

00551

15

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA.

DESNATURALIZACIÓN DE LA GLUCOSA DESHIDROGENASA DE *BACILLUS MEGATERIUM*  
INDUCIDA POR UREA.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

BIOL. JUAN FERNANDO MINAURO SANMIGUEL.

2802314

2000



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.

JURADO DESIGNADO:

PRESIDENTE:	DRA. ESTELA SÁNCHEZ DE JIMÉNEZ.
VOCAL:	DRA. GLORIA SAAB.
SECRETARIO:	DR. ARMANDO GÓMEZ-PUYOU.
SUPLENTE:	DRA. ROSARIO A. MUÑOZ CLARES.
SUPLENTE:	DR. JUAN LUIS RENDÓN GÓMEZ.

SUSTENTANTE:

BIOL. JUAN FERNANDO MINAURO SANMIGUEL.

TUTOR:

DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ.

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. ROSARIO MUÑOZ CLARES.  
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO.  
DR. GUILLERMO MENDOZA HERNÁNDEZ.

"The song remains the same"

Esta tesis esta dedicada a:

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

Palabras mas, palabras menos Edgar Allan Poe.

## Agradecimientos.

Al Dr. Guillermo Mendoza por el apoyo y la guía en este trabajo, al CONACYT por proveerme de los medios económicos durante la realización del mismo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Rosario Muñoz Clares, Dr. Alejandro Fernández Velasco y al Dr. Guillermo Mendoza Hernández, por su disposición para revisar y enriquecer con su participación este trabajo.

A mis padres y hermanos por su interés y apoyo en mi desempeño profesional.

A los amigos que comparten las penas y glorias; con quienes se aprende a vivir.

Al dpto. de bioquímica de la facultad de medicina por su compañía y por proporcionarme un ambiente amable de trabajo.

A los profesores y miembros del posgrado en Ciencias Bioquímicas por la experiencia académica que me brindaron.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme cabida en sus aulas y por darme la oportunidad de ser participe de este universo.

A todos aquellos que de una u otra manera tuvieron que ver.

A quienes se alegren de este logro.

A todos ellos:

¡Gracias!

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
-DESNATURALIZACIÓN .....	6
-PROTEÍNAS OLIGOMÉRICAS .....	11
ANTECEDENTES .....	12
-ALCOHOL DESHIDROGENASAS DE CADENA CORTA .....	12
-LA 17B ESTRADIOL DESHIDROGENASA .....	16
-MODELO EXPERIMENTAL: GLUCOSA DESHIDROGENASA .....	18
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVOS .....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
-ENSAYOS DE ACTIVIDAD .....	22
-INACTIVACIÓN Y REACTIVACIÓN.....	22
-CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.....	23
-ENTRECRUZAMIENTO CON GLUTARALDEHÍDO.....	23
-ELECTROFORESIS EN GELES TRANSVERSOS DE UREA .....	24
-DICROÍSMO CIRCULAR .....	24
-FLUORESCENCIA .....	25
-UNIÓN DE BIS-ANS CON LA GDH .....	25
RESULTADOS .....	26
-ACTIVIDAD DE LA GDH DURANTE LA DESNATURALIZACIÓN CON UREA .....	26
-CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR .....	26
-ENTRECRUZAMIENTO CON GLUTARALDEHÍDO.....	30
-ELECTROFORESIS EN GELES TRANSVERSOS DE UREA .....	32
-DICROÍSMO CIRCULAR .....	34
-FLUORESCENCIA DE LA GDH .....	34
-UNIÓN DEL BIS-ANS A LA GDH.....	37
DISCUSIÓN .....	42
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA .....	49

## INTRODUCCIÓN.

El campo en la investigación de proteínas abarca muchos aspectos difíciles de catalogar e incluso abordar, por lo que las técnicas y metodologías utilizadas en su estudio son muy diversas. El marco en que se inscribe este trabajo se refiere al del plegamiento de proteínas, un campo en el que a pesar de toda la investigación que se ha hecho, el panorama aún no es claro y encierra muchas interrogantes.

Para entender el problema hay que tomar en cuenta que el gene que codifica para una proteína lo hace de manera particular. En general, se acepta que una secuencia de nucleótidos se traduce en una secuencia específica de residuos de aminoácidos de una cadena polipeptídica y se tiene un conocimiento relativamente preciso de los mecanismos por los cuales lo hace; sin embargo, los hechos involucrados en este proceso no explican enteramente la importancia biológica del papel del gene: la codificación de una molécula con una función biológica específica, dada por una estructura tridimensional. La importancia de adoptar un arreglo conformacional en las proteínas radica en el reconocimiento selectivo de los diferentes sustratos y en la participación efectiva en otros procesos biológicos.

La secuencia de nucleótidos puede compararse con una pieza de información unidimensional que se traduce en una secuencia de residuos de aminoácidos con el mismo carácter, pero la función biológica requiere de un arreglo espacial definido. Aunado a lo anterior sabemos que, por ejemplo, en el genoma humano existen alrededor de 100 000 secuencias de este tipo que deben adoptar una estructura tridimensional estable y se sabe que hay sólo alrededor de unas 1 000 conformaciones que cumplen con estos requisitos (Dobson y Karplus, 1999).

De esta manera, para que esto ocurra exitosamente, una secuencia polipeptídica debe cumplir con ciertos requisitos cinéticos y termodinámicos en un lapso de tiempo razonable (de milisegundos a minutos); por lo que podemos referirnos al plegamiento de proteínas como el proceso que va desde la síntesis de una secuencia de residuos de aminoácidos a la estructura tridimensional nativa bien conformada (Goldberg, 1985).

El problema se basa en un principio enunciado por Anfinsen y sus colaboradores en 1973. En dicho enunciado Anfinsen postula que el "código" de plegamiento de una proteína dada radica en la secuencia de residuos de aminoácidos y las interacciones que forma con el solvente. Los primeros trabajos acerca del problema datan de la década de los años treinta

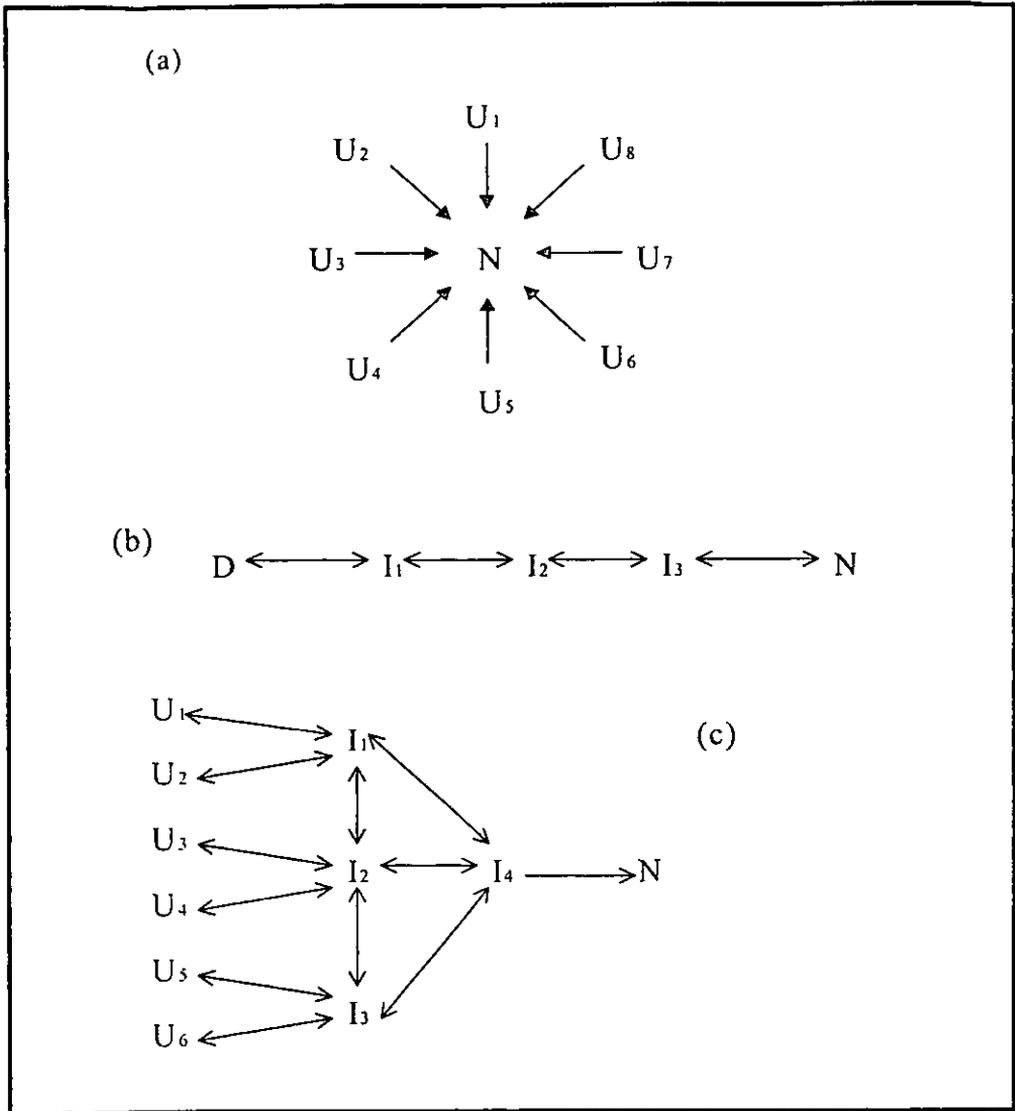
(Ansen y Mirsky, 1925), cuando se encontró que la hemoglobina, podía recuperar sus propiedades biológicas tras la desnaturalización alcalina. En sus trabajos hechos en la ribonucleasa pancreática de bovino, Anfinsen y sus colaboradores, (Anfinsen, 1973, Anfinsen y Scheraga, 1975) demostraron con resultados contundentes que dicha proteína desnaturalizada en urea puede recuperar el estado nativo eficientemente (renaturalizarse), una vez que el desnaturalizante es diluido. Estos experimentos los llevaron a concluir y enunciar el principio que mencionamos.

De esta manera, la incógnita central de este proceso recae en cómo es que una secuencia de residuos de aminoácidos codifica para un plegamiento específico. Para hallar el mecanismo que permite estas circunstancias, la proteína en cuestión debe elegir primero, de entre las miles de conformaciones que puede adquirir, sólo una pequeña porción de estas posibilidades y plegarse en segundos, fenómeno al cual se le conoce como la "paradoja" de Levinthal.

En los últimos 30 años, este problema ha sido sumamente estudiado bajo estas perspectivas y sin embargo, continúa con muchas interrogantes. Los primeros intentos de solución involucraban la existencia de vías de plegamiento específicas de tal modo que las moléculas proteicas pasan por un número de estados parcialmente estructurados (muchos de los cuales pueden ser estudiados). Por esta razón el tratamiento del problema se ha hecho en gran medida, como si se tratara de reacciones con moléculas pequeñas, de tal modo que si estas rutas son específicas, entonces el número de conformaciones posibles se disminuye a sólo unas cuantas (Dobson y Karplus, 1999).

Algunos de los datos obtenidos experimentalmente, muestran que es posible detectar la existencia de intermediarios parcialmente estructurados durante el plegamiento y en condiciones parcialmente desnaturalizantes; el motivo de su presencia puede estar relacionado con la adquisición de la forma nativa estable, dicho de otra manera, como parte del proceso por el cual una cadena polipeptídica se pliega progresivamente a un estado bien estructurado que podemos relacionar con la estructura nativa. Este proceso es muy complejo y puede variar con respecto al tiempo, además involucra cambios notables en los arreglos estructurales y rutas de plegamiento, lo que implica diferentes intermediarios y estados de transición.

El proceso de plegamiento se puede caracterizar de manera cinética y termodinámica. En el primer caso, con base en el carácter vectorial de la biosíntesis de las proteínas, un proceso en el cual los aminoácidos son añadidos, uno por uno, en dirección amino-carboxilo



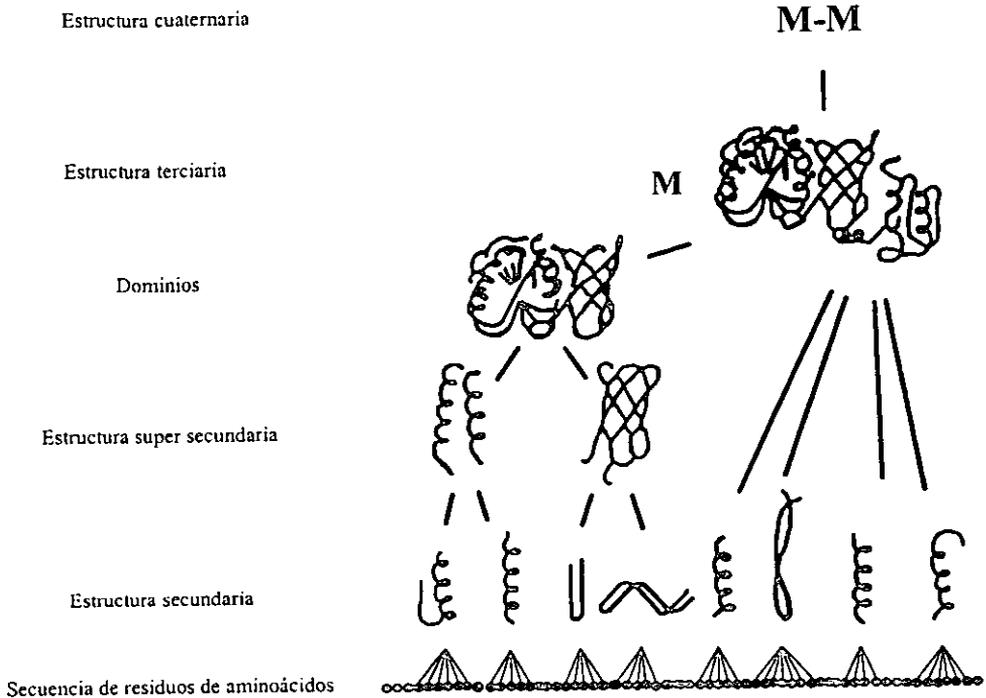
**Figura 1.** La cadena polipeptídica extendida puede adoptar miles de formas. Aunque durante el plegamiento se pueden tener varias rutas a partir de los estados iniciales, siempre se siguen o favorecen ciertas rutas que pueden formar intermediarios precisos (b y c), o no detectables (a), pero que siempre pueden adquirir la estructura nativa. En este esquema U se refiere al estado inicial o hebra al azar, I son diferentes tipos de intermediarios por los que se pueden pasar y N el estado final o nativo.

de las cadenas, se considera que el plegamiento es un proceso relativamente rápido con intermediarios accesibles solo cinéticamente e inestables termodinámicamente. Es importante mencionar que hay evidencias que indican que, durante el plegamiento, las proteínas no se pliegan al azar, sino que pasan por un número limitado de estados conformacionales que finalmente desembocarán en la estructura tridimensional definitiva. Este hecho se acentúa al considerar el número astronómico de conformaciones disponible (paradoja de Levinthal) en el estado desnaturalizado de las proteínas (estructura primaria, cadena polipeptídica). Una búsqueda por todas estas conformaciones tomaría demasiado tiempo, del que no se dispone en un evento de plegamiento, de este modo se sugiere que hay un número limitado de vías por las que puede pasar una proteína antes de alcanzar su estructura nativa (Fig.2). En la caracterización termodinámica del proceso, se debe enfatizar principalmente la minimización de energía en términos del balance dado por las interacciones estabilizantes y desestabilizantes en la formación de la estructura nativa. En el plegamiento de todas las proteínas, ambos aspectos participan en la generación de la estructura tridimensional

Para tratar de entender el plegamiento de proteínas es necesario conocer los principios estructurales y los requerimientos de plegamiento que permiten la adquisición del estado nativo. Esto se debe principalmente a que la vía por la cual se pliega una cadena polipeptídica para llegar a su estado final refleja la jerarquía estructural: dada una secuencia de residuos de aminoácidos (estructura primaria) y las interacciones que efectúa, se pueden formar los elementos de estructura secundaria y súper secundaria, que a su vez pueden formar dominios estructurales, que se pliegan independientemente para originar la estructura terciaria (Fig. 1). En el caso de la formación de una estructura cuaternaria, los monómeros, que ya están estructurados con la estructura terciaria nativa, adquieren su estado final de menor energía por diversas reacciones de asociación (Jaenicke, 1991).

De esta manera, la adquisición espontánea de la estructura tridimensional, y la capacidad para formar estructuras de mayor complejidad, son características primarias de una cadena polipeptídica, aunque el mecanismo por el que todo esto ocurre aún no está bien entendido.

Para responder y dar una explicación satisfactoria al problema de plegamiento, es decir, a cómo una estructura de "una sola dimensión" representada por la secuencia de residuos de aminoácidos genera la estructura tridimensional correspondiente, se deben tratar de resolver los siguientes aspectos: la determinación de un "código de plegamiento", la elucidación de la



**Figura 2.** Jerarquía del plegamiento y la estructura en proteínas. La información codificada por la secuencia de residuos de aminoácidos (contenida en una "pieza" de una sola dimensión) determina el plegamiento y asociación de proteínas globulares. Las interacciones de corto y largo alcance provocan la formación de motivos estructurales y dominios. La vía por la cual se pliega una cadena polipeptídica para llegar a su estado final, refleja la jerarquía estructural: A partir de una secuencia de residuos de aminoácidos y las interacciones que efectúa, se pueden formar los elementos de estructura secundaria y super secundaria, los que a su vez pueden formar dominios estructurales que se pliegan independientemente y originar la estructura terciaria, finalmente, si es el caso, estos elementos forman la estructura cuaternaria.

relación estructura-función y la forma en que se da el plegamiento y reconocimiento de las subunidades que forman la molécula (Jaenicke, 1991; Creighton, 1990).

A pesar de los avances alcanzados hasta el momento, el mecanismo de plegamiento *in vivo* se desconoce. Se sabe que algunos pasos del plegamiento pueden ser asistidos por enzimas y otras proteínas (como las chaperonas moleculares); sin embargo, muchas veces la transición *in vivo* entre la conformación desnaturalizada y la nativa puede llevarse a cabo sin su presencia. Por lo tanto, se puede decir que la adquisición y la estabilidad de estas estructuras están sujetas a la secuencia lineal de residuos de aminoácidos (Anfinsen y Scheraga, 1975) y a las condiciones del disolvente, mas que a aspectos ajenos a ella. Así una de las maneras mediante la que se han tratado de dilucidar estos mecanismos, ha sido la identificación de los pasos individuales en el análisis de reacciones de desnaturalización y renaturalización *in vitro* (Jaenicke, 1991)

Como puede verse, la estructura del estado nativo es el resultado de un delicado balance entre fuerzas, muchas veces opuestas entre sí, para alcanzar el estado nativo. Las fuerzas que favorecen el estado desplegado deben ser compensadas por interacciones covalentes y no covalentes que favorecen el estado plegado. Los estudios de desnaturalización con urea o guanidina son métodos convenientes en la estimación de la estabilidad conformacional de una proteína (Pace, 1986). Estos estudios han sido muy útiles en la comprensión de la estructura, estabilidad y plegamiento de proteínas monoméricas, sin embargo, el mismo tipo de estudios ha sido más raro en el caso de proteínas oligoméricas, a pesar del potencial informativo que puede tener en otros aspectos relacionados, por ejemplo, en lo referente a la asociación de subunidades (Neet y Timm, 1994).

### *Desnaturalización.*

Una de las estrategias que se ha aplicado con más éxito en el estudio del plegamiento es la de desnaturalización; que persigue el fin de encontrar las transiciones cruciales en las vías de este proceso. Para definir el fenómeno de desnaturalización debemos entender primero a la estructura nativa (o el estado plegado) como aquella conformación (o el pequeño grupo de éstas) en la cual la proteína es capaz de realizar su función biológica. Este estado puede ser representado por el modelo cristalográfico correspondiente, y podemos hablar del estado desnaturalizado como su antónimo (Kyte, 1995).

Dicho de otra manera, la desnaturalización es la desorganización de la proteína nativa, el cambio que va de un arreglo estructural ordenado a uno irregular y difuso en la cadena polipeptídica, que de esta manera queda abierta y flexible ("hebra al azar", en el caso más extremo). Por lo tanto, podemos referirnos a este proceso como cualquier cambio del estado nativo (o biológicamente activo), incluyendo aquellos que no son del todo entendidos (modificación covalente, agregación, etc.), por lo que en este tipo de estudios, sólo hemos de considerar aquellos cambios que son, en principio, reversibles. Se considera que este fenómeno es un proceso que se lleva a cabo cooperativamente, ya que, el aumento del factor desnaturalizante modifica la proporción de proteínas en estado nativo y/o desnaturalizadas (Dill, 1991). El estado completamente desnaturalizado es apropiadamente descrito como una hebra al azar; aunque esto raramente ocurra, hay solutos como la urea o la guanidina que logran provocar un estado bastante similar en las proteínas, por lo que la estructura de estas moléculas se pierde en presencia de estos agentes. Sin embargo, debemos considerar que el solvente en que se realizan estos experimentos está compuesto de diferentes componentes, que eventualmente pueden interaccionar de manera diferente con distintas regiones de la cadena extendida. Además de lo anterior, se ha encontrado que en muchas proteínas la estructura y la función cambian de manera simultánea, lo que valida aún más esta estrategia (Creighton, 1994).

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

La trascendencia y valor de este tipo de estudios radica en que el plegamiento de una cadena polipeptídica recién sintetizada ó renaturalizada comienzan de estados iniciales poco o nada definidos (Dill, 1991), lo que puede ser muy significativo con respecto a los estudios de plegamiento, debido a que la vía de formación de la estructura (a partir de la cadena polipeptídica en síntesis) puede depender de un estado como el desnaturalizado (hebra al azar) y las interacciones que puede formar (Fig.3).

La proteína desnaturalizada está representada por una población de confórmeros rápidamente convertibles en otros de energía similar, aunque es importante subrayar que casi todos los intermediarios son tan inestables con relación al estado nativo, que uno de los modelos más aceptados en el plegamiento de proteínas es el que postula únicamente dos estados: el nativo y el desnaturalizado (Fig.4a). Aunque, se conocen otros modelos donde se

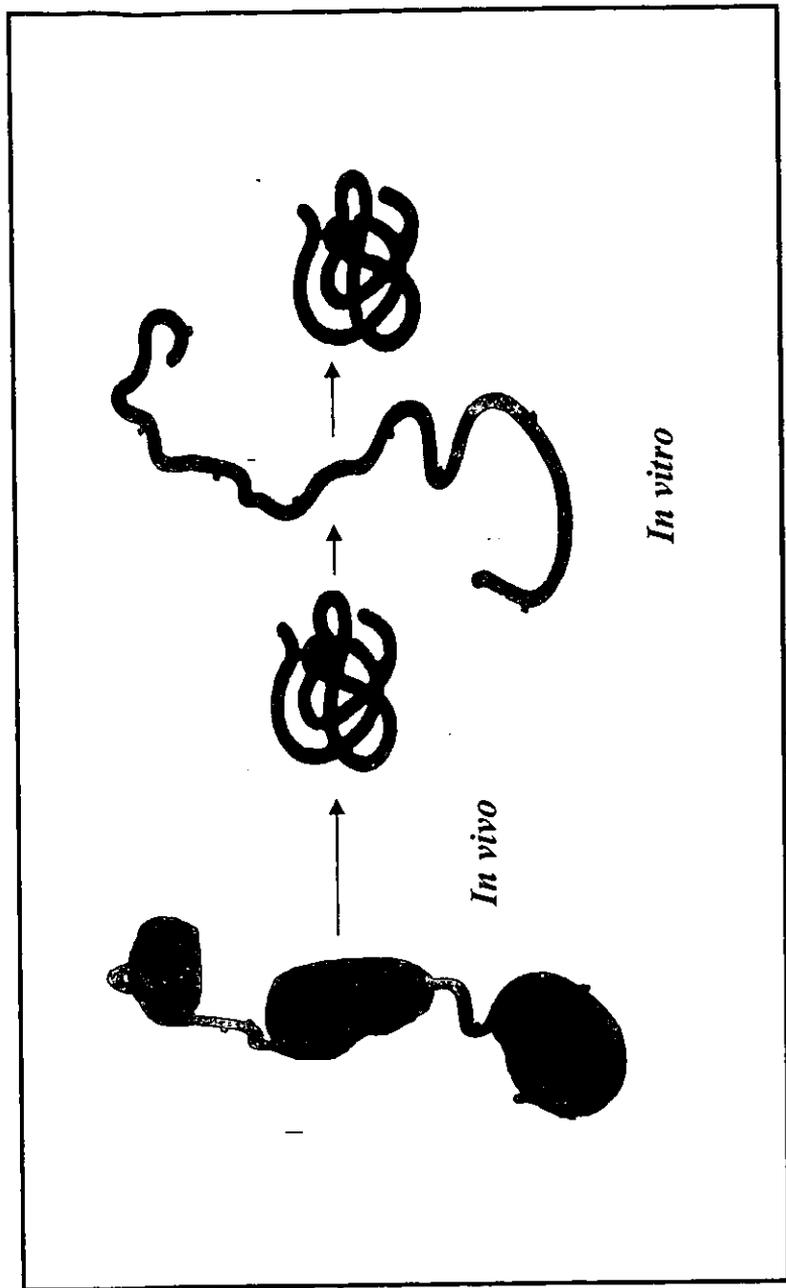


Figura 3. Los estados iniciales en una proteína desnaturizada durante la renaturalización, o inmediatamente después de la síntesis en el ribosoma, son muy similares. Cuando el plegamiento se lleva a cabo *in vivo* puede, o no, auxiliarse con proteínas accesorias. Cuando no lo hace, el proceso es muy similar al de una cadena desnaturizada que puede (o no) adquirir nuevamente su estructura nativa.

postula la existencia de conformaciones estructurales más o menos precisas durante el plegamiento y reconocen por tanto más de dos estados (Fig. 4b)

Estos experimentos son más informativos si el proceso que se registra es la isomerización entre la hebra al azar y la estructura nativa, a pesar de que lo que ocurra en la célula pueda involucrar otros procesos y aspectos que le hagan diferente.

En el trabajo que desarrollamos utilizamos a la urea como agente desnaturizante pues, como mencionamos, puede desnaturizar hasta un estado muy aproximado a la hebra al azar. Esta propiedad tiene que ver con que este agente incrementa la estabilidad de ese estado, principalmente por los cambios favorables en la solvatación de las cadenas laterales de los aminoácidos y del esqueleto polipeptídico por este soluto.

Hay un gran número de reactivos que al ser añadidos al solvente acuoso afectan la estabilidad de la proteína, uno de los mejor conocidos y usados es precisamente la urea. En un principio se creía que la acción de este agente se debía a su potencial para formar puentes de hidrógeno, por lo que se consideraba que su acción se basaba en la ruptura y sustitución de este tipo de interacciones; sin embargo, actualmente se ha visto que no son mejores formadores de estos puentes que el agua, por lo que esta explicación queda muy limitada (Creighton, 1994).

El efecto de aditivos en la estabilidad de las proteínas se puede interpretar en términos de las interacciones preferenciales que forman con la fase acuosa y con la superficie de la proteína, es decir, algo similar a lo que ocurre con las interacciones que determinan su propia solubilidad.

Al parecer, parte de lo que ocurre es que la urea modifica la solubilidad de superficies polares y no polares con relación a la superficie accesible al solvente de la proteína. Este efecto conlleva un decremento de aproximadamente un tercio en las interacciones hidrofóbicas. Además, es capaz de afectar la estructura del agua debido a que tiene un potencial de formación de puentes de hidrógeno similar, aunque, de geometría diferente. Sus efectos en el agua incrementan la tensión superficial, lo que a su vez, puede incrementar la estabilidad de las proteínas; sin embargo, aparentemente hay una interacción preferente con las superficies o grupos polares y no polares de la proteína que con el agua.

La naturaleza física de las interacciones que forma es desconocida hasta ahora; lo que se puede decir, es que este agente puede unirse a la superficie de la proteína plegada y las moléculas de urea pueden permear el interior de la proteína (que en otras condiciones esta

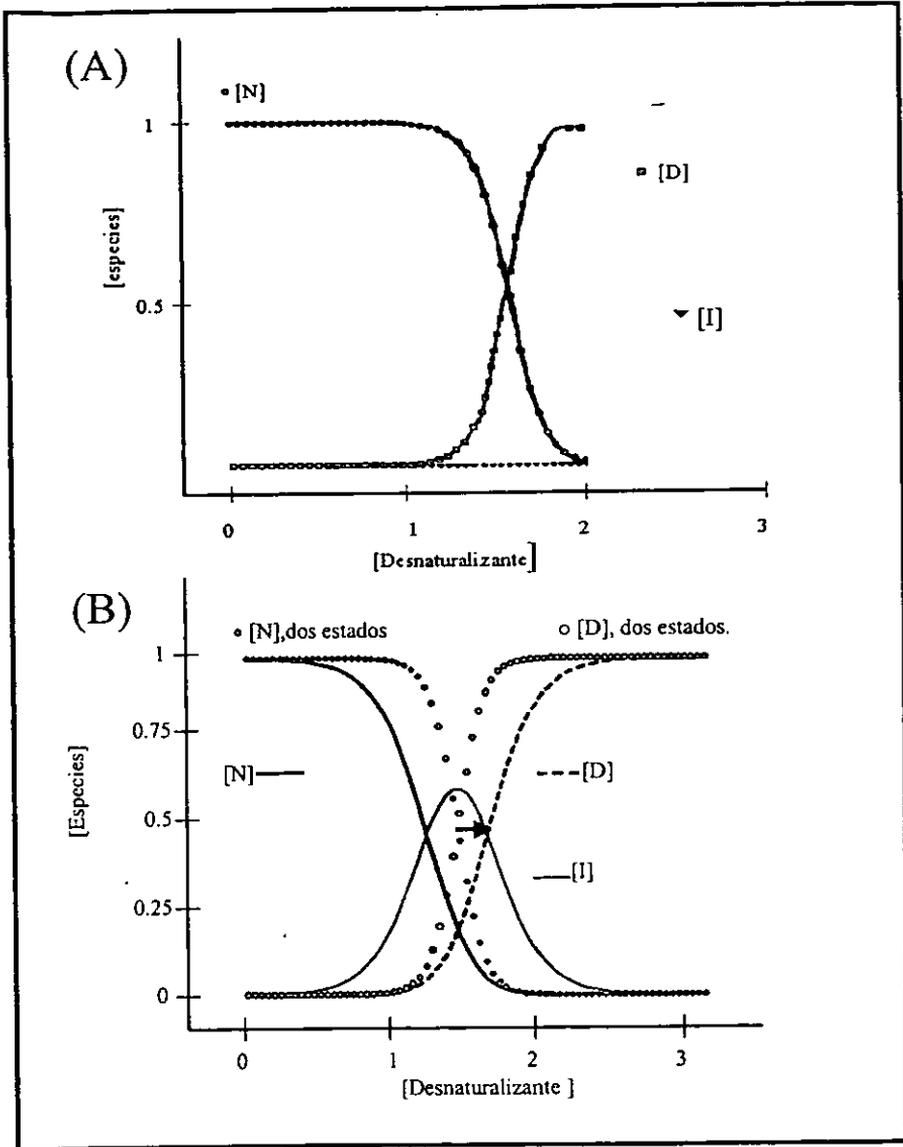


Figura 4. Proceso de desnaturalización en que el modelo se ajusta a un análisis de dos estados (A), donde las únicas especies existentes son la enzima en condiciones nativa (N) y desnaturalizada (D) y, por ende, no existe algún intermediario (I) de plegamiento que se pueda detectar. En un modelo donde se detectan intermediarios (B), el análisis termodinámico se dificulta, → indica el desfaseamiento y "error" provocado por la presencia de éste.

fuertemente empacado) ocupando pequeñas cavidades y perturbando el interior (Creighton, 1994)

### *Proteínas oligoméricas.*

Los estudios de desnaturalización han sido más escasos con proteínas oligoméricas, a pesar de la información adicional que pueden proporcionar las interacciones entre subunidades (Neet y Timm, 1994). Generalmente, para adquirir la estructura nativa, estas proteínas deben asociarse. La asociación requiere de un sitio específico en cada uno de los monómeros, de tal manera que sólo tiene lugar si estos han sido formados previamente. Por lo anterior se considera que el plegamiento de una proteína oligomérica a partir del estado desnaturalizado de sus subunidades, comience a partir de estados similares a los de una proteína monomérica, y continúe hasta formar el sitio de reconocimiento con otro(s) monómero(s). De esta manera, la etapa crítica en el plegamiento de estas proteínas es intermolecular y no intramolecular como ocurre en las monoméricas (Jaenicke, 1994).

En el caso de proteínas oligoméricas, se puede considerar que los primeros pasos en la ruta de reconstitución son similares a los involucrados en los sistemas monoméricos; por lo tanto, los intermediarios de asociación representan también intermediarios de plegamiento. Se considera que, para evitar la agregación, en la renaturalización de las proteínas oligoméricas las subunidades deben plegarse independientemente antes de que ocurra la asociación (Jaenicke y Rudolph, 1986).

El estudio de este tipo de proteínas se ha abordado con una perspectiva similar al utilizado en proteínas monoméricas; es decir, por medio del estudio cinético de las vías de plegamiento con el fin de determinar la relación de este proceso con la actividad de la proteína, y, el análisis termodinámico de la estabilidad conformacional a partir de los estudios de desnaturalización, para así obtener información acerca del proceso. En este caso el análisis de plegamiento y desnaturalización puede ser más complicado debido a los procesos colaterales involucrados, que en muchas ocasiones se tornan irreversibles. La velocidad y rendimiento de los experimentos dependen en gran medida de las condiciones del solvente, el método de desnaturalización que se maneja y la concentración de la proteína. En general, las proteínas oligoméricas tienen fuertes tendencias a la precipitación y/o agregación durante la transición desnaturalización-renaturalización, lo que provoca la irreversibilidad total o parcial en el

sistema (Mendoza y Rendón, 1996; Jaenicke y Rudolph, 1986), lo que dificulta y limita en gran medida el análisis del plegamiento.

En condiciones intracelulares, se ha determinado que hay muchos factores que pueden estar relacionados con el plegamiento, muchos de ellos involucrados en procesos de control y localización que no confieren información conformacional a la cadena polipeptídica con la que interactúan, tal es el caso de las chaperonas moleculares (Ranson *et al.*, 1998; Braig, 1998); por este motivo, la evidencia obtenida hasta el momento mantiene aún el principio postulado por Anfinsen en 1973 (Fig.5).

El plegamiento de proteínas constituye uno de los problemas centrales de la Biología. Sabemos que las secuencias de residuos de aminoácidos determinan la estructura tridimensional y que el cambio conformacional del estado desnaturalizado al nativo puede ocurrir de forma espontánea. Cuando se comprenda la relación entre la secuencia y la estructura tridimensional, se podrá diseñar proteínas nuevas que realicen funciones de interés industrial o terapéutico. Debemos enfatizar también que la mayoría de los estudios de esta índole están hechos en proteínas monoméricas, a pesar de que la mayoría de estas son oligoméricas, por lo que es importante equilibrar este balance antes de generalizar las conclusiones. Entender los factores que determinan el plegamiento de las proteínas tiene, por consiguiente, una gran importancia científica, desde las perspectivas básica y aplicada.

## ANTECEDENTES

### *ALCOHOL DESHIDROGENASAS DE CADENA CORTA*

La glucosa deshidrogenasa (GDH), proteína que utilizamos para este estudio, pertenece a una familia propuesta recientemente llamada "alcohol deshidrogenasas de cadena corta". Esta familia está integrada por un grupo de diversas enzimas que catalizan la oxidación de una amplia variedad de alcoholes primarios y secundarios, a productos aldehídos y cetonas. Las reacciones catalizadas por estas enzimas involucran la reducción de  $\text{NAD}^+$  o  $\text{NADP}^+$ . La información contenida en la secuencia se ha utilizado para clasificarlas en tres grupos principales: Las de cadena corta, las de cadena media y las de cadena larga (Ribas de Pouplana *et al.*, 1991).

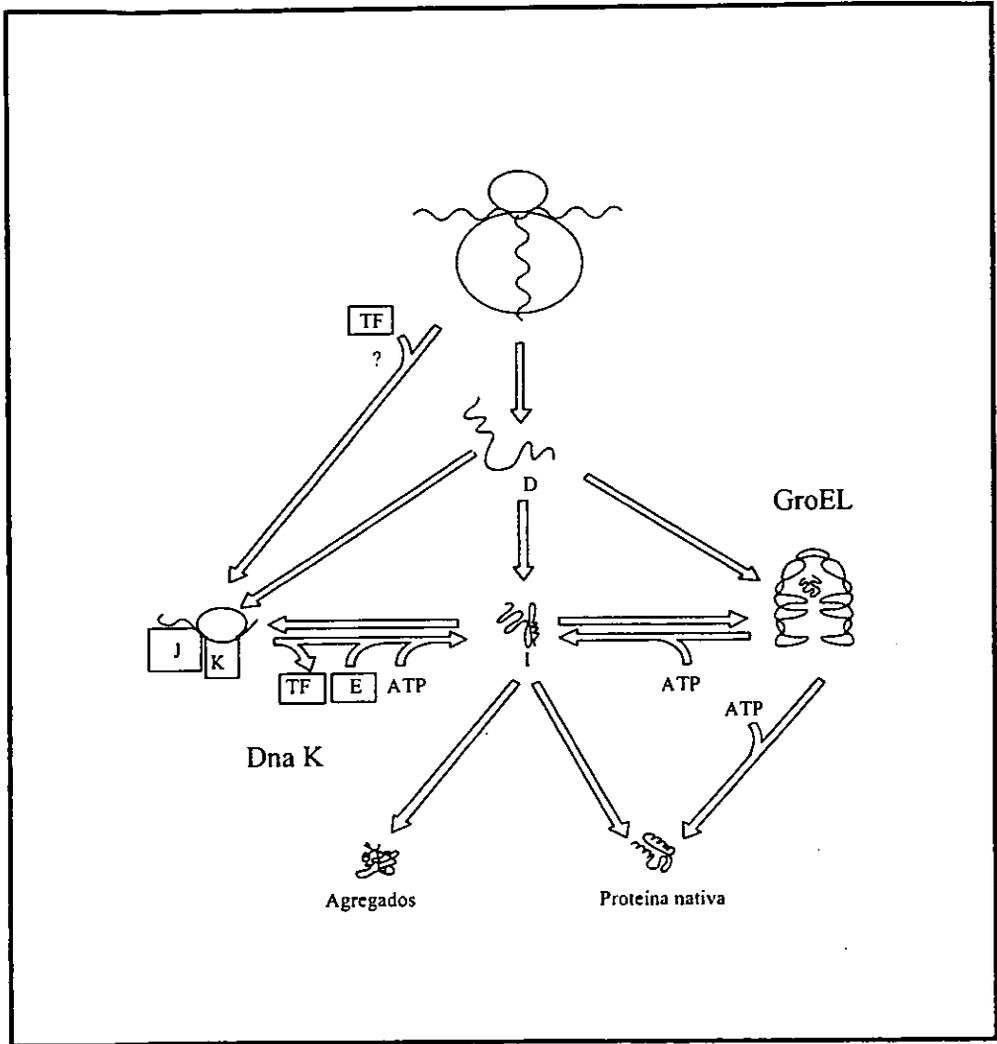


Figura 5. En la célula el plegamiento puede ser asistido por varios sistemas moleculares, en esta figura se muestra la cooperación entre dos de ellos: el sistema GroEL y Dna K (J, K, TF, E). La proteína desplegada (D) emerge del ribosoma, y pasa a través de varios intermediarios (I) que pueden no terminar el plegamiento por su cuenta y formar agregados, o interactuar con cualquiera de los sistemas de chaperonas y alcanzar la estructura nativa.

Por el caso que nos ocupa, nos enfocaremos principalmente a las proteínas pertenecientes a la alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SCAD, por sus siglas en inglés). Estas enzimas son oxidoreductasas multiméricas, que están relacionadas filogenéticamente y actúan sobre diversos sustratos (azúcares, esteroides, prostaglandinas, ect.); además incluyen proteínas de origen procarionte y eucarionte (Krozowski Z., 1994).

<i>Característica</i>	<i>Cadena corta</i>	<i>Cadena media</i>	<i>Cadena larga</i>
Tamaño de la subunidad (a.a.)	250 a.a. aprox.	300 a.a. aprox.	Más de 300 a.a.
Orden de los dominios	Coenzima-catalítico	Catalítico-Coenzima	Catalítico-Coenzima
Sitio activo con Zn <sup>+</sup>	-	+	+

*Tabla 1.* Principales diferencias entre las familias alcohol deshidrogenasas de cadena corta, media y larga.

Los miembros de esta familia poseen de 250 a 300 residuos de aminoácidos y su función es independiente de Zn<sup>+</sup>, lo que les distingue de las otras dos familias (de cadena media y larga) (Tabla 1). En general, los miembros de esta familia prefieren actuar sobre alcoholes secundarios, mientras que, en el caso de las familias restantes el sustrato preferido son los alcoholes primarios. Otra diferencia radica la estereoespecificidad con la que trabajan estas proteínas (pro-S) con respecto a las otras familias (pro-R). Para integrar a la familia, se recurrió a la alineación de secuencias de residuos de aminoácidos y se encontró que hay seis regiones o dominios bien conservados (fig.6). Funcionalmente sólo se reconocen dos de ellos, uno que forma parte de la unión a nucleótido y otro que aparentemente forma parte del sitio activo, del resto se presume que pueden cumplir con una tarea estructural y/o funcional que no es clara.

Además de la alineación de aminoácidos, las predicciones de estructura secundaria son muy similares y sugieren la existencia de un patrón  $\alpha/\beta$ , característico del sitio de unión a

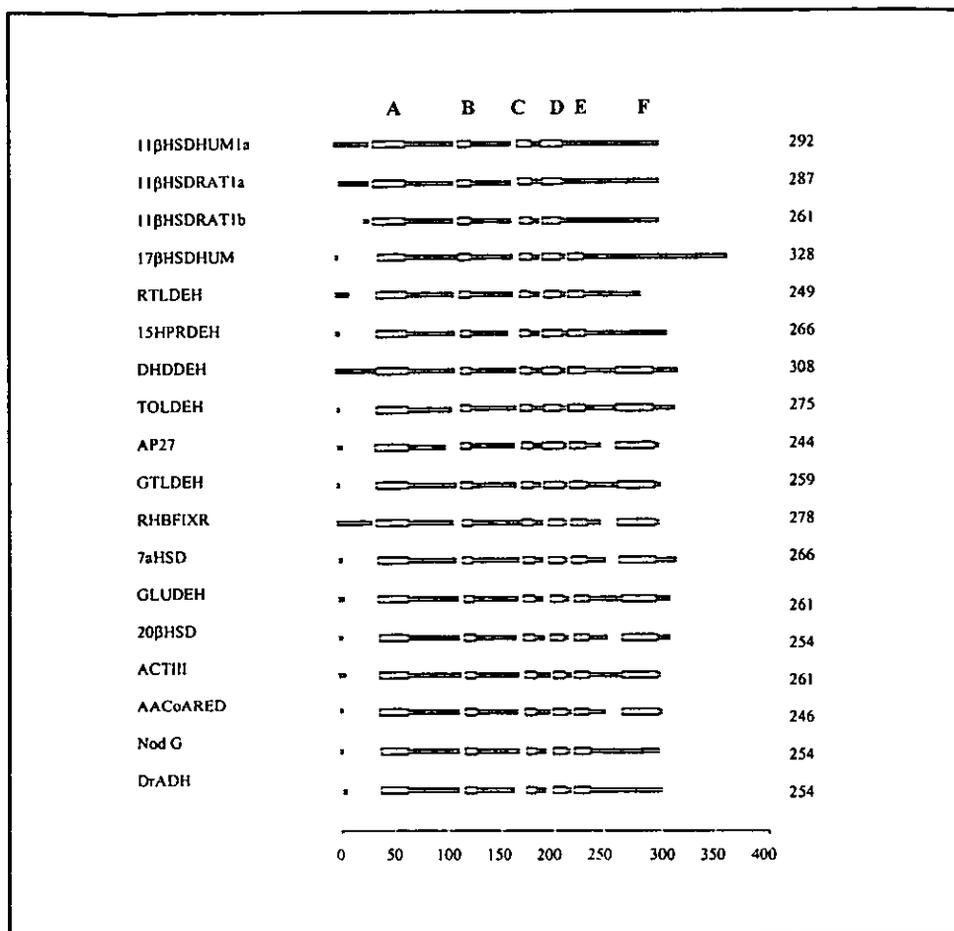


Figura 6. Alineación de la secuencia de residuos de aminoácidos de la familia SCAD. Las letras A-F, representan los dominios conservados de esta familia (representados como ensanchamientos en cada una de las secuencias); Los números a la derecha indican la longitud de la secuencia individuales; las siglas a la izquierda se refieren al nombre de la proteína: 11βHSDHUM1a 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de humano, 11βHSDRAT1a 11β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa de rata, 11βHSDRAT1b forma corta de la 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de rata, 17βHSDHUM 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa de humano, RTLDEH ribitol deshidrogenasa, 15HPRDEH 15-hidroxi prostaglandina deshidrogenasa, DHDDEH dihidrodiol deshidrogenasa, TOLDEH cis-toluenodihidrodiol deshidrogenasa, AP27 proteína de adipocito (sin función conocida), GTLDEH glucitol deshidrogenasa, RHBFIXR proteína fixR de *Bradyrhizobium japonicum*, 7αHSD 7α-Hidroxiesteroide deshidrogenasa, GLUDEH glucosa deshidrogenasa; 20βHSD, 20β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, ACTIII producto génico de *Streptomyces coelicolor*, AACoERED acetoacetil coenzima A reductasa, NodG producto génico de la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhizobium meliloti*, DrADH alcohol deshidrogenasa de *Drosophila*.

nucleótido en el extremo amino de uno los dominios secuenciales conocido (Persson *et al.*, 1991; Ribas de Pouplana *et al.*, 1991).

Aparentemente, por la similitud y comparación de las cadenas de residuos de aminoácidos, esta familia tiene mecanismos funcionales y algunos residuos críticos comunes, por lo que se puede decir que estas proteínas han evolucionado en una familia de oxido-reductasas, a través de la duplicación de genes y la mutación, que comprende actividades enzimáticas diferentes (Krozowski 1992).

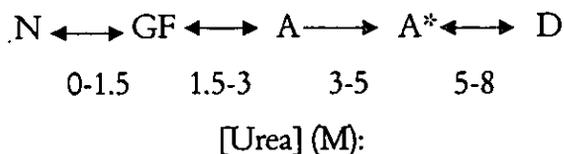
Como es una familia postulada recientemente ha sido poco estudiada y muchas de las características de las proteínas que la integran no se conocen, por lo que una de las motivaciones de este trabajo tiene que ver con el interés de saber si las similitudes de estructura primaria y secundaria, que llevan a la integración de una familia, generan rutas de plegamiento similares, aspecto que podría añadirse como característico de esta familia.

#### *LA 17 $\beta$ -ESTRADIOL DESHIDROGENASA.*

La 17  $\beta$ -estradiol deshidrogenasa (17  $\beta$ -HSD) es una proteína que también pertenece a la familia SCAD, esta enzima cataliza la interconversión entre el estradiol y la estrona (Fig. 7). En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se hizo el estudio de desnaturalización con urea de esta proteína con el fin de encontrar las etapas relevantes de plegamiento al equilibrio. (Mendoza y Rendón, 1996).



Figura 7. Reacción de la 17 $\beta$ -HSD, un miembro de la familia SCAD.



*Figura 8.* Esquema de desnaturalización de la 17  $\beta$ -HSD. N es la enzima nativa, GF es un intermediario del tipo del glóbulo fundido, A es la 17  $\beta$ -HSD agregada, A\* la enzima en un estado de agregación que por sus características es irreversible y D es la subunidad de la 17  $\beta$ -HSD desnaturalizada.

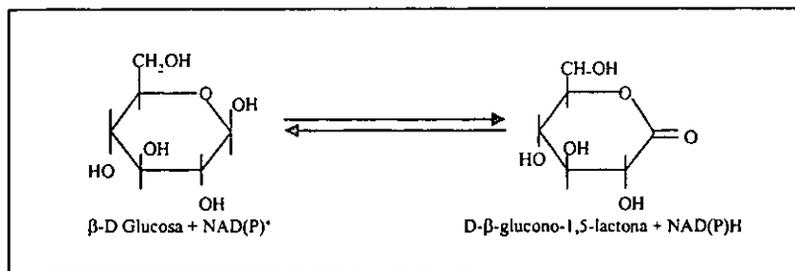
Los datos obtenidos arrojaron un patrón de desnaturalización complejo (Fig.8). A bajas concentraciones de desnaturalizante ocurre una transición conformacional importante visible tanto por cambios en los espectros de dicroísmo circular como por fluorescencia intrínseca. Este estado está relacionado con un estado expandido de la enzima que coincide con su inactivación y la formación de especies poliméricas donde además se sugiere la existencia de un glóbulo fundido de la enzima dimérica. La dilución de la urea en esta etapa permite la recuperación completa de la actividad enzimática y de la estructura nativa de la proteína. Entre 3 y 5 M de urea la estradiol deshidrogenasa se encuentra como una mezcla de oligómeros de alto peso molecular. En este intervalo de concentraciones de urea, se detectan sólo cambios menores pero la inactivación se torna irreversible. A concentraciones de urea mayores de 5 M ocurre otra transición conformacional, evidente por métodos espectroscópicos. Esta etapa resulta en la disociación completa de la enzima en subunidades desnaturalizadas. Los datos en su conjunto permiten postular un modelo termodinámico de plegamiento en el cual existen intermediarios conformacionales con diferente estabilidad, entre los cuales se encuentra un glóbulo fundido dimérico.

Sin embargo, la caracterización completa de macromoléculas en equilibrio, además de la identificación de los estados relevantes a la reacción, requiere la determinación de los cambios en energía libre, entalpía, entropía y capacidad calorífica para cada estado; la determinación de estos parámetros no se pudo determinar debido a la irreversibilidad que presenta el sistema.

**MODELO EXPERIMENTAL: GLUCOSA DESHIDROGENASA.**

La proteína que utilizamos en este trabajo es la glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium* (GDH), esta enzima cataliza la oxidación de la β-D-Glucosa a D-β-glucono-1,5-lactona y para ello utiliza al NAD<sup>+</sup> o al NADP<sup>+</sup> como coenzima (Fig.10).

Aislada de *B. megaterium*, esta proteína se encuentra como tetrámero con subunidades idénticas de 262 residuos de aminoácidos (Jany *et al.*,1984) y una masa de alrededor de 30 kDa cada una (Tabla 2). Esta proteína aún no ha sido cristalizada (Pal *et al.* 1987)



**Figura 9.** Reacción llevada a cabo por la GDH, otro miembro de la familia SCAD

Familia.	Alcohol deshidrogenasas.
Superfamilia.	Alcohol deshidrogenasas de cadena corta.
Estructura secundaria.	Proteína $\alpha/\beta$ .
Estructura oligomérica.	Tetrámero con subunidades idénticas.
Punto isoeléctrico (pI).	4.9
Aminoácidos por subunidad.	262
Masa molecular por subunidad.	28 350 Da
Volumen específico parcial (ml/g).	0.723
Coefficiente de sedimentación ( $S_{20,w}$ ).	6.5 S
Radio de Stokes (nm).	4.85 nm
Triptofanos por subunidad.	4

Tabla 2. Propiedades de la Glucosa deshidrogenasa de *Bacillus megaterium*.

Se ha visto que esta proteína muestra la característica de disociarse en sus subunidades mediante cambios en el pH y/o fuerza iónica (Pauly y Pfeleiderer, 1977). Cuando la GDH se encuentra en pH 6.5 se presenta como tetrámero y cuando el pH se lleva a 8.5-9 se disocia en sus subunidades. La disociación ocurre de tetrámero a monómeros inactivos. Estos cambios son completamente reversibles cuando el pH se restablece al valor original, es decir, cuando se reajusta el pH a 6.5 (Maurer y Pfeleiderer, 1985). Este fenómeno se evita cuando el experimento se realiza a fuerza iónica alta (en presencia de NaCl), pues, aunque se efectúe el cambio de pH la proteína permanece como tetrámero. Esta conducta es poco común ya que, la disociación de enzimas oligoméricas requiere frecuentemente condiciones extremas para llevarse a cabo; dichas condiciones incluyen cambios de pH, utilización de solventes orgánicos, urea y/o cloruro de guanidinio, que además pueden inducir cambios estructurales que llevan a la agregación o a varios productos intermediarios de desnaturalización, muchas veces irreversibles.

Para nuestros fines, una de las conclusiones más interesantes extraída de los trabajos hechos sobre la GDH es que los cambios conformacionales que se sufren durante la disociación de esta enzima, bajo las condiciones mencionadas, son de pequeña magnitud (Maurer y Pfeleiderer, 1985; Maurer y Pfeleiderer, 1987). Asimismo, en estos trabajos también se reporta que la incubación de una muestra de la GDH en 8 M de urea fue capaz de recuperar el 100% de su actividad (Pauly y Pfeleiderer, 1977), lo que es de particular interés para esta investigación, ya que apunta la reversibilidad de la desnaturalización en una proteína oligomérica y su probable caracterización termodinámica.

Debido a la facilidad y completa reversibilidad de la disociación de la enzima, se supone que los cambios conformacionales que llevan a la pérdida de la estructura cuaternaria y a la inactivación de esta enzima, reflejan la dependencia existente entre las interacciones de las subunidades y la actividad de la enzima. Estas características hacen que esta enzima luzca como un modelo ideal para el estudio de los procesos de disociación, reasociación, desnaturalización y renaturalización de una enzima oligomérica.

Además de lo anterior, el interés por estudiar esta proteína nace de su inclusión dentro de la familia SCAD y a los estudios previos de desnaturalización hechos sobre la 17 $\beta$ -estradiol deshidrogenasa, otro miembro de esta familia (Mendoza y Rendón, 1996); aspectos sobre los que abundaremos mas adelante.

## HIPÓTESIS.

La desnaturalización con urea es una estrategia ampliamente utilizada en el estudio de proteínas, ya que por medio de este tipo de estudios podemos obtener algunos parámetros útiles acerca de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Es posible reconocer y calcular (entre otras cosas) las constantes termodinámicas del sistema y por lo tanto obtener información acerca de etapas relevantes en la conducta de desnaturalización de esta enzima (GDH). Esto sólo es posible si el modelo de desnaturalización que se obtiene es reversible, por lo que si la GDH presenta un esquema con estas características, podremos definir dichos parámetros, información que nos permitirá profundizar en su conocimiento y en el de la familia que le incluye (SCAD).

## OBJETIVOS.

De esta manera, y tomando en cuenta lo mencionado hasta este momento, los objetivos sobre los que se guía esta investigación son:

1-Determinar los estados conformacionales de la GDH, resultado de la desnaturalización inducida por urea.

2-Establecer la estabilidad conformacional y funcional de la enzima (GDH) en función de la concentración de desnaturalizante (urea).

3-Comparar el esquema de desnaturalización obtenido con el correspondiente al de la  $17\beta$ -HSD, una proteína emparentada.

## HIPÓTESIS.

La desnaturalización con urea es una estrategia ampliamente utilizada en el estudio de proteínas, ya que por medio de este tipo de estudios podemos obtener algunos parámetros útiles acerca de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Es posible reconocer y calcular (entre otras cosas) las constantes termodinámicas del sistema y por lo tanto obtener información acerca de etapas relevantes en la conducta de desnaturalización de esta enzima (GDH). Esto sólo es posible si el modelo de desnaturalización que se obtiene es reversible, por lo que si la GDH presenta un esquema con estas características, podremos definir dichos parámetros, información que nos permitirá profundizar en su conocimiento y en el de la familia que le incluye (SCAD).

## OBJETIVOS.

De esta manera, y tomando en cuenta lo mencionado hasta este momento, los objetivos sobre los que se guía esta investigación son:

- 1-Determinar los estados conformacionales de la GDH, resultado de la desnaturalización inducida por urea.
- 2-Establecer la estabilidad conformacional y funcional de la enzima (GDH) en función de la concentración de desnaturalizante (urea).
- 3-Comparar el esquema de desnaturalización obtenido con el correspondiente al de la 17 $\beta$ -HSD, una proteína emparentada.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

La enzima utilizada en este trabajo fue la GDH, que se obtuvo de una preparación comercial de Sigma. Para utilizarla se debe purificar, lo que se logra con una simple precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 70%, a partir de la misma preparación. Los demás reactivos utilizados tienen grado analítico y se obtuvieron de fuentes comerciales con reconocido prestigio. En la parte experimental de este trabajo, utilizamos el método que detallamos a continuación:

*Ensayos de actividad.* Una de las maneras en que se puede determinar el estado de la enzima es por medio de los cambios en su actividad catalítica. La actividad de esta enzima, como en muchas otras deshidrogenasas, se determina por el incremento lineal de absorbencia a 340 nm, y a temperatura ambiente; esto ocurre como consecuencia de la reducción del  $\text{NAD}^+$  por la acción de la GDH sobre el sustrato  $\beta$ -D-glucosa. El aparato utilizado en esta técnica fue un espectrofotómetro de doble haz Cecil 5000. La reacción se lleva a cabo, en un medio preparado en un volumen final de 1 ml, que contiene: 1 mM de  $\text{NAD}^+$  (cosustrato,  $K_m = 0.11$  mM), 100 mM de D-glucosa (sustrato,  $K_m = 8.7$  mM), 1 mM de EDTA y 100 mM de amortiguador de fosfatos pH 7. Para iniciar la reacción se añade una muestra de enzima y se obtienen los registros y datos correspondientes.

*Inactivación y reactivación.* Estos experimentos funcionan como primera aproximación a nuestros objetivos; de hecho, es una prueba comúnmente utilizada (Shirley, 1995; Jaenicke y Rudolph, 1986) para estos fines, ya que nos permiten intuir grosso modo el deterioro estructural de la enzima con diferentes concentraciones de urea, es decir, el intervalo donde la GDH pierde su actividad. La reactivación de las muestras se hace por la dilución de la urea y nos permite vislumbrar si los cambios provocados por su presencia son o no reversibles.

En estos experimentos se hace la incubación de las muestras de GDH (0.2 nmol/mL de subunidad) en diferentes concentraciones de urea (en un gradiente de 0-8 M) a temperatura ambiente durante 18 hr. Todo esto se prepara en un volumen final de 1 mL con un amortiguador de fosfatos 100 mM, pH 7 y 1 mM de EDTA. Transcurrido el tiempo de incubación (18 hrs.) se mide la actividad residual de cada una de las muestras de GDH con y sin urea, para lo cual se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución stock de 5 M de D-glucosa (20  $\mu\text{L}$ ) y

otra de 100 mM de NAD<sup>+</sup> (10  $\mu$ L ) (sustrato y cosustrato). Para la reactivación se incubó la enzima bajo las mismas condiciones que en la inactivación, sólo que ahora en un volumen final de 30  $\mu$ l; transcurrido el tiempo de incubación se efectúa la dilución de las muestras por la adición de 1ml de amortiguador de reactivación, que contiene: 100 mM de fosfatos y 50 mM de EDTA, pH 7. Tras la dilución se incubó durante 24 hr mas a temperatura ambiente y se mide la actividad como lo hicimos anteriormente.

*Cromatografía de exclusión molecular.* Estos experimentos tienen el objetivo de determinar el grado polimérico o de asociación de la GDH durante la desnaturalización con urea. Esta técnica es también de uso común en el estudio de proteínas, ya que el cambio en el volumen hidrodinámico de las mismas es dependiente de la concentración del desnaturalizante utilizado (Shalongo *et al.*, 1993; Uversky, 1993). En estos experimentos utilizamos un sistema HPLC de la firma Beckman. Las muestras se corrieron en una columna de 7.5 x 300 mm, con una resina (o fase estacionaria) de Ultra Spherogel-sec 3000. La fase móvil corresponde a un amortiguador de 100 mM de fosfatos, 1 mM EDTA pH 7 y la concentración de urea requerida en cada experimento. La GDH se desnaturalizó como ya hemos descrito y antes de cada corrida las muestras se filtraron individualmente. Las fracciones eluidas se colectaron a una velocidad de 1ml/min y los perfiles de elución se obtuvieron por medio de la absorbencia continua a 280 nm. Los datos obtenidos de esta técnica nos ayudan a determinar el grado de desnaturalización y/o de asociación, a través del radio de Stokes (Rs); para la medición de estos, la columna fue calibrada con proteínas globulares de Rs bien conocido (mioglobina 1.9 nm, anhidrasa carbónica 24.3 nm, ovoalbúmina 2.8 nm, albúmina de suero bovino 3.5 nm, aldolasa 4.6 nm, catalasa 5.2 nm, ferritina 6.1 nm, tiroglobulina 8.6 nm), de tal manera que puede obtenerse el Rs de la GDH nativa y en cada una de las concentraciones de urea utilizadas.

*Entrecruzamiento con glutaraldehído.* Para complementar y corroborar el estudio sobre los estados de agregación y/o asociación de la enzima durante la desnaturalización, se analizaron las muestras de GDH con y sin urea por medio del entrecruzamiento covalente con glutaraldehído, seguido del análisis electroforético en geles con gradiente de poliacrilamida y en presencia de SDS. Esta técnica permite la fijación de diferentes estados de oligomerización, por lo que es posible evaluar cuantitativamente este tipo de intermediarios (Jaenicke y

Rudolph, 1986). En el entrecruzamiento, las muestras de proteína (10 µg) se mezclaron con el glutaraldehído (25% v/v), a una concentración final del 1% (v/v), en el amortiguador de fosfatos y la concentración de urea usada en cada caso; después de 30 seg. de incubación, la reacción se detiene con NaBH<sub>4</sub> para quedar con un cociente molar de NaBH<sub>4</sub>/glutaraldehído de 2. Después de 20 minutos de incubación la proteína se coprecipita con desoxicolato de sodio y ácido Tricloroacético (50% v/v) y por último es resuspendida en un amortiguador (20 µl) con Tris 1.5 M (pH 8.8), 1% de SDS (P/V) y 50 mM de DTE. El análisis se hizo por medio de electroforesis por geles en gradiente del 4-20% de poliacrilamida y en presencia de SDS.

*Electroforesis en geles transversos de urea.* Esta técnica se ha utilizado para el análisis de la transición del estado nativo al desnaturizado de muchas proteínas (Creighton, 1979; Santoro y Bolen, 1988), ya que, los geles transversos de urea permiten detectar este fenómeno en una sola fase y, por lo tanto, pueden brindar información acerca de la existencia de intermediarios, acerca de la estabilidad intrínseca y de otros aspectos. Para la GDH, estos geles se elaboran con un gradiente transversal (con respecto a la dirección de la corrida) de 0-8 M de urea, acoplado a un gradiente de poliacrilamida inverso (con respecto al gradiente de urea) de 11-7%, que cumple con la tarea de compensar el efecto de la viscosidad producido por la urea. La preparación de los geles se adaptó del método empleado en otros trabajos (Goldenberg, 1989). Para evitar el efecto de disociación por pH mostrado por esta enzima, en la preparación y corrida de los geles se utilizó un sistema amortiguador con 100 mM de fosfatos y un pH de 7. Los geles utilizados fueron pre-electroforados durante 1 hr a 70 v. Para las corridas se usaron 50 µg de enzima nativa (para seguir la desnaturización) ó desnaturizada en 8 M (para seguir la renaturalización) de urea, aplicados en la parte superior del gel; la duración del experimento fue de 4 hr a 100 v; una vez que se termina la corrida de las muestras, los geles son teñidos con azul de Coomassie para visualizar la proteína.

*Dicroísmo circular.* Estos experimentos se hicieron con el fin de obtener información detallada de lo que ocurre con la estructura secundaria durante la desnaturización (Kelly y Price, 1997). En este experimento utilizamos un espectropolarímetro Aviv 62 DS, a 25°C. Los espectros de dicroísmo fueron registrados en el

uv lejano en el intervalo de 200-260 nm. Las muestras de enzima utilizadas fueron preincubadas en diferentes concentraciones de urea (18 hr) como ya hemos mencionado y se obtuvieron los espectros de cada una de las muestras; en concentraciones altas de urea (por ejemplo 8 M), los espectros sólo pueden ser registrados hasta 210 nm. Todos los datos fueron corregidos por una línea de base correspondiente a la contribución que pudieran tener el amortiguador y la urea. La elipticidad residual fue calculada del promedio de dos experimentos distintos. Los cambios en la elipticidad a 220 nm se utilizaron para indicar los efectos de la desnaturalización en la estructura secundaria de la proteína.

*Fluorescencia.* Estos estudios se hacen para analizar los cambios ocurridos en la estructura terciaria de la GDH durante la desnaturalización (Eftink, 1995). El equipo utilizado fue un espectrofluorómetro Aminco SPF-500. Las muestras de GDH se desnaturalizan como se describió anteriormente. Para obtener los espectros de fluorescencia, se excita a 295 nm cada una de las muestras correspondientes, se utiliza esta longitud de onda con el fin de excitar selectivamente a los residuos de triptofano de la proteína (4 en cada subunidad) y evitar en lo posible la interferencia de las tirosinas; los espectros de emisión fueron registrados de 300 a 540 nm, el corte de luz fue de 4 nm para la excitación y 5 nm para la emisión.

*Unión de bis-ANS con la GDH.* Con la fluorescencia también se puede estudiar la unión de la GDH con bis-ANS. El bis-ANS es un compuesto ampliamente usado en el estudio e identificación de intermediarios de desnaturalización. En estos experimentos se excita cada una de las muestras a 380 nm y se obtienen los espectros de emisión correspondientes; el paso del haz o corte de banda (slid width) para la excitación y emisión fue de 4 y 8 nm respectivamente. La concentración utilizada del bis-ANS se midió espectrofotométricamente a 387 nm con base en un coeficiente de extinción molar de 17 000  $M^{-1} cm^{-1}$ . La unión de esta sonda fluorescente se probó por la adición de 1  $\mu l$  de esta (3.5  $\mu M$  final) a una muestra de 1 ml de enzima (0.4  $\mu M$ ) nativa o preincubada en urea. Para corregir las lecturas se hizo la sustracción de un blanco hecho con la sonda fluorescente, la concentración de urea requerida y el amortiguador.

Con los resultados obtenidos en cada una de estas técnicas tendremos la información necesaria para determinar un patrón de desnaturalización completo. Todos los ensayos se hacen al equilibrio, por lo que, si la naturaleza de la desnaturalización lo permite, podremos

determinar las constantes termodinámicas de esta proteína bajo las condiciones de desnaturalización utilizadas.

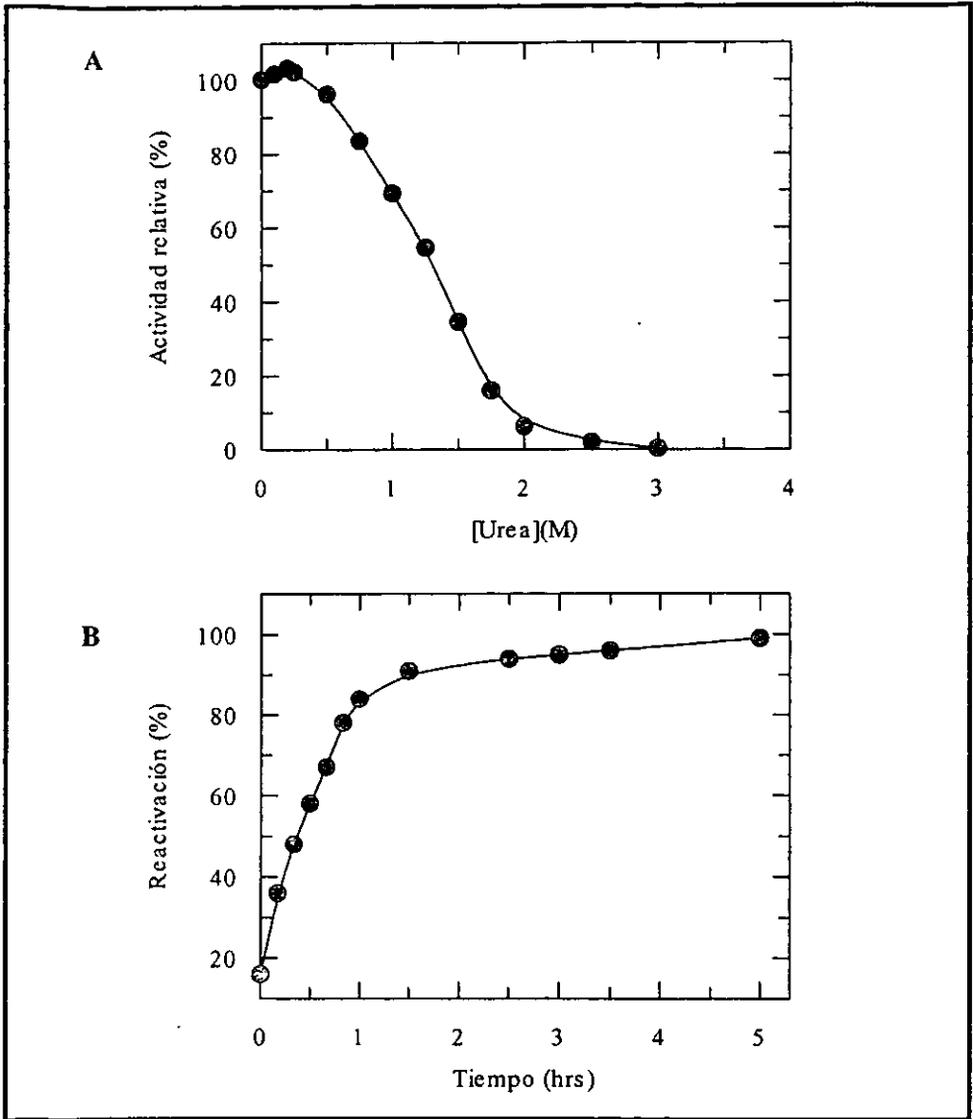
## RESULTADOS.

Los datos que obtuvimos en nuestros experimentos nos dejan ver la siguiente información:

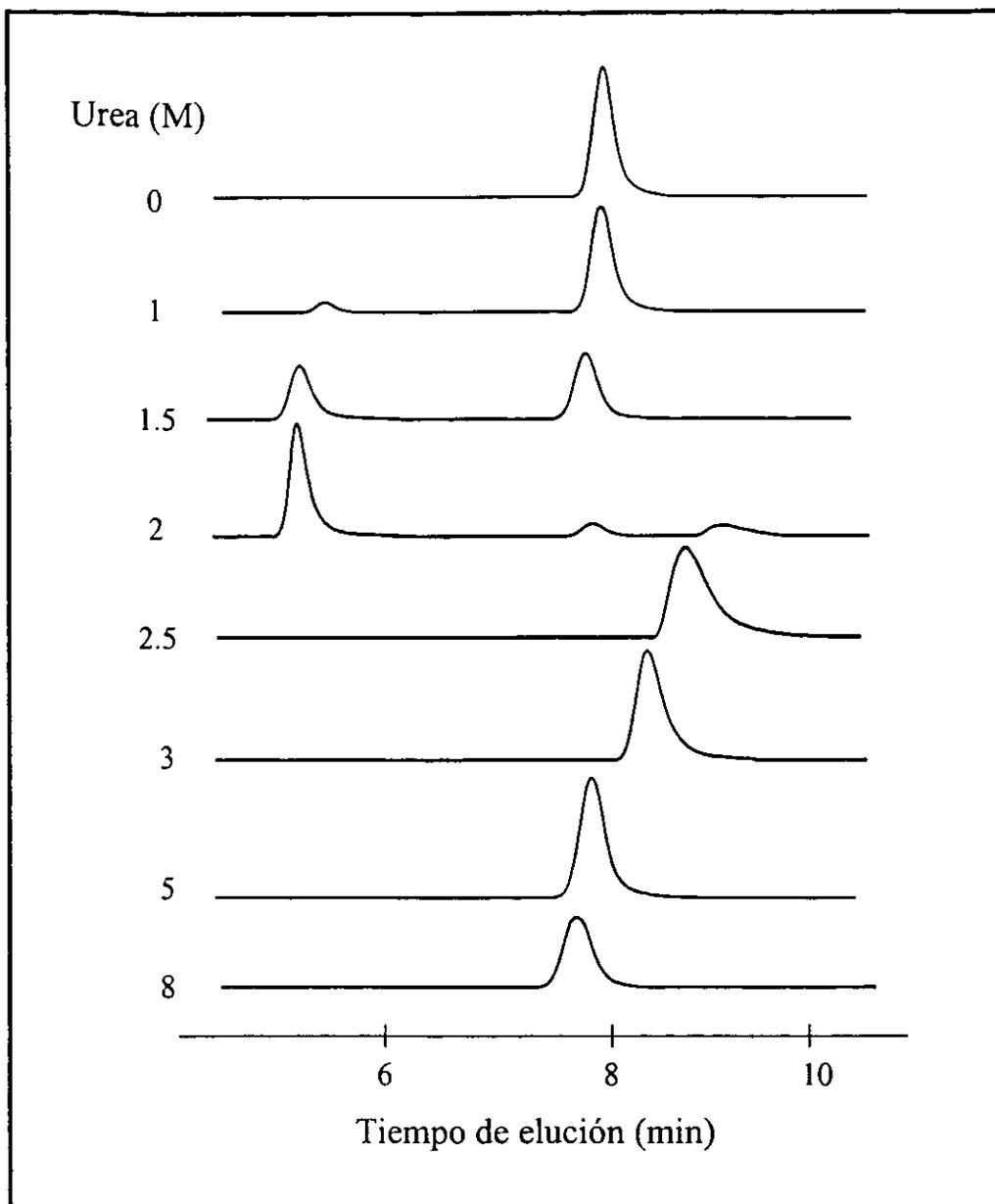
*Actividad de la GDH durante la desnaturalización con urea.* Los cambios en la catálisis de la GDH después de la incubación en las concentraciones de urea utilizadas se muestran en la figura 10 A. En esta figura se puede ver que durante la inactivación, a concentraciones menores de 0.5 M de urea, la enzima mantiene el 100% de su actividad, lo que nos habla de que en este intervalo la proteína mantiene su conformación nativa - o una muy parecida - de tal forma que aún puede actuar sobre su sustrato. A partir de esta concentración y hasta 2 M de urea, la enzima pierde gradualmente su actividad y finalmente se inactiva completamente alrededor de 2.5 M. Esto se puede relacionar directamente con la pérdida de estructura cuaternaria y el deterioro de las interacciones que contribuyen a la estabilidad de la terciaria.

En la reactivación vemos que esta enzima es capaz de revertir los efectos de la urea en un 100%. Es decir, los cambios provocados por la urea son, en lo que a actividad se refiere, completamente reversibles en todas las muestras, de tal forma que la dilución del desnaturalizante en cada una de las concentraciones utilizadas da como resultado una actividad comparable con la de la enzima nativa (Fig. 10 B). Este fenómeno se relaciona y sustenta muy bien con las observaciones de reversibilidad anteriormente reportadas (Pauly y Pfeleiderer, 1977).

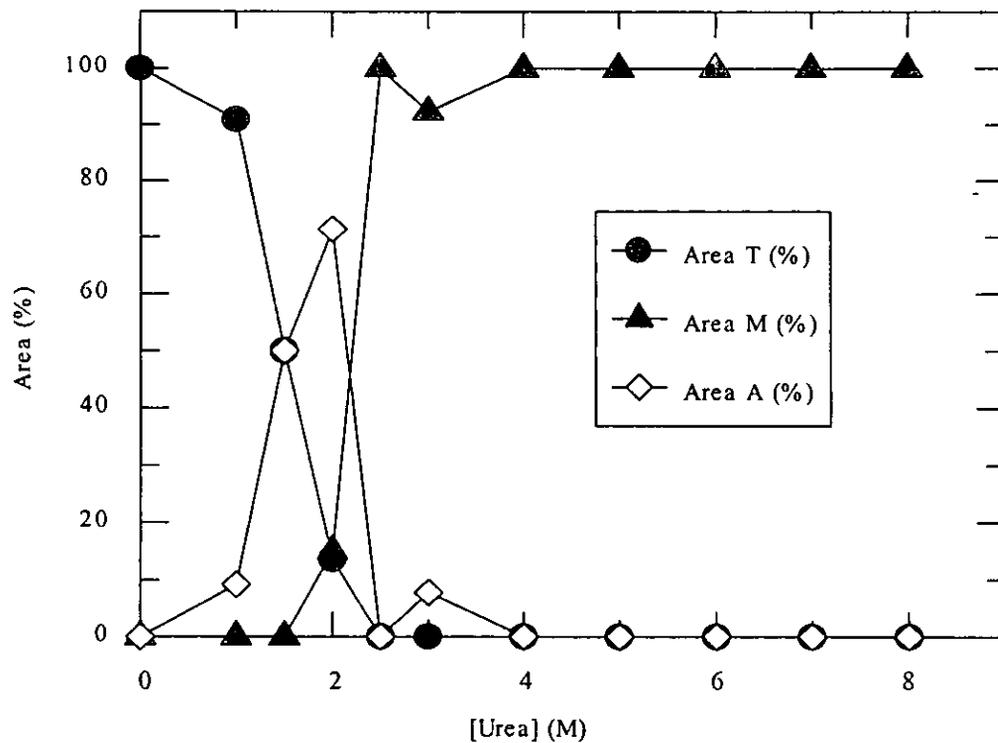
*Cromatografía de exclusión molecular.* Los perfiles de elución de la GDH nativa y en presencia de urea se muestran en la figura 11. Como puede verse, la enzima en condiciones nativas (0 M de urea) eluye en un sólo pico cromatográfico simétrico cuyo volumen corresponde a un radio de Stokes de 4.45 nm, por lo que consideraremos este valor como referencia a los cambios vistos con las otras muestras. La presencia de urea (Figs. 11 y 12) en concentraciones relativamente bajas provoca la aparición de un segundo pico que eluye en el



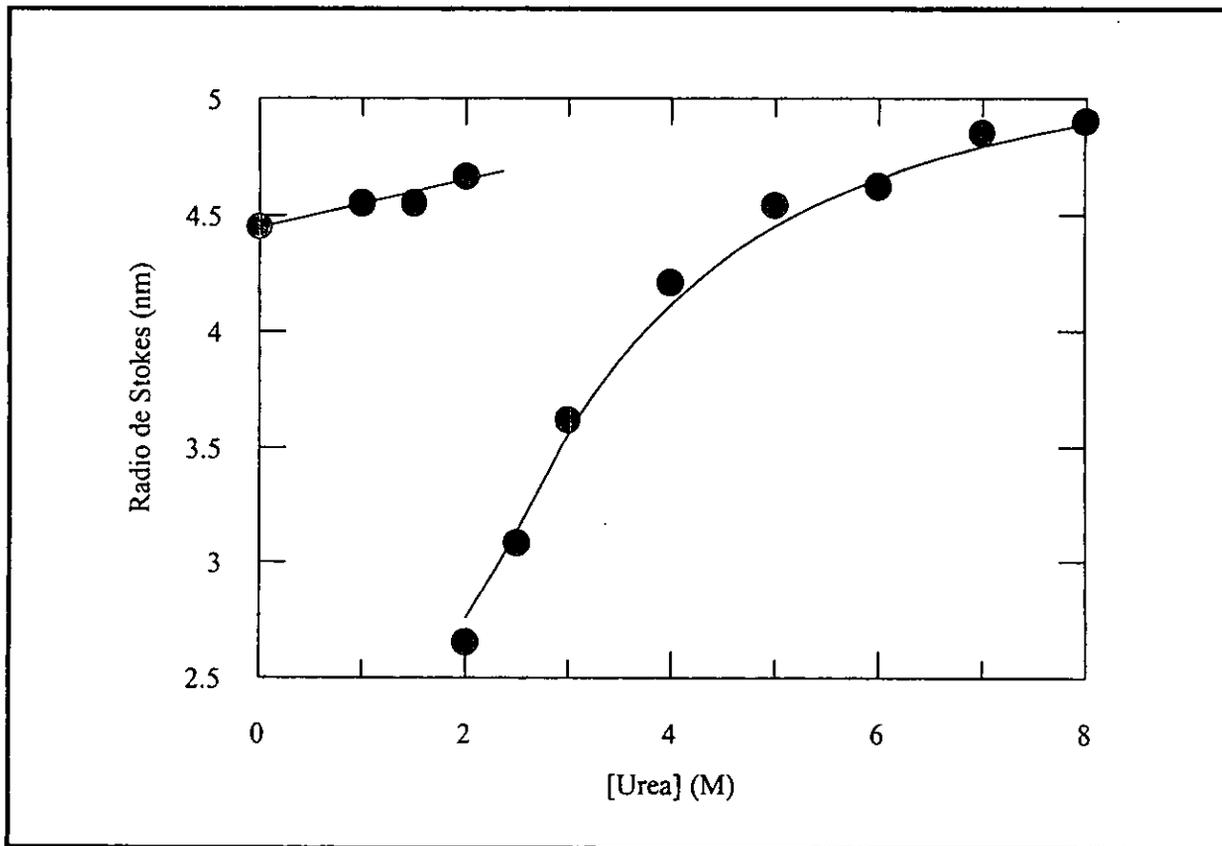
**Figura 10.** Actividad relativa de la GDH con diferentes concentraciones de urea. A) Desnaturalización de la enzima como se indica en "Materiales y métodos" y B) la reactivación por dilución de la urea de la muestra desnaturalizada en 8 M.



**Figura 11.** Perfiles de elución obtenidos en las concentraciones de urea indicadas al margen izquierdo. El flujo de las corridas fue de 1ml/min y en cada corrida se preequilibró la columna con la concentración de urea necesaria; la GDH se preincubó en urea como se indica en "Material y métodos".



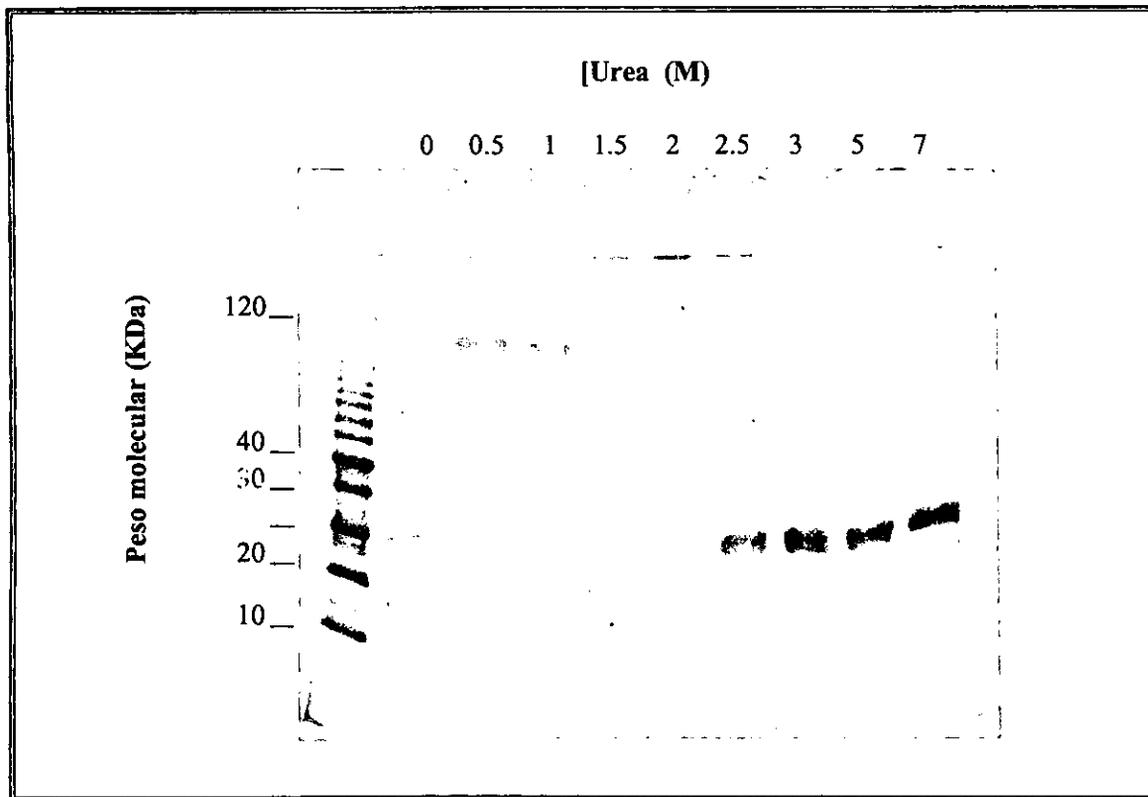
**Figura 12.** Distribución de los picos hallados durante la cromatografía de filtración molecular. El área T(●) representa a la porción de moléculas que se encuentra en forma tetramérica y activa, A (◇) y M(▲) representan las porciones de enzima agregada y en forma monomérica respectivamente.



**Figura 13.** Efectos sobre el radio de Stokes ( $R_s$ ) de la GDH con respecto a las concentraciones de urea utilizadas. Para estos experimentos se calibró la columna de cromatografía con proteínas de  $R_s$  bien conocidos. En 2 M se obtienen dos picos que pueden ser medidos, de ellos, el de menor  $R_s$  es el que permanece, aunque aumenta su radio con concentraciones crecientes del desnaturalizante.

volumen muerto de la columna. En 1.5 M de urea la proporción entre ambos picos cambia de tal forma que en este intervalo de concentraciones el pico en el volumen muerto es notoriamente mayor. La medida del radio de Stokes de este componente no se puede obtener, ya que eluye en el volumen muerto de la columna y queda fuera de su resolución, sin embargo podemos decir que por sus características se trata de una especie molecular muy grande. En el primer pico que se obtuvo, y al que se puede relacionar con la enzima nativa o tetramérica, el único cambio que notamos es un decremento en el volumen de elución y por lo tanto un aumento del radio de Stokes (Fig. 13), un comportamiento similar al de una molécula de mayores proporciones, aspecto este que se puede relacionar con un efecto de expansión de la GDH en este intervalo de concentraciones. En 2 M, el pico de la GDH tetramérica desaparece casi por completo, y aparece un tercero cuyo  $R_s$  es de 2.65 nm; sin embargo, el pico en el volumen muerto está en su máximo, cabe destacar además que este pico es asimétrico lo que nos habla de la coexistencia de varias especies moleculares. A partir de 2.5 M, y hasta 8 M, sólo se encuentra el tercer pico cromatográfico correspondiente a la última especie en aparecer (Fig. 12). Sin embargo, a concentraciones altas de desnaturizante el volumen de elución de esta última cambia hacia medidas con mayor  $R_s$ , es decir la proteína se comporta como si fuera haciéndose cada vez más grande (Fig.13).

*Entrecruzamiento con glutaraldehído.* Estos experimentos nos ayudaron a identificar el estado polimérico de las especies separadas por la cromatografía. La figura 14 nos muestra los geles de electroforesis obtenidos en estos experimentos. En esta figura vemos que la GDH sin entrecruzar migra como un monómero (por la presencia del SDS) con una masa molecular de aproximadamente 30 kDa. Cuando la enzima es entrecruzada en presencia de urea, hallamos que a bajas concentraciones, la GDH se entrecruza principalmente en forma tetramérica, sin embargo, se puede ver que hay una banda de proteína que no ingresa a la resolución del gel, lo que habla de que existen conformeros de alto peso molecular, o proteína que probablemente se encuentra agregada. La intensidad de las bandas correspondientes a las fracciones de la proteína agregada y tetramérica cambia con relación a la concentración del desnaturizante durante este intervalo de concentraciones relativamente bajas, de tal manera que hacia 2 M es más intensa la fracción de GDH agregada que la tetramérica. En 2 M de urea, la proteína se encuentra totalmente agregada y a concentraciones mayores a 2.5 M las especies multiméricas o agregados comienzan a desaparecer, mientras aparece una banda que

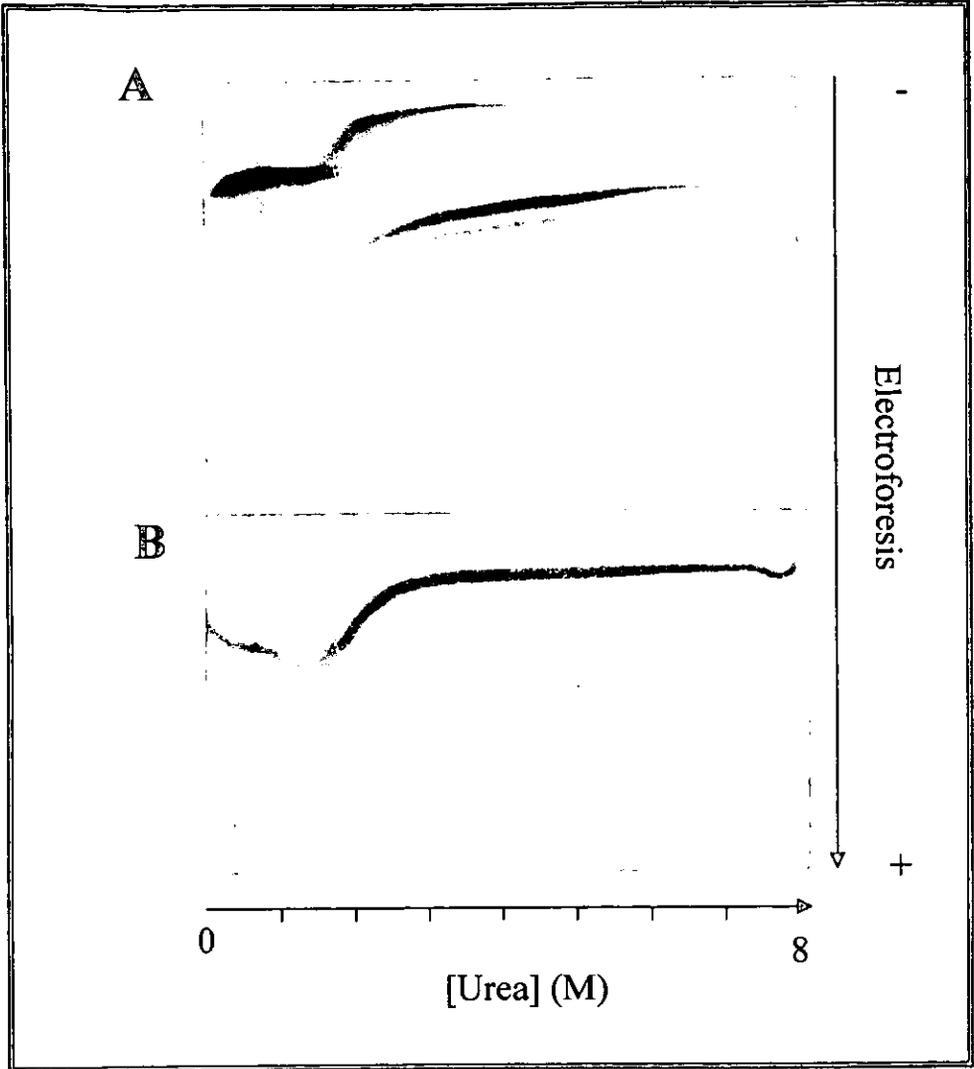


**Figura 14.** Electroforesis en presencia de SDS del entrecruzamiento covalente con glutaraldehído de la GDH. En cada experimento se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de enzima entrecruzada y las concentraciones de urea indicadas en la parte superior. 0 es la enzima sin entrecruzar y sin urea. A concentraciones bajas de desnaturalizante la GDH se entrecruza principalmente como tetramero y agregados. En concentraciones mayores sólo se registra una banda con la movilidad del monómero de la GDH.

por su movilidad y peso se puede relacionar directamente con el monómero de la GDH en diferentes fases de desnaturalización. Cabe mencionar que en 8 M esta es la única especie que se resuelve claramente en estos geles.

*Electroforesis en geles transversos de urea.* Con esta técnica es posible identificar diferentes intermediarios de desnaturalización. En este caso se obtiene un patrón de desnaturalización complejo. Lo primero que encontramos cuando la electroforesis se hace a partir de una muestra de proteína nativa (Fig. 15 a), es que la GDH no sigue un modelo de desnaturalización de dos estados, sino al contrario, pasa por varios estados (al menos tres) que se interconvierten y desnaturalizan con diferentes velocidades. En particular, cuando se aplica la GDH nativa, se obtienen dos bandas paralelas al gradiente de urea; entre ambas hay una transición caracterizada por una zona difusa en un intervalo corto de concentraciones de urea (alrededor de 2 M). La banda superior muestra tres movilidades electroforéticas distintas a lo largo del gradiente de urea: La primera, a bajas concentraciones del desnaturalizante (0- ≈2 M), muestra una movilidad como la de la enzima tetramérica. La segunda se caracteriza por una inflexión que es causada por la coexistencia de varias especies con menor movilidad y las últimas especies, representadas por la última fase de movilidad, son detectadas a concentraciones relativamente altas de urea (arriba de 3.5 M). El comportamiento de la otra banda encontrada, a bajas concentraciones de desnaturalizante, se identifica como una banda difusa con una movilidad semejante a la de la subunidad de la enzima. A mayores concentraciones de urea (arriba de 2.5 M), el gel sólo muestra una banda bien definida con menor movilidad electroforética. Estas especies se mueven más rápido que el tetrámero nativo y seguramente se trata del monómero en desnaturalización.

Cuando en este experimento se parte de una muestra de enzima previamente desnaturalizada (incubada en 8 M de urea), se ve que hay una banda predominante que persiste a todo lo largo del gradiente de urea (fig. 15 b); a pesar de esto, es posible ver también una pequeña banda en la parte superior del gel entre 1.5 y 3 M de urea, correspondiente a oligómeros de alto peso molecular y baja movilidad electroforética. Incluso se puede hablar de una interconversión rápida entre estas dos bandas como se revela por la zona difusa entre ambas. La banda predominante muestra también tres movilidades distintas, con mayor movilidad a bajas concentraciones de desnaturalizante y menor a altas concentraciones, y una transición que une a ambas alrededor de 2.5 M. De estos resultados podemos afirmar que el



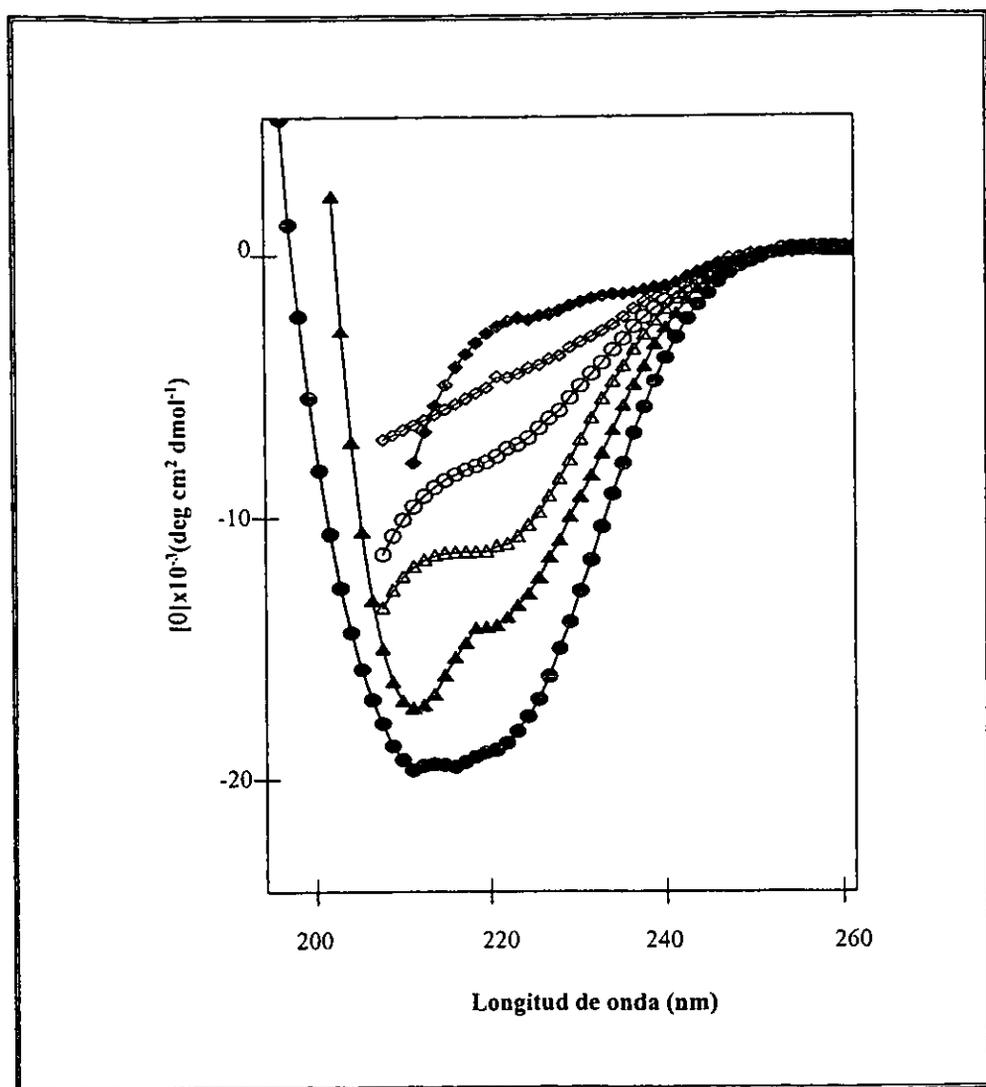
**Figura 15.** Electroforesis en geles transversos de urea. Para cada experimento se utilizaron 50  $\mu\text{g}$  de proteina en condiciones nativas (A), o desnaturizada en 8 M de urea (B). La corrida de los geles fue de 4 hrs. a 100 v .

proceso de renaturalización es igual al de desnaturalización ya que, para ambos se pueden determinar las mismas etapas. Cabe destacar que dentro de las especies detectadas en esta última parte no hay ninguna con las características de movilidad de la enzima nativa. Esto puede ser consecuencia de que el equilibrio monómero- tetrámero de la GDH se ve afectado por la electroforesis.

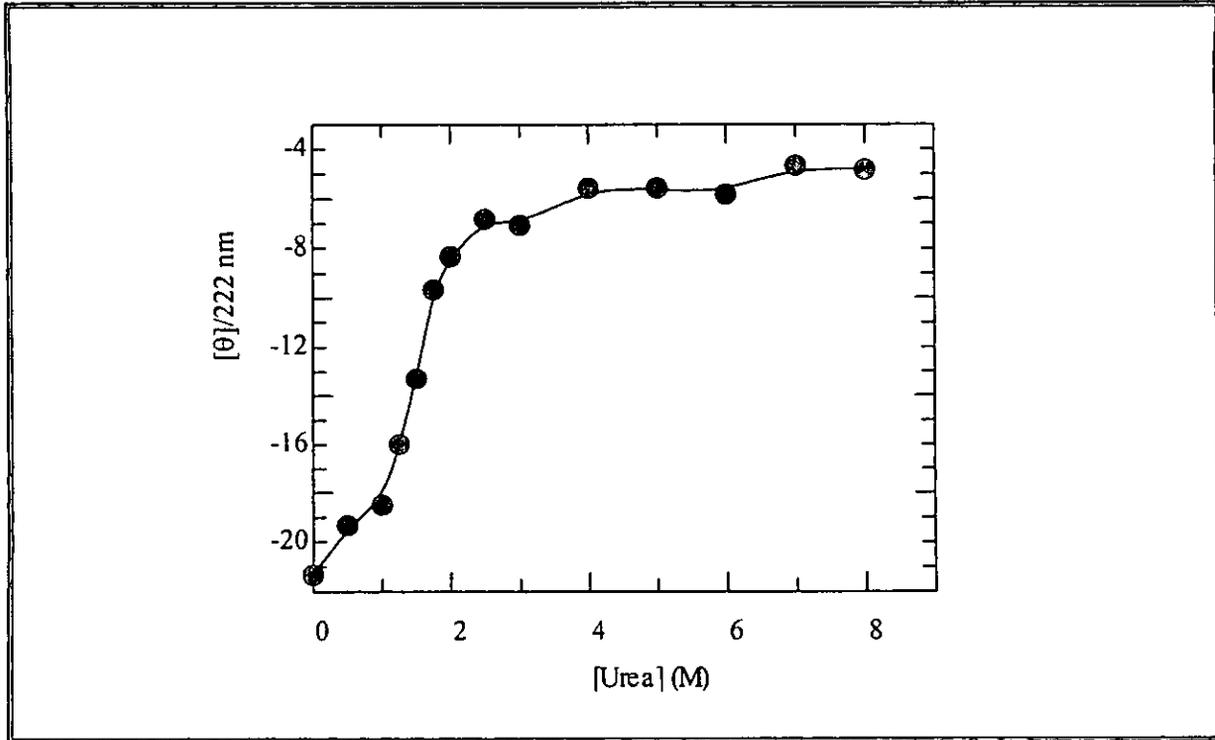
*Dicroísmo circular.* Con esta técnica se identificaron los cambios al nivel de estructura secundaria durante la desnaturalización con urea. Los espectros obtenidos de la enzima nativa o desnaturalizada en el UV lejano (fig. 16), muestran varias diferencias. La GDH nativa muestra un espectro típico de una proteína  $\alpha/\beta$ , caracterizado por una meseta que une a dos mínimos negativos de magnitud semejante en 210 y 222 nm. En presencia de urea, y particularmente entre 0.75 y 1.2 M la relación de la magnitud de estos mínimos cambia de tal forma que el pico hallado en 210, cambia su ubicación a 213 y la proporción entre ambos cambia, esta diferencia alcanza su máximo en 1 M de urea (espectro no mostrado).

A concentraciones altas de urea, los espectros obtenidos son deficientes debido al efecto de este agente. Sin embargo, en estas condiciones la enzima parece perder su estructura secundaria, como puede verse en el análisis del cambio en la elipticidad en 222 nm (Fig.17), que nos muestra que las diferencias halladas se mueven de manera drástica hacia valores más positivos en una sola transición que va de 1 a 1.75 M de urea. Esto es un reflejo de la pérdida de la elipticidad y por lo tanto de estructura secundaria. Los cambios encontrados a mayores concentraciones de urea, hacia 8 M, son mucho más atenuados, en gran parte debidos al mismo agente.

*Fluorescencia de la GDH.* Con este método es posible inferir los cambios conformacionales de la GDH al nivel de estructura terciaria. En este caso se analizaron los cambios en la intensidad de emisión y el cambio en la longitud de onda de máxima emisión durante la desnaturalización con urea. Como se puede ver en la figura 18, se encontró que en el estado nativo el máximo de emisión de esta proteína se encuentra en 340 nm. Desnaturalizada en presencia de 8M urea, el máximo de emisión se mueve 20 nm hacia las longitudes de onda del rojo, hasta llegar a 360 nm. La desnaturalización provoca además cambios en la intensidad de emisión (Fig.19) A bajas concentraciones de urea (0.25-1 M) hay un incremento gradual en la intensidad de fluorescencia con un cambio parcial en la longitud de onda de emisión. En



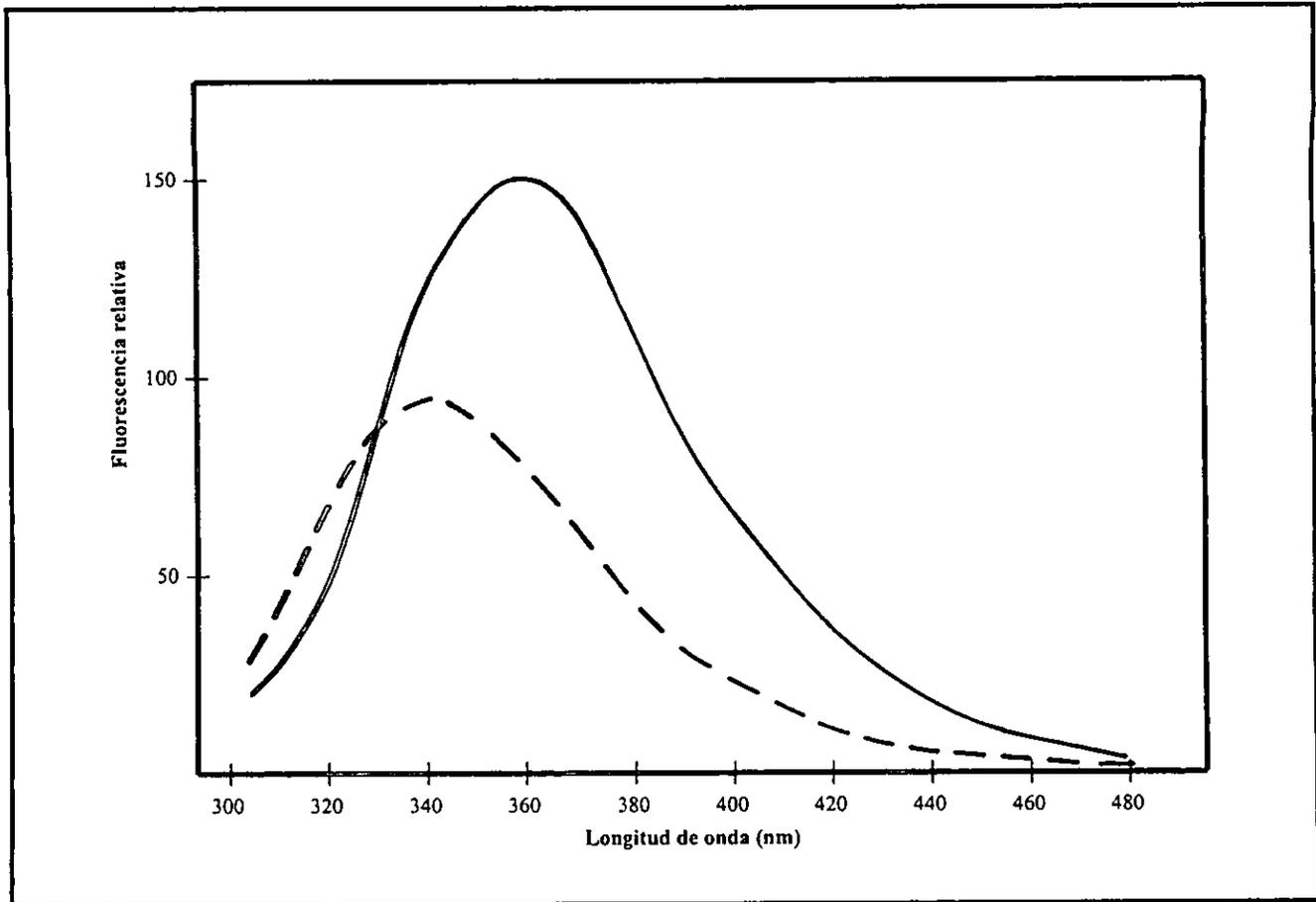
**Figura 16.** Espectros de dicroísmo circular en el uv lejano. La GDH nativa (●) muestra el espectro típico de una proteína  $\alpha/\beta$ . Los espectros obtenidos se modifican en presencia de diferentes concentraciones de urea, (▲) 1.2 M, (△) 1.5 M, (○) 1.75 M, (◇) 3 M y (◆) 8 M.



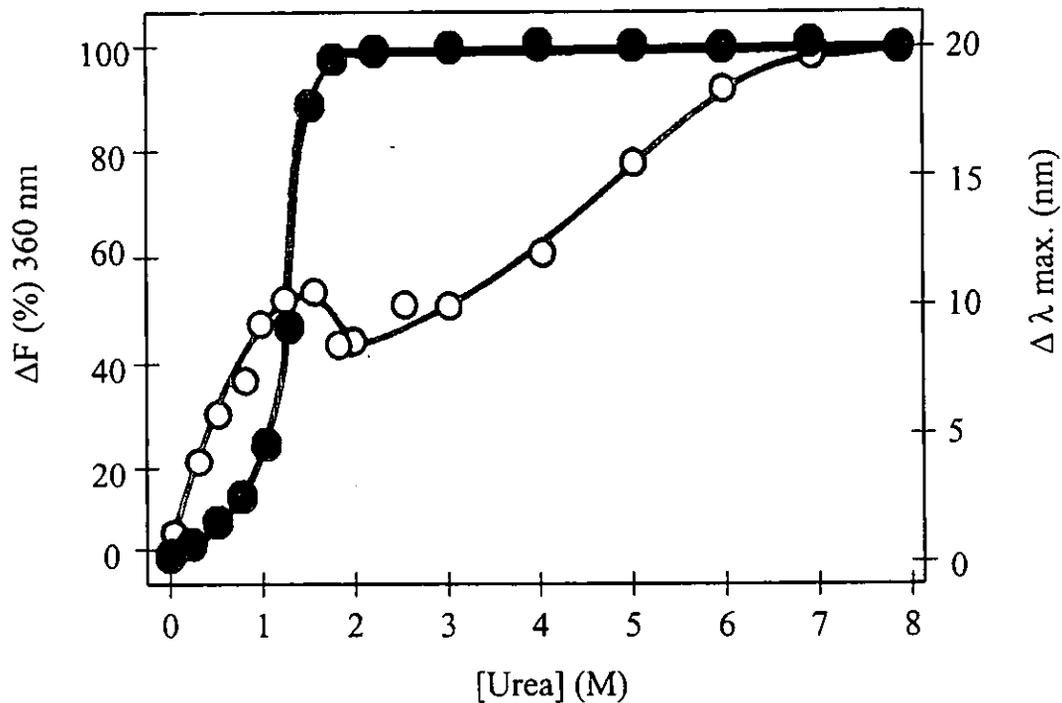
**Figura 17.** Elipticidad de la GDH durante la desnaturalización con urea. La incubación con urea provoca la pérdida de elipticidad, decremento que es visible por los registros obtenidos en 222 nm.

mayores concentraciones de urea ( $> 1$  M) hay un ligero decremento en la intensidad que termina alrededor de 2 M y un cambio total a las longitudes de onda del rojo (a 260 nm) en la emisión. A concentraciones superiores de estos valores hay cambios adicionales en el medio circundante de los triptofanos y por lo tanto en la estructura terciaria de la GDH, visibles por un nuevo incremento, esta vez gradual, que termina hacia 8 M de urea.

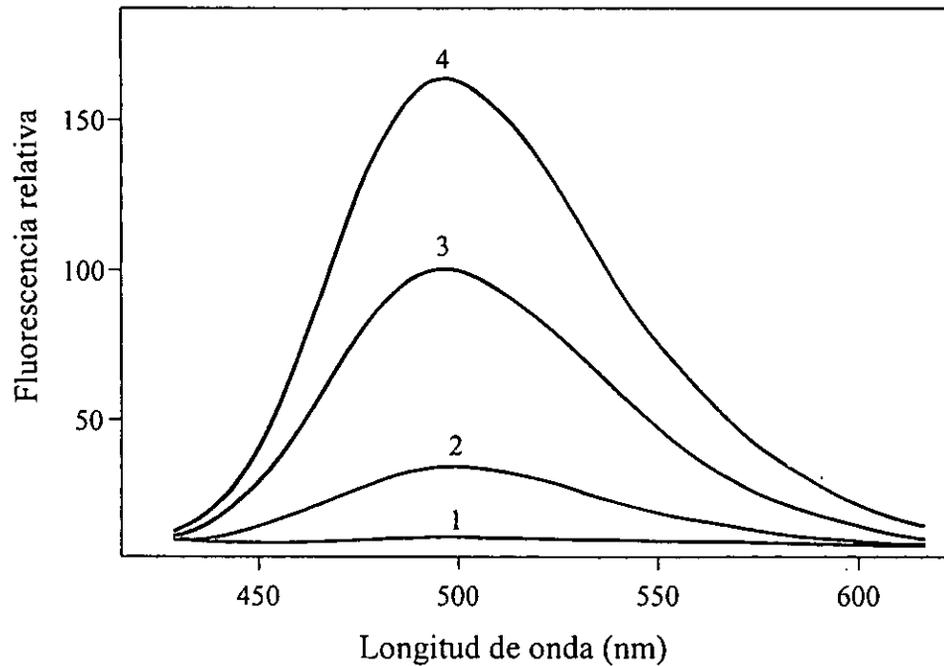
*Unión del bis-ANS a la GDH.* El bis-ANS se utiliza frecuentemente como prueba de cambios conformacionales en las proteínas, mediante la localización y distribución de zonas apolares o área hidrofóbica. Esto se debe a que es capaz de unirse a estas zonas y emitir una señal de fluorescencia, por lo que además, con este compuesto, se pueden identificar intermediarios en la ruta de plegamiento. Para esta proteína vemos que en condiciones nativas hay área hidrofóbica expuesta, ya que el complejo de bis-ANS con la enzima muestra señal de fluorescencia; el bis-ANS aislado (disuelto únicamente en amortiguador) no presenta fluorescencia (Fig. 20). La longitud de onda de máxima emisión de este complejo se encuentra en 500 nm. Cuando la urea se encuentra presente, la emisión de este complejo cambia y se refleja principalmente por cambios de intensidad. Este fenómeno se caracteriza por un incremento en la emisión que alcanza su máximo a bajas concentraciones de desnaturizante, específicamente en 0.25 M; a mayores concentraciones la intensidad de fluorescencia comienza a decaer más lentamente (fig. 21) hasta que en 3 M de urea aproximadamente, se pierde la señal de fluorescencia. Este decremento es un reflejo directo de la pérdida de estructura en estas concentraciones, ya que el bis-ANS sólo fluoresce cuando se encuentra unido a sitios hidrofóbicos bien estructurados.



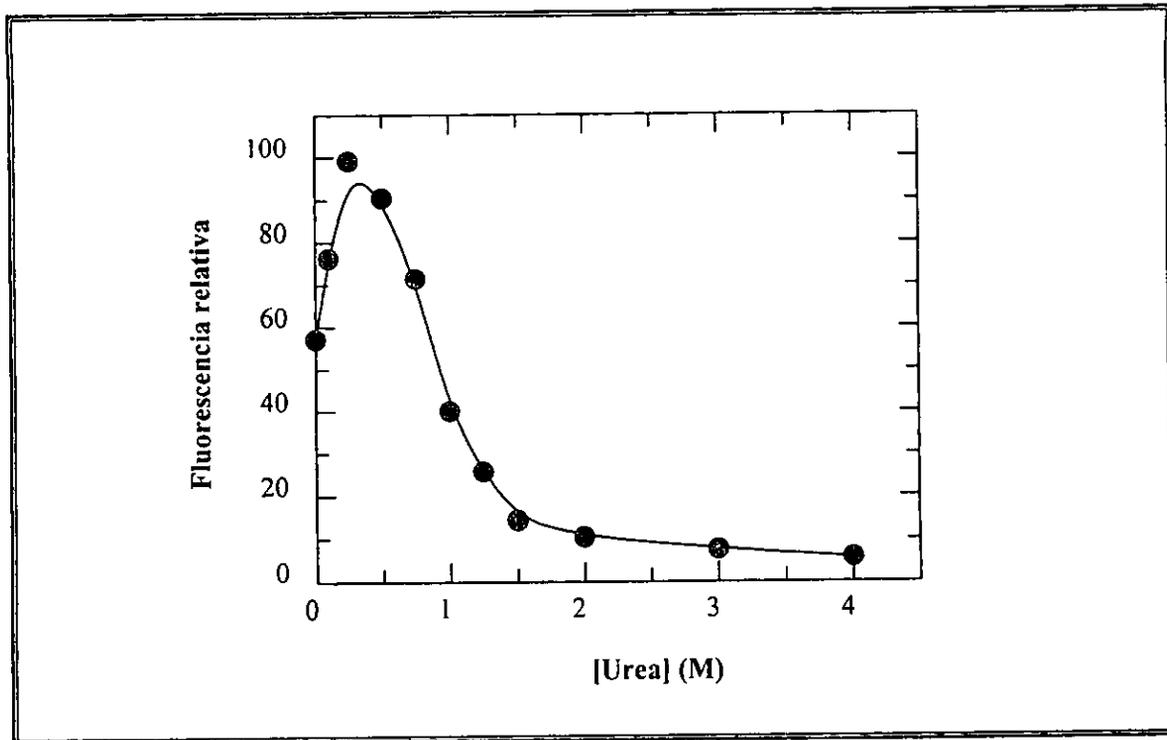
**Figura 18.** Espectros de emisión de la GDH en condiciones nativas (línea punteada) y desnaturalizada en 8 M de urea (línea continua). Las muestras se excitaron a 295 nm y la emisión se registró de 300 a 540 nm. La presencia de esta concentración (8 M) de urea desplaza el pico de máxima de emisión 20 nm hacia el rojo.



**Figura 19.** La desnaturalización de la GDH con urea provoca cambios en los perfiles de fluorescencia intrínseca. En la intensidad de emisión hay un cambio en dos fases (O) y en la longitud de onda de máxima emisión un corrimiento hacia el rojo (●).



**Figura 20.** Efectos de la urea sobre la emisión de la fluorescencia del complejo GDH-bis-ANS. Para estos experimentos se excitó cada muestra a 380 nm. Cuando no existe el complejo no hay señal de emisión (1). El complejo GDH-bis-ANS sin urea (3) es capaz de emitir fluorescencia. Con 0.25 M de urea (4) la señal de emisión alcanza su máximo registro de intensidad. Con concentraciones mayores de desnaturalizante el complejo pierde intensidad (2).



**Figura 21.** Emisión del complejo GDH-bis-ANS a 500 nm en presencia de diferentes concentraciones de urea. La presencia de este desnaturalizante provoca un aumento en la intensidad de este complejo que alcanza su máximo en 0.25 M. A concentraciones mayores la intensidad de emisión comienza a decaer.

## Discusión.

Los resultados de nuestros experimentos aportan la información necesaria para construir un modelo de desnaturalización de la GDH. Como es de esperarse en una proteína oligomérica, el patrón que sugerimos es bastante complejo. Esto no es extraño, ya que la desnaturalización de proteínas con agentes desnaturalizantes (como la urea), a pesar de ser un recurso ampliamente utilizado en la investigación de proteínas, es diferente con respecto a la organización de la proteína, pues, la naturaleza polimérica de la proteína puede afectar en gran medida al proceso, principalmente por los procesos colaterales que están involucrados (por ejemplo, el reconocimiento entre subunidades, la existencia de intermediarios, etc.).

En el caso de proteínas oligoméricas, la desnaturalización se describe convencionalmente como una sucesión de etapas, donde primero ocurre la inactivación, luego la disociación y finalmente la desnaturalización de las subunidades (Jaenicke, 1994; Le Bras *et al.*, 1989; Findlay y MacKenzie, 1987). En estos sistemas, los datos obtenidos se pueden ajustar y analizar con un modelo de desnaturalización de dos estados, como en el caso de proteínas monoméricas, para obtener las constantes termodinámicas del proceso (Santoro y Bolen, 1988; Neet y Timm, 1994), sin embargo, frecuentemente, este tipo de análisis se complica.

En el caso de la GDH, a pesar de que este proceso concluye con la desnaturalización de las subunidades separadas y tiene un carácter completamente reversible, toma lugar en varias etapas y no muestra una conducta de dos estados, lo que definitivamente limita y dificulta su análisis termodinámico. En general, se puede ver que durante la desnaturalización, esta proteína pasa primero por un estado de agregación que posteriormente se revierte para dar paso a la disociación de las subunidades, mismas que al final se convierten en monómeros totalmente desnaturalizados. A primera vista notamos que este modelo difiere de lo convencional en tanto que hay un evento de agregación anterior a la disociación de las subunidades. Los hechos que nos permiten argumentar lo anterior se basan en que, cuando la GDH se somete a bajas concentraciones de desnaturalizante, se pierde la actividad de la enzima (0.2 M) y los cambios detectados en las estructuras secundaria y terciaria se traslapan con la aparición de especies agregadas; estos eventos los podemos visualizar en los experimentos de filtración, donde estas formas eluyen como un pico asimétrico en el volumen muerto de la columna. En el entrecruzamiento con glutaraldehído se pueden identificar directamente estas especies con aquellas que no logran ingresar a los geles en la electroforesis,

lo que supone estructuras de alto peso molecular que se identifican como especies agregadas. Los espectros de dicroísmo circular (Fig. 16) merecen mención aparte, ya que en presencia de urea, muestran un comportamiento muy peculiar: cambio en la proporción de los picos mínimos (principalmente en 210 nm) de los espectros obtenidos, cuyo punto más extremo se da en 1M de urea; esta conducta es muy similar a la reportada para otras proteínas durante un evento de asociación (Johnson, 1990; Hennessey *et al.*, 1992), un hecho que de alguna manera acusa la agregación en la GDH. De la misma manera, la fluorescencia intrínseca de la GDH cambia parcialmente el máximo de emisión hacia longitudes de onda del rojo y alrededor del punto de máxima agregación (2 M) se ve una caída en la intensidad de emisión, probablemente debido a un fenómeno de apagamiento dado por la interacción entre los triptofanos o algún otro elemento de subunidades vecinas. Además de lo anterior, se puede añadir la evidencia obtenida de los geles transversos de urea, pues cuando la electroforesis se hace con GDH nativa, se puede ver claramente una transición entre las especies tetráméricas y otras con menor movilidad electroforética, es decir especies mucho más pesadas que podemos identificar con los agregados encontrados mediante las demás técnicas. Cabe destacar que todos estos fenómenos alcanzan su máximo alrededor de la misma concentración de desnaturante, esto es alrededor de 2 M de urea.

Es importante mencionar que en este intervalo de concentraciones (concentraciones bajas de urea) encontramos además otros aspectos interesantes en la conducta de desnaturación de esta enzima. En nuestros experimentos con bis-ANS observamos que, en condiciones nativas la enzima puede unirse a esta sonda fluorescente y emitir una señal que se puede registrar claramente (Fig. 20), un hecho que nos señala que en tales condiciones, la conformación de la GDH expone área hidrofóbica. La presencia de urea provoca un incremento importante en la intensidad de fluorescencia del complejo GDH-bis-ANS, que alcanza su máximo en 0.25M (Fig. 21); a partir de entonces la intensidad comienza a decaer, este fenómeno aunado a que, en el mismo intervalo, por filtración molecular se detecta un incremento en el  $R_s$  correspondiente al pico de la enzima tetramérica (Figs. 11 y 13) - es decir una ligera expansión de la estructura nativa - nos permite identificar a un intermedio de plegamiento cuyas características son parecidas a las de un glóbulo fundido; sin embargo no lo es, pues, en este caso habría que hacer algunas consideraciones; entre ambos intermedios hay diferencias que deben de ser contempladas. El glóbulo fundido es un intermedio con estructura secundaria similar a la de la enzima nativa, aunque con cierta pérdida de la estructura

terciaria, lo que deriva en una mayor exposición de sitios hidrofóbicos (y un incremento en la unión con el bis-ANS) y, por lo tanto, un comportamiento "adherente" con cierta tendencia a agregarse de acuerdo al grado de exposición de grupos no polares al solvente; además, este estado es condensado, con un radio de Stokes similar o un poco mayor (alrededor de 15%) al de la enzima nativa y generalmente inactivo (Christensen y Pain, 1994). El intermediario que hallamos en la desnaturalización de la GDH, a pesar de su semejanza con un glóbulo fundido, viola las dos últimas reglas que mencionamos, pues posee la peculiaridad de ser funcional - en estas concentraciones de urea ( $\approx 0.25$  M) la GDH es tetramérica y activa al 100% (Fig. 10) - y los glóbulos fundidos son típicamente inactivos. Además, debemos considerar que el incremento del radio de Stokes está por debajo del límite inferior reportado para los glóbulos fundidos (10-20%); finalmente, el incremento en la intensidad de la fluorescencia con bis-ANS no es tan espectacular como podría esperarse en un glóbulo fundido. De esta manera, si bien podemos encontrar algunas características comunes entre ambos estados, creemos que los datos se ajustan más convenientemente a otro tipo de intermediario, sobretodo, teniendo en cuenta que en condiciones nativas la GDH expone área hidrofóbica (Fig. 20) y que la presencia de urea ocasiona que en ciertas regiones de la cadena polipeptídica ocurran rearrreglos conformacionales, que le llevan a una mayor exposición de superficie hidrofóbica y al consabido aumento en la intensidad de emisión del complejo formado con el bis-ANS.

En el esquema de desnaturalización que sugerimos, encontramos que, la siguiente fase, dada en concentraciones mayores de 2 M de urea, se puede identificar con otros eventos relevantes en la desnaturalización de la GDH. Es en esta etapa donde se alcanza el estado completamente desnaturalizado y donde además ocurre la disociación de las subunidades de la enzima. De nuevo, la evidencia se basa en los siguientes hechos: en el dicroísmo circular podemos ver un decremento gradual en la amplitud de la elipticidad negativa, un indicio de pérdida de la estructura secundaria; en los experimentos con fluorescencia se da el incremento en la señal de emisión y el cambio total a las longitudes de onda del rojo, además de que las especies obtenidas en 8 M de urea muestran un  $R_s$  de 4.9 nm, mayor que el obtenido para la enzima nativa (4.45 nm).

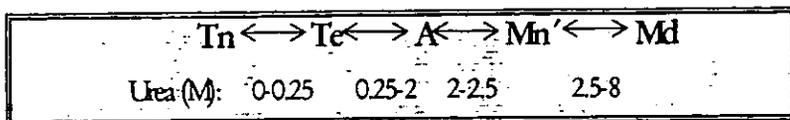
Para abordar el análisis de esta parte trataremos por separado los eventos que ocurren entre 2 y 2.5 M y el que ocurre a partir de estas concentraciones hasta 8 M. En la primera parte se observa que la enzima pasa por un sólo evento de disociación, que en su caso va del tetrámero a las subunidades correspondientes, sin pasar por un estado de asociación superior

(como dímeros o trímeros). La evidencia para esta afirmación viene dada por los experimentos de filtración molecular, donde puede apreciarse que en 2.5 M de urea aparece un pico con un  $R_s$  de 2.55 nm, que, como queda comprobado en los experimentos de entrecruzamiento con glutaraldehído, corresponde al monómero, pues es claro en estos que a estas concentraciones, la única especie existente se identifica con el monómero de la enzima sin urea (Fig.14), ya que tienen la misma movilidad y peso; en los geles transversos de urea, partiendo de GDH nativa, se le puede asociar directamente con la banda que aparece entre 2-2.5 M de urea, pues, como hemos visto de la evidencia anterior, es la única especie que se encuentra a concentraciones altas de desnaturizante. En estos geles transversos vemos además que, la banda relacionada con la enzima tetramérica pasa por una transición a especies con menor movilidad electroforética, característica del estado agregado; la banda correspondiente a este estado desaparece conforme se vuelve más nítida e intensa la banda del monómero, de tal manera que a altas concentraciones del desnaturizante sólo se encuentra esta última. El hecho de que entre las bandas halladas encontremos siempre una zona difusa, evidencia un fenómeno de interconversión entre las especies que coexisten en la transición. Por todo lo anterior podemos decir que el fenómeno de agregación es revertido por la disociación de las subunidades de la enzima, que tras este evento se encuentran parcialmente desnaturizadas.

En la parte final de nuestro esquema de desnaturización para la GDH, los monómeros son inducidos a la desnaturización total. Las subunidades que son producto de la disociación deben de encontrarse parcialmente desnaturizadas en 2.5 M de urea ya que, los espectros de dicroísmo circular muestran que la GDH ya ha perdido mucho de su estructura secundaria en este punto y todavía hay un incremento considerable en el  $R_s$  por arriba de esta concentración. De esta manera, en concentraciones altas de urea sólo es posible hallar al monómero en distintas fases de desnaturización, que alcanza su máximo en 8 M de urea (la

concentración más alta usada en este trabajo); esto se puede ver claramente en el incremento gradual del  $R_s$  - que alcanza la medida de 4.9 nm -, el aumento en la intensidad de fluorescencia y los cambios en los espectros de dicroísmo circular ya mencionados.

Todo anterior puede resumirse en un esquema de desnaturización donde los eventos mencionados, agregación, disociación y desnaturización, quedan relacionados con los estados conformacionales de la GDH, de la siguiente manera:



Donde las letras se asocian con los distintos estados conformacionales hallados: Tn se refiere a la GDH en condiciones nativas, Te es un intermediario de plegamiento con características similares a las de un glóbulo fundido, A es la enzima agregada, Mn' es el monómero de la GDH que se obtiene después de la disociación de los agregados y se encuentra parcialmente desnaturalizada, y Md representa al monómero de la enzima completamente desnaturalizado. Debajo de cada una de estas etapas se señalan los intervalos de concentración de urea donde se dan los equilibrios.

A pesar del hecho de que esta proteína muestra un patrón completamente reversible el análisis típico de dos estados no se puede aplicar, pues es claro que la GDH pasa por al menos cuatro estados conformacionales bien definidos (enzima nativa, intermediario con mayor área hidrofóbica expuesta, enzima agregada y enzima desnaturalizada), aspecto, este, que dificulta su análisis termodinámico. Sin embargo, es posible obtener una evaluación aproximada de la energía intrínseca de la proteína con los experimentos de electroforesis en geles transversos de urea, donde en el experimento que trata con la GDH en renaturalización (Fig. 15 B), cuando se parte de enzima previamente desnaturalizada, se obtiene un patrón semejante al de dos estados; esto si se ignora la presencia de los agregados y se aprovecha el efecto sobre el equilibrio (que tiene la electroforesis) entre la forma tetramérica y los monómeros, de tal manera que es posible ver una sola transición entre el monómero nativo y el desnaturalizado, a partir de la cual se puede obtener el valor tentativo de estabilidad intrínseca del monómero. El valor que se obtiene de hacer esto es  $\Delta G^\circ = -4.93 \text{ KJ mol}^{-1}$ , este valor está muy cercano al reportado para otras enzimas monoméricas y oligoméricas; aunque, repetimos, este valor es muy relativo y debe mirarse con cierto sesgo.

Este esquema de desnaturalización que planteamos muestra algunas semejanzas con el correspondiente de la 17 $\beta$ -HSD (Mendoza y Rendón, 1996). Una de las similitudes esenciales es que en ambas proteínas existe un estado de agregación previo a la disociación y desnaturalización de sus respectivas subunidades. En cuanto a esto es importante mencionar que la agregación se considera como un fenómeno asociado principalmente con proteínas

oligoméricas, debido a que ciertas estructuras locales de los intermediarios formados en este proceso forman interacciones equivocadas con otras subunidades de tal modo que pueden actuar como trampas cinéticas, lo que eventualmente lleva a la agregación irreversible. Sin embargo, recientemente se ha encontrado una fase de agregación transitoria durante la desnaturalización de la fosfoglicerato cinasa, una enzima monomérica (Pecorari et al., 1996) Este hecho, aunado a lo hallado en nuestros estudios, podría argumentar a favor de una fase de agregación transitoria en la conducta de desnaturalización de algunas proteínas.

A pesar de que ambas proteínas, la GDH y la 17 $\beta$ -HSD, pasan por la agregación, la naturaleza de ésta es diferente en ambos sistemas, ya que mientras en la GDH ésta es transitoria y reversible, en la 17 $\beta$ -HSD es completamente irreversible. Cabe mencionar al respecto, que la 17 $\beta$ -HSD es el único miembro de esta familia que viola la regla de longitud de cadena característica de los miembros de esta familia, ya que excede el tamaño promedio (250-300) por unos 30 aminoácidos, con 327 residuos (Burns et al., 1972), esto podría favorecer el reconocimiento erróneo entre subunidades vecinas y por lo tanto influir considerablemente en la irreversibilidad exhibida en este sistema.

Hay otras características estructurales que relacionan a estas proteínas, por ejemplo, ambas proteínas son capaces de unir ANS en condiciones nativas; es decir, en estas condiciones presentan área hidrofóbica expuesta, y es mediante la unión a esta sonda fluorescente que se puede identificar en ambos modelos un intermediario parecido a un glóbulo fundido (Semisotnov et al., 1991) oligomérico y activo a bajas concentraciones de urea. Es interesante notar que la presencia de un intermediario de este tipo puede estar involucrado también en la tendencia de estos a formar agregados (por la mayor área hidrofóbica expuesta), aunque para saber bien a bien el papel jugado por ellos en estos esquemas habría que especificar con certeza su contribución.

Por lo anterior no es difícil suponer que la similitud estructural entre los miembros de esta familia (SCAD) puede favorecer un comportamiento de desnaturalización similar al hallado en estas enzimas (GDH y 17 $\beta$ -HSD), donde, repetimos, hay una etapa de agregación anterior a la disociación en la desnaturalización y renaturalización con urea. Para esto, es necesario indagar más en la conducta de desnaturalización de otras enzimas relacionadas; el hecho de que no se conozcan ejemplares monoméricos dificulta un poco esta labor, ya que la agregación en un sistema monomérico sería una prueba contundente para un modelo que

involucrara a todos los miembros de esta familia, sin importar su nivel de organización, pues los sistemas que nosotros hemos estudiado han sido oligoméricos.

### CONCLUSIONES.

Como se puede apreciar de lo dicho anteriormente, esta proteína sigue un patrón de desnaturalización complejo caracterizado por varios estados, entre los que destacan: GDH nativa, un intermediario, GDH agregada y monómeros de la enzima desnaturalizados. Todos los cambios observados son reversibles y siguen el mismo patrón de desnaturalización y renaturalización, a pesar de lo cual, es difícil obtener las constantes termodinámicas del proceso dada la complejidad de los estados encontrados que incluyen a un intermediario y la fase de agregación. Este trabajo permite vislumbrar una conducta de desnaturalización por urea común en dos miembros de la familia alcohol deshidrogenasas de cadena corta (SCAD), pues los datos hallados marcan puntos equivalentes con la 17 $\beta$ -HSD. Obviamente para hacer estas propiedades extensivas a la familia se deben caracterizar las conductas de desnaturalización de otras proteínas miembros de la misma.

La agregación como etapa en el plegamiento de proteínas no es común, de hecho las proteínas que la presentan muestran esquemas de desnaturalización irreversibles y los agregados hallados son, en su mayoría, insolubles. El hecho de que se encuentren agregados solubles en el esquema de desnaturalización de dos proteínas emparentadas pone de manifiesto la similitud estructural entre los miembros de la familia y probablemente con otras proteínas que presenten motivos estructurales muy particulares.

- Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*. 181:223-229.
- Anfinsen, C. B. y H. A. Scheraga. 1975. Experimental and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Prot. Chem.* 29: 205- 300.
- Ansen, M. L., y A. E. Mirsky. 1925. *J. Physiol.* 60: 50-67.
- Braig, K. 1998. Chaperonins. *Curr. Op. Str. Biol.* 8: 159-165.
- Burns, D. J., Engel, L.L., y J. L. Bethune. 1972. Aminoacid composition and subunit structure. Human placental 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase. *Biochemistry.* 11: 2699-2703.
- Christensen, H., y Pain, R. H., 1994. The contribution of the molten globule model, en *Protein folding*, 55-79 p. IRL press. New York, USA.
- Creighton, T. E. 1979. Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea. *J. Mol. Biol.* 129: 235-264.
- Creighton, T. E. 1980. Kinetic study of protein unfolding and refolding using urea gradient electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 137: 61-80.
- Creighton, T. E. 1990. Protein folding. *Biochem. J.* 270: 1-16
- Creighton, T. E. 1994. *Proteins: Structures and molecular properties*. 2a ed. W. H. Freeman and company. New York . 287-303 p.
- Dill, K. A. 1991. Denaturated states of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 795-825.
- Dobson, C. M. y M., Karplus. 1999. The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr. Op. Str. Biol.* 9: 92-101.
- Eftink, M. R. 1995. Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins. *Methods in enzymology.* 259: 487-512.
- Findlay, W. A., y R. E. MacKenzie . 1987. Dissociation of the octameric bifunctional enzyme formiminotransferase-cyclodeaminase in urea. Isolation of two monofunctional dimers. *Biochemistry.* 26: 1948-1954.
- Goldberg, M.E. 1985. The second translation of the genetic message: protein folding and assembly. *TIBS.* 10:388-391.
- Goldenberg D. P., y T. E. Creighton. 1984. Gel electrophoresis studies in protein conformation and folding. *Anal Biochem.* 138: 1-18
- Goldenberg D. P. 1989. Analysis of protein conformation by gel electrophoresis, en

Protein structure, a practical approach. (Creighton T, E., ed), 225-250 p. IRL press, Oxford, UK.

Hennessey, J. P., Jhonson W. C., Bahler C., y H. G. Wood. 1992. Biochemistry. 21: 642-646.

Horowitz, P. M., y R. Xu. 1992. Acid pH-induced conformational changes in bovine liver rhodanase. J. Biol. Chem. 267: 19464-19469.

Jany K-D., Ulmer W., Fröschle, M., y G. Pfeleiderer. 1984. Complete amino acid sequence of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. FEBS Lett. 165: 6-10.

Jaenicke, R. 1986. Folding and association of proteins. Prog. Biophys. Molec. Biol. 59: 117-237.

Jaenicke, R. y R. Rudolph. 1986. Refolding and association of oligomeric proteins. Methods Enzymol. 131: 218-250

Jaenicke, R. 1991. Protein folding: local structures, domains, subunits, and assemblies. Biochemistry. 30: 3147-3161.

Jaenicke, R. 1994. Folding and association versus misfolding and aggregation of proteins. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 348: 97-105.

Johnson, W. C. 1990. Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide. Prot. Str. Func. Gen. 7: 205-214.

Kelly, S. M., y N. C. Price. 1997. The application of circular dichroism to studies of protein folding and unfolding: Biochim. Biophys. Acta. 1338: 161-185.

Krozowski, Z. 1992. 11 $\beta$ -Hidroxyesteroid dehidrogenase and the short-chain alcohol dehidrogenase (SCAD) superfamily. Mol. Cell: Endocrinol. 84: C25- C31

Krozowski Z. 1994. The short-chain alcohol dehidrogenase superfamily: Variations on a common theme. J. Steroid Biochem. Molec. Biol. 51: 125-130.

Kyte, J. 1995. Folding and assembly, en Structure in protein chemistry. 445-500 p. Garland. New York- London.

Le Bras, G., Teschner, W., Deville-bonne, D., y Garel J-R.. 1989 Urea-induced inactivation, dissociation, and unfolding of the allosteric phosphofruktokinase from *escherichia coli*. Biochemistry. 28:6836-6841.

Maurer E., y G. Pfeleiderer. 1985. Reversible pH-induced dissociation of glucose dehidrogenase from *Bacillus megaterium*. I. Conformational and functional changes. Biochim. Biophys. Acta. 827: 381- 388.

Maurer, E., y G. Pfeleiderer. 1987. Reversible pH- induced dissociation of glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. II. Kinetics and mechanism. Z. Naturforsch. 42c: 907-915.

Mendoza, H. G., y J. L. Rendón. 1996. Human placental estradiol 17 $\beta$ -dehydrogenase: structural and catalytic changes during urea denaturation. Biochim. Biophys. Acta. 1297: 219-227.

Neet, K. E., y D. E. Timm. 1994. Conformational stability of dimeric proteins: quantitative studies by equilibrium denaturation. Prot. Sci. 3: 2167-2174.

Pace, C. N., (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. Meth. Enzymol. 131:266-280.

Pace, C. N., Shirley, B. A., y J. A. Thomson. 1989. Measuring the conformational stability of protein, en Protein structure a: a practical approach. (Creighton T. E., ed.), p. 311-330. IRL press, Oxford, UK.

Pal G. P., Jany K-D., y W. Saenger. 1987. Crystallization of and X-ray investigations on glucose dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. Eur. J. Biochem. 167: 123-124.

Pauly H. E., y G. Pfeleiderer. 1977. Conformational and functional aspects of the reversible dissociation and denaturation of glucose dehydrogenase. Biochemistry. 16: 4599-4604.

Pecorari, F., Minard, P., Desmadril, y Yon, J. M. 1996. Occurrence of transient multimeric species during the refolding of a monomeric protein. J. Biol. Chem. 271:5270-5276.

Persson B., Krook, M., y H. Jörnvall. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. Eur. J. Biochem. 200: 537-543.

Ranson, N. A., White, H. E., y H. R. Saibil. 1998. Chaperonins. Biochem. J. 333: 233-242.

Ribas de Pouplana, Ll., Atrian S., González-Duarte, R., Fothergill-Gilmore L.A., Kelly S.M., y N. C. Price. 1991. Structural properties of long- and short-chain alcohol dehydrogenases. Biochem. J. 276: 433-438.

Santoro, M. M., y Bolen, D. W. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl  $\alpha$ -Chymotrypsin using different denaturants. Biochemistry. 27:8063-8068.

Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Rasgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas A.F.,

y Gilmanshin, R.I. 1991. Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers*. 31:119-128.

Shalongo, W., Heid, P., y E. Stellwagen. 1993. Kinetic analysis of the hydrodynamic transition accompanying protein folding using size exclusion chromatography. 1. Denaturant dependent baseline changes. *Biopolymers*. 33: 127-134.

Shirley, B. A. 1995. Urea and guanidine Hydrochloride denaturation curves. *Methods in molecular biol.* 40:177-190.

Soulages, J. L. 1998. Chemical denaturation: potential impact of undetected intermediates in the free unfolding and m-values obtained from a two-state assumption. *Biophys. J.* 75: 484-492.

Uversky, V. N. 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*. 32: 13288-13298.

Uversky, V. N., Winter S., y G. Löber. 1996. Use of fluorescence decay times of 8-ANS- protein complexes to study the conformational transitions in proteins which unfold through the molten globule state. *Biophys. Chem.* 60: 79-88.