residuo de 107.5 calculada a partir de la composición de aminoácidos de la enzima [76]. Para el monitoreo de la elipticidad en función de la temperatura, se calentó gradualmente la celda conteniendo la solución de enzima mediante un baño recirculador; a fin de tener valores reales de la temperatura, se le acondicionó un termopar a la celda del instrumento. La desnaturalización térmica fue seguida a 218 nm.

Espectroscopía de Fluorescencia. Se utilizó un espectrofluorómetro SPF-500 (Aminco). Las lecturas se llevaron a cabo en celdas de 1 ml. La concentración de proteína fue en todos los casos de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las muestras fueron excitadas a 280 nm y los espectros de emisión se registraron entre 300 y 450 nm.

Entrecruzamiento Covalente. El estado de agregación de la proteína a diferentes temperaturas se analizó mediante una combinación de entrecruzamiento covalente y electroforesis desnaturalizante. El protocolo de entrecruzamiento seguido fue aquel descrito por Jaenicke et al. [84]; para ello, se incubaron alícuotas de la enzima (50 μg de proteína en 350 μl de amortiguador estándar) en un baño de agua y se calentaron a una velocidad de aproximadamente 1 grado/minuto. A ciertas temperaturas se añadieron 20 μl de glutaraldehído al 25 % y se permitió que la reacción de entrecruzamiento continuara durante 1 min; transcurrido dicho lapso, se detuvo la reacción añadiendo 30 μl de borhidruro de sodio 2 M. Después de 20 min, se precipitó la proteína por adición de 5 μl de desoxicolato de sodio al 10 % y unas gotas de ácido tricloroacético al 60 %, seguido de centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Los paquetes de proteína se lavaron dos veces con 100 μl de acetona fría y se secaron bajo nitrógeno. Las muestras entrecruzadas se disolvieron en un volumen mínimo con amortiguador Tris-HCl 0.062 M (pH 8.8) conteniendo SDS al 1 % y DTE 50 mM. El análisis de las mismas se llevó a cabo mediante PAGE, utilizando gradientes de poliacrilamida del 4 al 20 % según Laemmli [80]. La tinción y el lavado de los geles se llevó a cabo por

procedimientos convencionales.

Electroforesis en un Gradiente Transverso de Urea. Para la elaboración de los geles se siguió el protocolo descrito por Goldenberg [85]. Todas las soluciones fueron preparadas en el amortiguador estándar de fosfatos (pH 7.0), que se utilizó también como electrolito durante la corrida. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 200 V.

Cromatografía de Filtración. La presencia de intermediarios parcialmente desnaturalizados, así como la caracterización hidrodinámica de los mismos, se llevó a cabo en columnas de Sephacryl S-300 (1 X 28 cm) o mediante HPLC en una columna SEC 3000 (0.75 X 30 cm) previamente calibradas en presencia de la concentración requerida del desnaturalizante. Las columnas fueron resueitas a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El radio de Stokes fue evaluado mediante una curva de calibración [86] utilizando las siguientes proteínas: mioglobina ($R_s = 2.0$ nm); anhidrasa carbónica ($R_s = 2.4$ nm); ovoalbúmina ($R_s = 3.1$ nm); albúmina de suero bovino ($R_s = 3.4$ nm); inmunoglobulina G ($R_s = 5.2$ nm) y ferritina ($R_s = 6.1$ nm). La viscosidad intrínseca fue evaluada mediante la ecuación:

$$[\eta] = \left(\frac{2.5 N}{M_r} \right) \left(\frac{4 \pi R_s^3}{3} \right)$$

donde N es el número de Avogadro y R_s el radio de Stokes en cm. Cuando fué necesario, los perfiles cromatográficos obtenidos se analizaron por deconvolución utilizando el programa "PEAKFIT".

RESULTADOS

Efecto del Gdn-Cl y la urea sobre la actividad enzimática. La Fig. 2 muestra la actividad residual y el porcentaje de reactivación de la glutatión reductasa de *S. maxima* en presencia de Gdn-Cl (A) o urea (B). Con respecto a la actividad residual, es evidente que el aumento de concentración de ambos compuestos da como resultado una pérdida gradual de la actividad enzimática. Si bien era de esperarse el mayor poder inhibitor del Gdn-Cl, llama la atención el intervalo de concentraciones tan diferente en el que ocurre la inhibición. Mientras que en presencia de Gdn-Cl la actividad residual llega a cero en un intervalo muy estrecho, con urea dicha actividad decae gradualmente, extendiéndose en todo el intervalo de concentraciones analizado. Expresado en términos de $C_{1/2}$, los valores correspondientes para Gdn-Cl y urea son 0.36 M y 4.5 M, respectivamente. En el caso del Gdn-Cl se observó una segunda zona de transición, centrada en 3.4 M, donde la enzima se inactiva de forma irreversible.

Por otra parte, contrasta también la diferente capacidad de la proteína para recuperar la actividad basal después de la dilución del compuesto desnaturizante. Así, mientras que la enzima se reactiva al 100 %, incluso después de haber permanecido 24 h en urea 8 M, la capacidad para recuperarse después de haber sido inhibida por el Gdn-Cl es limitada; en este caso, la concentración máxima permitida es de 2.8 M.

Cambios en el estado de agregación inducidos por el Gdn-Cl o la urea. Como se mencionó en la introducción, una característica de la glutatión reductasa es el hecho de que cada uno de sus sitios activos se constituyen por residuos de ambas subunidades, por lo que la integridad del dímero es un requisito para la actividad catalítica de la enzima. De acuerdo con ello, y sabiendo que en muchas proteínas oligoméricas la disociación precede a la desnaturización [87,88], parecía una hipótesis plausible que la inactivación reversible - inducida por cualquiera de los dos compuestos desnaturizantes - fuese debida a la disociación del oligómero nativo en sus monómeros constituyentes. Con el fin de someter a prueba dicha hipótesis, se procedió a analizar el estado de agregación de la glutatión reductasa de *S. maxima*, empleando concentraciones de desnaturizante capaces de provocar la inactivación reversible.

En lo que respecta a la urea, fue necesario analizar todo el intervalo de concentraciones hasta una molaridad de 8 ya que, como muestra la Fig. 2B, la inactivación reversible inducida por dicho compuesto presenta una dependencia menor en comparación con aquella provocada por el Gdn-Cl.

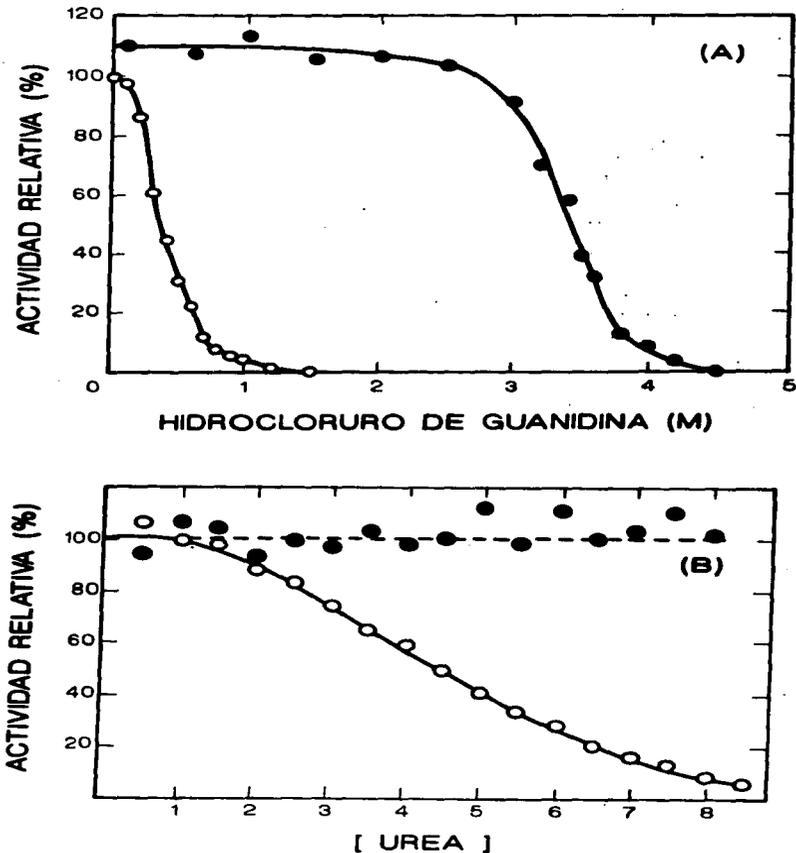


Figura 2. Perfiles de la actividad residual (O) y de la reactivación (●) de la glutatión reductasa en presencia de Gdn-Cl (A) o urea (B). Ambos parámetros se determinaron como se describió en la sección metodológica. Cada punto representa el promedio de cinco determinaciones independientes. En ambos casos se utilizaron controles incubados en ausencia del compuesto, y su actividad se tomó como el 100 % de actividad relativa.

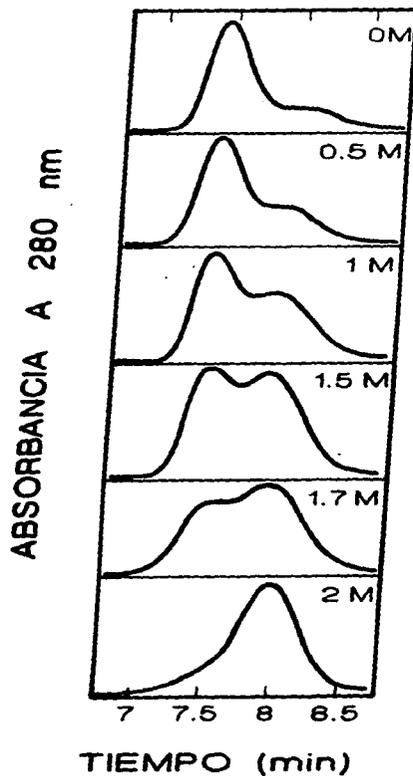


Figura 3. Perfiles de elución de la glutatión reductasa en función de la concentración de urea. Se preincubaron alícuotas de la proteína (18 μ g en 30 μ l) durante 24 h en presencia de urea a la concentración indicada antes de analizarlas por cromatografía de filtración como se describió en la sección metodológica. Los números a la derecha indican la concentración de urea a la que se obtuvo el perfil correspondiente.

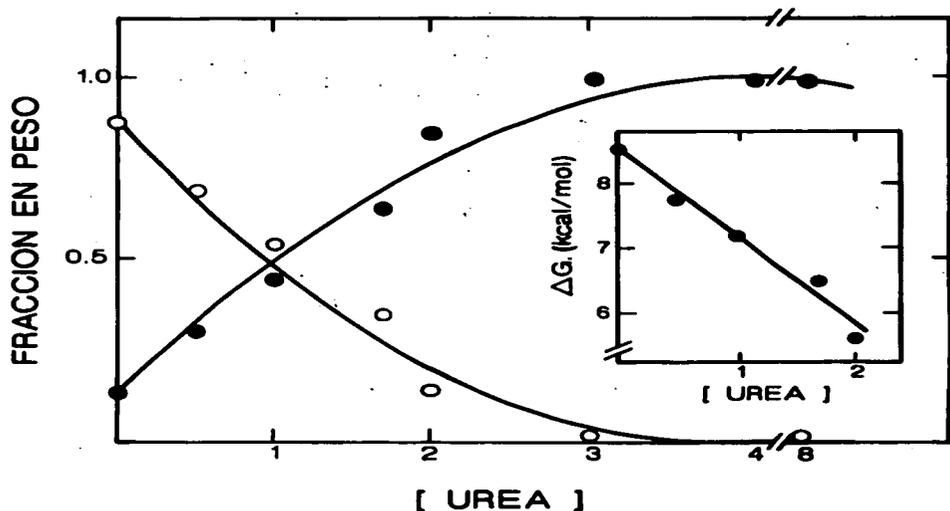


Figura 4. Abundancia relativa de las especies dimérica (●) y tetramérica (○) en función de la concentración de urea. Los valores asociados a cada concentración de urea se obtuvieron por descomposición del perfil cromatográfico correspondiente como se describió en la sección metodológica. Inserto: Energía libre de disociación en función de la concentración de urea. El valor numérico de la constante de disociación se obtuvo a partir de los datos de la abundancia relativa. Cada punto representa el promedio de tres experimentos.

En la Fig. 3 se muestran los perfiles cromatográficos de la glutatión reductasa obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de urea. Un primer punto que merece ser resaltado es el hecho de que la enzima nativa, tetramérica, se disocia completamente a dímeros a concentraciones de urea relativamente bajas. Así, por arriba de 3 M sólo se detecta la especie dimérica, y la enzima permanece en este estado de agregación hasta una concentración de urea 8 M sin mostrar indicios de monomerización. Al comparar dichos cambios con la actividad residual, llama la atención la ausencia de correlación entre la pérdida de actividad y la disminución en la abundancia relativa de la especie

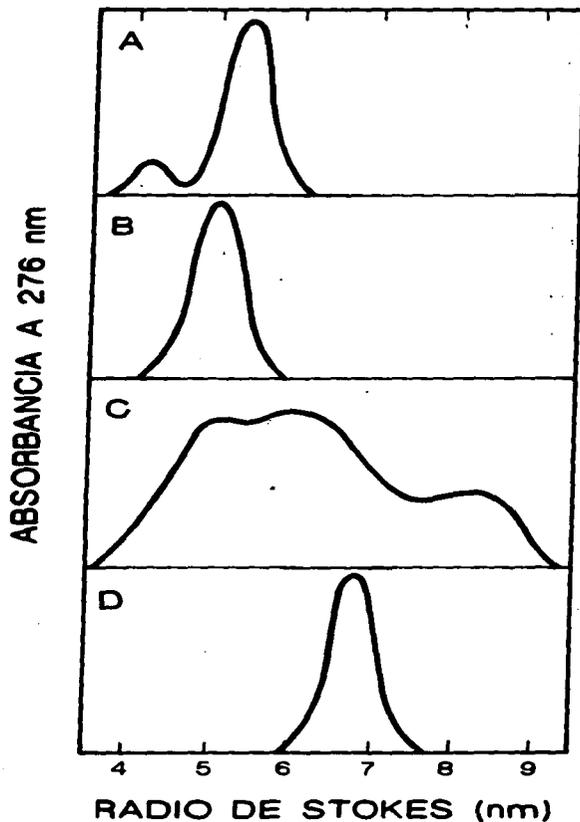


Figura 5. Perfiles de elución de la glutatión reductasa a diferentes concentraciones de Gdn-CI. Alícuotas de la proteína (200 μ g en 200 μ l), previamente incubadas durante 24 h a la concentración correspondiente de Gdn-CI se cromatografiaron en una columna de Sephacryl S-300 como se describió en la sección metodológica. Las concentraciones analizadas de Gdn-CI fueron: A) 0; B) 3.5 M; C) 4 M; D) 5 M.

tetramérica. Si el dímero fuese una especie menos activa - o completamente inactiva - como se dedujo en un trabajo anterior a partir de experimentos de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa [77], la caída en actividad residual de la Fig. 2B debería haber ido acompañada de un aumento gradual en la fracción dimérica; sin embargo, ello no es así. En urea 3 M todavía persiste el 75% de la actividad enzimática nativa, a pesar de que el único oligómero presente es el dímero. La Fig. 4 muestra la abundancia relativa de dímero y tetrámero en función de la concentración de urea. A partir de tales datos se procedió a calcular la constante de equilibrio de la interconversión dímero-tetrámero, así como los cambios de energía libre correspondientes. El inserto de la Fig. 4 revela una dependencia lineal del ΔG respecto de la molaridad de urea.

Por otra parte, el R_s de ambos oligómeros en el intervalo de concentraciones de urea donde se observa la disociación, revela que el grado de compactación de la proteína es prácticamente idéntico al observado en condiciones nativas, sugiriendo la ausencia de cambios conformacionales grandes. Los resultados anteriores sugieren fuertemente que la inactivación reversible de la glutatión reductasa de *S. maxima*, inducida por la urea, se debe a cambios conformacionales sutiles. La evidencia espectroscópica que apoya esta conclusión se da en una sección posterior.

En el caso del Gdn-Cl, no se observaron cambios en la fracción del tetrámero hasta el límite de concentración donde se da la pérdida reversible de la actividad (2.8 M) descartando también, para este compuesto, que la caída en actividad residual sea debida a la disociación del tetrámero en monómeros. Al analizar la región comprendida entre 3 y 4 M de Gdn-Cl, donde se da la inactivación irreversible por este compuesto (Fig. 2A), los cambios observados en el estado de agregación de la enzima fueron espectaculares, sugiriendo que dicha inactivación va acompañada de la pérdida de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria de la enzima. En Gdn-Cl 3.5 M - concentración correspondiente a la pérdida irreversible del 50 % de la actividad -el perfil cromatográfico de la glutatión reductasa de *S. maxima* muestra una sola zona, con un radio de Stokes de 5 nm (Fig. 5B); si bien este valor es muy semejante al calculado para el tetrámero nativo, la evidencia espectroscópica presentada en la siguiente sección sugiere fuertemente que dicha especie representa una forma expandida (es decir, parcialmente desnaturalizada) del dímero. A una concentración mayor de Gdn-Cl (4M), donde la enzima ha perdido prácticamente la capacidad de reactivarse, el perfil de elución reveló un patrón trimodal (Fig. 5C), con R_s de 5, 6.2 y 8.6 nm. Aunque en principio podría concluirse que bajo estas condiciones existen 3 formas de la enzima cromatográficamente diferenciables, también

existe la posibilidad de que el pico central fuese el resultado de una zona de reacción [89-91], resultante de la interconversión entre dos especies (sea por un proceso de isomerización o de equilibrio entre oligómeros).

A fin de aclarar el punto anterior, se procedió a realizar el siguiente experimento: se cromatografió una muestra de la enzima previamente incubada en Gdn-Cl 4 M; una vez obtenido el perfil trimodal mencionado, se colectaron por separado las fracciones correspondientes a las zonas "líder" y "retrasada", se concentraron hasta el volumen original y se re-cromatografiaron bajo las mismas condiciones después de una incubación de 12 h. El perfil cromatográfico resultante fue, para ambas fracciones, muy similar al mostrado en la Fig. 5C, apoyando así la existencia de especies interconvertibles. Por otra parte, para discriminar entre una isomerización o un equilibrio entre oligómeros, se analizó la conducta cromatográfica de una muestra preincubada en Gdn-Cl 4.5 M, concentración que debe favorecer un incremento en la especie más desnaturalizada. Bajo estas condiciones, la cromatografía de filtración reveló un incremento en el pico con un R_s de 5 nm a expensas del pico de 8.6 nm. Los resultados anteriores llevan a la conclusión de que, entre Gdn-Cl 4 y 4.5 M, la glutatión reductasa de *S. maxima* existe bajo la forma de dos especies - que parecen corresponder al dímero y monómero - y cuyo grado de desdoblamiento es considerable, a juzgar por sus R_s .

Finalmente, la enzima preincubada en Gdn-Cl 5 M y analizada por cromatografía de filtración, se comporta como una especie única con un R_s de 6.8 nm. La $[\eta]$ de esta especie (41.3 cm³/g), sugiere que corresponde al monómero completamente desnaturalizado. De hecho, si se considera el número de residuos que constituyen la cadena polipeptídica en un gráfico logarítmico de $[\eta]M_0$ versus "n", el dato correspondiente a la glutatión reductasa de *S. maxima* cae sobre la línea que describe cadenas polipeptídicas en conformación de "cadena desorganizada" (random coil) [4].

Cambios en la estructura terciaria. Aunque las conclusiones planteadas en la sección anterior respecto del estado conformacional de algunos intermediarios, estuvieron basadas exclusivamente en el grado de expansión de los mismos - grado de expansión cuantificado como el aumento en el R_s - la evidencia que confirme o rechace tales conclusiones debe provenir de metodologías más sensibles a alteraciones de la estructura terciaria. Para el presente trabajo se eligieron tres de tales técnicas: accesibilidad de grupos sulfhidrilo, cambios en el espectro de emisión de la fluorescencia y electroforesis desnaturalizante en gradientes transversos de urea.

1. **Accesibilidad de grupos sulfhidrilo.** Cada subunidad de la glutatión reductasa de *S. maxima*, en ausencia de NADPH, posee dos grupos sulfhidrilo libres [92]; en condiciones nativas uno de ellos es parcialmente accesible, mientras que el otro sólo se expone en un medio fuertemente desnaturalizante (por ejemplo, en presencia de SDS).

Como se mencionó en el capítulo anterior, en el caso de la urea no fue posible detectar cambios conformacionales mediante esta técnica; la cinética de titulación de los grupos sulfhidrilo de la enzima preincubada en urea 8 M fue prácticamente idéntica a la exhibida en condiciones nativas (Fig. 6). En contraposición, en presencia de Gdn-Cl, el comportamiento de los tioles de la enzima fue radicalmente diferente. La Fig. 6 muestra la accesibilidad diferencial de ambos tioles en diferentes concentraciones de Gdn-Cl. En 1 M de dicho compuesto, el tiol parcialmente accesible en la enzima

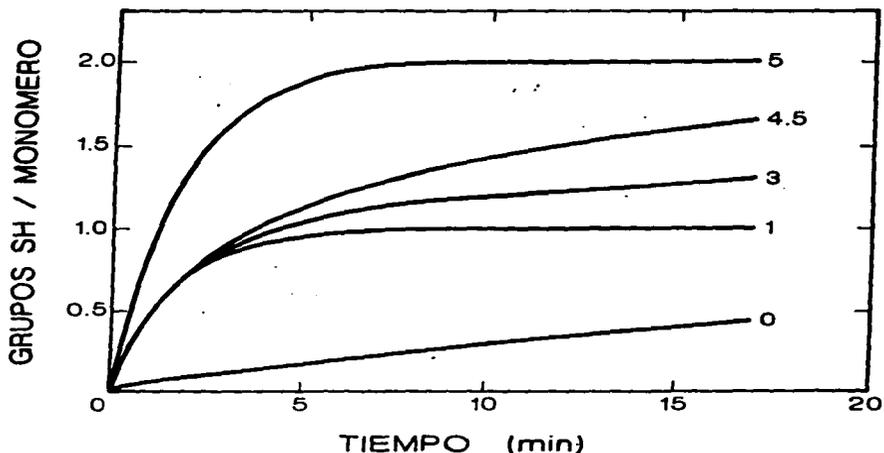


Figura 6. Cinética de titulación de los grupos sulfhidrilo de la glutatión reductasa en presencia de Gdn-Cl. Se incubaron alícuotas de la enzima (208 μ g) en presencia de Gdn-Cl a la concentración indicada y la reacción se inició por adición de DTNB a una concentración final de 1.4 mM. El volumen total de la mezcla de reacción fue de 0.7 ml. Los números a la derecha de cada trazo indican la molaridad de Gdn-Cl a la cual se llevó a cabo la titulación.

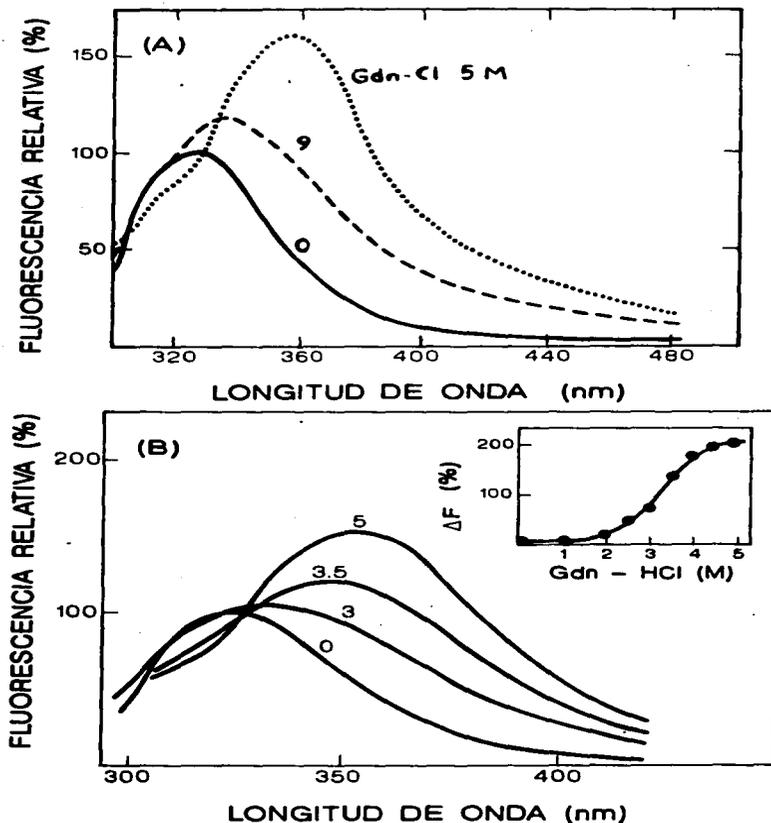


Figura 7. Espectros de emisión de fluorescencia de la glutatión reductasa en presencia de urea (A) ó de Gdn-HCl (B). Los espectros se registraron después de que las mezclas enzima-desnaturalizante permanecieron incubadas durante 24 h. La intensidad a la longitud de onda del máximo de emisión de la enzima nativa (325 nm) se tomó como el 100 % de fluorescencia relativa. En la gráfica "A" se incluye, con fines comparativos, el espectro de emisión de una muestra de la enzima preincubada en Gdn-HCl 5 M. Recuadro: cambios relativos en la intensidad de la fluorescencia a 354 nm en función de la concentración de Gdn-HCl.

nativa incrementa notablemente su reactividad, alcanzando una meseta cuando se completa la titulación de un tiol por subunidad. Así, la conformación de la glutatión reductasa bajo tales condiciones es claramente diferente de la proteína nativa.

Al aumentar la concentración de Gdn-Cl comienza a exponerse el segundo grupo tiol; sin embargo, la accesibilidad completa de este último sólo se alcanza en Gdn-Cl 5 M. Es interesante mencionar que el alineamiento de las secuencias de los péptidos conteniendo cisteínas de la enzima de *Spirulina* con la estructura primaria de la glutatión reductasa humana [92], sugiere que los dos tioles titulables podrían localizarse en dominios distintos. Así, mientras que una de las cisteínas de la enzima de *Spirulina* se alinea con el Trp 287 de la proteína humana (localizado en el dominio de unión del NADPH), la otra parece corresponder a la Val 332 (ubicada en el dominio central). Aunque no es claro cuál de las dos cisteínas porta el tiol parcialmente accesible, los resultados de los experimentos de titulación con DTNB en presencia de Gdn-Cl sugieren una estabilidad diferencial de los diferentes dominios de la proteína.

2. Espectroscopia de fluorescencia. A fin de complementar la información suministrada por los experimentos de titulación con DTNB, se procedió a estudiar la estabilidad conformacional de la glutatión reductasa monitoreando los cambios en el espectro de emisión de la fluorescencia. La Fig. 7 muestra los resultados obtenidos, tanto en presencia de urea (A) como de Gdn.Cl (B). A diferencia de lo obtenido con la cromatografía de filtración y el DTNB, la espectroscopia de fluorescencia permitió determinar que la conformación de la enzima, en presencia de altas concentraciones de urea, no es exactamente idéntica a la de la proteína nativa. El espectro de emisión muestra un corrimiento hacia el rojo así como un incremento en la intensidad de la emisión. En urea 8 M, la longitud de onda del máximo se localiza en 336 nm, comparado con 325 nm para la glutatión reductasa nativa; sin embargo, tales cambios fueron más espectaculares cuando las mediciones se realizaron en soluciones de Gdn-Cl (Fig. 7B). A bajas concentraciones del compuesto - hasta aproximadamente 2 M - sólo es detectable un aumento modesto en la intensidad de la emisión, sin ningún desplazamiento en la longitud de onda del máximo característico de la proteína nativa. A concentraciones superiores a 2 M, y hasta 4 M, se dieron los mayores cambios, involucrando tanto un incremento en la intensidad de la emisión como un corrimiento hacia el rojo. En Gdn-Cl 5 M la longitud de onda del máximo de la emisión se ubicó en 354 nm; a esta misma longitud de onda, la intensidad de la emisión se incrementó en un 200 %.

El intervalo de concentraciones de dicho compuesto donde se dan los mayores cambios en la intensidad de la emisión, coincide con la pérdida irreversible de la actividad. Debe mencionarse en este punto que la remoción del Gdn-Cl - sea por dilución o por diálisis - no permitió recuperar el espectro de emisión característico de la enzima nativa, si bien el espectro resultante de dicho proceso tampoco es idéntico al de la enzima desnaturalizada en Gdn-Cl (datos no mostrados).

Al conjuntar los datos de la inactivación con aquellos resultantes del análisis de estructura terciaria, es claro que la inactivación irreversible de la glutatión reductasa de *S. maxima* por el Gdn-Cl se debe a la pérdida de la estructura nativa como resultado de grandes cambios conformacionales.

3. Electroforesis desnaturalizante en gradientes transversos de urea. Una técnica interesante para detectar cambios conformacionales inducidos por la urea fue introducida por Creighton [38]. Dicha técnica consiste en analizar el comportamiento de una proteína que migra a través de un gel en el cual se halla incorporado un gradiente de urea, que es perpendicular a la dirección de migración de la

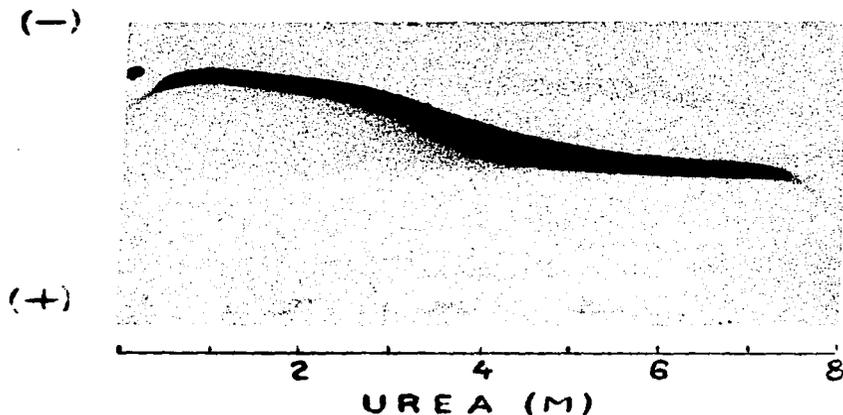


Figura 2. Perfil electroforético de la glutatión reductasa en presencia de un gradiente transversal de urea. Una alícuota de la proteína nativa (40 μ g) fue aplicada en lo alto de un gel de poliacrilamida (8.5 cm X 9 cm) en el cual se incorporó un gradiente de urea perpendicular a la dirección de migración de la proteína. La corrida se realizó a 200 V durante 1 h.

proteína. A diferencia de las técnicas anteriores, esta variante de la electroforesis permite un seguimiento muy detallado de los cambios conformacionales sufridos por la proteína, ya que el gradiente de urea es continuo y lineal.

La Fig. 8 muestra el perfil electroforético obtenido con la glutatión reductasa de *S. maxima*. En contraste con lo observado para una gran variedad de proteínas, en las cuales la desnaturalización inducida por urea da como resultado una disminución en la movilidad electroforética, la enzima muestra un aumento en la movilidad a altas concentraciones de urea; dicho aumento no se debe a cambios conformacionales, sino a la disociación de la proteína tetramérica en dímeros. Así, a altas concentraciones de urea, la Fig. 8 muestra que la movilidad electroforética de la especie principal es prácticamente idéntica a aquella del dímero nativo, lo que confirma nuevamente la ausencia de cambios estructurales significativos. El perfil difuso en la región de transición debe atribuirse a la interconversión dímero-tetramero durante el experimento. Dicha región parece ubicarse entre 3 y 5 M de urea.

La información suministrada mediante esta técnica corrobora los datos previos acerca de la notable estabilidad conformacional de la glutatión reductasa de *S. maxima* en soluciones de urea. Desafortunadamente el carácter iónico del Gdn-Cl impide su utilización en este tipo de electroforesis. Cambios en el contenido de estructura secundaria. De acuerdo con la información proporcionada por los estudios cristalográficos, la glutatión reductasa es una proteína que pertenece a la categoría α/β [69]. En el caso particular de la enzima de eritrocito humano, el contenido de hélices α y láminas β es de 31 % y 32 %, respectivamente [64,69]. Aunque para la glutatión reductasa de *S. maxima* no se dispone de la estructura tridimensional, la existencia de métodos de predicción basados en el espectro de DC en el ultravioleta cercano, permite hacer una estimación aproximada del porcentaje de cada tipo de elemento de estructura secundaria. En la Fig. 9 se incluye el espectro correspondiente a la enzima de *S. maxima* en condiciones nativas; con base en los valores de elipticidad por residuo se calculó un 23 % de hélice α y 24 % de lámina β . Si bien dichos valores son inferiores a los reportados para la enzima humana, debe considerarse que el método utilizado muestra una incertidumbre considerable, amén de la enorme distancia evolutiva entre ambas especies.

Como era de esperarse por los resultados obtenidos mediante técnicas de transporte de masas y fluorescencia, la urea no ejerció ningún efecto sobre la estructura secundaria de la glutatión reductasa. Según se muestra en la Fig. 9A, los cambios sobre la elipticidad de la enzima en urea 9 M

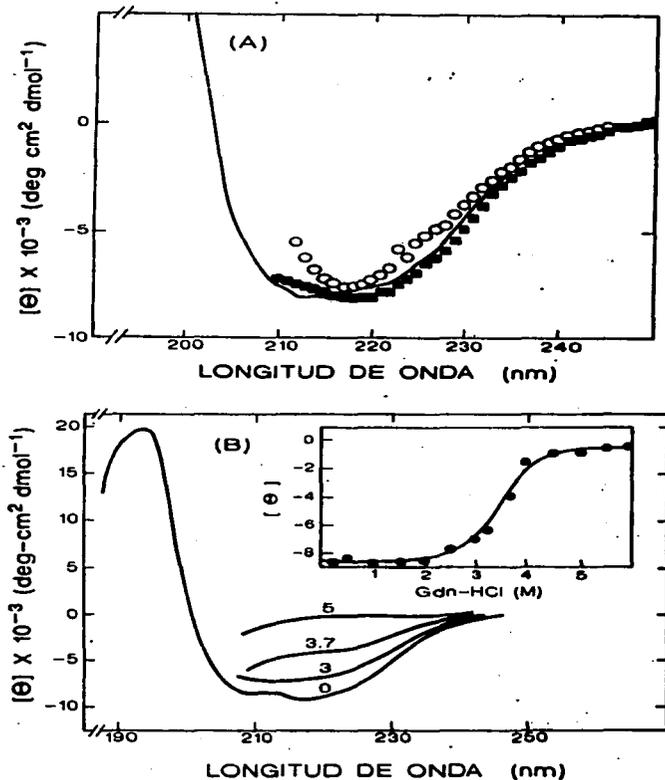


Figura 9. Espectros de DC en el UV lejano de la glutatión reductasa en presencia de urea (A) o Gdn-HCl (B). Antes de llevar a cabo el registro de cada espectro, se preincubaron alícuotas de la enzima (150 μg en 1 ml) durante 24 h en presencia del compuesto desnaturalizante a la concentración indicada. Los números sobre las curvas indican la concentración de Gdn-HCl a la que se registró el espectro correspondiente. Por claridad, sólo se muestran los espectros a 3 M, 3.7 M y 5 M. Recuadro: curva de transición medida por los cambios de elipticidad a 220 nm. En el caso de la urea, sólo se muestran los espectros de la enzima nativa (—), en urea 3 M (■) y en urea 9 M (○).

son apenas perceptibles; en contraste, la incubación en soluciones de Gdn-Cl resultó nuevamente en una transición entre la especie nativa y la desnaturalizada (Fig. 9B). El intervalo de concentraciones donde se da dicha transición es coincidente con los resultados obtenidos mediante espectroscopia de fluorescencia. De acuerdo con ello, parece razonable concluir que los cambios sufridos por la enzima durante la desnaturalización implican la pérdida simultánea de las estructuras secundaria y terciaria.

Por otra parte, los espectros de DC a concentraciones por debajo de Gdn-Cl 2 M fueron prácticamente idénticos al de la proteína nativa, sugiriendo nuevamente que la inactivación reversible inducida por el Gdn-Cl implica cambios conformacionales sutiles que no involucran la pérdida de elementos de estructura secundaria. En este sentido, cabe señalar que los porcentajes de hélice α y lámina β , evaluados a partir de los espectros obtenidos en soluciones de Gdn-Cl por debajo de 3 M, fueron idénticos a los porcentajes correspondientes a la enzima en condiciones nativas.

Inactivación térmica. Como se demostró en las secciones anteriores, la inactivación reversible de la glutatión reductasa de *S. maxima* inducida por desnaturalizantes químicos se da sin grandes alteraciones de la estructura nativa. A fin de comparar tales observaciones con el efecto producido por el calor, se procedió a determinar la actividad enzimática en función de la temperatura. La Fig. 10 muestra que durante el calentamiento gradual ($1^{\circ}\text{C}/\text{min}$) de una alícuota de la glutatión reductasa, la actividad se mantiene sin cambio hasta los 60°C . Por arriba de este valor se observa una inactivación que se extiende hasta los 76°C , alcanzando el 50 % de la misma a 71°C ; sin embargo, cuando se incubó la enzima 5 min en cada una de las temperaturas muestreadas, se observó una menor termoestabilidad, con una $T_{1/2}$ de 67°C .

El calentamiento de la proteína en presencia de GSSG no alteró la estabilidad térmica de la actividad enzimática, ni siquiera a una concentración de 5 mM, equivalente a 40 veces la K_m (Fig. 10). En contraste, el NADPH ejerció un efecto notable, ya que a una concentración de 500 μM (aproximadamente 35 veces la K_m), la $T_{1/2}$ se desplazó hasta los 44°C e incluso en NADPH 60 μM , la disminución en la termoestabilidad fue considerable ($T_{1/2} = 47^{\circ}\text{C}$).

La capacidad de la glutatión reductasa para recuperar la actividad basal después de haber sido calentada fue prácticamente nula. En la Fig. 11 se muestran los resultados de un experimento diseñado con tal propósito. Alícuotas de la enzima que permanecieron a 4°C después de haber sido calentadas a 73°C durante periodos variables, no mostraron ningún incremento en actividad en comparación con aquellas cuantificadas en el momento mismo del calentamiento.

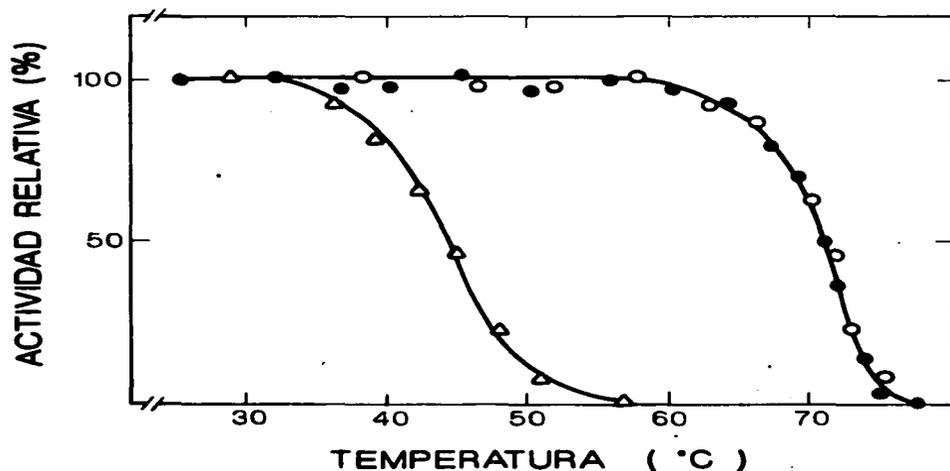


Figura 10. Inactivación térmica de la glutatión reductasa de *Spirulina maxima*. Se diluyeron 12.3 μg de proteína en 280 ml de amortiguador y la mezcla se colocó en un baño de agua que se calentó gradualmente desde temperatura ambiente en ausencia (●) o en presencia (△) de NADPH 500 μM . A determinadas temperaturas se extrajeron alícuotas y se les ensayó la actividad residual a temperatura ambiente. La actividad enzimática a 26°C se tomó como el 100 % de actividad residual. Siguiendo un protocolo idéntico se analizó el efecto del GSSG 5 mM sobre la termoestabilidad de la enzima (○).

Calorimetría diferencial de barrido. De acuerdo con los datos suministrados por los experimentos de inactivación térmica, es claro que la glutatión reductasa pierde completamente su capacidad catalítica por arriba de los 76°C. La irreversibilidad de dicha inactivación sugiere, en principio, que la proteína ha sufrido cambios conformacionales significativos. Sin embargo, de los resultados mostrados en la sección previa no es posible concluir nada definitivo en este sentido.

Con el propósito de correlacionar dichos resultados con posibles cambios estructurales de la proteína, se procedió a analizar la conducta calorimétrica de la enzima. En la Fig. 12 se puede observar el perfil calorimétrico de la glutatión reductasa de *S. maxima* determinado a pH neutro. Una

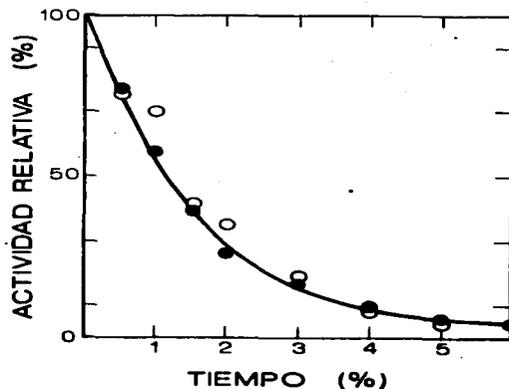


Figura 11. Capacidad de reactivación de la glutatión reductasa inactivada por calor. Se calentó una solución de la enzima desde temperatura ambiente siguiendo el protocolo descrito en la sección experimental. Al llegar a 73°C se extrajeron alícuotas a diferentes tiempos y se les determinó la actividad residual (●) ó bien se incubaron a 4°C por 24 h y entonces se ensayó la actividad enzimática (○).

primera característica digna de mencionarse es la forma asimétrica del trazo, que sugiere que en la desnaturalización térmica de la proteína deben estar implicados más de dos estados en la transición. En segundo lugar, la región donde se localiza la endoterma parece coincidir con el intervalo de temperaturas donde se da la inactivación; sin embargo, es necesario considerar la diferencia en las concentraciones de proteína utilizada en ambos casos. En este sentido, está establecido que para las proteínas oligoméricas la T_m muestra una dependencia proporcional a la concentración de proteína, debido a la energía extra invertida en la disociación de las subunidades constituyentes [93]. Sin embargo, cuando se analizó el efecto de dicha variable sobre la T_m de la glutatión reductasa de *S. maxima*, no se observó una tendencia consistente con lo esperado. A concentraciones de proteína de 0.7, 1.4 y 2.5 mg/ml, las T_m fueron de 74.6°C, 74.4°C y 76.4°C, respectivamente.

Por otra parte, la transición calorimétrica resultó ser completamente irreversible. Una muestra de la proteína calentada hasta 80°C, enfriada y vuelta a analizar en el calorímetro no mostró ninguna

endoterma. Tal observación excluye el empleo de los métodos de la termodinámica del equilibrio para el análisis de los datos. Pese a ello, es posible obtener información sobre la desnaturalización térmica de la proteína, así como del proceso irreversible, a partir de la dependencia de los parámetros termodinámicos respecto de la velocidad de calentamiento. El modelo más sencillo para una desnaturalización térmica con estas características, implica la conversión del estado nativo (N) a una forma final (F) mediante un proceso cinético de primer orden [94] de acuerdo con el siguiente esquema:

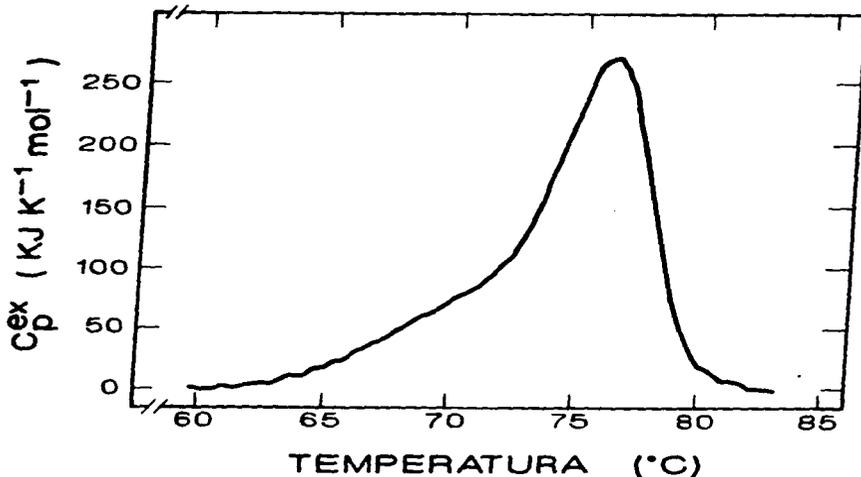


Figura 12. Perfil calorimétrico de la glutatión reductasa. Se colocó una muestra de la proteína en la celda del calorímetro y se calentó gradualmente como se describió en la sección experimental.

En este caso, a partir de cada trazo calorimétrico es posible obtener el valor de la constante de velocidad de la etapa irreversible, a una temperatura dada, mediante la ecuación:

$$k(T) = v \frac{C_p}{Q_t - Q}$$

donde v representa la velocidad de barrido; C_p es el exceso de capacidad calorífica; Q_t corresponde al calor total de la endoterma y Q al calor liberado hasta una cierta temperatura [31]. En el caso particular de la glutatión reductasa de *S. maxima*, los experimentos calorimétricos llevados a cabo a diferentes velocidades de calentamiento demostraron efectivamente una dependencia de los

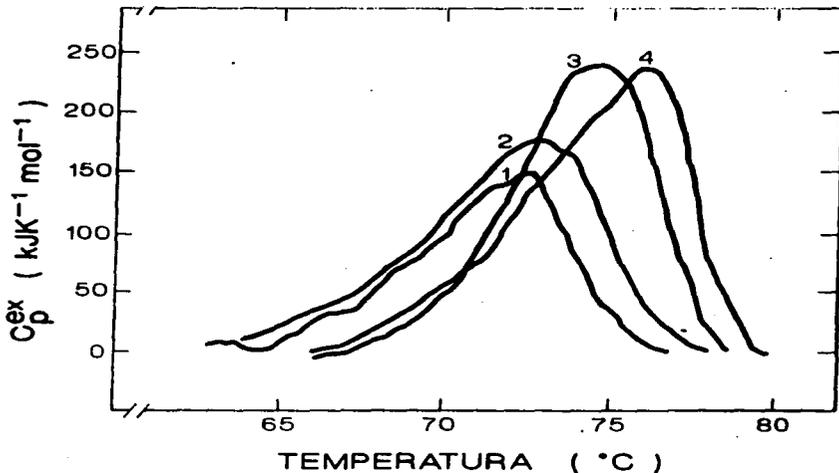


Figura 13. Perfiles calorimétricos de la glutatión reductasa obtenidos a diferentes velocidades de barrido. Se colocaron alícuotas de la proteína (0.7 mg/ml) en la celda calorimétrica y se calentaron siguiendo el protocolo descrito en la sección experimental. Las velocidades de calentamiento utilizadas, en K/min fueron: 1) 0.5; 2) 0.75; 3) 1; 4) 1.5.

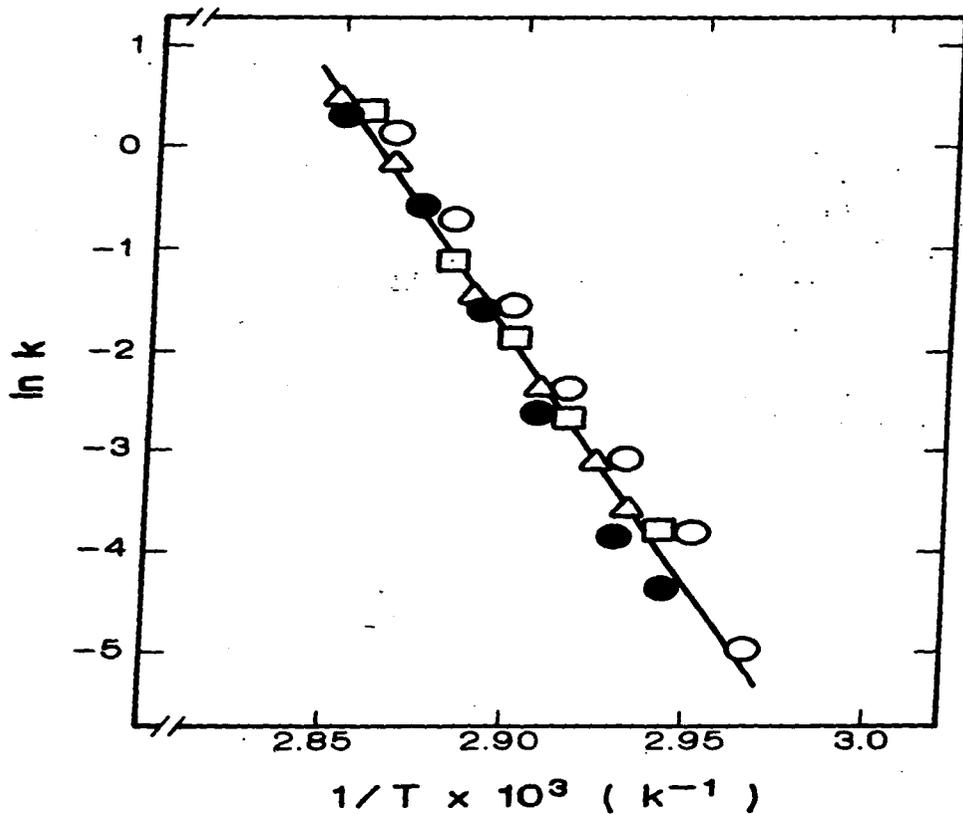
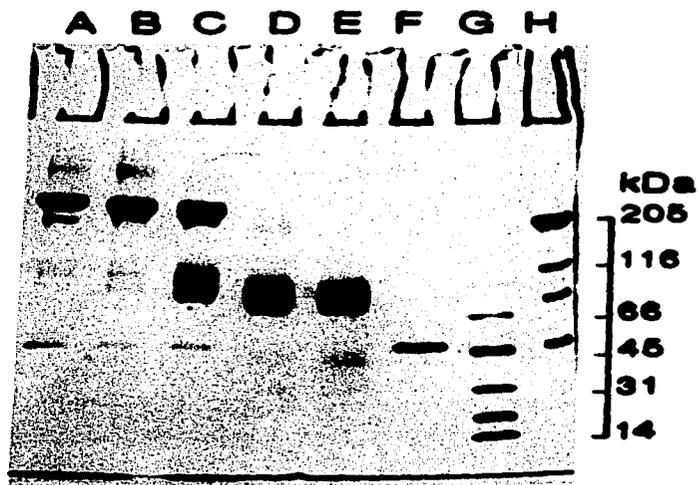
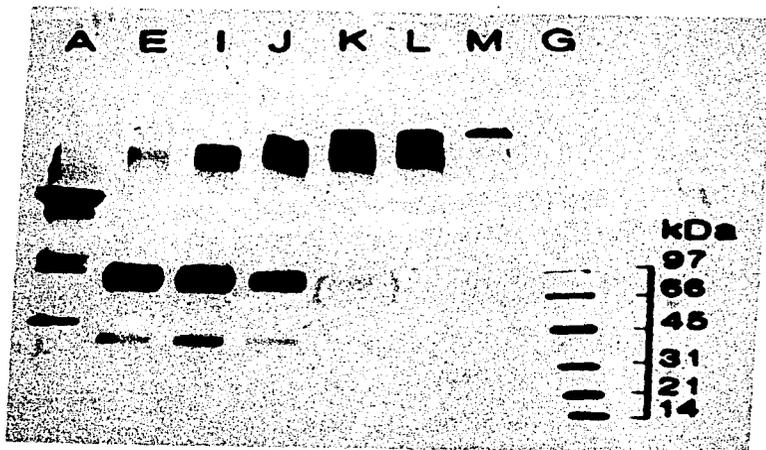


Figura 14. Gráfica de Arrhenius construido con las constantes de velocidad obtenidas a partir de los perfiles calorimétricos de la Fig. 13. ($r = 0.99$). (□) 0.5 K/min; (○) 0.75 K/min; (●) 1 K/min; (△) 1.5 K/min.



a

Figura 15 a. Patrones electroforéticos de la glutatión reductasa después de haber sido entrecruzada a diferentes temperaturas en la zona previa a la transición. Las temperaturas analizadas fueron: A) 20°C, B) 40°C, C) 50°C, D) 60°C, E) 66°C, F) enzima no entrecruzada, G) marcadores de masa molecular baja, H) marcadores de masa molecular alta.



b

Figura 15 b. Patrones electroforéticos de la glutatión reductasa después de haber sido entrecruzada a diferentes temperaturas en la región donde ocurre la transición calorimétrica. Las temperaturas analizadas fueron: A) enzima entrecruzada a 20°C, E) 68°C, I) 70°C, J) 72°C, K) 74°C, L) 76°C, M) 78°C, G) marcadores de masa molecular baja.

parámetros termodinámicos respecto de dicha velocidad (Fig. 13), lo que sugiere que el proceso de desnaturalización térmica de esta proteína es controlado cinéticamente debido a la existencia de etapas irreversibles.

Con la información así obtenida, es posible calcular la energía de activación del proceso irreversible a partir de un gráfico de Arrhenius. Los datos correspondientes a las cuatro velocidades de barrido utilizadas se muestran en la Fig. 14. Es claro que los cuatro conjuntos de datos se ajustan razonablemente bien a una sola línea recta, lo que sugiere que el modelo utilizado explica la conducta calorimétrica de la glutatión reductasa de *S. maxima* en forma adecuada. A partir de la pendiente de la gráfica se obtiene una energía de activación de 411 kJ/mol.

A fin de estimar la magnitud del cambio de entalpía molar, fue necesario conocer el estado oligomérico de la enzima en el intervalo donde se da la transición térmica; para ello, se llevaron a cabo experimentos de entrecruzamiento covalente en combinación con electroforesis desnaturalizante en SDS. La Fig. 15 a muestra los perfiles electroforéticos determinados a temperaturas inferiores a aquellas del intervalo de la transición. Puede verse que el calentamiento gradual de la proteína da como resultado la disociación del tetrámero de tal manera que, previo a la desnaturalización, la única especie existente es el dímero. Además, en la región correspondiente a la endoterma no se observa un incremento en la abundancia relativa del monómero (Fig. 15 b), lo que sugiere fuertemente que la desnaturalización térmica de la glutatión reductasa de *S. maxima* no va acompañada de un evento disociación y explica además la no dependencia de la T_m respecto de la concentración de proteína. En la Fig. 15 b puede verse además que la proteína desnaturalizada tiene una fuerte tendencia a agregarse.

Con base en los resultados anteriores, los datos calorimétricos se ajustaron a una proteína dimerica con una M_r de 96 kDa [76]. Cuando tales valores se graficaron en función de la velocidad de calentamiento, se obtuvo el perfil mostrado en la Fig. 16, que muestra una tendencia del ΔH_{cal} a alcanzar asintóticamente un valor máximo a altas velocidades de calentamiento. Dadas las limitaciones instrumentales de los calorímetros actuales, no es posible alcanzar velocidades de barrido mayores a 2 grados/mín; sin embargo, a partir de un regráfico de ΔH_{cal} versus $1/v$ [95] es posible hacer una estimación del cambio de entalpía en ausencia del proceso irreversible por extrapolación a velocidad de calentamiento infinito. El inserto de la Fig. 16 muestra dicho regráfico con los datos calorimétricos de la glutatión reductasa. A partir del intercepto se obtuvo un valor de 1.807 MJ/mol. A fin de

comparar este parámetro con los valores correspondientes a otras proteínas, fue necesario expresar el valor anterior por gramo de proteína - es decir, el cambio de entalpía específico -. Al hacerlo así, se obtuvo un valor (18.8 J/g) significativamente menor al reportado para las proteínas que sufren una desnaturalización completa [96]. Así, parecía factible que la transición endotérmica observada en el calorímetro para la glutatión reductasa de *S. maxima* fuese el resultado de una desnaturalización parcial de la proteína.

Para verificar o descartar el punto anterior, se procedió a analizar el proceso de desnaturalización térmica de la glutatión reductasa, siguiendo los cambios de elipticidad durante el calentamiento gradual de la proteína. Como se muestra en la Fig. 17, el patrón observado apoya la hipótesis de una transición parcial. Tanto la forma de la curva como la magnitud del cambio total de elipticidad, sugieren que la proteína solo sufre una pérdida parcial de sus elementos de estructura secundaria al ser calentada; además, el espectro residual de la proteína al final de la transición,

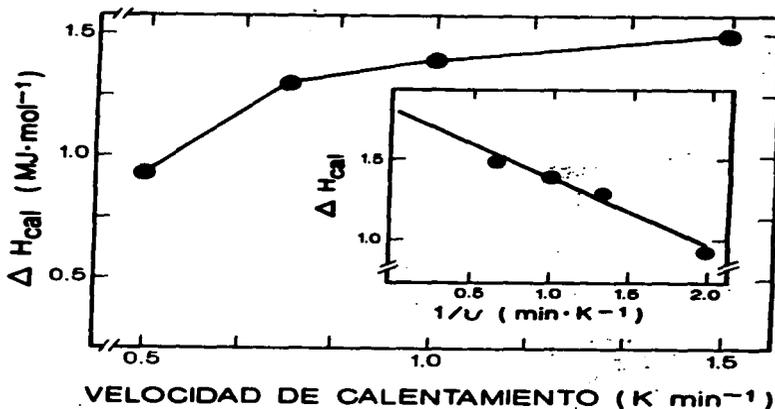


Figura 16. Dependencia del ΔH_{cal} respecto de la velocidad de calentamiento. Cada valor fue obtenido por integración del perfil calorimétrico correspondiente. Recuadro: gráfica del ΔH_{cal} en función del recíproco de la velocidad de calentamiento ($r = 0.985$).

determinado a 80°C, revela un perfil muy similar a aquel de la proteína nativa (inserto de la Fig. 17).

Cuando el experimento anterior se repitió en presencia del Gdn-Cl a concentraciones inferiores a aquellas que inducen la desnaturalización, el resultado obtenido fue muy diferente; bajo estas condiciones, el registro de la elipticidad mostró una transición cooperativa completa, mientras que el espectro de la proteína así calentada fue muy semejante a aquel de una muestra desnaturalizada por Gdn-Cl (recuadro de la Fig. 17). A concentraciones inferiores a Gdn-Cl 2.8 M se obtuvieron los mismos resultados cualitativos; sin embargo, se observó una dependencia notable del ΔH y la T_m respecto de la concentración de desnaturalizante (datos no mostrados).

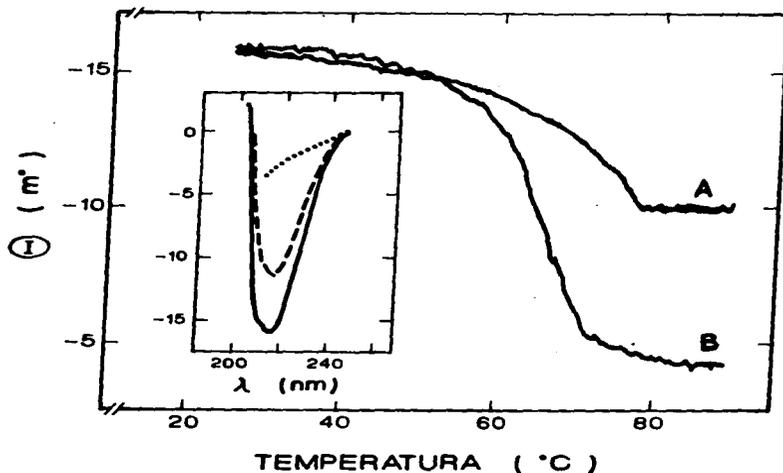


Figura 17. Elipticidad a 222 nm de la glutatión reductasa en función de la temperatura. Se colocó una muestra de la proteína (0.15 mg/ml) en la celda del espectropolarímetro en ausencia (A) o en presencia (B) de Gdn-Cl 2.8 M y se calentó desde temperatura ambiente. La señal se registró en forma continua. Recuadro: Espectro de DC en el UV lejano de la glutatión reductasa desnaturalizada por calor en ausencia del Gdn-Cl (---). El espectro fue registrado a 80°C después de que la enzima había sido calentada gradualmente como se describió. Para fines comparativos se incluyen también los espectros de la enzima nativa (—) y desnaturalizada en Gdn-Cl 5 M (· · · · ·).

Efecto del NADPH sobre la transición calorimétrica. Como se demostró anteriormente, el NADPH ejerce un efecto notable sobre la termoestabilidad de la enzima cuando el parámetro monitoreado es la actividad enzimática. Con el propósito de determinar si dicho sustrato es también capaz de provocar cambios en la conducta calorimétrica de la enzima, se procedió a analizar el efecto del NADPH sobre la desnaturalización térmica de la glutatión reductasa de *S. maxima*. La Fig. 18 muestra el perfil resultante de tal experimento. Comparado con el trazo obtenido en ausencia de NADPH (Fig. 12), el cambio provocado por el nucleótido resulta espectacular. Tanto el intervalo de temperaturas donde se da la transición, como la magnitud del ΔH_{cal} son claramente diferentes. Es interesante observar que la $T_{1/2}$ - derivada de los experimentos de inactivación térmica en presencia del NADPH - no coincide con la T_m resultante del experimento calorimétrico. A partir del área bajo la curva se calculó un ΔH_{cal} de 1.04 MJ/mol.

Debido a que el GSSG no modificó el perfil de inactivación térmica de la enzima, se decidió no analizar su efecto sobre la transición calorimétrica.

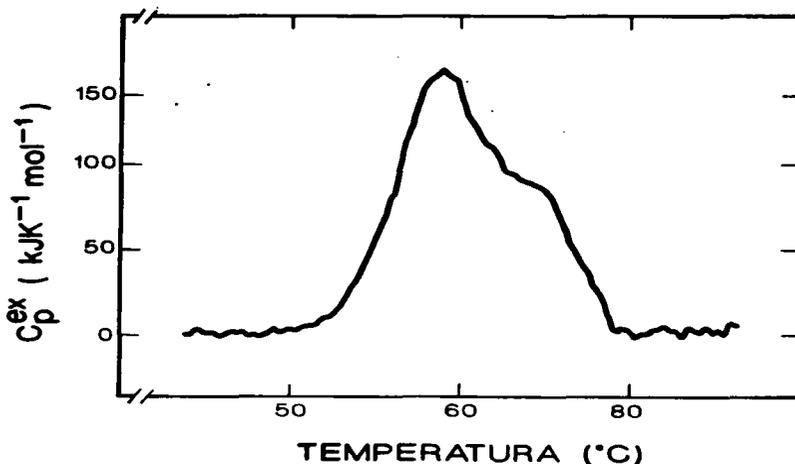


Figura 18. Perfil calorimétrico de la glutatión reductasa en presencia de NADPH. Se colocó una muestra de la enzima (1.4 mg/ml) en la celda del calorímetro y se calentó en presencia de NADPH 500 μM como se describió en la sección experimental

DISCUSION

El empleo de agentes desnaturalizantes ha sido de gran utilidad en el estudio de las proteínas, ya que ha permitido obtener una gran cantidad de información respecto de la estabilidad de tales macromoléculas [11,28,94]. El objetivo final de dichos estudios es doble: por una parte, dilucidar los principios que gobiernan el plegamiento de las cadenas polipeptídicas, desde una conformación de cadena desorganizada (random coil) hasta la conformación altamente estructurada característica del estado nativo; en segundo término, obtener información cuantitativa respecto de los parámetros termodinámicos propios de cada proteína. Con la introducción de la tecnología de la Biología Molecular se hizo posible la creación de mutantes controlados, lo que ha permitido evaluar, en el caso de algunas proteínas simples, la importancia de aminoácidos específicos en la estabilidad global [97,98]. Pese a ello, la respuesta a la primera pregunta parece aún lejana.

El presente trabajo se circunscribe a indagar en la estabilidad de una proteína particular: la glutatión reductasa. La información previa disponible, aunque dispersa, escasa y restringida a evaluar la estabilidad en función de la actividad enzimática, apuntaba a una proteína relativamente estable [57,59,73]. Los datos obtenidos con la enzima de *S. maxima* refuerzan dicha observación.

Un primer aspecto que llama la atención es la gran tolerancia de la capacidad catalítica de la glutatión reductasa a la urea (Fig. 2B). En este sentido, es importante señalar que los datos colectados se obtuvieron con soluciones de la enzima previamente incubadas durante un periodo prolongado - hasta 24 h - en presencia del agente desnaturalizante, por lo que se supone representan condiciones en equilibrio. Si bien la actividad residual es de sólo 8 % en urea 8 M, la enzima se recupera completamente por dilución del compuesto desnaturalizante. La información estructural recabada revela que el "status" conformacional del intermediario inactivo es muy semejante al del estado nativo, sugiriendo que la pérdida de la actividad se debe a una alteración estructural muy sutil y no a una desnaturalización reversible. Aunque el Gdn-Cl a bajas concentraciones también da lugar a una inactivación reversible sin cambios conformacionales significativos (Fig. 2A), la naturaleza estructural del intermediario involucrado debe ser diferente respecto de aquel observado en soluciones de urea. Esta conclusión deriva de los resultados obtenidos en los experimentos de accesibilidad de los grupos tiol de la proteína y de espectroscopía de fluorescencia (Figs. 6 y 7).

Los resultados anteriores pueden explicarse a la luz de un modelo que supone que una región local de la proteína adquiere la conformación de un intermediario extendido, como ha sido descrito

por Freire [99]; en dicho intermediario, las interacciones terciarias locales están perturbadas, manteniendo intactas las estructuras secundarias. Obviamente, las regiones afectadas de la enzima deben ser diferentes, ya sea que la inhibición se deba a la urea o al Gdn-Cl. Para algunas proteínas se ha demostrado, mediante estudios de intercambio de hidrógeno [100,101], la existencia de conformaciones muy semejantes al estado nativo en equilibrio con este último, incluso en ausencia de agentes desnaturalizantes. Los datos mostrados en el presente trabajo sugieren que, para el caso de la glutatión reductasa de *S. maxima*, existen al menos dos de tales conformaciones.

Los resultados de la inactivación reversible también sugieren que existen regiones de la proteína cuya estabilidad es inferior a la de la proteína como un todo. Si bien resulta atractivo proponer que la inactivación reversible es consecuencia de la menor estabilidad de alguno de los dominios de la enzima, no es claro si tal inactivación se debe a una perturbación localizada en uno o más dominios. Como se mencionó en la sección introductoria, es probable que dichas regiones lábiles involucren al sitio activo y/o los sitios de unión de los sustratos, ya que estas se caracterizan por presentar un elevado grado de flexibilidad.

Desde el punto de vista termodinámico, la estabilidad de dichos intermediarios parece ser muy semejante entre sí y marginal. La Fig. 19 muestra la dependencia del ΔG , correspondiente a la transición N = I, respecto de la concentración de desnaturalizante. La extrapolación a concentración cero revela valores de 2 kcal/mol y 1.55 kcal/mol para los intermediarios observados en urea y Gdn-Cl, respectivamente. Aunque el análisis termodinámico basado en los datos de inactivación-reactivación no es estrictamente válido, puede suponerse que la pérdida gradual de la actividad se debe a un desplazamiento del equilibrio entre dos conformaciones muy semejantes - como se mencionó anteriormente - una de las cuales es completamente inactiva.

Un punto que no se debe pasar por alto es el relacionado a la actividad enzimática de ambos oligómeros; en este sentido, los datos de la inactivación con urea parecen concluyentes, sugiriendo que tanto el dímero como el tetrámero presentan la misma actividad específica. Así, en el intervalo de concentraciones donde se da la disociación del tetrámero en dímeros, no se observa una caída correspondiente en la actividad. En urea 3 M, donde el único oligómero detectable es el dímero (Fig. 4), la actividad residual es de aproximadamente 70 %, sin que se observe una discontinuidad en la curva de actividad residual (Fig. 2B). De hecho, el único cambio estructural significativo que acompaña a la inactivación inducida por urea es precisamente la disociación del tetrámero en

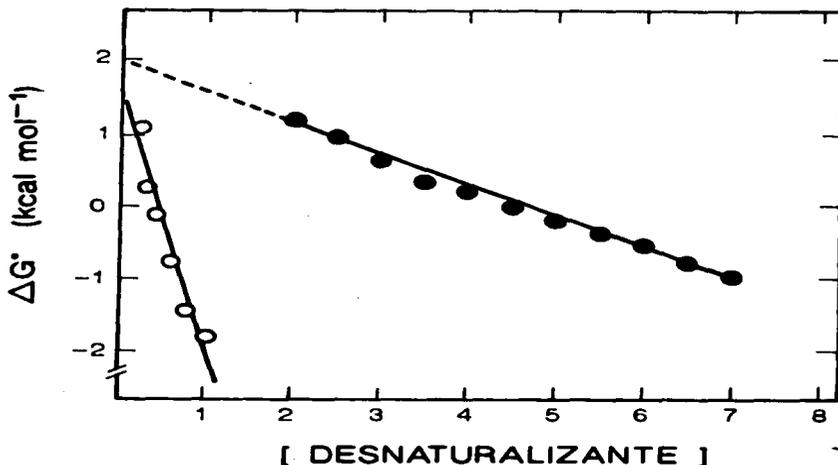


Figura 19. Estabilidad termodinámica de los intermediarios observados en soluciones de urea y Gdn-Cl. Cada punto se obtuvo a partir de los datos de actividad residual mostrados en la Fig. 2, tanto para la urea (●) como para el Gdn-Cl (○). Los coeficientes de correlación son -0.995 y -0.984 para urea y Gdn-Cl, respectivamente.

dímeros. Dicho cambio contrasta con la estabilidad del tetrámero en soluciones de Gdn-Cl a concentraciones comparables a aquellas donde la urea promueve la disociación. Aunque "a priori" este resultado puede parecer sorprendente, dado el mayor poder desnaturalizante del Gdn-Cl, debe tenerse presente el carácter iónico de este último. En este sentido cabe señalar que el tetrámero retiene su estructura cuaternaria en presencia de NaCl 2 M [78] y que, como se mencionó en la sección introductoria, el fosfato inorgánico favorece su agregación [78]. Parece razonable suponer que en la estabilidad del tetrámero, las interacciones hidrofóbicas juegan un papel esencial.

La variación de la energía libre de disociación de la glutatión reductasa respecto de la concentración de urea (inserto de la Fig.4), es significativamente mayor que aquella reportada para la hemoglobina humana [102]. Si se considera el hecho de que en condiciones nativas el grado de disociación de la glutatión reductasa de *S. maxima* es mayor que el de la hemoglobina, y suponiendo que el arreglo de subunidades en ambas proteínas sea el mismo - tetrámeros con simetría D_2 - podría plantearse la hipótesis de que la dependencia mencionada está dada por las interacciones del área de

interface que estabilizan al tetrámero correspondiente. De acuerdo con ello, a mayor área de interface menor será la variación de la constante de disociación respecto de la concentración de urea (dada por la pendiente del gráfico ΔG versus [urea]). Desafortunadamente, aunque se conoce en detalle el área de interface de un cierto número de proteínas tetraméricas [103], no existe información respecto a la estabilidad de su estructura cuaternaria en soluciones de urea, con excepción de la hemoglobina humana.

Al comparar los resultados de los experimentos electroforéticos y cromatográficos en presencia de urea (Figs. 3 y 8), se pone de manifiesto que no hay coincidencia en el intervalo de concentraciones donde se observa la disociación. Mientras que los perfiles cromatográficos muestran que dicho proceso ocurre entre 0.5 M y 2 M, el patrón electroforético sugiere que la disociación se da a mayores concentraciones. Aunque tales observaciones podrían sugerir incongruencia en la conducta de la glutatión reductasa, debe tenerse presente la magnitud del tiempo que la enzima permaneció en contacto con la urea antes de cada experimento. En la electroforesis la proteína nativa fue colocada directamente sobre el gel, sin contacto previo con la urea; en cambio, las muestras aplicadas a la columna cromatográfica fueron preincubadas durante 24 h en la concentración correspondiente de urea. En el primer caso, no hubo tiempo suficiente para que el sistema llegara al equilibrio en todo el intervalo de concentraciones.

En contraste con el tetrámero, es digno de mencionar la gran estabilidad que exhibe la interface entre subunidades en el dímero. En la glutatión reductasa de eritrocito humano dicha interface está constituida por dos regiones de contacto, una "superior" y una "inferior", con un área total de 3400 \AA^2 por subunidad [67]. Cabe señalar que los residuos localizados en la región superior muestran una identidad elevada (92 %) entre la enzima humana y la de *E. coli*; en contraste, la identidad de la región inferior es de solo el 37 % [67]. Existen evidencias que sugieren que la contribución de la región superior de la interface a la estabilidad del dímero, es mucho mayor que la de la región inferior (constituida por extensiones del dominio de unión del FAD); así, mientras que el área de superficie oculta por la región superior es de 2100 \AA^2 , la correspondiente a la región inferior es de sólo 1200 \AA^2 . Por otra parte, los estudios cristalográficos también han puesto de manifiesto que los residuos que contribuyen a la región inferior exhiben una elevada flexibilidad [67].

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan que la interface de la proteína dimérica es notablemente resistente a la disociación. Aunque en Gdn-Cl 5 M la proteína se comporta como un

monómero desnaturalizado, a concentraciones inferiores - entre 4 y 4.5 M - existe un equilibrio entre el monómero y el dímero parcialmente desnaturalizados (Fig. 5C) sugiriendo que la disociación en monómeros es concomitante con la desnaturalización de la proteína. Es tentador sugerir que en el dímero parcialmente desdoblado, es la región superior de la interface de contacto la que se mantiene intacta. Los experimentos calorimétricos pusieron de manifiesto que, más que disociarse, el desdoblamiento parcial de las cadenas polipeptídicas va acompañado de su agregación (Fig. 15b). Así, en Gdn-Cl, la transición al estado desnaturalizado involucra cambios simultáneos en las estructuras cuaternaria, terciaria y secundaria, que se traslapan con la pérdida irreversible de la actividad. De particular interés es la existencia de diversos intermediarios, cuyo grado de desnaturalización depende de la concentración del Gdn-Cl, como revelan los resultados de los experimentos hidrodinámicos y espectroscópicos. En 3.5 M, la única especie detectable correspondió a una forma parcialmente desdoblada del dímero, que en Gdn-Cl 4 M muestra ya un grado considerable de disociación en monómeros. La existencia de una zona de reacción intermedia en el perfil cromatográfico sugiere que el equilibrio entre el monómero y el dímero parcialmente desdoblados es relativamente rápido. A pesar de que en Gdn-Cl 4.5 M la glutatión reductasa ha perdido completamente la capacidad de reactivarse, los intermediarios observables bajo estas condiciones no han llegado todavía al estado completamente desnaturalizado.

Los resultados experimentales, concernientes a la inactivación y desnaturalización de la glutatión reductasa de *S. maxima* inducida por urea o Gdn-Cl, pueden ser integrados en el siguiente esquema:



En este modelo, M_2 y M_4 representan las formas dimérica y tetramérica, respectivamente, de la enzima nativa, mientras que M_2^* y M_4^* son conformaciones inactivas de las mismas, en equilibrio con los correspondientes conformeros nativos. La adición de Gdn-Cl incrementa la estabilidad de M_4^* , de tal manera que a concentraciones superiores a 1.2 M el equilibrio ha sido completamente desplazado en favor de dicha especie. De manera similar, la presencia de urea desplaza el equilibrio nativo hacia M_2^* , siendo esta última la única especie detectable hasta la máxima concentración analizada de urea. Por otra parte, M_4^* se mantiene como la única forma detectable de la enzima en

soluciones de Gdn-Cl hasta que este compuesto alcanza una concentración de 2.8 M, condición que favorece la disociación del intermediario tetramérico en dímeros (D_2). Sin embargo, la conformación del intermediario dimérico es claramente diferente de aquella de M_2^* , y su grado de desdoblamiento se incrementa con la concentración de Gdn-Cl. En 4 M muestra ya un grado considerable de disociación en monómeros parcialmente desnaturizados. Como se discutió anteriormente, llama la atención la gran estabilidad de la interface del dímero, lo que permite que la disociación y la desnaturización se traslapen en el mismo intervalo de concentraciones de Gdn-Cl, estableciéndose un equilibrio entre las conformaciones parcialmente desnaturizadas de dímero y monómero. Finalmente, en soluciones de Gdn-Cl cercanas a 5 M, la especie más estable - y única bajo dichas condiciones - está representada por la forma desnaturizada del monómero (D).

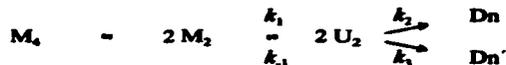
¿A que se debe la notable estabilidad estructural de la glutatión reductasa en soluciones de urea? No debe olvidarse que los resultados del presente trabajo fueron obtenidos a pH 7.0, condición que maximiza la resistencia de las proteínas frente a agentes desnaturizantes [11,28]. Se ha propuesto que la estabilidad conformacional de una proteína esta determinada por la flexibilidad de la cadena polipeptídica [104], de tal manera que conforme ésta se incrementa, aumenta la susceptibilidad frente a los agentes desnaturizantes. Si bien no es el comportamiento esperado, existen reportes de enzimas que son notoriamente estables en presencia de urea [105-106]. Así, en el límite de solubilidad de la urea (10 M), la lisozima sólo se desnaturiza en un 25 % [105], mientras que la endoglucanasa de *Clostridium thermocellum* retiene la conformación nativa después de 6 h en urea 8 M [106].

En lo que respecta a la desnaturización térmica de la glutatión reductasa de *S. maxima*, hay varios aspectos que merecen ser analizados. En primer lugar, resulta interesante que la especie involucrada en la transición calorimétrica sea el dímero; en este sentido, el análisis electroforético de las muestras entrecruzadas a diferentes temperaturas es concluyente (Fig. 15b). Aunque en un trabajo anterior se demostró que el calentamiento de la enzima a pH 7.7 resultaba en la disociación del tetramero [77], los experimentos calorimétricos de la presente investigación fueron realizados a pH 7.0, por lo que resultaba esencial verificar dicho punto. Al comparar los resultados obtenidos a ambos valores de pH, se pone de manifiesto que el intervalo de temperaturas donde ocurre la disociación es mayor a pH neutro que a pH 7.7, revelando la mayor estabilidad del tetramero a pH 7.0.

En segundo lugar, cabe señalar el caracter parcial de la desnaturización térmica. La

retención de un porcentaje significativo de estructuras secundarias en la enzima calentada a 80°C, así como la observación de una transición cooperativa en presencia de concentraciones relativamente bajas del Gdn-Cl, apoyan dicha conclusión. La persistencia de estructura residual en las proteínas desnaturalizadas por calor parece ser un fenómeno frecuente, tanto en proteínas monoméricas como oligoméricas [33-35]. En el caso de la glutatión reductasa de *S. maxima*, la naturaleza parcial de la transición parece deberse a la agregación de las cadenas polipeptídicas parcialmente desdobladas; este último fenómeno parece explicar también el carácter cinético del proceso, que se manifiesta en la dependencia de la T_m y el ΔH_{cal} respecto de la velocidad de calentamiento. Para estos casos complejos, dicha variable determina la abundancia relativa de cada especie - nativa, parcialmente desdoblada y final - al terminar la transición. Ya que es de esperar que la agregación sea un proceso exotérmico, se entiende que a mayor velocidad de calentamiento mayor sea la magnitud del ΔH_{cal} .

El modelo que se presenta a continuación parece ser consistente con las observaciones experimentales asociadas con la desnaturalización térmica de la glutatión reductasa:



siendo M_4 y M_2 las especies tetramérica y dimérica, respectivamente; U_2 representa el estado parcialmente desdoblado del dímero, mientras que Dn y Dn' corresponden a diferentes agregados de este último. El modelo propuesto requiere que las constantes de velocidad k_2 y k_3 sean mucho mayores en relación con k_1 , de modo que k_1 está asociada con la etapa limitante de la velocidad del proceso. Además, para explicar la dependencia de los parámetros termodinámicos (ΔH_{cal} y T_m) respecto de la velocidad de calentamiento se postula que el estado al que llega la enzima al finalizar la transición está representado por una mezcla de Dn y Dn' , cuyas proporciones variarán dependiendo de dicha velocidad. Para ello es necesario que, en cierto intervalo de temperaturas, el proceso que conduce a Dn sea preferido sobre aquel que lleva a Dn' , y que se invierta la preferencia en otro intervalo. Ello implica que las energías de activación para ambos eventos sean diferentes (es decir, pendientes diferentes de sus gráficos de Arrhenius).

En relación al origen de la irreversibilidad en la transición del estado nativo al desnaturalizado de la glutatión reductasa de *S. maxima*, sea inducida por compuestos químicos o por calor, debe tenerse presente, en primer lugar, que se trata de una proteína compleja constituida por cuatro

cadena polipeptídica organizadas en cuatro dominios estructurales. Así, el desdoblamiento parcial o total de cualquiera de estos últimos podría resultar en la exposición de regiones con un elevado contenido de residuos hidrofóbicos, lo que daría lugar a su agregación para formar complejos de manera irreversible. Esta posibilidad puede aplicarse a la desnaturalización térmica de la enzima, explicando la retención de un porcentaje significativo de estructura organizada. En el caso de la desnaturalización inducida por Gdn-Cl, si bien el carácter total de la misma debe resultar en una exposición considerablemente mayor de área hidrofóbica, la estabilización de las cadenas polipeptídicas desdobladas por el Gdn-Cl evita su agregación.

Por otra parte, puede descartarse la posibilidad de que la irreversibilidad observada con el Gdn-Cl sea debida a la adopción de conformaciones "erroneas" por intercambios tiol-disulfuro, ya que la adición de β -mercaptoetanol a las mezclas de desnaturalización-renaturalización no resultó en ningún incremento en el porcentaje de reactivación. Es claro, entonces, que deben buscarse hipótesis alternativas para explicar la irreversibilidad de la desnaturalización. En este sentido, se sabe que la readopción de la configuración correcta de los enlaces polipeptídicos (cis o trans), en los cuales están involucrados residuos de prolina, es un proceso lento y constituye una etapa limitante en el replegamiento hacia la conformación nativa [107,108]. Si consideramos que en cada subunidad de la glutatión reductasa de *S. maxima* hay 8 residuos de prolina [76], esta última hipótesis aparece como probable.

Una última alternativa para explicar la irreversibilidad se basa en la existencia de codones poco frecuentes, localizados en aquellas regiones del RNA mensajero que codifican a los segmentos polipeptídicos "interdominio". Se cree que durante la síntesis *in vivo* de ciertas proteínas, los codones mencionados actúan como "pausas traduccionales", dando tiempo al dominio recién sintetizado para que se pliegue en la conformación nativa [109,110].

Cabe mencionar que, si bien la desnaturalización de la glutatión reductasa inducida por Gdn-Cl resultó ser un proceso irreversible, de manera que no fue posible recuperar la actividad enzimática inicial, la remoción de dicho compuesto resultó en una especie conformacionalmente diferente a los estados nativo y desnaturalizado. Ello sugiere que la cadena polipeptídica desdoblada es capaz de "replegarse" a un estado (ζ metaestable ?) que, si bien no corresponde a la conformación nativa, es claramente diferente de aquel adoptado en soluciones concentradas de Gdn-Cl.

Por lo que respecta al efecto del NADPH sobre la termoestabilidad catalítica y estructural

de la glutatión reductasa de *S. maxima*, es necesario señalar que la conducta observada es radicalmente opuesta a la reportada para otras proteínas, en las cuales la unión del sustrato se traduce en un aumento de la termoeestabilidad [111,112]. En el caso de la glutatión reductasa, cualquier hipótesis que pretenda explicar los efectos espectaculares observados debe basarse en los cambios conformacionales que acompañan a la unión del NADPH. En primer lugar, cabe señalar que no se han encontrado sitios de fijación secundarios para dicho sustrato, incluso cuando la proteína se incubaba en presencia de concentraciones elevadas del mismo [113]. En segundo lugar, aunque los residuos involucrados en la unión del nucleótido provienen en su mayor parte del dominio del NADPH, también participan residuos del dominio del FAD, del dominio central y del dominio de interface [66]. Sin embargo, los movimientos sufridos por las cadenas laterales de la Tyr 197 y la Arg 218, como consecuencia de la fijación de los anillos de nicotinamida y adenina, respectivamente [113] son, con mucho, los más significativos. Si bien tales cambios distan de ser espectaculares, podrían contribuir a disminuir la estabilidad estructural de la proteína.

Por otra parte, la evidencia cristalográfica ha revelado que la unión del NADPH a la glutatión reductasa va acompañada de un rearrreglo de la estructura del solvente en el sitio de fijación [66], de tal manera que son desplazadas 14 moléculas de agua. En este sentido se ha propuesto que, en ausencia de sustrato, el sitio activo de las enzimas es ocupado por moléculas de agua que "imitan" los grupos polares del ligando [114]. Es posible que en el caso de la glutatión reductasa, las interacciones establecidas entre el NADPH y la enzima no compensen la estabilidad perdida como consecuencia de la remoción de moléculas de agua, resultando así en una proteína más lábil.

CONCLUSIONES

- 1) La glutatión reductasa de la cianobacteria *S. maxima* es una proteína que exhibe una estabilidad considerable frente a agentes desnaturalizantes. Si bien la enzima es completamente inactivada por urea y Gdn-Cl, dicha inactivación es reversible y no va acompañada por cambios conformacionales considerables; incluso a temperaturas elevadas (80°C) la proteína retiene un porcentaje importante de estructura ordenada. De acuerdo con lo anterior, la conducta desnaturalizante de la glutatión reductasa permite agruparla junto a aquellas proteínas caracterizadas por que la pérdida de la actividad biológica precede al desdoblamiento de la cadena polipeptídica.
- 2) La inactivación reversible es atribuida a cambios conformacionales locales. El modelo que más se ajusta a los resultados obtenidos supone que una región localizada de la cadena polipeptídica pierde su estructura terciaria pero retiene la estructura secundaria. Aunque la inactivación reversible se observó tanto con la urea como con el Gdn-Cl, los intermediarios resultantes no son estructuralmente equivalentes.
- 3) La interface involucrada en la formación del dímero presenta una estabilidad excepcional. Sólo en presencia de un agente desnaturalizante como el Gdn-Cl es posible disociar completamente a la enzima en monómeros; sin embargo, tal disociación es concomitante con la desnaturalización de la cadena polipeptídica. Es probable que dicha característica esté relacionada con el hecho de que en la formación del sitio activo participan residuos de ambas subunidades, por lo que la selección natural ha favorecido la retención de aquellas interacciones que imparten una gran estabilidad al dímero.
- 4) Ambos oligómeros son igualmente activos. Ello lleva a postular que la existencia de una glutatión reductasa tetramérica en *S. maxima* no parece estar asociada a ningún aspecto regulatorio, sino que puede considerarse como un mero accidente evolutivo, resultante de una mutación que favoreció la agregación de la proteína dimérica sin alterar su función biológica. Podría así ser considerada un ejemplo de mutación neutra.
- 5) El efecto espectacular del NADPH sobre la termoestabilidad de la glutatión reductasa es atribuido a los cambios en la estructura del solvente en el sitio de fijación del nucleótido, como resultado de la unión de dicho sustrato. Sin embargo, esta hipótesis requiere una investigación posterior.

REFERENCIAS

- 1) Sela, M., White, F.H., and Anfinsen, C.B. (1957) *Science* 125: 691-692.
- 2) Privalov, P.L. (1992) in *Protein Folding* (Creighton, T.E., ed.): 83-126. Freeman, New York.
- 3) Kauzmann, W. (1959). *Adv. Prot. Chem.* 14: 1-63
- 4) Tanford, C. (1968). *Adv. Prot. Chem.* 23: 121-282.
- 5) Tanford, C. (1970). *Adv. Prot. Chem.* 24: 1-95
- 6) Nozaki, Y., and Tanford, C. (1971). *J. Biol. Chem.* 246: 2211-2217.
- 7) Nozaki, Y., and Tanford, C. (1963). *J. Biol. Chem.* 238: 4074-4081.
- 8) Nozaki, Y., and Tanford, C. (1970) *J. Biol. Chem.* 245: 1648-1652.
- 9) Spiro, K. (1900) *Z. Physiol. Chem.* 30:182-199.
- 10) Greenstein, J.P. (1938). *J. Biol. Chem.* 125:501-513.
- 11) Pace, C.N. (1975) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 3: 1-43.
- 12) Castellino, F.J. and Barker, R. (1968). *Biochemistry.* 7:4135-4138.
- 13) Elbaum, D., Pandolfelli, E.R. and Herskovits, T.T. (1974) *Biochemistry.* 13:1278-1284.
- 14) Herskovits, T.T., Carberry, S.E. and San George, R.C. (1983). *Biochemistry.* 22:4107-4112.
- 15) Tanford, C. (1962) *J. Amer. Chem. Soc.* 84: 4240-4247.
- 16) Alonso, D.O., and Dill, K.A. (1991) *Biochemistry* 30: 5974-5985.
- 17) Makhatazde, G.I. and Privalov, P.L. (1992) *J. Mol. Biol.* 226: 491-505.
- 18) Hibbard, L.S., and Tulinasky, A. (1978). *Biochemistry.* 17:5460-5468.
- 19) Yao, Q.Z., Tian, M. and Tsou, C.L. (1984). *Biochemistry.* 23:2740-2744.
- 20) Xiao, J., Liang, S. and Tsou, C.L. (1993). *Biochim. Biophys. Acta.* 1164:54-60.
- 21) Wang, H.R., Zhang, T. and Zhou, H.M. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1248:97-106.
- 22) Tsou, C.L. (1986) *Trends. Biochem. Sci.* 11: 427-429.
- 23) Brandts, J.F. (1965) *J. Amer. Chem. Soc.* 87: 2759-2760.
- 24) Sophianopoulos, A.J., and Weiss, B.J. (1964) 3: 1920-1928.
- 25) Brandts, J.F. (1964) *J. Amer. Chem. Soc.* 86: 4302-4314.
- 26) Privalov, P.L. (1974). *FEBS Lett.* 405: S140-S153.
- 27) Privalov, P.L. and Potekhin, S.A. (1986). *Meth. Enzymol.* 131:4-51.
- 28) Privalov, P.L. and Khechinashvili. (1974). *J. Mol. Biol.* 86: 665-684.
- 29) Novokhatny, V.V., Kudinov, S.A., and Privalov, P.L. (1984) *J. Mol. Biol.* 179: 215-
- 30) Lepock, J.R., Rodahl, A.M., Zhang, C., Heynen, M.L., Waters, B., and Cheng, K.H. (1990) *Biochemistry.* 29:681-689.
- 31) Sánchez-Ruiz, J.M., López Lacomba, J.L., Cortijo, M. and Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry* 27:1648-1652.
- 32) Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* 61:921-935.
- 33) Shake, A., Fisher, M.T., McFarland, P.J. and Ginsburg, A. (1989) *Biochemistry.* 28:6281-6294.
- 34) Aune, K.C., Salahuddin, A., Zarlengo, M.H. and Tanford, C.C. (1967) *J. Biol. Chem.* 242:4486-4489.
- 35) Pfeil, W. (1987) *Biochim. Biophys. Acta.* 911:114-116.
- 36) Ackers, G.K. (1975) in *The Proteins* (Neurath, H., and Hill, R.L. eds.): 1-94. Academic Press.
- 37) Eason, R. (1984) in *Centrifugation. A Practical Approach.* (Rickwood, D. ed.): 251-286. IRL Press. Oxford.
- 38) Creighton, T.E. (1979) *J. Mol. Biol.* 129:235-264.
- 39) Tanford, C., Kawahara, K., and Lapanje, S. (1967) *J. Amer. Chem. Soc.* 89:729-736.

- 40) Corbett, R.J.T. and Roche, R.S. (1984) *Biochemistry*. 23:1888-1894.
- 41) van Holde, K.E. (1975) *Physical Biochemistry*. cap. 7. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.Y.
- 42) Lakowicz, J.R. (1983) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. pp. 342-381. Plenum Press.
- 43) Adler, A.J., Greenfield, N.J., and Fasman, G.D. (1973) *Meth. Enzymol.* 27: 675-735.
- 44) Cooper, T.G. (1977) *The Tools of Biochemistry*. cap. 2. Wiley, New York.
- 45) Chen, L.Y., Tian, M., Du, J.S., and Ju, M. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.* 1039: 61-66.
- 46) Banik, U., Saha, R., Mandal, N.C., Bhattacharyya, B., and Roy, S. (1992) *Eur. J. Biochem.* 206: 15-21.
- 47) Nozais, M., Béchet, J.J., and Houadjeto, M. (1992) *Biochemistry* 31: 1210-1215.
- 48) Zhou, H.M., Zhang, X.H., Yin, Y., and Tsou, C.L. (1993) *Biochem. J.* 291: 103-107.
- 49) Zhang, Y.L., Zhou, J.M., and Tsou, C.L. (1996) *Biochim. Biophys. Acta.* 1295: 239-244.
- 50) Williams, C.H. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., Ed.). Vol. 13: 90-165. Academic Press, New York.
- 51) Schirmer, R.H., Krauth-Siegel, R.L. and Schulz, G.E. (1989) in *Glutathione*. (Dolphin, D., Avramović, O. and Poulson, R. Eds) Part A. 553-596. Wiley, New York.
- 52) Meldrum, N.U. and Tarr, H.L.A. (1935) *Biochem. J.* 29: 108-
- 53) Mata, A.M., Pinto, M.C. and López-Barea, J. (1984) *Z. Naturforsch.* 39c: 908-915.
- 54) Serrano, A., Rivas, J., and Losada, M. (1984) *J. Bacteriol.* 158:317-324.
- 55) Libreros-Minotta, C.A., Pardo, J.P., Mendoza-Hernández, G., and Rendón, J.L. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* 298: 247-253.
- 56) Woodin, T.S. and Segel, I.H. (1968) *Biochim. Biophys. Acta.* 164:64-77.
- 57) Montero, S., de Arriaga, D. and Soler, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 952:56-66.
- 58) Boggaram, V., Larson, K. and Mannervik, B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta.* 527:337-347.
- 59) Zanetti, G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 198:241-246.
- 60) Carlberg, I., and Mannervik, B. (1975) *J. Biol. Chem.* 250:5475-5480.
- 61) Newton, G.L. and Javor, B. (1985) *J. Bacteriol.* 161:438-441.
- 62) Worthington, D.J. and Rosemeyer, M.A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48:167-177.
- 63) Schulz, G.E., Zappe, H., Worthington, D.J., and Rosemeyer, M.A. (1975) *FEBS Lett.* 54:86-88
- 64) Thieme, R., Pai, E.F., Schirmer, R.H. and Schulz, G.E. (1981) *J. Mol. Biol.* 152:763-782.
- 65) Pai, E.F. and Schulz, G.E. (1983) *J. Biol. Chem.* 258:1752-1757.
- 66) Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1989) *J. Mol. Biol.* 210:163-180.
- 67) Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1987) *J. Mol. Biol.* 195:701-729.
- 68) Scrutton, N.S. Berry, A. and Perham, R.N. (1988) *FEBS Lett.* 241:46-50
- 69) Schulz, G.E., Schirmer, R.H., Sachsenheimer, W. and Pai, E.F. (1978) *Nature* 273:120-124.
- 70) Massey, V. and Williams, C.H. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:4470-4480.
- 71) Mannervik, B. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53:1151-1158.
- 72) Montero, S., de Arriaga, D., Busto, F. and Soler, J. (1990) *Arch. Biochem. Biophys.* 278:52-59.
- 73) Bielawski, W. and Joy, K.W. (1986) *Phytochemistry* 25:2261-2265.
- 74) Colman, R.F. and Black, S. (1965) *J. Biol. Chem.* 240:1796-1803.
- 75) Mavis, R.D. and Stellwagen, E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243:809-814.
- 76) Rendón, J.L., Calcagno, M., Mendoza-Hernández, G. and Ondarza, R.N. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248:215-223.
- 77) Rendón, J.L., and Mendoza-Hernández, G. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 268:255-263.
- 78) Rendón, J.L., and Mendoza-Hernández, G. (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31:701-708.
- 79) Weber, K. and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* 244:4406-4412.

- 80) Laemmli, U.K. (1970) *Nature*. 227:680-685.
- 81) Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82: 70-77.
- 82) Collier, B.H. (1973) *Anal. Biochem.* 56:310-311.
- 83) Schmid, F.X. (1989). in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T.E. ed.): 251-285. IRL Press, Oxford.
- 84) Jaenicke, R. and Rudolph, R. (1989) in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T.E. Ed.) 191-223. IRL Press, Oxford.
- 85) Goldenberg, D.P. (1989) in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T.E. Ed.) 225-250. IRL Press, Oxford.
- 86) Laurent, T.C., and Killander, J. (1964) *J. Chromatog.* 14: 317-330.
- 87) Tsou, C.L. (1995) *Biochim. Biophys. Acta.* 1253:151-162.
- 88) Jaenicke, R., Vogel, W., and Rudolph, R. (1981) *Eur. J. Biochem.* 114:525-531.
- 89) Halvorson, H.R., and Ackers, G.K. (1974) *J. Biol. Chem.* 249: 967-973.
- 90) Mitchell, R.M. (1976) *Biopolymers* 15: 1717-1739.
- 91) Zimmerman, J.K. (1974) *Biochemistry* 13: 384-389.
- 92) Cui, J.Y., Wakabayashi, S., Wada, K., Fukuyama, K. and Matsubara, H. (1989) *J. Biochem.* 105:390-394.
- 93) Freire, E. (1989) *Mol. Cell. Biophys.* 6:123-140.
- 94) Lumry, R. and Eyring, H. (1954) *J. Phys. Chem.* 58:110-120.
- 95) Tello-Solis, S.R. and Hernández-Arana, A. (1995) *Biochem. J.* 311: 969-974.
- 96) Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1995) *Adv. Prot. Chem.* 47:307-425.
- 97) Albert, T., Dao-pin, S., Wilson, K., Wozniack, J.A., Cook, S.P., and Matthews, B.W. (1987) *Nature*. 330:41-46.
- 98) Kellis, J.T., Nyberg, K., Sali, D., and Fersht, A. (1988) *Nature*. 333:784-786.
- 99) Haynie, D.T. and Freire, E. (1993) *Proteins*. 16:115-140.
- 100) Ikai, A., and Noda, H. (1968) *J. Biol. Chem.* 243: 5028-5034.
- 101) Pohl, F.M. (1968) *Eur. J. Biochem.* 4: 373-377.
- 102) Kawahara, K., Kirshner, A.G., and Tanford, C. (1965) *Biochemistry* 4:1203-1213.
- 103) Janin, J., Miller, S., and Chothia, C. (1988) *J. Mol. Biol.* 204:155-164.
- 104) Harris, J.I., Hocking, J.D., Runswick, H.J., Suzuki, K. and Walker, J.E. (1980) *Eur. J. Biochem.* 108:537-545.
- 105) Hamaguchi, K. and Kurono, K. (1963) *J. Biochem.* 54:111-116.
- 106) Chaffotte, A. F., Guillou, Y., and Goldberg, M.E. (1992) *Eur. J. Biochem.* 205:369-373.
- 107) Brandts, J.F., Halvorson, H.R. and Brennan, M. (1975) *Biochemistry* 14:4953-4963.
- 108) Houry, W.A., and Scheraga, H.A. (1996) *Biochemistry* 35:11719-11733.
- 109) Purvis, I.J., Bettany, A.J., Santiago, T.C., Coggins, J.R., Duncan, K., Eason, R. and Brown, A.J. (1987). *J. Mol. Biol.* 193:413-417.
- 110) Crombie, T., Swaffield, J.C., and Brown, A.J. (1992). *J. Mol. Biol.* 228:7-12
- 111) Brandts, J.F., Hu, C.Q., Lin, L.N. and Mas, M.T. (1989) *Biochemistry*. 28:8588-8596.
- 112) Shriver, J.W., and Kamath, U. (1990) *Biochemistry* 29:2556-2564.
- 113) Pai, E.F., Karplus, P.A. and Schulz, G.E. (1988). *Biochemistry*. 27:4465-4474.
- 114) Warshel, A., Åqvist, J., and Creighton, S. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5820-5824.

A N E X O S

Archives of BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS

EDITORIAL COMMITTEE

J. Thomas AUGUST, Chairman
The Johns Hopkins University School
of Medicine
Baltimore, Maryland 21205
FAX (410) 955-1070
INTERNET: tom.august@jhmi.edu

R. H. ABLES
Birmingham University
Weston, Massachusetts 02454
FAX (617) 726-5200
E-MAIL: ables@birmingham.edu

J. S. BOWEN
Pennsylvania State University
Harrisburg, Pennsylvania 17103
FAX (717) 631-7070
E-MAIL: bowen@psu.edu

R. P. COLMAN
University of Colorado
Boulder, Colorado 80502
FAX (303) 441-4200
INTERNET: rcolman@colorado.edu

R. CROTSCHAU
Washington State University
Pullman, Washington 99164-5400
FAX (509) 335-7543
E-MAIL: crotsch@wsu.edu

A. GINSBURG
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892
FAX (301) 495-6200
E-MAIL: agins@nih.gov

V. G. MARSHALL
The Cleveland Clinic Foundation
Cleveland, Ohio 44199
FAX (714) 444-0900

A. W. META
The Metropolitan Institute of Gerontology
Flint, Michigan 48906
FAX (313) 237-4770

M. L. MCCORD
University of Colorado
Denver, Colorado 80202
INTERNET: maccord@colorado.edu
FAX (303) 370-8941

G. W. REED
University of Wisconsin
Madison, Wisconsin 53706
FAX (608) 263-2000
INTERNET: greed@facstaff.wisc.edu

A. SCARPA
Case Western Reserve University
Cleveland, Ohio 44106
FAX (216) 368-5500
INTERNET: ascarpa@case.edu

H. OHS
Hennrich-Hagen University
D-42021 Gelsenkirchen
Germany
FAX (01) 49-211-311-2000

S. C. SCHERER
Case Western Reserve University
Cleveland, Ohio 44106
FAX (216) 368-5500
E-MAIL: scherer@case.edu

S. R. STATHAM
National Institutes of Health
Bethesda, Maryland 20892
FAX (301) 495-0000
INTERNET: statham@ci.nih.gov

M. R. WATKINSON
Vanderbilt University
Nashville, Tennessee 37232-3146
FAX (615) 328-6300

EXECUTIVE EDITORS

Editorial Office
455 G Street, Suite 1000
San Diego, California 92101-4000
(619) 444-0000 FAX (619) 444-0000
E-mail: archives@sanjedi.com

PUBLISHERS
ACADEMIC PRESS, INC.

January 3, 1995

Dr. Juan Luis Rendon
Dept. de Bioquim., Fac. de Med.
Univ. Natl. Autonoma
Edif. D 2do. Piso, CD. Universitaria
Mexico City 04510
MEXICO

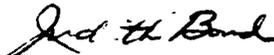
Re: MS#W0513-B048

Dear Dr. Rendon:

Your revised manuscript entitled "Denaturing behavior of glutathione reductase from cyanobacterium *Spirulina maxima* in guanidine hydrochloride" has been accepted for publication in **ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS**. The editors are satisfied that your revisions comply with the criticisms of the reviewers; your cooperation is appreciated.

Galley proofs of the article will be sent to you as soon as possible.

Yours sincerely,


Judith Bond, Ph.D.
Executive Editor

JB:fjc

Denaturing Behavior of Glutathione Reductase from Cyanobacterium *Spirulina maxima* in Guanidine Hydrochloride

Juan L. Rendón,^{*,1} Juan P. Pardo,* Guillermo Mendoza-Hernández,* Arturo Rojo-Domínguez,† and Andrés Hernández-Arana†

*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, 04510 México, DF, México; and †Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana—Iztapalapa, Apartado Postal 55-534, 06340 México, DF, México

Received July 15, 1994, and in revised form December 19, 1994

The influence of guanidine hydrochloride (Gdn-HCl) on glutathione reductase from *Spirulina maxima* has been studied by measuring the changes in enzymatic activity, protein fluorescence, circular dichroism, thiol groups accessibility, and gel filtration chromatography. It was found that the denaturation process involves several intermediate states. At low Gdn-HCl concentrations ($C_m = 0.4$ M), reductase activity was fully lost. However, below 3 M Gdn-HCl, this inhibition was freely reversible upon removal of the denaturing agent. Gel filtration experiments revealed that this reversible inhibition was not due to dissociation of the tetrameric enzyme. Structural studies strongly suggest that the conformation of this intermediate state is similar to that of native enzyme. A model in which a local region of the polypeptide chain assumes an extended conformation (D. T. Haynie, and E. Froure, *Protein* 16, 115-140) is proposed for the reversibly inactivated enzyme. Between 3 and 4 M Gdn-HCl ($C_m = 3.5$), the enzyme activity was irreversibly lost, this inhibition being concomitant with the loss of ellipticity, changes in both wavelength and intensity at the maximum of fluorescence emission, and dissociation of the enzyme into unfolded monomers; these results reveal that gross changes in the protein conformation occur under these conditions. At 4 M Gdn-HCl an equilibrium exists between the denatured forms of dimer and monomer, which is completely shifted toward the unfolded monomers at 5 M Gdn-HCl. Irreversibility in the Gdn-HCl-induced denaturation of *S. maxima* glutathione reductase was not due to aggregation of the unfolded enzyme.

© 1995 Academic Press, Inc.

Glutathione reductase (NAD(P)H:GSSG² oxidoreductase, EC 1.6.4.2.), a member of the flavoenzyme family (1), catalyzes the NADPH-dependent reduction of GSSG. This reaction is essential for the maintenance of a proper GSH/GSSG concentration ratio in cells. Typically, the enzyme is a dimeric protein composed by two identical subunits with a molecular mass of about 50 kDa each (2). It is interesting to note that the dimeric nature of the enzyme is essential for its function, because both subunits contribute essential residues to the formation of the active site (3, 4). The enzyme has been purified to homogeneity from a variety of sources, both prokaryotic and eukaryotic (2). Particularly important have been the crystallographic studies carried out with human erythrocyte glutathione reductase, because a great amount of both structural and catalytic information has been obtained. These studies revealed that each polypeptide chain is constituted by four domains, representing the NADPH-binding domain, the FAD domain, the central domain, and the subunit interface domain (5). However, in spite of the considerable amount of structural and kinetic data available on glutathione reductase, no detailed study concerning its structural stability has been performed. The possibility that these four domains have a different folding/unfolding behavior makes glutathione reductase an interesting system.

Information concerning the behavior of glutathione reductase in the presence of denaturing agents is scarce. In an earlier study dealing with the role of thiol groups in the catalytic mechanism of yeast glutathione reductase, Colman and Black (6) were able to achieve a total

¹ To whom correspondence should be addressed.

² Abbreviations used: Gdn-HCl, guanidine hydrochloride; R_s , Stokes radius; C_m , concentration of denaturant at half of the transition; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid).

exposure of the thiol groups of this enzyme by incubation in 6 M urea. More recently, the stability of the reductase activity of the enzyme in urea solutions was reported for glutathione reductase from rabbit liver (7) and *Phycomyces blakesleanus* (8). In both cases, incubation of the enzyme in 8 M urea during a 5-min period has no effect on enzyme activity. However, an 80% inhibition for rabbit liver glutathione reductase has been observed by incubation in 4 M Gdn-HCl. Longer times of incubation in the presence of denaturing reagent have not been tested. Further, in no case was a detailed study of the changes in both activity and structure was carried out.

Glutathione reductase from the cyanobacterium *Spirulina maxima* is unusual in being constituted by a mixture of oligomers in reversible equilibrium (9). The position of the equilibrium is dependent on pH, temperature, and the concentration of inorganic phosphate. Thus, by changing the pH to values higher than 8.0, the equilibrium is totally displaced toward the dimer (10). Alternatively, at pH 7.0 and concentrations of phosphate higher than 0.15 M, the dimer is removed and a new oligomer, presumably an octamer, coexists in equilibrium with the tetramer (11). At neutral pH in 0.1 M potassium phosphate buffer, the standard assay condition for the reductase, the enzyme exists as a dimer-tetramer mixture in which tetramer represents 86% of the total enzyme.

In order to gain insight into the structural stability of glutathione reductase, a detailed study on the behavior of *S. maxima* enzyme toward Gdn-HCl was carried out.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. All biochemical reagents, including molecular mass calibration proteins, were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Potassium phosphate and EDTA were purchased from Merck de México, S.A. Gdn-HCl (molecular biology grade) was of the highest purity available from Sigma Chemical Co. All reagents were used without further purification. Reverse osmosis purified water was employed in the preparation of solutions. Unless otherwise noted, all experiments described in this work were performed in 0.1 M potassium phosphate buffer at neutral pH plus 1 mM EDTA. Stock solutions of Gdn-HCl were prepared in the above-mentioned buffer and its exact concentration was determined by refractive index measurements (12).

Enzyme. Glutathione reductase was purified to homogeneity from *S. maxima* biomass as previously described (9). Purity of preparations was routinely assessed by PAGE under denaturing conditions (13). Purified glutathione reductase had a sp act of 240 ± 10 U/mg. All experiments involving measurements of the conformational state of *S. maxima* glutathione reductase were performed with enzyme samples previously incubated for 24 h in the presence of different concentrations of Gdn-HCl.

Protein determination. Concentration of glutathione reductase stock solutions were determined spectrophotometrically by using an absorption coefficient at 274 nm of 9.47 for a 10 mg/ml enzyme solution (10).

Reductase assays. The GSSG-reducing activity was assayed in 1-ml cuvettes by following the decrease in absorbance at 340 nm in a DU-70 uv-vis spectrophotometer. Analyses of the kinetic data were performed using the program ENZFITTER, by R. J. Leatherbarrow

(Elsevier Biosoft, Cambridge, UK). The oxidation of 1 μ mol NADPH per minute at pH 7 and 25°C is defined as a unit of activity.

Inactivation and reactivation experiments. For inactivation experiments, glutathione reductase (usually at 18 nM) was incubated for 24 h at room temperature in a final volume of 1 ml of the standard buffer containing Gdn-HCl at different concentrations. After incubation, residual activity was determined by adding a small aliquot containing both NADPH and GSSG. For reactivation experiments, the enzyme was preincubated as above in a final volume of 30 μ l. After 24 h, Gdn-HCl was diluted by adding 1 ml of the standard buffer and the mixture were incubated further for 24 h at room temperature before the assay of the activity. The residual concentration of Gdn-HCl in reactivation mixtures was always under 0.15 M.

Thiol groups titration. The reactivity of thiols in *S. maxima* glutathione reductase was measured according to Ellman (14), by monitoring at 412 nm the time course of the reaction of the protein (4.6 μ M) with DTNB (310-fold excess over enzyme) in a final volume of 700 μ l of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 1 mM EDTA and the required concentration of Gdn-HCl. The reaction was followed in a Cecil 5505 spectrophotometer. An extinction coefficient of $14,140 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ at 412 nm for DTNB (15) was used in the calculations.

Mass transport experiments. The aggregation state of the enzyme, as well as the presence of residual dimer in the presence of Gdn-HCl, was analyzed by both gel filtration chromatography and zonal centrifugation. Gel filtration experiments were carried out in a 20×1 -cm Sephacryl S-300 column previously equilibrated with the phosphate buffer containing the required concentration of Gdn-HCl. Samples were eluted at a flow rate of 10 ml/h and the protein profile was monitored by continuous recording of the absorbance at 276 nm. Zonal ultracentrifugation experiments under isokinetic conditions were performed in 5-ml linear sucrose density gradients (5–20%) previously prepared in the potassium phosphate buffer at the corresponding Gdn-HCl molarity. Enzyme samples were layered on top of the gradient and ultracentrifuged at 45,000 rpm ($r_{\text{eff}} = 250,000$ g) at 5°C. Due to the strong dependence of viscosity on Gdn-HCl concentration (16), the run length was dependent upon this last parameter. At 3.5 M Gdn-HCl, the maximum concentration of denaturing reagent analyzed by sedimentation, a run length of 25 h was used. Enzyme samples used for both gel filtration and sedimentation experiments were previously preincubated in the presence of Gdn-HCl at the desired concentration. Proteins of well known R_s and sedimentation coefficients were used as markers.

Fluorescence measurements. Fluorescence measurements were made using an Aminco SPF-500 spectrofluorometer. The excitation wavelength was 280 nm; this choice was based in the fact that tryptophan residues are the major contributors to fluorescence spectrum (17). Emission spectra were recorded between 300 and 450 nm.

Circular dichroism. Circular dichroism (cd) measurements were made in the far uv using a Jasco J-500 spectropolarimeter. Results are expressed as residue ellipticities, calculated according to Schmid (17). A mean residue weight of 107.5, calculated from the amino acid composition of the enzyme (9) was used in the calculations. Data obtained from cd experiments were used for secondary structure prediction according to Hennessy and Johnson (18).

RESULTS

Enzyme activity. Incubation of glutathione reductase in the presence of increasing concentrations of Gdn-HCl resulted in a gradual loss of its catalytic activity. However, two regions could be detected (Fig. 1). Between 0 and 3 M Gdn-HCl, the inactivation was freely reversible, and dilution of the denaturant led to the full recovery of activity. Higher concentrations of Gdn-HCl resulted in a gradual and irreversible inactivation of the

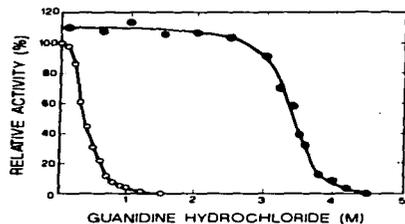


FIG. 1. Transition curves of *S. maxima* glutathione reductase induced by Gdn-HCl. Residual activity (○), and percentage of enzyme reactivation (●) were determined as described under Materials and Methods. Each point represents the average of five independent determinations. In both cases, the final concentration of the enzyme was 18 nM.

enzyme. The C_m values for the reversible and irreversible inactivations were 0.4 and 3.5 M, respectively. A Kinetic analysis of the effect of 0.4 M Gdn-HCl was performed. Gdn-HCl behaved as a mixed-type inhibitor, increasing K_m for both NADPH and GSSG, and decreasing V_m (Table I). On the other hand, incubation of the enzyme during 12 h in the presence of 2.5 M Gdn-HCl, followed by dilution and an additional 12-h recovery period, resulted in a slight increase in K_m values for both substrates, although these values were not significantly different from those of the native enzyme.

In order to gain insight into the possible mechanism involved in the irreversible inactivation, the effect of protein concentration on the ability of the enzyme to recover its activity was assayed. Protein samples (between 1 and 40 nM) were preincubated in the presence of 5 M Gdn-HCl for 10 min. Then, reductase activity was measured by dilution of the denaturing reagent with 1 ml of buffer containing both NADPH and GSSG. Results

TABLE I
Kinetic Parameters of Enzyme Samples Determined under Native Conditions, at 0.4 M Gdn-HCl, and Reactivated from 2.5 M Gdn-HCl

Enzyme	K_m [GSSG] (μ M)	K_m [NADPH] (μ M)	V_m (%)
Native	115 \pm 10	15 \pm 3	100*
+0.4 M Gdn-HCl	946 \pm 70	67 \pm 10	45 \pm 6
Reactivated from 2.5 M Gdn-HCl	151 \pm 9	28 \pm 4	105 \pm 8

* Specific activity of native enzyme was taken as 100%.

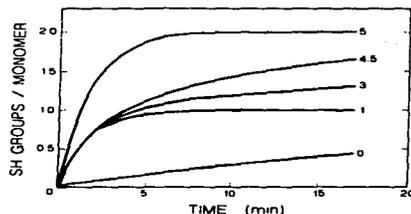


FIG. 2. Time course of the reaction of glutathione reductase with DTNB at different concentrations of Gdn-HCl. Numbers at right of the curves represent the molar concentration of Gdn-HCl used for the titration experiments. All curves were obtained under pseudo-first-order conditions by using a 310-molar excess of DTNB over enzyme. Other conditions were as described under Materials and Methods.

revealed that the percentage of reactivation was independent of the protein concentration (data not shown), thus suggesting that the irreversible inactivation was not due to aggregation of the unfolded enzyme. Attempts to achieve a higher degree of reactivation of the denatured enzyme in the presence of the prosthetic group FAD (up to 50-fold molar excess) were unsuccessful.

Thiol groups titration. It has been reported that native glutathione reductase from *Spirulina* sp. contains two free sulfhydryl groups per monomer, one of which is inaccessible to DTNB while the other one is only partially exposed (19). This result was confirmed by us in the present work for the *S. maxima* enzyme. By varying the concentration of Gdn-HCl in the reaction mixture, a different behavior for the two thiol groups was observed (Fig. 2). In 1 M Gdn-HCl, the condition at which the enzyme was 95% reversibly inactivated, the partially accessible thiol group became fully exposed, as revealed by its increase in reactivity toward DTNB. Kinetic analysis revealed a monophasic process, thus discarding the reaction of the buried thiol group with DTNB under these conditions; further, the total amount of sulfhydryl groups titrable in 1 M Gdn-HCl was not greater than one per monomer. Between 1 and 4.5 M Gdn-HCl, a gradual exposure of the second thiol group of the enzyme subunit was observed; but at concentrations of Gdn-HCl higher than 4.5 M, a larger increase in reactivity toward DTNB was observed, suggesting that the fully unfolded state of the enzyme was reached. The same results were obtained when the enzyme was previously incubated during 24 h at the corresponding concentration of Gdn-HCl before titrations were carried out.

Intrinsic fluorescence. The conformational transitions of *S. maxima* glutathione reductase in the presence of Gdn-HCl were also monitored by following the varia-

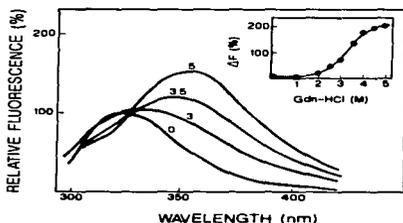


FIG. 3. Fluorescence emission spectra of glutathione reductase under native conditions and in the presence of different concentrations of Gdn-HCl. Spectra under all conditions were recorded after incubation of the enzyme (46 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h under native or in the presence of Gdn-HCl. The fluorescence of the native enzyme at 325 nm was taken as 100%. Numbers above the curves refer to the concentration of Gdn-HCl at which enzyme was preincubated. (Inset) Relative changes in the intensity of fluorescence emission at 354 nm as a function of Gdn-HCl molarity.

tion in both intensity and wavelength of the maximum fluorescence emission. Native enzyme was characterized by a fluorescence emission spectrum with a maximum at 325 nm (Fig. 3). The addition of Gdn-HCl caused a red shift of the spectrum, with a maximum displacement at 5 M Gdn-HCl, where the wavelength of the maximum fluorescence emission was located at 354. It is interesting to note that in the range of concentrations at which Gdn-HCl caused the reversible inactivation of the enzyme, no significant change in the fluorescence spectrum was observed, other than a slight increase in the intensity of fluorescence emission.

Circular dichroism. In order to determine if the reversible inactivation of glutathione reductase at low concentrations of Gdn-HCl was concomitant with changes in secondary structure content, a detailed study of the ellipticity of the enzyme under such conditions was performed. Figure 4 shows the cd spectra of glutathione reductase in the far-ultraviolet region under native conditions and in the presence of different concentrations of Gdn-HCl. It is evident that no detectable change occurred between 0 and 1.5 M Gdn-HCl. However, denaturation of the enzyme between 3 and 4 M Gdn-HCl was accompanied by a loss of ellipticity. The inset of Fig. 4 shows the variation in ellipticity values at 220 nm as a function of Gdn-HCl concentration. The range of Gdn-HCl concentrations at which the loss of ellipticity took place was in agreement with the results obtained from both reductase activity and fluorescence measurements. From the cd data, a prediction of the secondary structure content of native enzyme, as well as in the presence of 1 and 3 M Gdn-HCl was carried out. For these three con-

ditions, a $23 \pm 0.7\%$ of helicoidal content and $24 \pm 3\%$ β -sheet content was found. The cd spectrum for the "re-folded" enzyme showed an ellipticity at 220 significantly higher as compared with that of the denatured enzyme.

Hydrodynamic behavior. Mass-transport experiments of *S. maxima* glutathione reductase under both native conditions and in the presence of different concentrations of Gdn-HCl were performed (Fig. 5). At 1 M Gdn-HCl, both Stokes radii and sedimentation coefficients of the enzyme were essentially the same as compared with the corresponding values obtained in the absence of Gdn-HCl. At 3 M Gdn-HCl, the maximum concentration of denaturant at which enzyme activity is fully recovered, a slight increase in R_s of both dimer and tetramer was observed. Based in the protein profiles obtained from gel filtration experiments, no change in the relative proportions of dimer and tetramer was detected up to 3 M Gdn-HCl. However, at 3.5 M Gdn-HCl, concentration at which a 50% of the irreversible inactivation was reached, a single protein peak was observed, with a R_s of 5.0 nm (Fig. 5b). Taking into account the Stokes radius of both dimer and tetramer in its native form, as well as the changes in secondary structure detected by circular dichroism, this intermediary was assigned to a partially unfolded dimer. Sedimentation behavior of enzyme at 3.5 M Gdn-HCl was also consistent with a dimeric particle.

The most significant change in hydrodynamic behavior was detected after completion of the irreversible transition. Thus, at 4 M Gdn-HCl a trimodal pattern was observed, with Stokes radii of 5, 6.2, and 8.6 nm (Fig. 5c). Although in principle these values could represent the coexistence of three molecular species, we must take

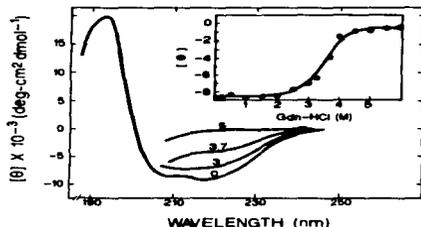


FIG. 4. Far uv circular dichroism spectra of glutathione reductase. Before spectra were recorded, the enzyme (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was incubated in the absence or in the presence of Gdn-HCl at different concentrations. Numbers on the curves refer to the concentration of denaturing reagent. Only spectra at 3, 3.7, and 5 M Gdn-HCl are included for clarity. (Inset) Transition curve of *S. maxima* glutathione reductase as measured by changes in ellipticity at 220 nm.

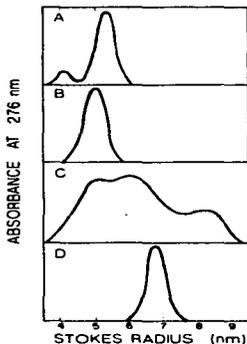


FIG. 5. Elution patterns of *S. maxima* glutathione reductase at different concentrations of Gdn-HCl. Protein samples (200 μ g in 200 μ l) were chromatographed on a S-300 sephacryl column as described under Materials and Methods. Protein was monitored by its absorbance at 276 nm. Conditions were as follows: (A) native, (B) 3.5 M Gdn-HCl, (C) 4 M Gdn-HCl, (D) 5 M Gdn-HCl.

into account alternative hypotheses, i.e., an isomerizing system between two conformers of identical molecular mass (20) or an equilibrium between two oligomers (21). In both cases, the middle zone of the protein profile appears as the result of a relatively slow interconversion process.

In order to evaluate the hypothesis on the existence of a reaction zone the following experiment was performed: a protein sample was incubated and chromatographed in the presence of 4 M Gdn-HCl; then, fractions representing the leading and trailing zones were pooled separately, concentrated up to the original volume and rechromatographed after a 12-h incubation period. The resultant protein profiles were, in both cases, very similar to the original one, thus discarding the existence of independent species. On the other hand, the chromatographic profile of an enzyme sample preincubated at 4.5 M Gdn-HCl showed a notable increase in the relative abundance of the trailing zone, concomitant with a diminution in the abundance of the leading zone (data not shown). Hence, the most plausible explanation of the experimental data at 4 M Gdn-HCl is the existence of an association-dissociation reaction, in which denatured states of monomer ($R_s = 5$ nm) and dimer ($R_s = 8.6$ nm) are involved.

At 5 M Gdn-HCl, the enzyme behaved as a single protein peak whose Stokes radius was estimated as 6.8 nm

(Fig. 5d). This value did not change in the presence of 7 mM β -mercaptoethanol. Based on the experimental data, and by using the known relationship between intrinsic viscosity and Stokes radius (22), the intrinsic viscosity for this form of the enzyme was calculated as 41.3 ml/g (this value was obtained by assuming enzyme exist as a monomer under this condition, an assumption confirmed by cross-linking experiments).

In Table II a summary of the physicochemical properties of the native, the reversibly inhibited intermediate, and the fully unfolded state of *S. maxima* glutathione reductase is given.

DISCUSSION

Gdn-HCl has become one of the most preferred denaturing compounds in the folding/unfolding studies on proteins. Its great denaturing ability allows the obtention of fully denatured proteins (22); however, the concentration at which the native-denatured transition is observed depends on a number of factors such as pH (23, 24), temperature (25, 26), and intrinsic factors of the protein such as the length of the polypeptide chain and the hydrophobic nature of its lateral chains (27). In the case of oligomeric proteins, the interaction between subunits constitutes an additional factor that influences the behavior of proteins toward denaturing reagents (28).

The present results with *S. maxima* glutathione reductase suggest that in the native-denatured transition, an intermediate state which is able to be reactivated is involved. However, the nature of the latter does not differ greatly from the native structure. As was mentioned in the introduction, the oligomeric nature of glutathione reductase is a prerequisite for its function; hence, the possibility that the reversible inactivation was due to dissociation of the tetrameric enzyme into monomers seems plausible. However, gel filtration experiments revealed that this inactivation was not due to dissociation of the enzyme. As regards conformational changes, the evidence obtained from both CD and fluorescence emission experiments did not reveal gross alterations in enzyme structure in the same Gdn-HCl concentration range where *S. maxima* glutathione reductase is reversibly inactivated. However, a clear conformational difference between the native enzyme and the reversibly inactivated intermediate was suggested by thiol titration experiments. Thus, in 1 M Gdn-HCl, concentration at which 95% of reversible inhibition was achieved, the reactivity of the partially exposed thiol was significantly increased as compared to its reactivity in the native enzyme (Fig. 2).

Although the possibility for the existence of an expandable intermediate (molten globule state) in the unfolding pathway of *S. maxima* glutathione reductase at low Gdn-HCl concentrations seems tempting from the results obtained with DTNB, experiments performed

TABLE II
Physicochemical Properties of Native, Reversibly Inhibited, and Denatured States of *S. maxima* Glutathione Reductase

Enzyme	Aggregation state	Molecular mass (kDa)	Stokes radius (nm)	Intrinsic ^a viscosity (cm ² g ⁻¹)	λ_{max} (nm)	$[\theta]$ (deg cm ³ dmol ⁻¹)
Native	Dimer-Tetramer	96 and 192 ^b	4.1 and 5.3 ^b	4.53	325	-8738
Reversibly inhibited intermediate	Dimer-Tetramer	96 and 192	4.5 and 5.8 ^c	nd	325-334	-8738 to -8950
Denatured	Monomer	48	6.8	41.3	354	-860

^a Calculated according to the equation $[\eta] = (2.5 N/M_r)(4/3 \pi R_g^3)$.

^b Values for dimer and tetramer, respectively.

^c Determined at 3 M Gdn-HCl.

with the hydrophobic fluorescence probe ANS to prove this hypothesis were unsuccessful. A third possibility to explain the reversible inactivation of the enzyme assumes minor conformational changes near the active site. It is well known that the active site of enzymes are located in regions of the protein structure characterized by a high flexibility (29). This feature renders these regions more sensible to perturbing agents, such as Gdn-HCl. A number of enzymes are known in which the folded/unfolded transition is preceded by the loss of enzyme activity; these include creatine kinase (30), glutathione transferase (31), and fumarase (32).

Taken as a whole, structural measurements of *S. maxima* glutathione reductase up to 3 M Gdn-HCl are consistent with the existence of an undissociated protein molecule in which a local region of the structure assumes the conformation of an extended intermediate (33); tertiary interactions in this region are perturbed, while secondary structures are retained. It is interesting to note the great stability of this intermediary state. In spite of a long incubation time (24 h) at moderate Gdn-HCl concentrations (up to 3 M), its ability for a total recovery of enzyme activity is fully retained.

Between 3 and 4 M Gdn-HCl *S. maxima* glutathione reductase is irreversibly inactivated, and this inactivation is overlapped with both changes in quaternary structure and gross changes in conformation. Thus, the irreversible loss of enzyme activity is concomitant with: (a) dissociation of tetramer into dimers and then into monomers, (b) the loss of secondary structure, and (c) changes in the environment in which aromatic residues are located. Interestingly, dissociation of enzyme into monomers seems to be a late event in the unfolding pathway. A complete unfolding of enzyme in 5 M Gdn-HCl is supported by the fact that Stokes radius has the same value both in the presence or in the absence of a disulfide reducing reagent. Further, the intrinsic viscosity of the unfolded enzyme is in accordance with a random coil of molecular mass 48 kDa (34).

In order to obtain a quantitative estimation about the cooperativity of the unfolding process, data from cd

experiments were used to calculate the apparent equilibrium constant (K_{app}) of the unfolding reaction according to Pace (35). The values of K_{app} thus obtained were then used to characterize the transition based on the empirical equation

$$K_{app} = C[D]^n,$$

where C represents a constant characteristic of the protein-denaturant system, $[D]$ is the concentration of the denaturant, and n , defining the apparent order of the transition, is a measure of the degree of cooperativity (36). A value of 7.3 was obtained from experimental data, revealing a high degree of cooperativity between the protein domains in *S. maxima* glutathione reductase, such that the polypeptide chain apparently behaves as a single cooperative unit on unfolding.

On the basis of the given data, a plausible scheme for the denaturation pathway of *S. maxima* glutathione reductase by Gdn-HCl can be postulated as



where N and N^* are folded forms of the enzyme which are fully active and reversibly inactivated, respectively; D^* is a dissociated and partially unfolded form of enzyme (probably dimeric), D represents the unfolded state of dimer, and U is the fully denatured monomer. From the results obtained in gel filtration experiments, it seems clear that the unfolded states of dimer and monomer are in a reversible equilibrium at Gdn-HCl concentrations of about 4 M. By increasing the concentration of the denaturing reagent above 4 M, equilibrium is displaced toward denatured monomer.

Although removal of Gdn-HCl is not enough for the correct refolding of enzyme into an active conformation, spectroscopic measurements of the Gdn-HCl-free enzyme reveal this is conformationally distinct from the fully denatured enzyme. Thus, the fluorescence emission spectrum of an enzyme sample incubated for 12 h in 5

M Gdn-HCl and then exhaustively dialyzed against the phosphate buffer, showed an intermediate position between those of the native and the unfolded states of enzyme, with a maximum at 334 nm.

As regards the possible origin of irreversibility in the unfolding of *S. maxima* glutathione reductase, the most plausible explanations include: (a) aggregation of the unfolded polypeptide chains followed by precipitation, (b) incorrect regain of the tertiary structure due to the scrambling of polypeptide chains by thiol/disulfide exchange, (c) inability of the proline residues in the disordered structure for reassuming its correct configuration, and (d) trapping of the protein in a metastable intermediate. The first possibility can be excluded because the mass-transport experiments revealed no additional protein peak other than that corresponding to denatured enzyme. Further, no dependence on the percentage of reactivation on protein concentration was observed. As regards the second option, it is worth noting that the addition of β -mercaptoethanol to reactivation mixtures results in no gain in the reductase activity recovered, thus discarding the thiol/disulfide exchange reactions as the origin of the irreversibility in the unfolding of *S. maxima* glutathione reductase. Therefore, either the third and/or the fourth options can be invoked to explain the Gdn-HCl-induced denaturation of this reductase. Unfortunately, the present results do not allow the discrimination between these two possibilities. Recently, a plausible hypothesis intended to explain the irreversibility observed under *in vitro* conditions for many multidomain proteins has been suggested (37). The model assumes that the *in vivo* rate of synthesis of a protein is under control of "translational pauses," such that the synthesis of defined portions of their polypeptide chains (i.e., domains) is separated temporally, thus allowing the folding of the newly nascent polypeptide region. Such translational pauses are determined by the presence of consecutive "rare" codons along messenger RNA. If this is the case for glutathione reductase, then it becomes clear that its primary structure does not contain all the information needed for the unfolded polypeptide chain to fold correctly *in vitro*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by research Grant IN 2037/94 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM. Authors are indebted to Ing. Sergio Castelan and Biol. Miguel Angel Zúñiga from Sosa Teacoco Company for the generous gift of *Spirulina maxima* biomass.

REFERENCES

- Williams, C. H. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P. D., Ed.), Vol. 13, pp. 90-165, Academic Press, New York.
- Schirmer, R. H., Krauth-Siegel, R. L., and Schulz, G. E. (1989) in

Glutathione (Dolphin, D., Avramović, O., and Poulson, R., Eds.), part A, pp. 553-595, Wiley, New York.

- Pai, E. F., and Schulz, G. E. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 1752-1757.
- Karplus, P. A., and Schulz, G. E. (1980) *J. Mol. Biol.* **130**, 163-180.
- Thieme, R., Pai, E. F., Schirmer, R. H., and Schulz, G. E. (1981) *J. Mol. Biol.* **152**, 763-782.
- Colman, R. F., and Black, S. (1966) *J. Biol. Chem.* **240**, 1796-1803.
- Zanetti, G. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* **188**, 241-246.
- Montoro, S., de Arrago, D., and Sober, J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **852**, 55-66.
- Rendón, J. L., Calceagno, M., Mendoza-Hernández, G., and Ondarsa, R. N. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* **248**, 215-223.
- Rendón, J. L., and Mendoza-Hernández, G. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.* **204**, 255-263.
- Rendón, J. L., and Mendoza-Hernández, G. (1983) *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**, 701-708.
- Nozaki, Y. (1972) *Methods Enzymol.* **27**, 43-50.
- Weber, K., and Osborn, M. (1969) *J. Biol. Chem.* **244**, 4405-4412.
- Ellman, G. L. (1969) *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 70-77.
- Collier, B. H. (1973) *Anal. Biochem.* **68**, 310-311.
- Kawahara, K., and Tanford, C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 3228-3232.
- Schmid, F. X. (1980) in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., Ed.), pp. 251-285, IRL Press, Oxford.
- Hennessey, J. P., and Johnson, W. C., Jr. (1981) *Biochemistry* **20**, 1085-1094.
- Cui, J. Y., Wakabayashi, S., Wada, K., Fukuyama, K., and Matsubara, H. (1989) *J. Biochem.* **105**, 390-394.
- Cann, J. R., and Bailey, H. R. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* **63**, 576-579.
- Stevens, F. J. (1980) *Biophys. J.* **65**, 1155-1167.
- Tanford, C. (1968) *Adv. Prot. Chem.* **23**, 121-282.
- Pace, C. N., and Vandenburg, K. E. (1979) *Biochemistry* **18**, 288-292.
- Pace, C. N., Laurents, D. V., and Thomson, J. A. (1980) *Biochemistry* **20**, 2564-2572.
- Pace, C. N., and Tanford, C. (1988) *Biochemistry* **7**, 198-206.
- Tanford, C., and Atune, K. C. (1970) *Biochemistry* **9**, 206-211.
- Darwin, O. V., and Dill, K. A. (1991) *Biochemistry* **30**, 5974-5985.
- Garel, J. R. (1992) in *Protein Folding* (Creighton, T. E., Ed.), pp. 405-454, Freeman, New York.
- Tsou, C. L. (1993) *Science* **262**, 380-381.
- Yao, Q. Z., Tian, M., and Tsou, C. L. (1984) *Biochemistry* **23**, 2740-2744.
- Sacchetti, P., Aceto, A., Bucciarelli, T., Dragani, B., Santaroni, S., Allocati, N., and Di Ilio, C. (1983) *Eur. J. Biochem.* **215**, 741-745.
- Kelly, S. M., and Price, N. C. (1991) *Biochem. J.* **275**, 745-749.
- Haynie, D. T., and Freire, E. (1983) *Proteins* **16**, 115-140.
- Tanford, C., Kawahara, K., and Lapanje, S. (1967) *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 729-736.
- Pace, C. N. (1986) *Methods Enzymol.* **131**, 266-280.
- Herakowitz, T. T., and Harrington, J. P. (1975) *Biochemistry* **14**, 4964-4971.
- Crombie, T., Swaffield, J. C., and Brown, A. J. P. (1992) *J. Mol. Biol.* **228**, 7-12.

Professor Vladimir P. Skulachev
Member of the Russian Academy of Science
President of the Club of Russian Members of Academia Europaea
Member of the Council of Academia Europaea
Director of Institute

119899, Moscow,
Moscow State University, Bldg. A
AN. Bolevsky Institute
of Physico-Chemical Biology

Tel: 07-095-939-55-30
Fax: 07-095-939-03-38
E-mail: skulach@head.genetec.msu.su

To: Dr. Juan L. Rendon
Departamento de Bioquimica,
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autonoma de Mexico
Apartado Postal 70-159
04510 Mexico, D.F.
Mexico

Moscow, March 11, 1997

Dear Dr. Rendon,

Thank you for sending me your interesting paper concerning denaturation of glutathione reductase, which will be accepted provided that you improve the language. Please, take into account that BMDI is produced photographically so no correction is done by the editors. If the text has many language mistakes, the paper is irreversibly rejected on this technical reason.

The resersal of $2M_2 \rightleftharpoons 2U_2$ interconversion should be shown since K_{-1} is given (p. 6).

I need 3 copies of your manuscript.

Sincerely yours,



Professor V.P. Skulachev

THERMAL DENATURATION OF GLUTATHIONE REDUCTASE FROM CYANOBACTERIUM *Spirulina maxima*

Arturo Rojo-Domínguez §, Andrés Hernández-Arana §, Guillermo Mendoza-Hernández ‡, and
Juan L. Rendón ‡¹

‡Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de
México, Apartado Postal 70-159, 04510 México, D.F., México

§Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa,
Apartado Postal 55-534, 09340 México, D.F., México.

SUMMARY

The thermal unfolding of glutathione reductase (NAD[P]H:GSSG oxidoreductase EC 1.6.4.2.) from cyanobacterium *Spirulina maxima* was monitored by differential scanning calorimetry and circular dichroism at neutral pH. Covalent cross-linking of enzyme at different temperatures revealed dimer as the species undergoing the thermal transition. A single endotherm was observed, but its thermodynamic parameters showed dependence on the scan rate. In the transition zone, aggregation of the dimeric species was observed. Analysis of the enzyme heated at 80°C revealed that the resultant species retained a high content of secondary structure. The addition of low concentrations of guanidinium hydrochloride resulted in a full cooperative thermal transition. A model in which the dimeric protein undergoes a partial unfolding in a kinetically controlled fashion is proposed, such that the experimental value of ΔH_{cal} results from the simultaneous occurrence of endothermic and exothermic events.

Key words: glutathione reductase, thermal denaturation, differential scanning calorimetry

INTRODUCTION.

The flavoenzyme glutathione reductase (NAD[P]H:GSSG oxidoreductase EC 1.6.4.2.) plays an important role in cell metabolism by maintaining a high GSH/GSSG ratio [1]. This enzyme is a dimeric protein member of the disulfide oxidoreductase family [2], and its presence in a variety of organisms, from bacteria to mammals, has been demonstrated [1]. The availability of glutathione

¹ To whom correspondence should be addressed

* Abbreviations used: Gdn-HCl, Guanidine hydrochloride; DSC, Differential scanning calorimetry; CD, Circular dichroism; ΔH_{cal} , Molar calorimetric enthalpy change.

reductase crystals, from both human erythrocytes [3] and *Escherichia coli* cells [4], amenable to crystallographic analysis, has made possible the knowledge of the three-dimensional structure of this enzyme to a high resolution [5]. However, in spite of the considerable structural detail at which the enzyme is known, no specific study concerning its thermal stability is available. Some isolated reports indicate that this enzyme shows a relatively high thermostability. Thus, glutathione reductase from mouse liver retains full activity at 75°C for 10 min [6], while the enzyme from pea chloroplasts is able to stand at 65°C for up to 30 min without apparent loss of reductase activity [7]. On the other hand, glutathione reductase from *Phycomyces blakesleanus* shows a slightly lower thermostability, being inactivated at temperatures above 55°C [8].

As regards to glutathione reductase isolated from cyanobacterium *Spirulina maxima*, previous work has shown that the purified enzyme is characterized by being a mixture of dimers and tetramers interconverted in a slow equilibrium [9-11]. At room temperature and neutral pH tetramer represents the more abundant species [10,11]. In order to gain insight into the thermal stability of glutathione reductase, we report the structural thermostability of glutathione reductase isolated from cyanobacterium *S. maxima*.

MATERIALS AND METHODS.

Reagents. All biochemical reagents, including molecular mass markers used in the electrophoretic experiments, were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, MO). Potassium phosphate, EDTA and glutaraldehyde were purchased from Merck de México, S.A. All reagents were used without further purification. Reverse osmosis purified water was used throughout.

Enzyme. Homogeneous glutathione reductase, as revealed by SDS-PAGE, was obtained from *S. maxima* biomass by a procedure previously described [9]. Enzyme obtained from the last purification step was exhaustively dialyzed against 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing 1 mM EDTA. Dialyzate from the last change of buffer was used as a blank in the determination of base lines in both calorimetric and CD * experiments.

Protein determination. Concentration of purified glutathione reductase was determined by its absorbance at 274 nm, using an absorption coefficient of 9.47 for a 10 mg/ml solution [10].

Covalent cross-linking. The protocol described by Jaenicke et al, [12], with minor modifications, was followed to determine the aggregation state of enzyme as a function of temperature. Enzyme aliquots (50 µg protein each in 350 µl standard buffer) were incubated in a water bath and heated at a rate of about 1 degree/min. At selected temperatures, a 20 µl aliquot of 25 % glutaraldehyde was added and the cross-linking reaction was allowed to continue for 1 min. Then, samples were processed as described [12]. Cross-linked samples were re-dissolved in a minimal volume of 1.5 M

Tris-HCl buffer (pH 8.8) containing 1% SDS and 50 mM DTE, boiled for 2 min, and analyzed by SDS-PAGE in 4-20% acrylamide gradient slab gels using the Tris-glycine buffer system according to Laemmli [13]. Staining and destaining of gels were performed by conventional procedures.

Differential scanning calorimetry. Calorimetric endotherms were obtained in a MicroCal MC-2 instrument (MicroCal Inc., Northampton, MA). Protein dialyzed samples were degassed under vacuum for 15 min before being loaded into the calorimeter cells. All measurements were conducted under a nitrogen atmosphere at a total pressure of 2.2. kg/cm² and scanning rates between 0.5 and 1.5 K/min. Buffer-buffer base lines were recorded under the same conditions and subtracted from sample curves to yield the excess heat capacity endotherms. DA-2 and Origin software packages (MicroCal) were used for automatic data collection and analysis, including base line subtraction and determination of denaturation enthalpies.

Circular dichroism spectroscopy. Far-UV-CD spectra, as well as changes in ellipticity as a function of temperature, were obtained in a Jasco J-500A spectropolarimeter. This instrument was equipped with a water-jacketed cell holder and a Haake NK-22 circulating bath for temperature control. In thermal titration experiments, the actual temperature inside the cell was continuously measured with a thermistor probe. The thermal denaturation of glutathione reductase was monitored by the ellipticity change at a fixed wavelength (218 nm) as a function of temperature. This latter parameter was continuously varied at a selected constant rate of 1 degree/min by carefully adjusting the heating control of the water bath.

RESULTS.

Figure 1 shows the calorimetric profiles of *S. maxima* glutathione reductase at various scanning rates. Although a single unimodal peak was observed, its non-symmetrical character is clearly evident. The reversibility of the transition was tested by reheating a denatured sample after its cooling and incubation at room temperature. As expected for a complex protein, no reversibility was found. Fig. 1 also shows that the temperature corresponding to the maximum heat capacity is highly dependent on the scanning rate, which suggest that the denaturation process of glutathione reductase is kinetically controlled due to the presence of irreversible steps [14]. In this case each calorimetric trace permits to obtain the rate constant (k) of the irreversible step at any given temperature as described by Sánchez-Ruiz et al [15]. We found excellent agreement between the values of $k(T)$ obtained from the traces at the four different scanning rates. Furthermore, from the corresponding Arrhenius plot, the energy of activation (E) of the process, was estimated as 411 kJ/mol (figure 2).

In order to evaluate the ΔH_{un} associated with the thermal unfolding of *S. maxima* glutathione reductase, it was necessary to elucidate the oligomeric state of the species involved in the thermal transition. A combination of covalent cross-linking, followed by PAGE under denaturing conditions, was used to accomplish this point. As shown in Figure 3a, heating of the enzyme samples results in

a gradual dissociation of the tetramer, such that above 60°C the dimer remains as the only oligomeric species; hence, calorimetric data were fitted considering a dimeric protein with a molecular mass of 96 000 [9]. Further, in the temperature range in which the thermal transition takes place (Fig. 3b), no evidence for a monomeric intermediate was obtained; instead, heating of the dimeric enzyme results in its aggregation. In this sense, when the calorimetric experiments were performed at different protein concentrations, no consistent tendency was observed (data not shown), suggesting that the dissociation of glutathione reductase did not occur during the thermal transition. Figure 4 shows that ΔH depends on the scanning rate, approaching a maximal value at high heating velocities. We estimated the value of the enthalpy change at infinite scanning rate from a plot of ΔH_{∞} versus $1/v$ [16]. The inset of Fig. 4 shows a good correlation for the data corresponding to the thermal transition of glutathione reductase. The extrapolated ΔH_{∞} was 1.807 MJ mol⁻¹. When this maximal value is expressed in a per gram basis, the calculated enthalpy change ($\Delta h=18.8 \text{ J g}^{-1}$) is far below as those reported for proteins in which a full unfolding transition is known [17]. Thus, the possibility that the obtained calorimetric peak was the result of a partial unfolding of *S. maxima* glutathione reductase seems to be feasible.

The verification that the heat-induced unfolding of *S. maxima* glutathione reductase is a partial one, was obtained by performing a thermal denaturation curve, either in the absence or in the presence of a non-denaturing concentration of Gdn-HCl. The choice of the latter was based on a previous work [18], in which it was demonstrated that no major conformational change occurred up to 2.8 M Gdn-HCl. As shown in Figure 5, the thermal titration curve obtained in the absence of any denaturing compound reveals a gradual decrease in ellipticity up to about 77°C, where an abrupt halt was observed; by contrast, a full cooperative transition was developed when the enzyme samples were heated in the presence of Gdn-HCl. Similar results were obtained with Gdn-Cl concentrations below 2.8 M. The residual content of secondary structures in heated samples of *S. maxima* glutathione reductase, as revealed by its far-UV CD spectrum (inset of Fig. 5), clearly shows a significant percentage of the ellipticity signal when heating was carried out in the absence of Gdn-HCl. These results further support that the thermal unfolding of *S. maxima* glutathione reductase is a partial one.

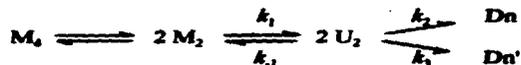
DISCUSSION

Although DSC has been applied to a number of oligomeric proteins, the presence of subunits and domains in these complex macromolecules are factors that complicate the interpretation of calorimetric traces [19]. In this sense, the thermal denaturation of oligomeric proteins is characterized by being an irreversible process, thus excluding the utilization of the equilibrium thermodynamic formalism in the analysis of data.

The results reported in the present work are concerned with the heat stability of glutathione reductase from *S. maxima*. Although at room temperature and neutral pH tetramer stands as the more abundant oligomeric species of *S. maxima* glutathione reductase [10,11], the results obtained in the present work reveals that the gradual heating of the enzyme results in dissociation of the tetrameric species, such that above 60°C, the dimer represents the major fraction of protein. Several experimental facts strongly suggest that the thermal transition is a partial one. First, the magnitude of the total ΔH_{cal} is far below as those values reported for proteins that undergo a full thermal denaturation [17]. Second, the retention of a significant percentage of secondary structure in the heated enzyme, as revealed by its far-uv CD spectrum. The persistence of a significant degree of residual structure in heat-denatured proteins has been reported for both monomeric and oligomeric proteins [20,21]. Third, the observation of a full cooperative transition when thermal denaturation is performed in the presence of Gdn-HCl. The effect of this compound on the thermal transition of glutathione reductase can be explained by assuming stabilization of the partially unfolded species, thus avoiding its aggregation.

As regards the calorimetric transition, the dependence of T_m on the scanning rate strongly suggests that a kinetic process controls the thermal transition. This phenomenon has a broad occurrence in complex proteins [22,23]. Sánchez-Ruiz has demonstrated that, for these complex cases, the relative abundance of the native, unfolded and final species at the end of the thermal transition is dependent on the scanning rate [24]. In the particular case of *S. maxima* glutathione reductase, the combined experiments of covalent cross-linking on heating, followed by PAGE reveals that the kinetic process responsible for the irreversibility must be ascribed to the concomitant irreversible aggregation of the partially unfolded polypeptide chains. Since this aggregation is expected to be an exothermic process, the dependence of the ΔH_{cal} on the scanning rate is thus

explained. The dependence of Tm on the scanning rate, as well as the behavior of $k(T)$ and E obtained from the calorimetric traces of the thermal denaturation of *S. maxima* glutathione reductase, suggest that this process might be explained by a simple two-state irreversible mechanism. Nevertheless, such mechanism requires a constant value for ΔH_{cal} , irrespective of the scanning rate; thus, a more complex mechanism should be proposed:



where M_4 and M_2 stand for native tetramer and dimer, respectively, U_2 represents a partially unfolded state of the dimeric species and Dn plus Dn' are different aggregated forms. As shown, dissociation of tetramers into dimers occurs below the temperature range of the thermal transition. The proposed model considers that k_2 and k_3 are much greater than k_{-1} , thus yielding a behavior of $k(T)$ and E consistent with a single step mechanism, k_1 being the constant for the rate limiting step. Thus, the observed activation energy approximately corresponds to the M_2 to U_2 conversion.

With respect to the steps producing the final states of the protein, our experiments showed no evidence of monomeric species but indicated the presence of aggregated states, here denoted as Dn and Dn' . As shown in figure 4, ΔH_{cal} increased with the scanning rate, suggesting that at high heating rates it is possible to isolate the denaturation of the molecule from the exothermic process. It can be considered that the reaction leading to Dn is preferred over that which produces Dn' in some temperature range, and the opposite in another temperature region, due to the different slopes in their respective Arrhenius plots. Also, the heat evolved in each reaction is expected to be different, giving rise to the reduction in ΔH_{cal} at low scanning rates because a more exothermic pathway is preferred. It should be pointed out that both proposed transformations of U_2 should be faster than the rate limiting step, M_2 to U_2 , in order to show a denaturation behavior consistent with our results. Therefore, any exothermic effect occurring during the process must be strongly overlapped by the main unfolding endotherm; i.e. no exothermic peak is detected in the calorimetric traces. Unfortunately, no comparison of the thermal unfolding of *S. maxima* glutathione reductase with other disulfide oxidoreductases can be made, because a similar work is lacking.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

ACKNOWLEDGMENT: This work was supported by research Grant IN 2037/94 from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM.

REFERENCES

- 1) Schirmer, R.H., Krauth-Siegel, R.L., and Schulz, G.E. (1989) in *Glutathione* (Dolphin, D., Avramovc, O., and Poulson, R., Eds.), part A, pp. 553-596, Wiley, New York.
- 2) Williams, C.H. (1976) in *The Enzymes* (Boyer, P.D., Ed.), Vol. 13, pp. 90-165, Academic Press, New York.
- 3) Worthington, D.J., and Rosemeyer, M.A. (1974) *Eur. J. Biochem.* 48: 167-177.
- 4) Ermler, U., and Schulz, G.E. (1991) *Proteins* 9: 174-179.
- 5) Karplus, P.A., and Schulz, G.E. (1987) *J. Mol. Biol.* 195: 701-729.
- 6) López-Barea, J., and Lee, C. (1979) *Eur. J. Biochem.* 98: 487-499.
- 7) Bielawski, W., and Joy, K.W. (1986) *Phytochemistry* 25: 2261-2265.
- 8) Montero, S., De Arriaga, D., and Soler, J. (1988) *Biochim. Biophys. Acta.* 952: 56-66.
- 9) Rendón, J.L., Calcagno, M., Mendoza-Hernández, G., and Ondarza, R.N. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.* 248: 215-223.
- 10) Rendón, J.L., and Mendoza-Hernández, G. (1989) *Arch. Biochem. Biophys.* 268: 255-263.
- 11) Rendón, J.L., and Mendoza-Hernández, G. (1993) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 31: 701-708.
- 12) Jaenicke, R., and Rudolph, R. (1989) in *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T.E., Ed.) pp. 191-223, IRL Press, Oxford.
- 13) Laemmli, U.K. (1970) *Nature* 227: 680-685.
- 14) Freire, E., van Osdol, W.W., Mayorga, O.L., and Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 19: 159-188.
- 15) Sánchez-Ruiz, J.M., López-Lacomba, J.L., Cortijo, M., and Mateo, P.L. (1988) *Biochemistry* 27: 1648-1652.
- 16) Tello-Solis, S.R., and Hernández-Arana, A. (1995) *Biochem. J.* 311: 969-974.
- 17) Makhatadze, G.I., and Privalov, P.L. (1995) *Adv. Prot. Chem.* 307-425.
- 18) Rendón, J.L., Pardo, J.P., Mendoza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A., and Hernández-Arana, A. (1995) *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 264-270.
- 19) Privalov, P.L. (1982) *Adv. Prot. Chem.* 35: 1-104.
- 20) Aune, K.C., Salahuddin, A., Zarlengo, M.H., and Tanford, C. (1967) *J. Biol. Chem.* 242: 4486-4489.
- 21) Ginsburg, A., and Zolkiewski, M. (1991) *Biochemistry* 30: 9421-9429.
- 22) Guzmán-Casado, M., Parody-Morreale, A., Mateo, P.L., and Sánchez-Ruiz, J.M. (1990) *Eur. J. Biochem.* 188: 181-185.
- 23) Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Avilés, F.X., and Sánchez-Ruiz, J.M. (1991) *Biochemistry* 30: 2067-2072.
- 24) Sánchez-Ruiz, J.M. (1992) *Biophys. J.* 61: 921-935.

Figure 1. Calorimetric recordings for *S. maxima* glutathione reductase obtained at different scan rates. Protein samples (0.7 mg ml^{-1}) in the standard buffer were placed in the calorimetric cell and heated as described under Materials and Methods. Scan rates were 1) 0.5 K min^{-1} ; 2) 0.75 K min^{-1} ; 3) 1 K min^{-1} ; 4) 1.5 K min^{-1} .

Figure 2. Arrhenius plot of the rate constants determined from the calorimetric profiles shown in figure 1. (□) 0.5 K min^{-1} ; (○) 0.75 K min^{-1} ; (●) 1 K min^{-1} ; (Δ) 1.5 K min^{-1}

Figure 3. Electrophoretic patterns of *S. maxima* glutathione reductase under denaturing conditions after cross-linking at various temperatures. a) Protein patterns in the pre-transition temperature zone; b) Protein patterns obtained in the temperature range where the calorimetric transition occurs. A) 20°C , B) 40°C , C) 50°C , D) 60°C , E) 68°C , F) non cross-linked enzyme, G) low molecular mass markers, H) high molecular mass markers, I) 70°C , J) 72°C , K) 74°C , L) 76°C , M) 78°C .

Figure 4. Dependence of ΔH_{∞} on the heating rate. Each value was obtained by integration of the calorimetric profiles shown in figure 1. Inset. Linear extrapolation of ΔH_{∞} to infinite scan rate obtained by plotting the experimental values of ΔH against the reciprocal of the heating rate.

Figure 5. Ellipticity at 222 nm of *S. maxima* glutathione reductase as a function of temperature. An enzyme sample (0.15 mg/ml) either in the absence (A) or in the presence (B) of Gdn-HCl was placed in the spectropolarimeter cell and heated from room temperature. The ellipticity signal of samples was simultaneously recorded as described under Materials and Methods. Inset. Far-uv CD spectra of heat-denatured glutathione reductase (---). An enzyme sample (0.15 mg/ml) was heated inside the water-jacketed cell up to 80°C . At this latter temperature, its CD spectrum was recorded. Spectra for both native (—) and denatured in 6 M Gdn-HCl enzyme (.....) are also included for comparison.

Fig. 1

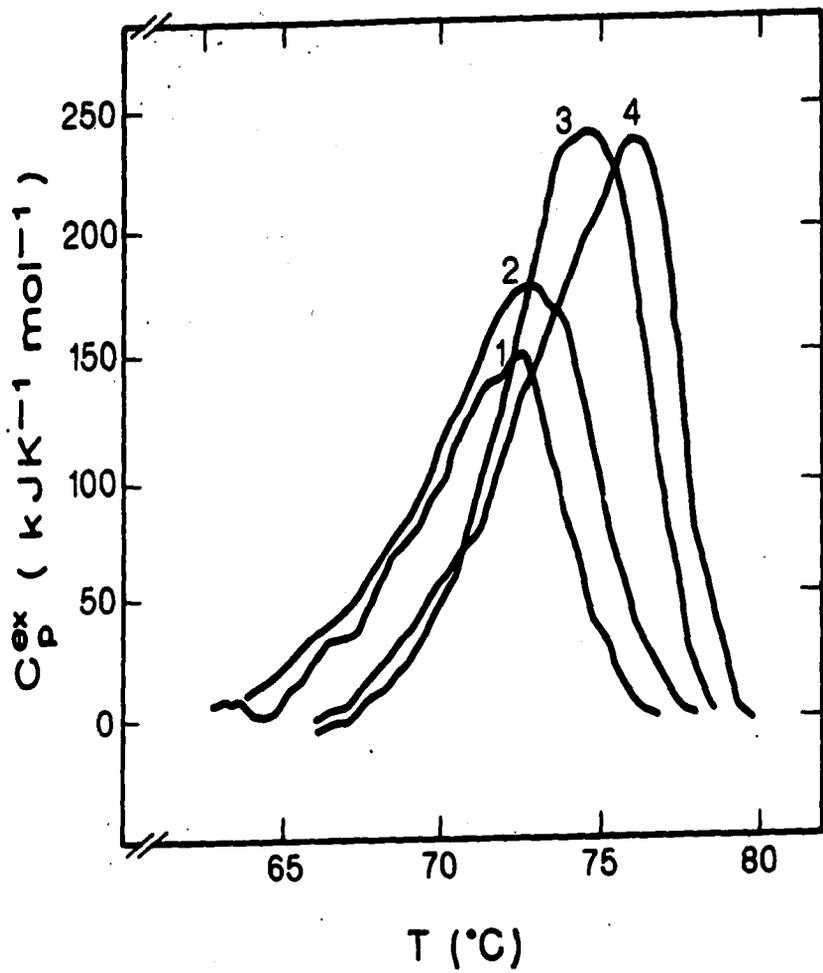
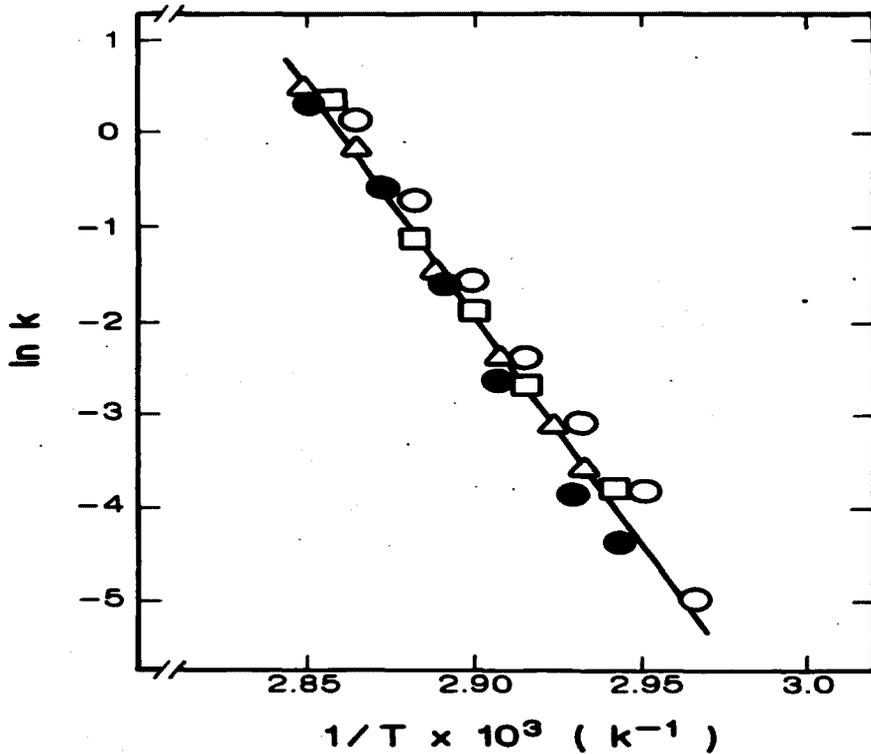
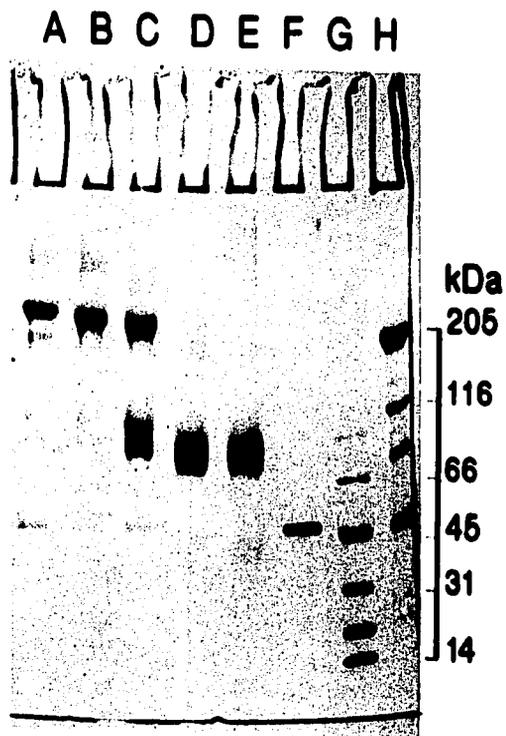


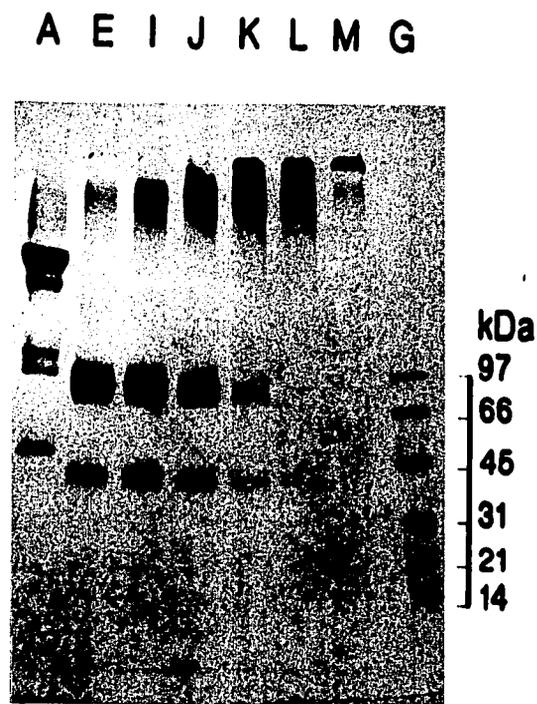
Fig. 2





a

Fig 3



b

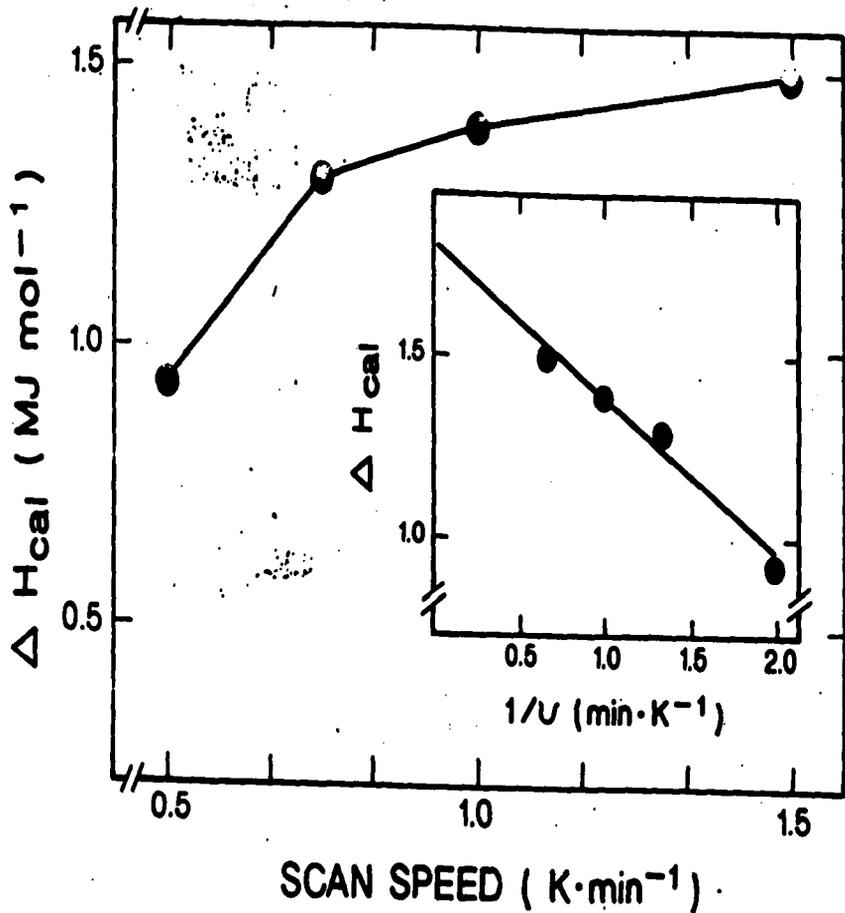


Fig. 4

Fig. 5

