

Tesis de Posgrado

Estudio del intercambio tiol/disulfuro en las proteínas: Caracterización y análisis de la Protein Disulfuro Isomerasa de colza (Brassica napus)

Heuck, Alejandro Pablo

1997

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Heuck, Alejandro Pablo. (1997). Estudio del intercambio tiol/disulfuro en las proteínas: Caracterización y análisis de la Protein Disulfuro Isomerasa de colza (Brassica napus). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2936_Heuck.pdf

Cita tipo Chicago:

Heuck, Alejandro Pablo. "Estudio del intercambio tiol/disulfuro en las proteínas: Caracterización y análisis de la Protein Disulfuro Isomerasa de colza (Brassica napus)". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1997.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2936_Heuck.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Instituto de Investigaciones Bioquímicas**

**Estudio del intercambio tiol/disulfuro en las proteínas.
Caracterización y análisis de la Protein Disulfuro Isomerasa de
colza (*Brassica napus*).**

Lic. Alejandro Pablo Heuck

Director: Prof. Dr. Ricardo Alejandro Wolosiuk

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires**

Agosto, 1997

203

lg

Agradecimientos

- Al consejo Directivo de la Fundación Campomar por haber permitido realizar mi trabajo de tesis en el Instituto y por haberme otorgado la beca postdoctoral para terminar dicho trabajo.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado las becas de "Iniciación" y "Perfeccionamiento".
- Al Dr. Ricardo A. Wolosiuk por todo el apoyo brindado para sacar las cosas adelante, por su cotidiana predisposición para analizar y discutir los resultados, por la confianza depositada y la libertad necesaria para poder trabajar en mis ocurrencias, y por todas las enseñanzas y experiencias transmitidas en mis primeros pasos en el terreno científico.
- A mis compañeros de Laboratorio, y en especial a Santiago por haberme facilitado la tiorredoxina de *E. coli* que fue fundamental en gran parte de la Tesis, por la atenta lectura y crítica del primer capítulo de la misma y por todos los ratos que compartimos discutiendo acerca de nuestro trabajo y sobre las historietas de Asterix; y a Roberto por el procesamiento de muchas de las figuras de la Tesis, por la amistad que compartimos, por todos los gratos momentos que pasamos juntos durante viajes y congresos, y por las largas discusiones sobre el arte de purificar proteínas.
- A Mariano por su experta labor en los HPLC y por haberme alentado y ayudado en la escritura de esta Tesis.
- A todos los compañeros del Instituto con los cuales compartí gratos momentos.
- A Marta Bravo y a Mario Sakson por su imprescindible e indispensable tarea en la ejecución de los HPLC y FPLC.
- Al Dr. J.J. Cazzulo por las cadenas A y B de la insulina gentilmente facilitadas.
- Al Dr. E. Gros por el análisis de espectroscopía de masas .
- Al Dr. J. A. Santomé y a la Lic. S. Linskens por los análisis de composición de aminoácidos y secuenciación de proteínas.

RESUMEN

La modificación de los enlaces disulfuro en las proteínas (escisión, formación e isomerización) es asistida por una creciente familia de proteínas denominadas protein disulfuro oxidoreductasas (PDOR). El mecanismo de acción de estas enzimas se basa en la rápida velocidad con la cual los residuos cisteína de su sitio activo (-Cys-X-Y-Cys-) llevan a cabo los intercambios tiol-disulfuro con los grupos sulfhidrilo o enlaces disulfuro de las proteínas sustrato.

En el presente trabajo se desarrolló un novedoso procedimiento para determinar la actividad de las PDORs (Capítulo 1) y se purificó a homogeneidad y se caracterizó tanto estructural, como cinéticamente, la Protein Disulfuro Isomerasa (PDI) de colza (*Brassica napus*) (Capítulo 2).

El método desarrollado para la medición continua de la actividad de las PDORs se basa en la escisión de los enlaces disulfuro de la insulina derivatizada en sus extremos amino terminales con una sonda fluorescente (fluoresceína). La velocidad del incremento en la fluorescencia de la "di Insulina-fluoresceintiocarbamilada" (di Ins-FTC) es lo suficientemente sensible para estimar concentraciones de Tiorredoxina (Trx) de *E. coli* desde 5 nM hasta 500 nM. Además, el ensayo permite estudiar, empleando reductores no-fisiológicos (DTT), el efecto del pH sobre la actividad de estas enzimas sin la interferencia de enzimas accesorias (e.g. NADP-Trx-reductasa).

Utilizando este ensayo, se purificó por primera vez, una PDI de semillas de una planta dicotiledónea. Los estudios estructurales revelaron que la PDI de colza es una glicoproteína homodimérica (57 kDa la subunidad) sustituida con un solo oligosacárido del tipo alta manosa. La PDI es estable a la desnaturalización térmica, y la presencia del oligosacárido no alteraría su estabilidad. Sin embargo, la remoción del oligosacárido disminuyó un 60% la actividad reductasa de la PDI.

La PDI cataliza tanto la formación, la escisión como la isomerización de los enlaces disulfuro en varias proteínas sustrato. Dos factores son fundamentales en estas reacciones de intercambio tiol-disulfuro: a) el pH y b) el potencial redox del medio.

El empleo de la di Ins-FTC como sustrato para medir la actividad reductasa de la PDI y de la Trx, permitió determinar que a pesar de compartir un sitio activo característico y una similitud estructural, ambas enzimas poseen pH óptimos distintos. La Trx cataliza esta reacción a pH neutro o ligeramente alcalino, mientras que la PDI lo hace más eficientemente a pH levemente ácido. Sin embargo, cuando se analizó la efectividad de la PDI en la catálisis de la formación y de la isomerización de las cistinas, la mayor eficiencia se obtuvo a pH levemente alcalinos. Por otra parte, a potenciales redox equivalentes a los que existirían dentro del retículo endoplásmico, la PDI acelera tanto la formación como la isomerización de los enlaces disulfuro. Pero a potenciales más reductores, estas actividades disminuyen y aumenta la capacidad para escindir estos enlaces. Estos estudios sugieren que tanto el pH intracelular, como los niveles de GSH reducido y oxidado (potencial redox) pueden modular la tendencia a la formación o a la escisión de los enlaces disulfuros cuando la PDI es el catalizador.

Finalmente, la PDI de colza fue efectiva en la reducción de los enlaces disulfuro de una proteína de reserva presente en la semilla de colza: la napina.

Estos resultados en conjunto, sugieren que la PDI podría proveer una vía alternativa para la reducción de varias proteínas presentes en la semilla, además de la ya propuesta para la Trx-h, en los eventos tempranos de la germinación.

**“ Studies on the Thiol/Disulfide Exchange Reaction in Proteins.
Characterization and Analysis of *Brassica napus* Protein Disulfide Isomerase.”**

SUMMARY

The modification of disulfide bonds in proteins (cleavage, formation, and isomerization) is assisted by a growing protein family named protein disulfide oxidoreductases (PDOR). The action mechanism relies on the fast rate of the thiol-disulfide exchange reaction between cysteines of the active site (-Cys-X-Y-Cys-) and the thiol groups or disulfide bonds of the protein target.

The present work reports a novel assay for the measurement of the PDOR activity (Chapter 1) and the purification of Protein Disulfide Isomerase (PDI) to near homogeneity, as well as the characterization of kinetic and structural properties (Chapter 2).

The method for the continuous assay of the PDOR activity is based on the cleavage of the disulfide bonds of insulin molecule, in which both N-terminal amino groups are chemically modified with a fluorescent probe (fluorescein). The rate of fluorescence increment of di-fluoresceinthiocarbamyl-insulin (di FTC-Ins) is sensitive enough for the estimation of *E. coli* thioredoxin (Trx) concentrations from 5 nM to 500 nM. Moreover, this assay allows the analysis of the pH effect on the activity of PDORs without the interference of accessory enzymes (e.g. NADP-Trx-reductase).

Using this assay, a PDI was purified from *Brassica napus* germinating seeds. The structural studies showed that this PDI was an homodimeric glycoprotein (subunit of 57 kDa), containing only one high mannose type oligosaccharide. Although the oligosaccharide was not responsible for the unusual resistance of PDI to thermal denaturation, cleavage of the carbohydrate moiety reduced 60% the activity of the enzyme.

PDI catalyzed the formation, the cleavage, and the isomerization of disulfide bonds in a variety of target proteins. Two factors were crucial in this thiol-disulfide exchange reactions: a) the pH and b) the redox potential of the milieu.

The use of di FTC-Ins as substrate for the reductase activity of PDI and Trx, unveiled that these enzymes have different pH optimum. Whereas Trx catalyzed this reaction at neutral or slightly alkaline pH, PDI was more effective at a slightly acidic pH. However, when the effectiveness of PDI in the catalysis of the formation or isomerization of cystines was assayed, the greatest efficiency was obtained at slightly alkaline pH.

At redox potentials similar to that prevailing in the endoplasmic reticulum, PDI catalyzed the formation as well as the isomerization of disulfide bonds. But at more reducing conditions, these activities decreased and the capacity to cleave disulfide bonds increased. These studies suggested that the intracellular pH, as well as the levels of reduced GSH and GSSG (redox potential) can modulate the formation or the cleavage tendency of the disulfide bonds when PDI was the catalyst. Finally, PDI was also effective in the cleavage of the disulfide bonds of a *B. napus* storage protein: napin.

Taking together, these results suggested that, like Trx-h on the early events in the seed germination, PDI could provide an alternative mechanism for the reduction of important seed proteins.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1

Pág.

Desarrollo de un método sensible y rápido para determinar la actividad protein disulfuro reductasa.

ABREVIATURAS.....1

INTRODUCCIÓN

Medición de la actividad protein disulfuro reductasa.....2

MATERIALES Y MÉTODOS.....4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 Síntesis de la Insulina mono, di y trisustituída con FITC.....7

2 Reducción química de las distintas Ins-FTC y la variación en la señal fluorescente.....9

3 Efecto de la Trx en la reducción de las distintas Ins-FTC.....11

4 La di Ins-FTC como reactivo para detectar la presencia de Trx.....12

5 La di Ins-FTC como reactivo analítico para determinar la actividad PDR.....22

APÉNDICE 1.....27

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....34

Capítulo 2

La reacción de intercambio tiol-disulfuro en las proteínas.

ABREVIATURAS.....35

INTRODUCCIÓN.....36

MATERIALES Y MÉTODOS.....66

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Sección 1

Purificación a homogeneidad y caracterización estructural de una PDI a partir de semillas germinadas de colza.

ÍNDICE GENERAL

1 Purificación de una PDI de semillas germinadas de colza.....	71
2 Análisis estructural de la PDI de colza.....	79
Sección 2	
<i>Análisis cinético de la PDI de colza.</i>	
1 Características generales de la formación, ruptura e isomerización de los enlaces disulfuro en las proteínas.....	82
2 Caracterización de una PDOR.....	83
3 Actividad PDR.....	84
4 Actividad TOx.....	96
5 Actividad PDI.....	102
Sección 3	
<i>Purificación a homogeneidad y caracterización de una proteína de reserva de semillas de colza (napina).</i>	
1 Ensayo de detección para una proteína oxidante de la PDI.....	108
2 Purificación de la proteína oxidante de la PDI.....	108
3 Identificación de la proteína purificada.....	110
4 Efecto del agente reductor en la reducción de la napina catalizada por Trx y PDI.....	111
5 La napina como oxidante de la PDI.....	113
6 Efecto del pH en la reducción de la napina.....	114
7 Discusión.....	115
APÉNDICE 2.....	119
APÉNDICE 3.....	122
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126

DESARROLLO DE UN MÉTODO SENSIBLE Y
RÁPIDO PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD
PROTEIN DISULFURO REDUCTASA.

	Pág.
ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1 Síntesis de la Insulina mono, di y tri sustituida con FITC.....	7
2 Reducción química de las distintas Ins-FTC y la variación en la señal fluorescente.....	9
3 Efecto de la Trx en la reducción de las distintas Ins-FTC.....	11
4 La di Ins-FTC como reactivo para detectar la presencia de Trx....	12
4.1 Caracterización estructural de la di Ins-FTC.....	13
4.2 Caracterización espectroscópica.....	15
4.3 Reducción química de la di Ins-FTC.....	16
4.3.1 Dependencia de la concentración de di Ins-FTC.....	16
4.3.2 El DTT como agente reductor.....	18
4.3.3 Efecto del pH.....	19
4.4 Análisis de la reducción de la di Ins-FTC por SDS-PAGE....	20
5 La di Ins-FTC como reactivo analítico para determinar la actividad PDR.....	22
5.1 Efecto de la concentración de DTT.....	22
5.2 Definición de actividad.....	23
5.3 Efecto de la concentración de Trx.....	23
5.4 Especificidad del ensayo.....	24
5.5 Comparación con el ensayo turbidimétrico.....	24
6 Conclusiones.....	25
<u>APÉNDICE 1</u>	
A.1 Aproximación al mecanismo de reducción de la di Ins-FTC.....	27
A.2 Estimación de las constantes aparentes de velocidad.....	29
A.3 Estimación de las constantes de velocidad.....	29
A.4 Equivalencia entre el cociente $(F-F_0)/F_0$ y los micromoles de producto formados.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34

aa-PTC.....	aminoácido sustituido con fenilisotiocianato
DEAE.....	grupo dietilaminoetil-
DsbA.....	proteín disulfuro oxidoreductasa A de <i>E. coli</i> .
DTNB.....	disulfuro de 3-carboxi-4-nitrofenilo, [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman]
DTT.....	DL-2,3-dihidroxibutano-1,4-ditiol, (ditiotreitól o reactivo de Cleland)
EDTA.....	(etilendinitrilo)tetracetato de sodio ajustado a pH 8 (etilendiaminotetraacetato de sodio)
FITC.....	fluoresceína-isotiocianato
HPLC.....	cromatografía líquida de alto rendimiento
mono, di o tri Ins-FTC.....	mono, di o tri Insulina-fluoresceintiocarbamilada
n.d.....	no determinado
PDI.....	proteín disulfuro isomerasa
PDOR.....	proteín disulfuro oxidoreductasa
PDR.....	proteín disulfuro reductasa
PITC.....	fenil-isotiocianato
QAE.....	grupo dietil-2-hidroxipropilaminoetilo
Tris-HCl.....	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol cuyo pH se ajustó con ácido clorhídrico.
Trx.....	tiorredoxina
SDS-PAGE.....	electroforesis en geles de poliacrilamida con duodecilsulfato de sodio.

INTRODUCCIÓN

Medición de la actividad protein disulfuro reductasa

La modificación de los enlaces disulfuro en las proteínas (reducción, formación e isomerización) es asistida por una creciente familia de proteínas denominadas protein disulfuro oxidoreductasas (PDOR). El mecanismo de acción de estas enzimas se basa en la rápida velocidad con la cual los residuos cisteína de su sitio activo (-Cys-X-Y-Cys-) lleva a cabo los intercambios tiol-disulfuro con los grupos sulfhidrilos o enlaces disulfuro de las proteínas sustrato. Entre las numerosas proteínas que integran esta familia, podemos destacar a la tioredoxina (Trx) y la protein disulfuro isomerasa (PDI), (ver capítulo 2).

A partir del hallazgo de Holmgren (1979), el procedimiento más utilizado para la estimación de la actividad PDR de estas enzimas, se basó en la detección de la precipitación de la cadena B de la insulina que sucede a la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios de esta proteína. Sin embargo, el ensayo presenta los siguientes inconvenientes: a) la señal detectable proviene de la disminución de la transmitancia a 650 nm producida por la agregación y posterior precipitación de la cadena B de la insulina, proceso que no depende directamente de la reducción de los enlaces disulfuro. b) una extensa fase lag precede la aparición de la turbidez y c) se utiliza alta concentración de insulina en el medio de reacción (entre 0.7 y 1 mg/ml de proteína). Posteriormente, el ensayo se mejoró con la utilización de la insulina marcada radioactivamente, y el posterior análisis de las cadenas constituyentes por HPLC (Tsibris *et al* 1989), o por la determinación espectrofotométrica de la oxidación de NADPH en presencia de NADP-Trx-reductasa (Luthman & Holmgren 1982). A pesar de esto, es bien conocido que la peligrosa manipulación de compuestos radioactivos en un ensayo en etapas no es un procedimiento conveniente para el análisis rutinario de gran número de muestras. Por otra parte, la sensibilidad de las enzimas auxiliares (*e.g.* NADP-Trx-reductasa) a la composición del medio impide el análisis de extractos crudos heterogéneos como así también de diferentes condiciones experimentales (pH, temperatura, metabolitos).

Las sondas fluorescentes unidas covalentemente a proteínas permiten detectar cambios conformacionales y realizar estudios de la interacción proteína-proteína. Dado

que el proceso de reducción de los enlaces disulfuros de la insulina involucra la aparición de dos entidades distintas - las cadenas A y B - las variaciones en la intensidad y/o longitud de onda de emisión de una sonda fluorescente permitirían detectar las modificaciones producidas en la estructura proteica. En estudios previos, se unió grupos fluoresceintiocarbamilo a los grupos amino de la insulina para analizar el efecto biológico e inmunológico de esta hormona (Tiezte *et al* 1962, Bromer *et al* 1967). Con el fin de desarrollar un método sensible y rápido para la estimación de la actividad PDR, se planteó la utilización de estos derivados fluorescentes para cuantificar el proceso reductivo. La escisión de los enlaces disulfuro intercatenarios de la insulina debería modificar la señal fluorescente y de este modo permitir monitorear en forma directa el proceso reductivo.

MATERIALES

La insulina pancreática bovina (Lotes 112H-0353 y 117B-2580), la fluoresceína-isotiocianato isómero I (Lotes 23H5019 y 102F-5045), las cadenas (-Cys[SO₃H]-)-A y -B de la insulina, el DTT, el DTNB, el EDTA y el Tris eran productos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Sephadex G-25 fue adquirido a Pharmacia y el β-mercaptoetanol a Fluka. Los demás reactivos provenían de diversas fuentes comerciales y su calidad era pro-análisis. En todos los casos se utilizó agua destilada.

MÉTODOS

Análisis de la reacción de síntesis de la Ins-FTC

Todos los procedimientos se efectuaron a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario.

La síntesis se basó en el trabajo realizado por Bromer *et al* (1967). Para remover el Zn²⁺, 1 ml de la insulina pancreática bovina (concentración 10 mg/ml) fueron dializados durante 16 horas a 4°C, contra dos litros de buffer bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.4, suplementado con EDTA en una concentración de 5 mM. Seguidamente se dializó contra un litro del mismo buffer sin EDTA por otras 16 horas. Se agregó al dializado la FITC (2.8 mg) de manera que la relación molar Insulina:FITC resultó de 1:4 y se incubó a 28 °C con agitación. La reacción se detuvo a distintos tiempos, separando la proteína de la FITC que no reaccionó, al filtrar la muestra a través de una columna de Sephadex G-25 (1 x 48 cm). Se eluyó a 20-25 °C con buffer bicarbonato de sodio 30 mM pH 9.0. Se reunieron las fracciones (recogidas cada 1 ml) que mostraron mayor absorbancia a 495 nm y constituían el primer pico en el perfil de elución. Este pico correspondió a las distintas Ins-FTC sintetizadas según se analizó por cromatografía de intercambio iónico (ver resultados). Las muestras se almacenaron a -15 °C hasta su utilización.

Síntesis de la di Ins-FTC

Se resuspendieron 22 mg de insulina pancreática bovina en 2.2 ml de buffer A (bicarbonato de sodio 30 mM pH 9.0). Se agregó dos gotas de NaOH 10 M para solubilizar totalmente la proteína (pH final ~12). La solución se dializó a 4 °C sucesivamente contra i) 1 litro de buffer A suplementado con EDTA (concentración 1 mM) por 2.5 horas. ii) 1 litro del mismo buffer por 10 horas y iii) 1 litro de buffer A por 5.5 horas para remover el EDTA.

El dializado se llevó a 3 ml con buffer A y se agregó 3 mg de FITC tal que la relación molar Insulina/FITC resultó de 1/2. La solución se incubó a 28 °C con agitación durante 10 horas y se detuvo la reacción por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (1x48 cm) eluyendo con buffer bicarbonato de sodio 20 mM pH 9.0. (Fracción recogida: 0.5 ml)

Se reunieron las fracciones correspondientes al primer pico coloreado que eluyó de la columna y se dializaron exhaustivamente contra buffer Tris-HCl 30 mM pH 7.6, NaCl 0.1 M. Al dializado (volumen final 28 ml) se agregó urea sólida hasta alcanzar una concentración de 6 M.

El dializado suplementado con urea se sembró en una columna de QAE-Sephadex (1.5x20 cm) equilibrada con buffer B (Tris-HCl 10 mM pH 7.6, Urea 6M, NaCl 100 mM) y se eluyó sucesivamente con i) 40 ml de buffer B, ii) 80 ml de un gradiente lineal de NaCl en buffer B (desde 0.1 a 0.8 M) y iii) 15 ml de NaCl 1 M en buffer B. (flujo 2 ml/min., fracción: 2ml). La di Ins-FTC eluyó con 0.55 M de NaCl y constituyó el pico mayoritario. Se reunieron las fracciones correspondientes a la di Ins-FTC y se dializaron exhaustivamente contra buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.6. (Volumen final ~50 ml)

Se agregó urea al dializado (concentración final 6 M) y se cromatografió de manera idéntica a la anterior. El pico que eluyó con 0.55 M de NaCl se dializó exhaustivamente contra H₂O destilada y se concentró por liofilización hasta un volumen de 25 ml. Se agregó 200 µl de buffer Tris-HCl 1M pH 7.6 y se almacenó en alícuotas de 1 ml a -15 °C, (Concentración final de la di Ins-FTC 41 µM).

Determinación de la concentración de proteínas

Se utilizó el método de Lowry *et al* (1951) utilizando insulina pancreática bovina para realizar la curva patrón. La FITC no presentó interferencias en el ensayo en concentraciones similares a la de las Ins-FTC medidas. La concentración de la Trx de *E. coli* se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm utilizando un coeficiente de extinción molar de 13700 M⁻¹ cm⁻¹. (Reuntimann *et al* 1981)

Determinaciones espectrofotométricas

Se realizaron en un espectrofotómetro Gilford modelo Response II. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 o 3 ml con un paso de luz de 1 cm. Para los espectros de absorbancia la velocidad de barrido fue de 60 nm/min. y los datos se adquirieron a intervalos de 0.1 nm desde 550 nm a 250 nm, con las ranuras de ancho de banda fijas en 0.5 nm.

Determinaciones espectrofluorométricas

Se realizaron en un espectrofluorómetro Jasco modelo FP-770 utilizando cubetas de polimetaacrilato de 1x1 cm (volumen máximo 3 ml). Los espectros para la di Ins-FTC se realizaron adquiriendo datos cada 0.2 nm, a una velocidad de barrido de 50 nm/min. y con las ranuras de ancho de banda fijas en 5 nm tanto para la excitación como para la emisión. Los ensayos de reducción de las Ins-FTC se realizaron excitando con una longitud de onda de 495 nm y registrando la emisión a 519 nm.

Determinación de la concentración de DTT

Se tituló con DTNB empleando un coeficiente de extinción molar (ϵ_{412}) de 14150 M⁻¹ cm⁻¹ para el 2-nitro-5-tiobenzoato (NTB) liberado. (Ellman 1959, Riddles *et al* 1980)

Purificación de la Trx recombinante de *E. coli*

Se realizó según el procedimiento descrito en Holmgren & Reichard (1967).

Análisis por HPLC

Se utilizó un equipo LKB provisto de un detector de longitud de onda variable.

Para la cromatografía de intercambio hidrofóbico (C18) se utilizó una columna Superpaq Spherisorb (ODS2) con un tamaño de partícula de 5 μm y un largo de columna de 25 cm. En cambio, para la cromatografía de intercambio hidrofóbico (C4) se utilizó una columna Selectosil C4 300Å Phenomenex (250 x 4.60 mm), con un tamaño de partícula de 3 μm .

Espectrometría de masa de la di Ins-FTC

La muestra de di Ins-FTC se disolvió en metanol, y se aplicó en una matriz de m-nitrobencil-alcohol. Posteriormente se ionizó con bombardeo rápido de iones y se analizó en un espectrómetro de masas ZAB-SEQ en el LANAIS-EMAR (CONICET-UBA).

Análisis de composición de aminoácidos

Luego de la hidrólisis ácida y la derivatización con PITC, la composición total de aminoácidos de la di Ins-FTC se determinó en un analizador modelo 420 de Applied Biosystems. (Este procedimiento fue realizado en el LANAIS-PRO, CONICET-UBA).

Secuenciación de aminoácidos

Se utilizó el método de degradación de Edman en un secuenciador Modelo 477 de Applied Biosystems en el LANAIS-PRO, CONICET-UBA.

Análisis de la di Ins-FTC por SDS-PAGE

Se realizó a temperatura ambiente (18-22 °C) en un sistema modular Mini-Protean II (Biorad, Richmond, CA) utilizando la técnica de Schägger & von Jagow (1987) con las siguientes especificaciones: Gel de concentración: 4% T, 2.6 % C, Gel de espaciado: 12.8 % T, 2.6 % C, Gel de separación: 16.5 % T, 2.6 % C, 10 % glicerol. Las proteínas (5 a 40 μg) i) se disolvieron en 15 μl de buffer Tris-HCl 50 mM pH 8, urea 6 M, SDS 1 % (p/v) y azul de bromofenol 0.025% (p/v), ii) se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y iii) se cargaron en el gel de poliacrilamida. Luego de la electroforesis realizada a 10 watts constantes, se tiñó el gel en metanol:ác. acético:H₂O (4:1:6, en volumen) conteniendo 0.125% de Coomassie brillant blue R-25 y se destiñó en la misma solución sin el colorante.

Tratamiento matemático de los datos experimentales

Para obtener el valor de las constantes aparentes de velocidad (k_a y k_b), se ajustaron las variaciones temporales de emisión de fluorescencia con el modelo descrito en el Apéndice 1 (ecuación 8). Para la estimación de las constantes de velocidad (k_1 , k_2 , k_4 y k_5) se ajustó el valor obtenido para las constantes aparentes k_a y k_b en función de la concentración de DTT (ecuaciones 13 y 14). Las regresiones no lineales para el ajuste se realizaron con una computadora personal utilizando el programa Table Curve (Jaendel Scientific).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 2 muestra los perfiles cromatográficos correspondientes a la elución de las alícuotas obtenidas a los distintos tiempos de la reacción. La relación molar FITC/insulina en la reacción fue de 4/1. Las letras M, D y T indican las fracciones escogidas para realizar los ensayos de caracterización de la mono, di y tri Ins-FTC. Las distintas fracciones se dializaron i) por 3 horas contra 2 litros de buffer bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.0 ii) por 12 horas contra 2 litros de buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.9, iii) por 3 horas contra 2 litros de buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.9 y se almacenaron a -15°C hasta su utilización. En estas condiciones los reactivos son estables por meses.

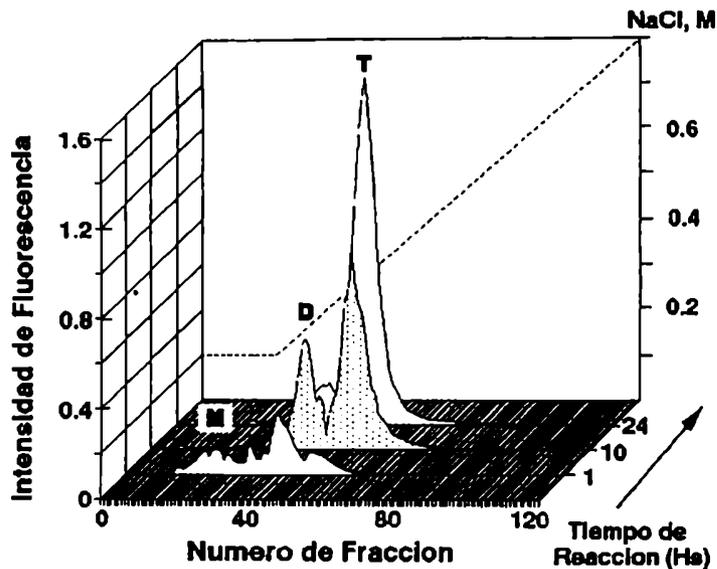


Figura 2: Estudio de la reacción de síntesis de la di Ins-FTC. Alícuotas conteniendo 0.5 micromoles de insulina total (todas las formas), se obtuvieron a distintos tiempos de reacción y se analizaron cromatográficamente en una columna de DEAE celulosa ($0.7 \times 15 \text{ cm}$). Se eluyó con 20 ml de buffer Tris-HCl 10 mM pH 7.6, NaCl 0.1M y Urea 7M y luego con 90 ml de un gradiente de NaCl (0.1 a 0.8 M) en el mismo buffer a 4°C . Fracción: 1 ml. Las fracciones se analizaron diluyendo $10 \mu\text{l}$ de cada una de ellas en 3 ml de buffer bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.0 y determinando su fluorescencia a 519 nm ($\lambda_{\text{em}} = 495 \text{ nm}$).

Luego de determinar la concentración proteica por el método de Lowry *et al* (1951) se prepararon soluciones $2.5 \mu\text{M}$ de las distintas Ins-FTC en NaOH 1M (Bromer *et al* 1967) y se determinó el espectro de absorción. (Figura 3) Los coeficientes de extinción molar (ϵ) a 495 nm para la mono, di y tri Ins-FTC calculados fueron 60500, 133600 y $195400 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente, cuya relación 0.91:2.0:2.93 fue muy cercana a la esperada 1:2:3.

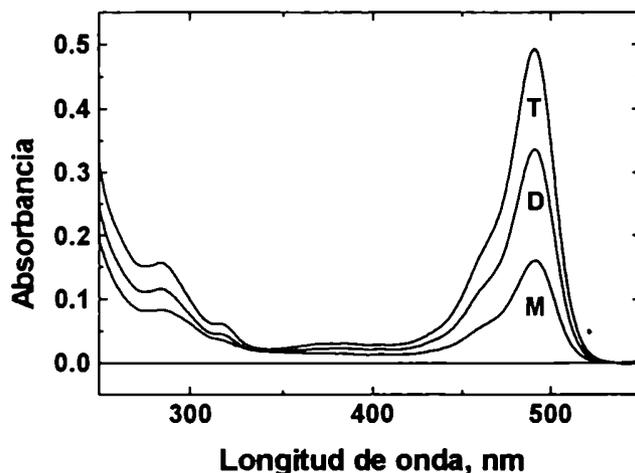


Figura 3: Espectro de absorción de la mono (M), di (D) y tri (T) Ins-FTC en NaOH 1M a 25 °C. La concentración de cada especie fue 2.5 μ M.

2 Reducción química de las distintas Ins-FTC y la variación en la señal fluorescente.

El DTT es un poderoso reductor de los enlaces disulfuro en las proteínas. En particular, la insulina posee tres enlaces disulfuro que son reducidos por este reactivo. (Holmgren 1979)

Para estudiar posibles modificaciones en las características fluorescentes de las insulinas derivatizadas cuando son reducidas por el DTT, se midió la variación en la fluorescencia a 495 nm (relativa a la fluorescencia inicial, F_0) en función del tiempo durante la reacción. (Figura 4)

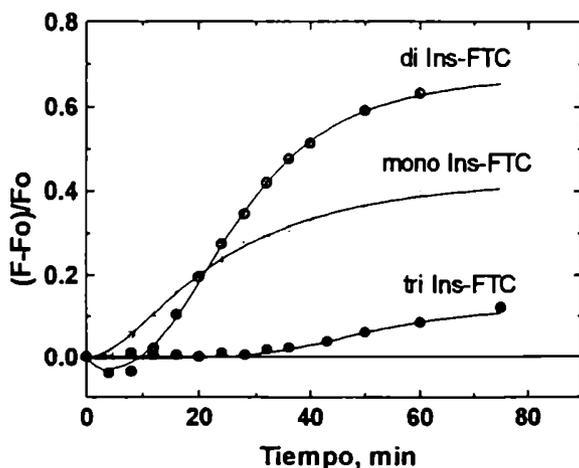


Figura 4: Incremento en la intensidad de fluorescencia (relativo a la fluorescencia inicial) para las distintas Ins-FTC en función del tiempo de reacción. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 3ml conteniendo buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.4, EDTA 1 mM y 70 nM de mono, di o tri Ins-FTC. Se inició la reacción con el agregado de DTT (concentración final 3 mM).

Existió una clara diferencia en la reactividad de cada uno de los compuestos. La

mono Ins-FTC tuvo un incremento del 30% respecto a la fluorescencia inicial. Si bien la fluorescencia de la di Ins-FTC disminuyó durante los primeros minutos, luego aumentó rápidamente hasta alcanzar una intensidad superior al 60% respecto de la inicial. La tri Ins-FTC reaccionó muy lentamente, aumentando un 10% la fluorescencia inicial luego de 60 minutos.

Dado que el aumento en la intensidad de fluorescencia para las distintas Ins-FTC estaría relacionado con el proceso reductor, se analizó el efecto de la concentración del agente reductor (DTT) en la velocidad de incremento de fluorescencia para la mono y la di Ins-FTC (no se analizó la tri Ins-FTC por ser muy pequeña la variación en la fluorescencia). Para ambos reactivos la velocidad de incremento en la fluorescencia fue mayor a medida que se aumentó la concentración de DTT. Mientras que para la mono Ins-FTC la velocidad aumentó 8 veces cuando la concentración de DTT varió desde 0.1 a 10 mM, para la di Ins-FTC aumentó 17 veces. (Datos no mostrados)

Los cambios en la intensidad de fluorescencia estarían originados, en principio, por cambios en los entornos de las moléculas de fluoresceína, los cuales derivarían de la reducción de los enlaces disulfuro y en consecuencia, de la separación de las cadenas A y B de la Ins-FTC.

Para establecer si el incremento en la señal correlacionaba con la reducción (separación de cadenas), los productos de la reacción con DTT se analizaron por filtración en geles. Utilizando una columna de Sephadex G-25, la molécula bicatenaria eluyó en el volumen de exclusión, mientras que los productos de la reducción con DTT 10 mM eluyeron posteriormente. (Figura 5) La relación 1.5 entre las áreas correspondientes a la elución a 3 hrs y a 0 hrs fue coherente con una fluorescencia mayor que la inicial para los productos reducidos. En este experimento, el buffer de elución se ajustó a pH 9.0 para evitar la precipitación de las cadenas reducidas de la Ins-FTC y se agregó al buffer EDTA (concentración final 2.5 mM) y β -Mercaptoetanol (concentración final 4.2 mM) para minimizar la reoxidación aeróbica. El pequeño pico correspondiente a las cadenas reducidas de Ins-FTC que se observa a tiempo cero, se debe a que una vez sembrada la muestra

en la columna, el pH aumenta de 7.5 a 9.0 (aumentando la velocidad de reducción por el DTT) y a que transcurre cierto tiempo hasta que el DTT se separa de la di Ins-FTC dentro de la columna.

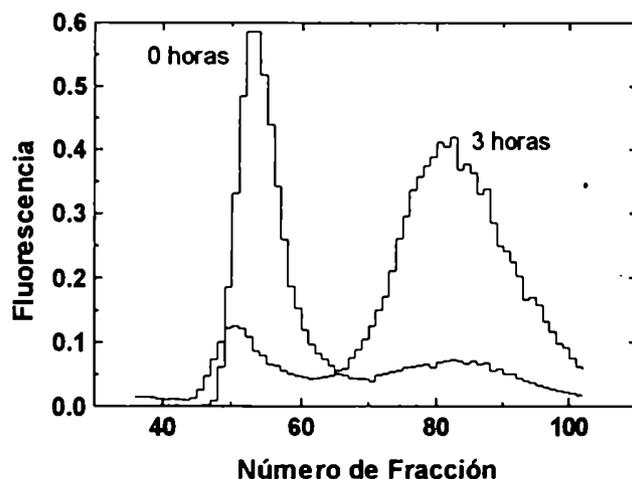


Figura 5: Análisis de la separación de las cadenas A y B de la Ins-FTC luego de reducirse con DTT 10 mM, mediante filtración con gel (Sephadex G-25 fine, 1x48 cm). Se incubaron 13 μ g de una mezcla de di y tri Ins-FTC (18 hs de reacción, ver figura 2) a 37 °C durante 3 horas en un volumen final de 200 μ l conteniendo, buffer fosfato de potasio 45 mM pH 7.5 y DTT 10 mM. El control a 0 horas se realizó agregando el DTT y sembrando inmediatamente en la columna. La elución se efectuó a temperatura ambiente (20-25) °C y se recogieron fracciones de 0.4 ml.

3 Efecto de la Trx en la reducción de las distintas Ins-FTC

La Trx de *E. coli* acelera la reducción de los enlaces disulfuro de la insulina por el DTT. (Holmgren 1979). Sobre esta base, sería de esperar que la Trx acelerara la reducción de las Ins-FTC.

El análisis de este proceso mostró que la Trx acelera el incremento relativo de fluorescencia aún cuando la concentración de DTT fue 30 veces menor a la utilizada en la reducción química. (Figura 6)

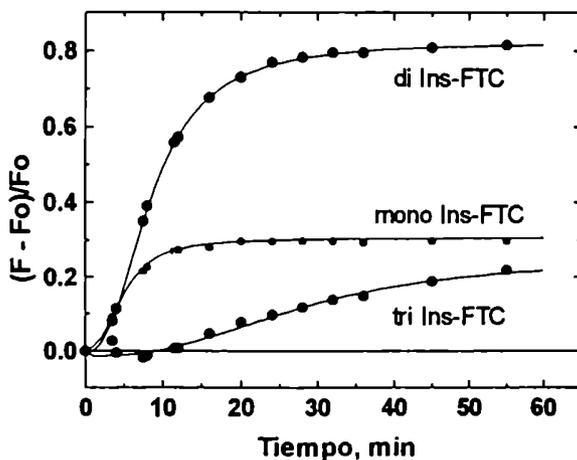


Figura 6: Reducción de las distintas Ins-FTC en presencia de Trx de *E. coli*. Las reacciones se llevaron a cabo a 21 °C en un volumen final de 3 ml conteniendo, buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.4, EDTA 1mM, DTT 0.1 mM, Ins-FTC 0.3 μ M y fueron iniciadas por el agregado de Trx (concentración final 21 μ M).

La fluorescencia de la di Ins-FTC aumentó un 80% respecto a la inicial, mientras que el incremento para la mono Ins-FTC fue de un 30%. La tri Ins-FTC no llegó a un valor estable dentro de los 60 minutos de reacción, siendo el máximo menor al 20% del valor inicial.

La filtración por gel del reactivo reducido mostró un aumento de los volúmenes de elución, lo cual indica de una disminución de masa molecular. (Figura 7)

Al comparar las áreas de los perfiles de elución de la figura 7, se observa que este aumento de fluorescencia correlaciona con la separación de las cadenas constituyentes de la insulina.

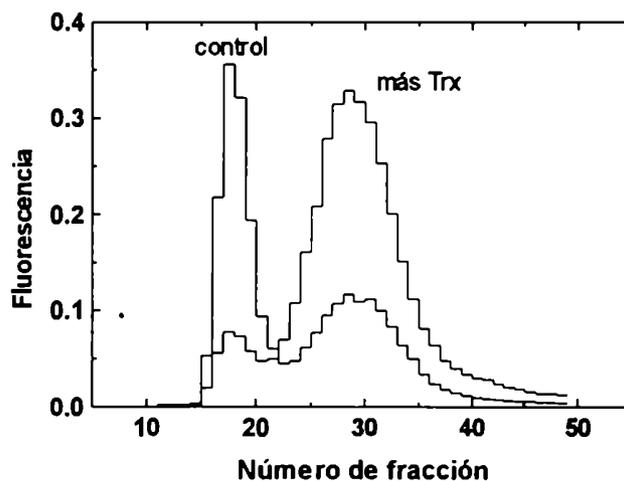


Figura 7: Análisis de la reducción de la Ins-FTC por la Trx de *E. coli* mediante filtración por gel (Sephadex G-25 fine, 1x48 cm). Las reacciones se llevaron a cabo a 30 °C durante 70 minutos en un volumen final de 200 μ l, conteniendo buffer fosfato de potasio 42 mM, DTT 0.05 mM, 13 μ g de una mezcla de di y tri Ins-FTC y donde se indica, Trx 42.5 nM. (c.f. Figura 5). La elución se realizó a 20-25 °C con buffer bicarbonato de sodio 50 mM pH 9.0, EDTA 2.5 mM y se recogieron fracciones de 1 ml.

4 La di Ins-FTC como reactivo para detectar la presencia de Trx.

Sobre la base de los experimentos descritos, la di Ins-FTC fue escogida como sustrato para las PDORs porque mostró:

- un rápido cambio en la fluorescencia
- el mayor incremento relativo
- sensibilidad a la Trx.

Por este motivo, la síntesis de los derivados fluoresceintiocarbamilados de la insulina fue optimizada para potenciar el rendimiento del derivado disustituído haciendo reaccionar a la insulina con la FITC en una relación molar 1/2 durante 10 horas a pH 9.0. Estas condiciones maximizan la formación del compuesto disustituído y minimizan la sustitución de la Lys 29 (B29). La posterior

cromatografía de intercambio aniónico de la di Ins-FTC produjo una fracción mayoritaria cuyo grado de pureza era mayor al 90%.

4.1 Caracterización estructural de la di Ins-FTC

Para confirmar que la ubicación de las moléculas de fluoresceína en estas condiciones de síntesis corresponde con la propuesta por Bromer *et al* (1967), se realizaron estudios relativos a la composición y secuencia de aminoácidos y de espectroscopia de masa.

Dado que estos análisis requieren que la sustancia tenga un alto grado de pureza, el reactivo obtenido luego de la cromatografía de intercambio aniónico se purificó por cromatografía de fase reversa (C18) en HPLC. (Figura 8). 100 μ l de di Ins-FTC (conc. 108 μ M) se diluyeron con igual volumen de buffer B (0.1% (v/v) de ác. trifluoroacético en acetonitrilo) y se sembraron en la columna equilibrada con 50% (v/v) de buffer B en buffer A (0.1% (v/v) de ác. trifluoroacético en agua). (Figura 8a) Se lavó con 3 ml de este buffer y se eluyó con un gradiente de 50% a 100% (v/v) de buffer B en buffer A durante 60 minutos manteniendo un flujo de 1 ml/min. Se registró absorbancia a 280 nm.

El pico mayoritario eluyó al 59% de acetonitrilo. Las fracciones correspondientes se llevaron a sequedad y el residuo se disolvió en 200 μ l de buffer de equilibrio. Una posterior cromatografía en la misma columna, utilizando un gradiente de 50% a 70% (v/v) de buffer B en buffer A durante 40 minutos con el mismo flujo utilizado en la primera corrida, produjo un pico simétrico que fue secado y guardado a -15 °C hasta la realización del espectro de masa. (Figura 8b)

La masa molecular correspondiente al reactivo disustituido es de 6512.3 Da. El análisis de espectroscopia de masa por bombardeo con átomos rápidos (FAB-MS) reveló una masa molecular para la di Ins-FTC de 6512 Da, confirmando que el reactivo sintetizado está sustituido con dos fluoresceínas. (Figura 9)

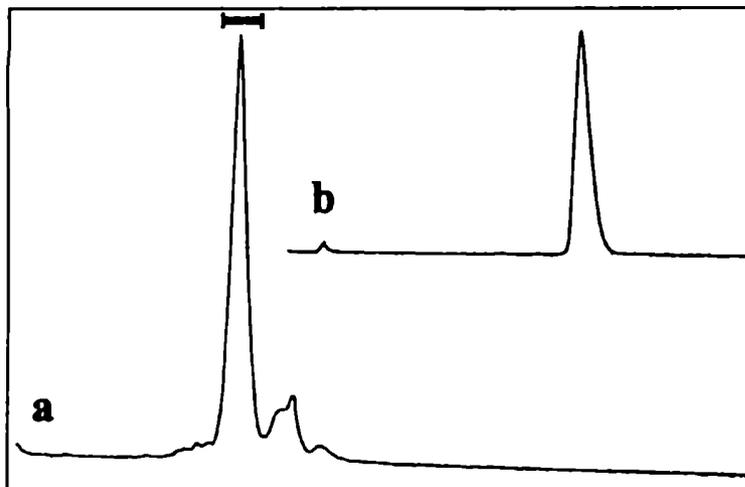


Figura 8: Análisis por HPLC de la di Ins-FTC utilizando una columna de fase reversa (C18). (a) Cromatograma correspondiente a una muestra de di Ins-FTC tal como se obtiene luego de sintetizada en condiciones que maximizan su formación y luego de purificarse por una columna de DEAE celulosa como se describe en la figura 2. Los detalles experimentales se detallan en el texto. (b) Cromatograma correspondiente a la elución del pico aislado en a) según se detalla en el texto.

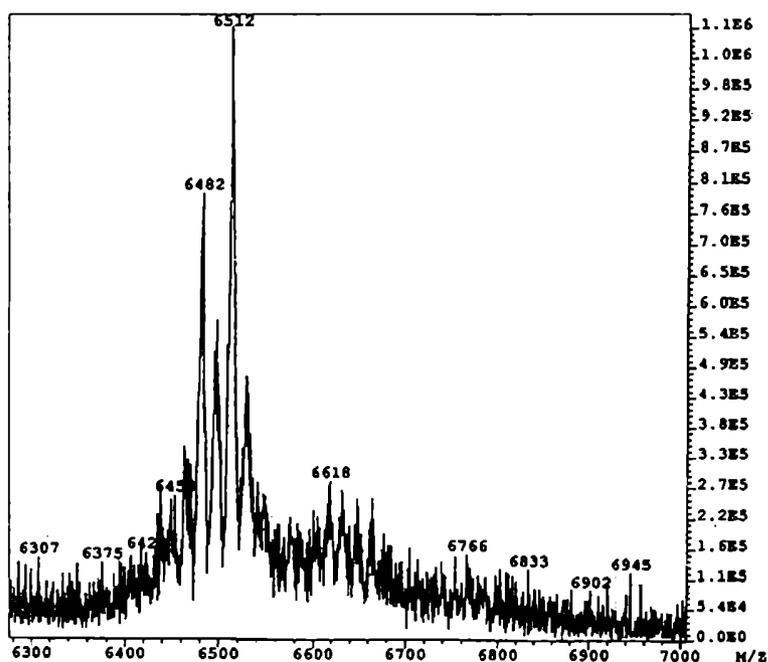


Figura 9: Espectro de masa por bombardeo con átomos rápidos de la di Ins-FTC. El reactivo purificado por cromatografía de fase reversa (HPLC) se llevó a sequedad en corriente de nitrógeno, se disolvió en metanol y se depositó en una matriz de 3-nitrobenzilalcohol.

Los aminoácidos sustituidos con FITC eluyen con tiempos de retención distintos a los que eluyen los aminoácidos sustituidos con PITC cuando se someten a una cromatografía de fase reversa. En consecuencia, la hidrólisis total de la di Ins-FTC causará una disminución en los aminoácidos que resultaron modificados. El análisis comparativo entre la insulina y la di Ins-FTC reveló la ausencia de una glicina (2.7 vs. 4.1) y una fenilalanina (1.8 vs. 3.3) en el reactivo, mientras que no hubo diferencias en el número de lisinas (1.2 vs. 1.0), lo que sugirió que la sustitución tuvo lugar en los dos amino terminales de la insulina (A1, B1). (Tabla I)

dependió linealmente de la concentración entre 0.04 y 2 μM , siendo el coeficiente de extinción molar (ϵ) 99000 $\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Los espectros de fluorescencia para el reactivo oxidado y reducido sólo difirieron en la intensidad de fluorescencia emitida. El espectro de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ox}} = 495 \text{ nm}$) presentó un máximo a 519 nm cuya intensidad, a concentraciones menores a 1 μM , dependía linealmente de la concentración de di Ins-FTC. El espectro de excitación ($\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$) presentó un máximo a 495 nm y un hombro a 468 nm. (Figura 10, c.f. Figura 3)

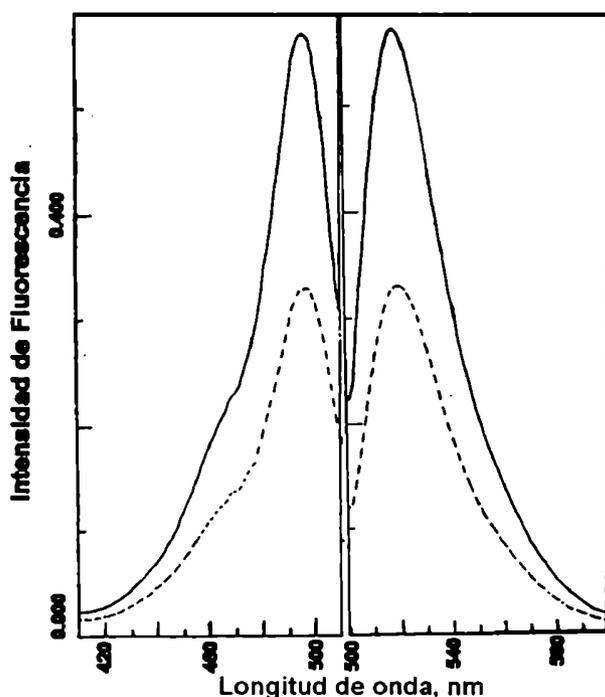


Figura 10: Espectro de excitación (izquierda) y de emisión (derecha) de la di Ins-FTC en estado oxidado (línea punteada) y estado reducido (línea llena). El reactivo (0.13 μM) disuelto en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM fue reducido agregando DTT (concentración final 10 mM) e incubando 60 min. a 25 $^{\circ}\text{C}$. La intensidad de fluorescencia se expresa en unidades relativas.

4.3 Reducción química de la di Ins-FTC

4.3.1 Dependencia de la concentración de di Ins-FTC.

Los estudios precedentes revelaron que la reducción de los enlaces disulfuro de la di Ins-FTC provoca un incremento en la intensidad de fluorescencia.

Con el objetivo de cuantificar este aumento, la fluorescencia emitida ($\lambda_{\text{ox}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 519 \text{ nm}$) fue evaluada a distintas concentraciones de di Ins-FTC utilizando el DTT como reductor. (Figura 11) A mayores concentraciones de di Ins-FTC, la diferencia en la emisión entre los estados reducidos y oxidados fue mayor.

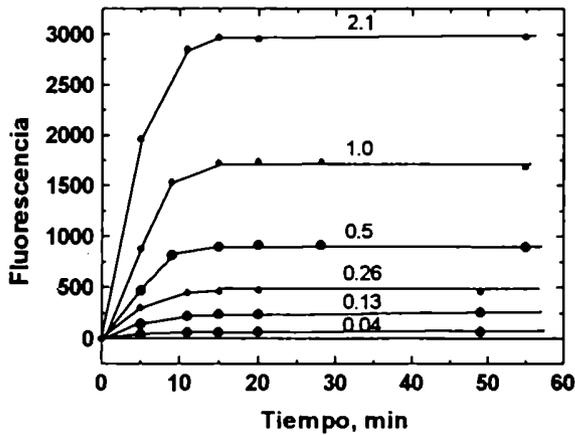


Figura 11: Incremento de la fluorescencia por reducción del reactivo. Las concentraciones utilizadas se indican sobre las curvas y están expresadas en micromoles por litro. Las reacciones se efectuaron a 25 °C en un volumen final de 2.6 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 1 mM y el reactivo en la concentración indicada. Las mismas se iniciaron con el agregado del DTT (concentración final 10 mM). La fluorescencia se expresa en unidades relativas.

La fluorescencia aumentó hasta un valor final (constante) que fue linealmente dependiente de la concentración de di Ins-FTC por debajo de 1 μM. (Figura 12a)

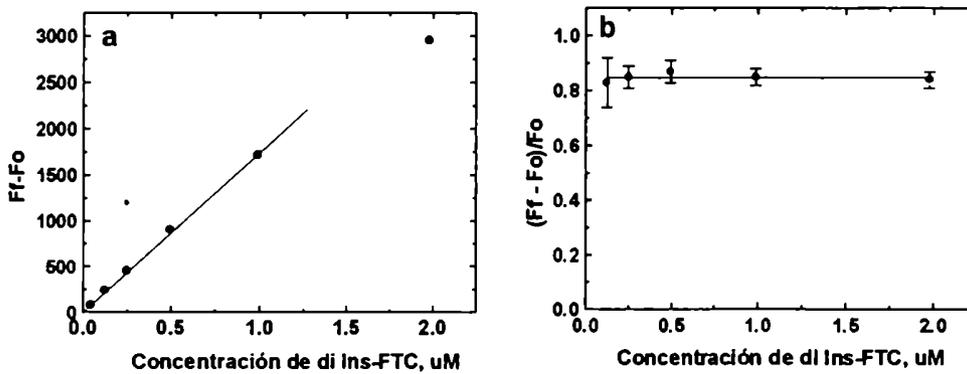


Figura 12: a) Incremento total de fluorescencia (en unidades relativas) por reducción total de la di Ins-FTC. Los valores graficados provienen de las curvas representadas en la figura 11. b) Incremento total de fluorescencia relativo a la fluorescencia inicial. Se graficó el promedio de dos determinaciones. Las barras de error indican la diferencia obtenida en las dos mediciones.

Esta dependencia lineal permitió normalizar la medida de incremento de fluorescencia de manera tal de hacerlo independiente de la concentración inicial de reactivo utilizada:

$$F_0 = q_1 \cdot [\text{di Ins-FTC}]_0 \quad \text{y} \quad F_f = q_3 \cdot [\text{di Ins-FTC}]_0$$

entonces

$$\left(\frac{F_f - F_0}{F_0} \right) = \frac{q_3 - q_1}{q_1} \cong 0.85 \quad (\text{Figura 12b})$$

Este valor varía entre 0.7 y 0.9 dependiendo de las condiciones del medio de reacción, (p.ej. pH, temperatura, fuerza iónica, etc.).

Por lo tanto, la pendiente de la curva obtenida al graficar el incremento relativo de fluorescencia $(F - F_0)/F_0$ en función del tiempo, daría una medida de la velocidad con que se reduce el reactivo. Esta velocidad dependería de la naturaleza del agente reductor y de su concentración.

4.3.2 El DTT como agente reductor.

La velocidad de reducción de la di¹Ins-FTC aumentó rápidamente cuando la concentración de DTT fue incrementada desde 0.1 a 5 mM. (Figura 13a)

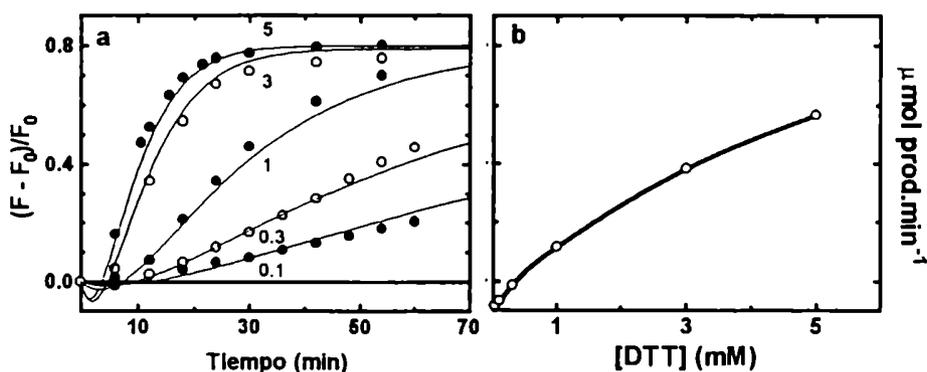
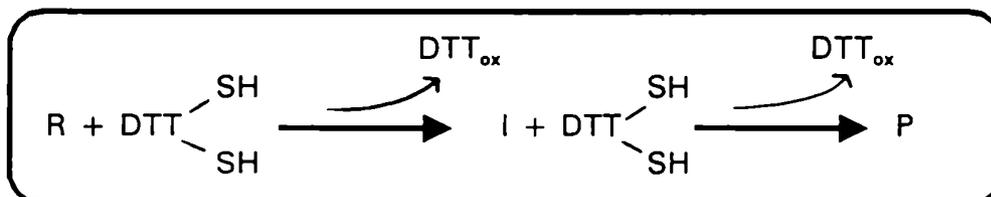


Figura 13: Efecto de la concentración de DTT sobre la reducción de la di¹Ins-FTC. a) Incremento relativo de la fluorescencia en función del tiempo de reacción. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 2 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 3 mM y di¹Ins-FTC 0.7 μM . La reacción se inició con el agregado de DTT (la concentración final utilizada, en mmoles/litro, se indica en el gráfico). b) Velocidad de aparición de los productos (cadenas A y B reducidas) para las curvas mostradas en a) (ver Apéndice 1).

A tiempos menores de 5 minutos, la intensidad de fluorescencia disminuyó y, prolongando la incubación, revirtió a un incremento. Este perfil indica la existencia de, al menos, tres especies detectables que difieren en su coeficiente de extinción o rendimiento cuántico.

Aparentemente la especie intermedia sería menos fluorescente que el reactivo, justificando que la intensidad de la fluorescencia disminuya durante los primeros instantes de reacción. Además, el incremento de intensidad de fluorescencia a tiempos mayores se debería a que la intensidad de fluorescencia del producto (F_t) es 1.7-1.9 veces mayor que la del reactivo (F_0). (Figura 12)

El esquema más simple para esta reacción sería el siguiente



donde R corresponde a la di Ins-FTC, I al intermediario de menor fluorescencia y P al producto de reacción (las cadenas A y B de la insulina separadas).

4.3.3 Efecto del pH

La fluorescencia de la di Ins-FTC (F_0) incrementó 2.8 veces cuando el pH aumentó desde 6.2 a 8.4 (Figura 14a). Similarmente, la emisión de fluorescencia para los productos reducidos (F_r) mostró un aumento de 2.4 veces en el mismo rango de pH. En primera instancia, parecería que la transición monoanión a dianión de la fluoresceína (pK_a *c.a.* 6.4) podría limitar el uso de la di Ins-FTC. Sin embargo, el proceso reductivo pudo monitorearse convenientemente utilizando el incremento relativo de fluorescencia $(F - F_0)/F_0$, ya que la variación de estos valores con el pH es mínima ($(F_r - F_0)/F_0 = 1.1$ a pH 6.2 y 0.83 a pH 8.4) Esta variación fue linealmente dependiente del pH, lo que permitió normalizar los valores de velocidad de reducción del reactivo a distintos pH. (ver Apéndice 1, ecuación 24).

Como la especie reactiva en la reacción de intercambio tiol-disulfuro es el ion tiolato, la variación del pH del medio de reacción afectará la cinética del proceso de reducción de la di Ins-FTC. Al incrementar el pH, a concentración de DTT constante, la velocidad de reducción de la di Ins-FTC aumentó a medida que el mismo se acerca al valor del pK_a del sulfhidrilo involucrado. (Figura 14b) En cambio la presencia de Trx permitió la reducción a pHs en los cuales la concentración del ion tiolato es despreciable (*i.e.* < 7.5).

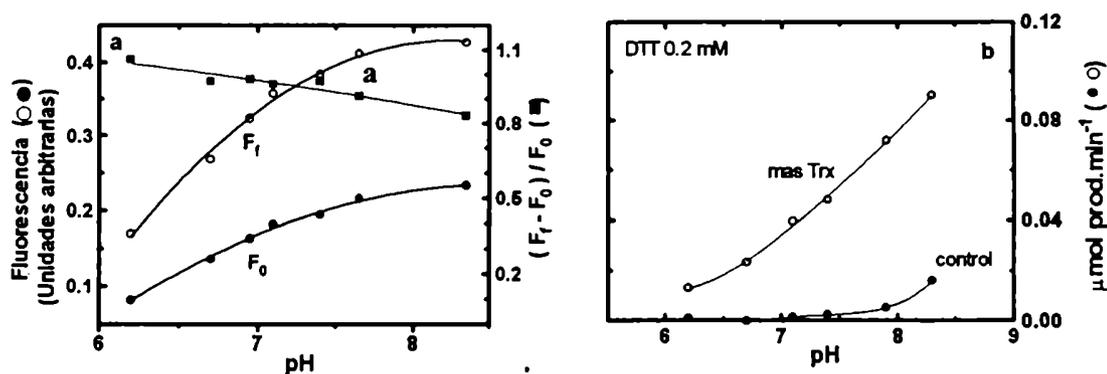


Figura 14: Efecto del pH en la reducción de la di Ins-FTC. a) Variación en la emisión de fluorescencia de la di Ins-FTC antes (F_0) y después (F_1) de reaccionar con el DTT. Se incubó la di Ins-FTC (32.4 μM) por 90 minutos a 37 °C en 0.1 ml de buffer Tris-HCl 100 mM pH 7.9 conteniendo DTT 20 mM y se removieron alícuotas de (0.01 ml) que se colocaron en 3 ml de buffer Tris-fosfato 50 mM ajustado al pH indicado. Las longitudes de onda de emisión y excitación fueron 519 y 495 nm respectivamente. b) Efecto del pH en la velocidad de reducción de la di Ins-FTC. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 2 ml a 22 °C que contenía buffer Tris-fosfato 50 mM al pH indicado, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.7 μM , Trx 0.1 μM donde se indica y se iniciaron con el agregado de DTT (concentración final 0.2 mM). Los resultados fueron corregidos teniendo en cuenta el efecto del pH sobre la relación $(F_1 - F_0)/F_0$. (ver A4. Apéndice 1)

4.4 Análisis de la reducción de la di Ins-FTC por SDS-PAGE.

Cuando se reducen los enlaces disulfuro intercatenarios de la di Ins-FTC (masa molecular 6512 Da) se separan las cadenas A (masa molecular 2729 Da) y B (masa molecular 3789 Da). Utilizando la técnica de SDS-PAGE desarrollada por Schägger & von Jagow (1987) para separar polipéptidos de baja masa molecular, se analizó la movilidad electroforética de la di Ins-FTC y sus productos de reducción. Se observó que luego de reducirse el reactivo, aparecen dos bandas (correspondientes a las cadenas A y B), pero por razones que aun se desconocen, una de ellas migró como si su masa molecular fuera mayor. Comparando con la movilidad de las cadenas A y B de la insulina y de sus correspondientes $-\text{[Cys-SO}_3^-]$ -derivados, se estableció que el polipéptido que migró anormalmente correspondía a la cadena A, mientras que el otro se comportaba como la cadena B. Además, la banda correspondiente a la cadena A fue teñida muy débilmente por el Coomassie blue. (Figura 15)

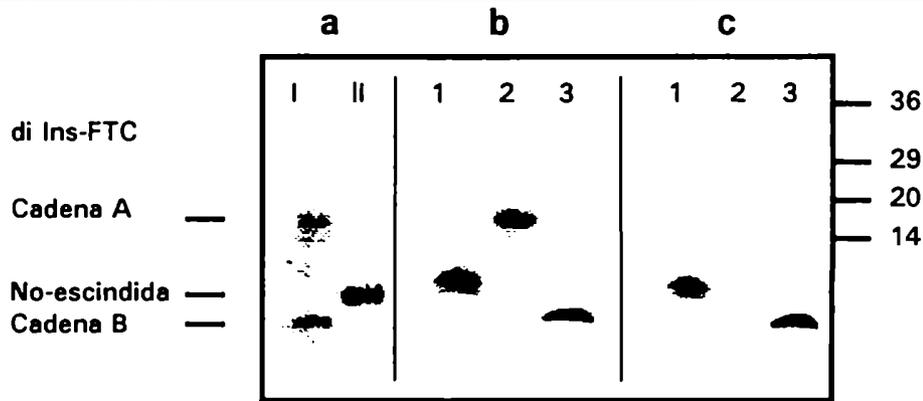


Figura 15: Análisis por SDS-PAGE de la di Ins-FTC y los productos de su reducción con DTT. a) Línea I: se incubó la di Ins-FTC (11 μg) con DTT 10 mM por 60 minutos y se detuvo la reacción con iodoacetamida 40 mM. Línea II: di Ins-FTC (8 μg). b) La di Ins-FTC (13.5 μg) y sus productos de reducción (36 μg) se purificaron por HPLC de fase reversa (C4). Línea 1: di Ins-FTC, línea 2: cadena A-FTC, línea 3: cadena B-FTC. Luego de la electroforesis, los gels se fotografiaron bajo iluminación UV con una película de polaroid y la imagen se digitalizó con un HP scanner. c) Luego de tomada la fotografía que se muestra en b), el gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue. Las masas moleculares de los estándares se indican en kDa.

Los productos de la reducción del reactivo se separaron por HPLC de fase reversa (C4) (Figura 16).

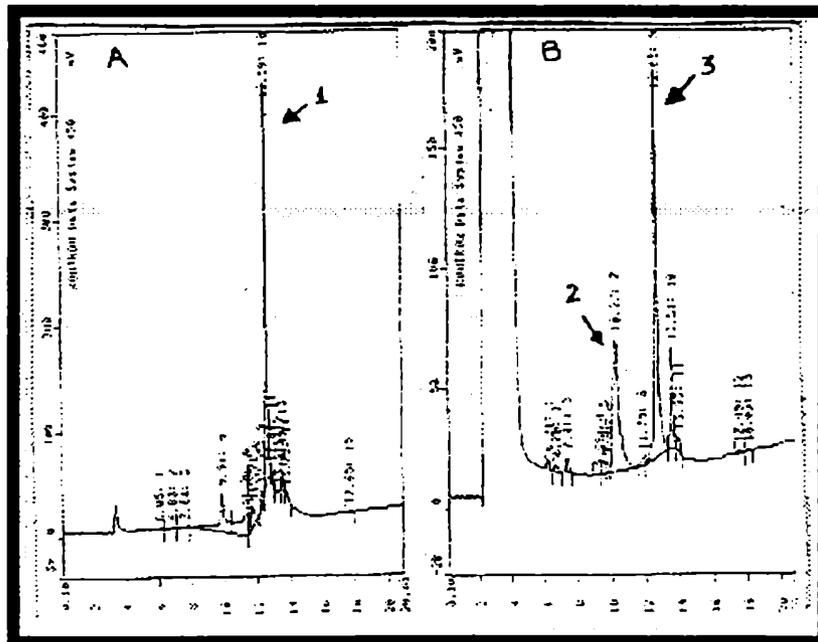


Figura 16: Perfiles cromatográficos (HPLC fase reversa) correspondientes a A) la di Ins-FTC y B) los productos de la reducción de la di Ins-FTC con DTT. Se registró la absorbancia a 280 nm. Los picos se analizaron por SDS-PAGE y los números corresponden a las líneas de la figura 15. La muestra disuelta en 20% (v/v) de buffer B en buffer A (ver 4.1), se sembró en la columna y se eluyó con un gradiente lineal de 20% a 70% (v/v) de buffer B en buffer A durante 20 minutos, manteniendo un flujo de 1 ml/min. Se registró la absorbancia a 220 nm.

El empleo de la técnica de SDS-PAGE no sólo permitió confirmar la sustitución de ambas cadenas de la insulina con FITC, sino también que la Trx acelera la reducción de los enlaces disulfuro de la di Ins-FITC con la correspondiente aparición de las cadenas A y B. (Figura 17)

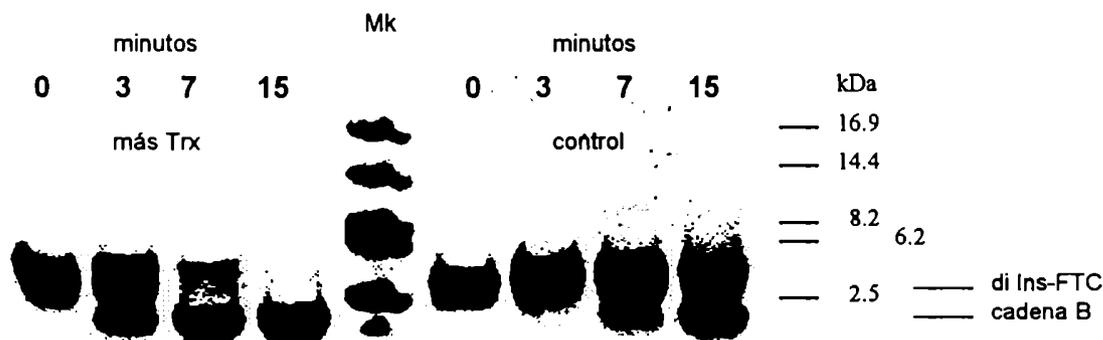


Figura 17: SDS-PAGE de alícuotas correspondientes a distintos tiempos de la reducción de la di Ins-FITC por el DTT (concentración final 2 mM), en presencia y en ausencia de Trx (concentración final 1.2 μ M). El gel se tiñó con Coomassie Brilliant Blue.

5 La di Ins-FITC como reactivo analítico para determinar la actividad PDR.

5.1 Efecto de la concentración de DTT.

Se analizó el efecto de la concentración de DTT (entre 0.1 y 5 mM) en el proceso reductor de la di Ins-FITC a concentración de Trx constante. Como se observa en la figura 18a, la velocidad con que se redujo el reactivo aumentó con la concentración de reductor.

El mecanismo propuesto por Holmgren (1979) para la reducción de la insulina dio base a un modelo para la de reducción de la di Ins-FITC (Ver Apéndice 1). Este modelo incorpora una especie intermediaria cuya fluorescencia es menor que la del reactivo, y permite explicar y predecir el comportamiento y de la variación temporal de fluorescencia observada.

Si bien el DTT reduce a la Trx 1000 veces más rápido que a la di Ins-FITC, la reducción química del reactivo adquiere importancia a concentraciones altas de DTT. (Figura 18b)

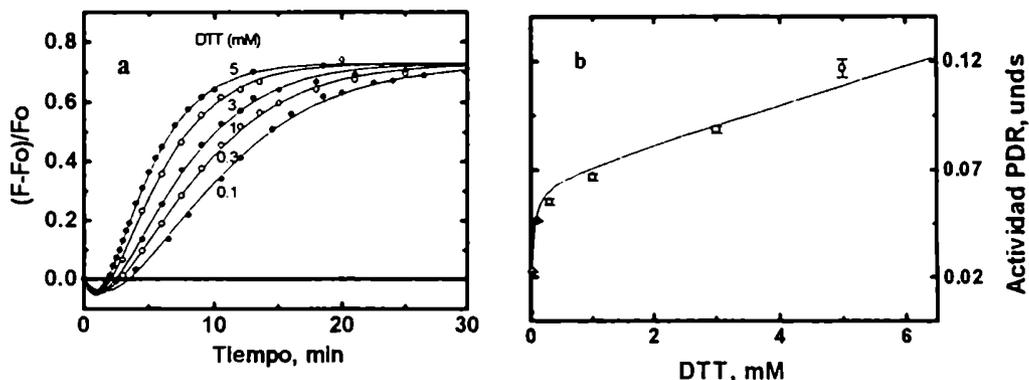


Figura 18: Efecto de la concentración de DTT en la reacción de reducción de la di Ins-FTC catalizada por tiorredoxina. a) La reacción se efectuó en un volumen final de 2 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 3mM, di Ins-FTC 0.7 μ M y Trx 70 nM. La reacción se inició con el agregado de DTT. b) Actividad PDR. Los símbolos representan las velocidades máximas de incremento de fluorescencia y los errores están dentro del 4%. Las líneas llenas que unen los puntos experimentales corresponden a los valores obtenidos utilizando el modelo descrito en el Apéndice 1, ecuaciones 8 y 23.

Para optimizar la medición de actividad PDR, se debe minimizar la reducción química utilizando una baja concentración de DTT. Sobre la base de los datos presentados en las figuras 13 y 18, la concentración óptima de DTT se encuentra entre 0.1 y 0.5 mM a pH 7.5.

5.2 Definición de actividad.

A un pH determinado y a una dada concentración de DTT, la pendiente máxima en el aumento de fluorescencia correlaciona con la velocidad máxima de formación del producto. Bajo estas condiciones, la aparición de 1 micromol de producto en 1 minuto por litro de solución, corresponde a una unidad enzimática. (Ver A.4 en apéndice 1)

5.3 Efecto de la concentración de la Trx.

Utilizando una concentración de DTT de 0.1 mM, el incremento en la concentración de Trx es acompañado por el incremento en la velocidad de reducción de la di Ins-FTC. (Figura 19)

El ensayo mostró una dependencia lineal entre la actividad PDR y la concentración de enzima por debajo de 200 nM. Aunque la correlación entre el aumento de actividad y la concentración de Trx se conservó por encima de 200 nM hasta un

valor de 500 nM, el proceso se apartó de la linealidad. Las causas de este comportamiento por el momento se desconocen.

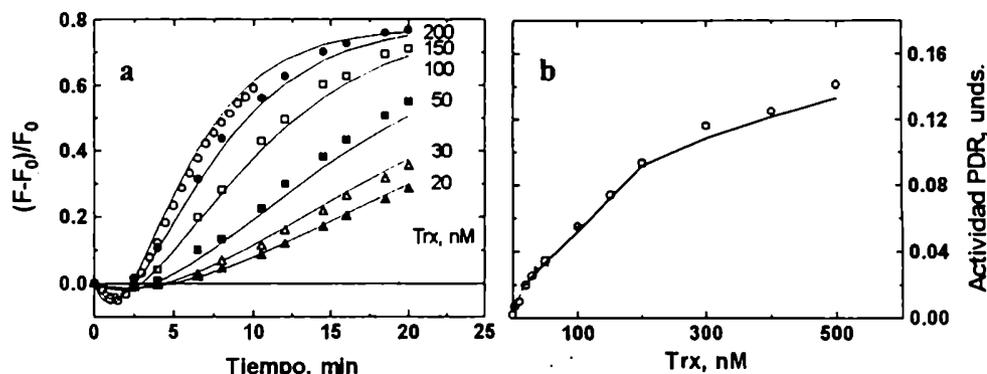


Figure 19: Efecto de la concentración de Trx en la reducción de la di Ins-FTC. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 2 ml conteniendo: buffer fosfato de potasio pH 7.5 100 mM, EDTA 3 mM, di Ins-FTC 0.7 μ M y Trx en la concentración indicada. La reacción se inició con el agregado DTT (concentración final 0.1 mM). a) Curvas de tiempo. Los símbolos son los valores experimentales medidos periódicamente. b) Actividad PDR. Los símbolos representan las velocidades máximas de incremento de fluorescencia y los errores están dentro del 7%. Las líneas llenas que unen los puntos experimentales corresponden a los valores obtenidos utilizando el modelo descrito en el Apéndice 1.

5.4 Especificidad del ensayo

Dentro de las variables que se pueden ajustar para modificar la especificidad del ensayo, las más relevantes son el reductor utilizado y el pH al cual se efectúa la reacción.

El glutatión no reduce a la Trx de *E. coli* en tanto lo hace con la glutarredoxina, la PDI y la DsbA. El uso de este tripéptido en el ensayo evitaría la interferencia de la Trx cuando se analizan otras PDR.

Por otra parte la actividad de la Trx de *E. coli* es mínima a pH inferiores a 6, pero la DsbA de *E. coli* es activa a pH ácidos

5.5 Comparación con el ensayo turbidimétrico

En relación al procesamiento utilizado ampliamente para la estimación de la actividad PDR (ensayo turbidimétrico) la figura 20 indica claramente que el ensayo desarrollado permitió:

- la detección de bajas concentraciones de Trx (mayor sensibilidad)
- en tiempos menores y

c) con cantidades menores de sustrato.

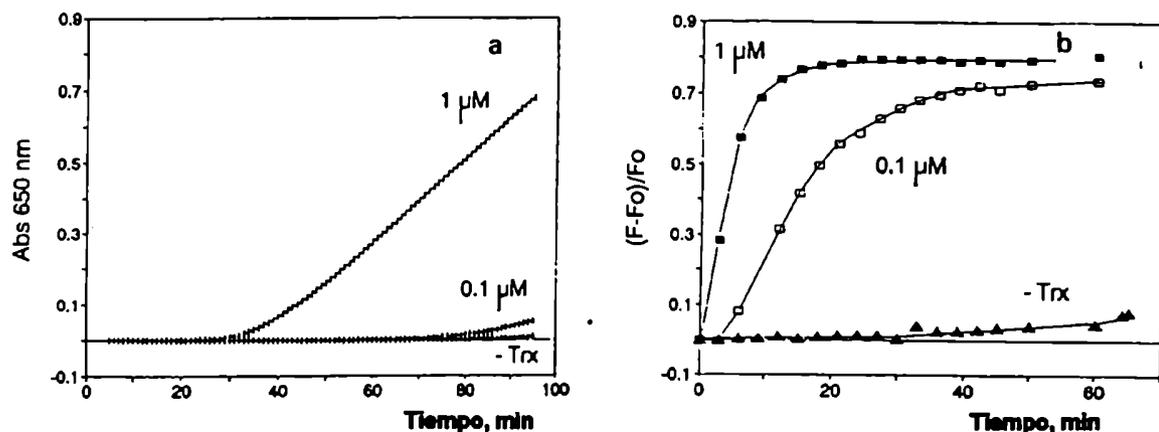


Figura 20: Comparación del ensayo turbidimétrico y el fluorescente. a) Aumento de la absorbancia a 650 nm. El ensayo se efectuó a 22 °C en un volumen final de 0.5 ml conteniendo buffer fosfato de potasio pH 6.6 100 mM, insulina 0.75 mg/ml, EDTA 2 mM y Trx en la concentración indicada. Se inició la reacción mediante el agregado DTT (concentración final 0.33 mM). b) Aumento de la fluorescencia. El ensayo se efectuó a 22 °C en volumen final de 3 ml conteniendo buffer fosfato de potasio pH 7.5 100 mM, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.2 μM y Trx en la concentración indicada. Se inició la reacción por adición de DTT (concentración final 0.1 mM).

6 Conclusiones

En el presente trabajo se describió la síntesis y purificación de los derivados fluorescentes de la insulina y se analizó su empleo como sustratos para un ensayo espectrofluorométrico de la actividad PDR. De los tres compuestos sintetizados (mono, di y tri Ins-FTC), el disustituído presentó la mayor variación en la señal fluorescente cuando se incubó con DTT. Además, la velocidad de esta variación aumentó con el incremento de la concentración del reductor. Por otra parte, la Trx de *E. coli* aceleró el aumento en la fluorescencia cuando se utilizó bajas concentraciones de DTT (0.1 mM). Sobre esta base, la di Ins-FTC constituía un potencial sustrato para el desarrollo de un método de medición de la actividad PDR. En consecuencia, se optimizó la síntesis de este derivado y los sitios de unión de la FITC a la insulina fueron caracterizados por diversas técnicas.

El estudio detallado de este proceso, donde se analizó el efecto de la concentración del reductor y de la enzima, mostró que la señal fluorescente ocasionada por la reducción de los enlaces disulfuro intercatenarios de la di Ins-FTC presenta un

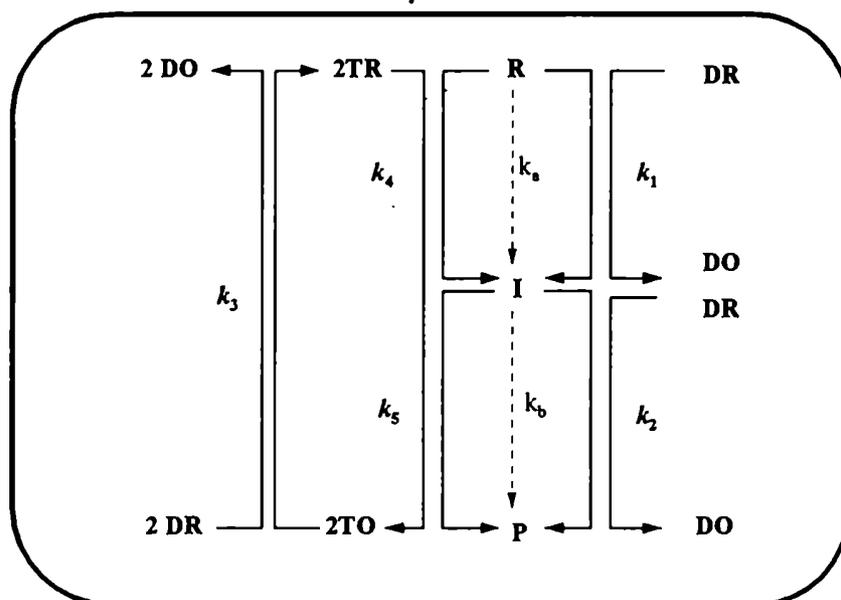
comportamiento bifásico. El incremento en la señal que correlaciona con el incremento en la concentración del reductor y de la enzima, es precedido por una leve disminución en la fluorescencia. Para explicar este comportamiento, se desarrolló un modelo secuencial para la reacción, que considera la existencia de una especie intermediaria de menor fluorescencia que la del reactivo, y un producto final de mayor fluorescencia. Este modelo no sólo permitió explicar la señal observada durante la reducción de la di Ins-FTC, sino que permitió predecir su comportamiento para una dada concentración de DTT y de Trx.

Al comparar el método desarrollado con el ensayo turbidimétrico, se observó claramente que el procedimiento fluorométrico no sólo fue 10 veces más sensible sino requirió tiempos experimentales más cortos.

Por lo tanto la di Ins-FTC, no sólo constituye un reactivo apropiado para la medición de la actividad PDR, sino que presenta considerables ventajas sobre los procedimientos desarrollados con anterioridad.

APENDICE 1**A.1 Aproximación al mecanismo de reducción de la di Ins-FTC.**

Sobre la base de lo discutido anteriormente, en la reducción de la di Ins-FTC participarían tres especies (R, I y P) con características fluorescentes distintivas. La reducción química implica una interacción directa del DTT con estas especies, en tanto que la reducción bioquímica es mediada por la Trx. Sobre esta base, el esquema general es:



Esquema para la reacción de reducción de la di Ins-FTC en presencia de tioredoxina. DR= DTT reducido, DO= DTT oxidado, TR= Trx reducida, TO= Trx oxidada, R= di Ins-FTC, I= intermediario, P= di Ins-FTC reducida.

La velocidad de desaparición del reactivo está dada por

$$v_R = -\frac{d[R]}{dt} = k_1 \times [DR] \times [R] + k_4 \times [TR] \times [R]$$

$$v_R = (k_1 \times [DR] + k_4 \times [TR]) \times [R]$$

si establecemos que $k_a = k_1 \times [DR] + k_4 \times [TR]$ (1)

entonces $v_R = k_a \times [R]$

Por otra parte, la velocidad de aparición de producto esta dada por

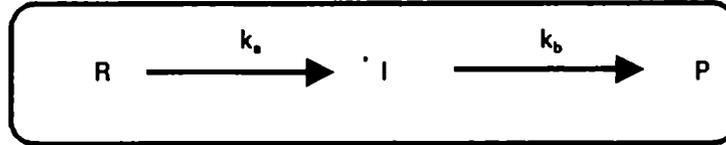
$$v_p = \frac{d[P]}{dt} = k_2 \times [DR] \times [I] + k_3 \times [TR] \times [I]$$

$$v_p = (k_2 \times [DR] + k_3 \times [TR]) \times [I]$$

si establecemos que $k_b = k_2 \times [DR] + k_3 \times [TR]$ (2)

entonces $v_p = k_b \times [I]$

Utilizando las constantes aparentes k_a y k_b , el esquema se reduce a



De manera que asumiendo un mecanismo secuencial para la reducción del reactivo (Frost & Pearson 1961), la concentración temporal de las especies estará dada por

$$[R]_t = [R]_0 \times e^{-k_a t} \quad (3)$$

$$[I]_t = [R]_0 \times \left(\frac{k_a}{k_b - k_a} \right) \times (e^{-k_b t} - e^{-k_a t}) \quad (4)$$

$$[P]_t = [R]_0 \times \left\{ 1 + \left(\frac{1}{k_a - k_b} \right) \times (k_b \cdot e^{-k_a t} - k_a \cdot e^{-k_b t}) \right\} \quad (5)$$

Tanto para el reactivo (datos no mostrados) como para el producto (c.f. Figura 12a), la intensidad de fluorescencia es linealmente dependiente de la concentración de di Ins-FTC (a concentraciones inferiores a 1 μ M). Asumiendo que lo mismo se cumple para el intermediario, podemos escribir

$$F_0 = q_1 \cdot [R]_0 \quad (6)$$

$$F = q_1 \cdot [R]_t + q_2 \cdot [I]_t + q_3 \cdot [P]_t \quad (7)$$

donde q_1 , q_2 y q_3 son las constantes de proporcionalidad que relacionan la intensidad de fluorescencia inicial (F_0) y al tiempo t (F) con la concentración de las especies.

Combinando (3), (4), (5), (6) y (7) se obtiene

$$\frac{F - F_0}{F_0} = e^{-k_a t} + \frac{q_2}{q_1} \times \left(\frac{k_a}{k_b - k_a} \right) \times (e^{-k_a t} - e^{-k_b t}) + \frac{q_3}{q_1} \times \left\{ 1 + \left(\frac{1}{k_a - k_b} \right) \times (k_b \cdot e^{-k_a t} - k_a \cdot e^{-k_b t}) \right\} - 1 \quad (8)$$

El ajuste computacional de las curvas de $(F - F_0)/F_0$ vs tiempo (Figuras 18 y 19),

permite obtener el valor de las constantes aparentes en función de la concentración de DTT y Trx. Conocida la relación de k_a y k_b con las constantes de velocidad (k_1 a k_5 en el esquema general), el ajuste de las curvas de k_a y k_b vs concentración de DTT (manteniendo la concentración de Trx constante) conduce a estimar los valores de k_1 , k_2 , k_4 y k_5 . Finalmente, el modelo secuencial permite describir como aumenta la intensidad de fluorescencia con el tiempo de reducción y relacionar este incremento con los micromoles de producto formados. Sobre esta base será factible definir la actividad PDR en unidades convencionales.

A.2 Estimación de las constantes aparentes de velocidad

Utilizando una concentración constante de Trx (70 nM) y variando la concentración de DTT (0.03 mM a 5 mM), se midió $(F-F_0)/F_0$ en función del tiempo de reacción. Empleando la ecuación (8), se ajustaron los datos experimentales mediante el procedimiento de cuadrados mínimos no lineal. (Johnson 1994)

Dado que las constantes de proporcionalidad q_1 , q_2 y q_3 varían ligeramente con la concentración de DTT o Trx, los cocientes q_2/q_1 y q_3/q_1 se utilizaron como variables, en el primer ajuste. Se promedió el valor obtenido para estas constantes y con el mismo se recalculó k_a y k_b para cada concentración de DTT. (Figura A1)

A.3 Estimación de las constantes de velocidad

La concentración de DTT empleada ($\geq 30 \mu\text{M}$) es mucho mayor que la concentración de Trx ($0.07 \mu\text{M}$) y de di Ins-FTC ($0.7 \mu\text{M}$) por lo que se consideró que

$$[\text{DR}] = [\text{DTT}]_{\text{total}} \quad (9)$$

Suponiendo que la concentración de tiorredoxina reducida alcanza el estado estacionario durante la reacción

$$\frac{d[\text{TR}]}{dt} = 0 = k_3 \times [\text{DR}] \times [\text{TO}] - (k_4 \times [\text{R}] + k_5 \times [\text{I}]) \times [\text{TR}] \quad (10)$$

con

$$[\text{TO}] = T_t - [\text{TR}] \quad (11)$$

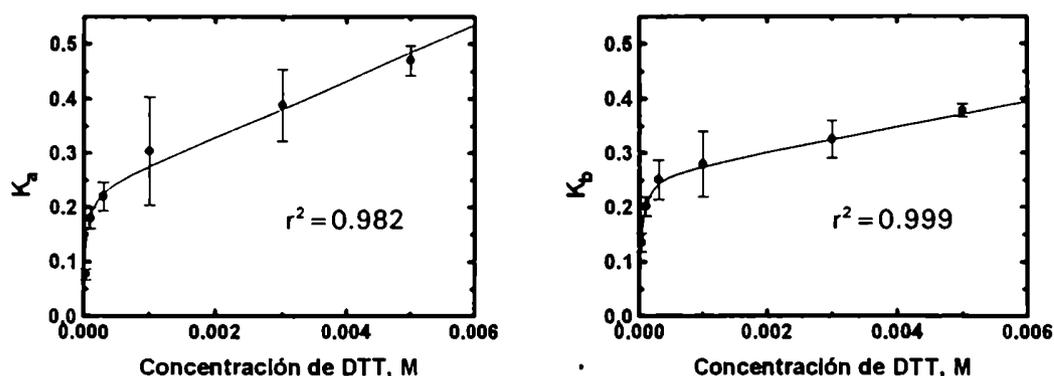


Figura A1: Valores para las constantes aparentes obtenidas mediante ajuste por cuadrados mínimos no lineal. Se empleó la ecuación (8) utilizando como variables de ajuste a k_a y k_b y fijando las constantes promediadas q_2/q_1 y q_3/q_1 en 0.680 y 1.726 respectivamente. Para el ajuste se utilizaron conjuntamente los valores correspondientes a dos ensayos independientes efectuados como se describe en la figura 18. Las barras de error indican el rango donde la probabilidad de encontrar al valor verdadero para la constante es del 95%. Las líneas llenas corresponden a los valores ajustados para las ecuaciones 13 y 14. Sobre los gráficos se indica el coeficiente de correlación cuadrático obtenido en cada ajuste.

Reemplazando (11) en (10) y despejando [TR] obtenemos

$$[TR] = \frac{k_3 \times [DR] \times T_i}{k_3 \times [DR] + k_4 \times [R] + k_5 \times [I]} \quad (12)$$

Sustituyendo (12) en (1) y en (2) y reordenando queda

$$k_a = \frac{\{k_3 \cdot k_4 \cdot T_i + k_1 \cdot (k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I])\} \times [DR] + k_3 \cdot k_1 \cdot [DR]^2}{k_3 \cdot [DR] + (k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I])} \quad (13)$$

$$k_b = \frac{\{k_3 \cdot k_5 \cdot T_i + k_2 \cdot (k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I])\} \times [DR] + k_3 \cdot k_2 \cdot [DR]^2}{k_3 \cdot [DR] + (k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I])} \quad (14)$$

En estudios previos Holmgren (1979) determinó que k_3 para la Trx era $96000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Por otra parte, dado que las concentraciones de R e I sólo pueden tomar valores entre $[R]_0$ y 0, la única condición que debe cumplir $k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I]$ es ser menor o igual al valor máximo promedio que alcanzan k_4 y k_5 multiplicado por la concentración inicial de reactivo

$$k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I] = 3.85 \times 10^{-6} \cdot 0.7 \times 10^{-6} = 2.7 \text{ min}^{-1}$$

Utilizando estos valores se ajustaron los datos representados en la figura A1

mediante el análisis de cuadrados mínimos no lineal empleando las ecuaciones (13) y (14).

Los valores obtenidos fueron

$$\begin{aligned} k_1 &= (51 \pm 16) \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} & k_4 &= (3.3 \pm 0.6) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \\ k_2 &= (23 \pm 2) \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} & k_5 &= (3.7 \pm 0.1) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1} \end{aligned}$$

El modelo propuesto y las constantes derivadas del mismo permiten predecir el comportamiento de la fluorescencia en función del tiempo para una dada concentración de DTT. (c.f. las líneas llenas de la figura 18a)

Cabe destacar que las constantes de velocidad aparentes pueden cambiar durante el transcurso de la reacción porque varía la concentración de R e I. En este contexto el valor de 2.7 min^{-1} para $k_4 \cdot [R] + k_5 \cdot [I]$ es arbitrario pero su estimación permitió optimizar el tratamiento de los datos.

A.4 Equivalencia entre el cociente $(F-F_0)/F_0$ y los micromoles de producto formado.

La velocidad de una reacción se puede expresar como la velocidad con que cambia la concentración de cualquiera de las especies. Dado que la concentración de di Ins-FTC en el ensayo está por debajo de los límites de detección de las técnicas más comunes (HPLC, SDS-PAGE) no resulta sencillo cuantificar el reactivo o el producto en función del tiempo.

Una alternativa es utilizar el mecanismo secuencial propuesto y relacionar la velocidad con que incrementa la fluorescencia con la velocidad de aparición de producto predicha por el modelo.

Este análisis mostró que la velocidad de aparición de producto es máxima cuando la velocidad de incremento de fluorescencia es máxima. (Figura A2)

Así, el gráfico $(F-F_0)/(F_1-F_0)$ vs. tiempo permite relacionar directamente el aumento de fluorescencia con los micromoles de producto formados por litro de solución. Comparando los valores para el máximo incremento de fluorescencia y para la máxima velocidad de aparición de producto a distintas concentraciones de DTT (Tabla A1), se observó que sólo difieren en un 6%, por lo que corrigiendo esta diferencia

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{max} \times [R]_0 = 0.94 \times \left[\frac{d \frac{(F - F_0)}{(F_f - F_0)}}{dt} \right]_{max} \times [R]_0 \quad (20)$$

Dado que las derivadas respecto del tiempo en la ecuación (20) se refieren a las fracciones molares de los compuestos, se debe multiplicar por la concentración de reactivo utilizado ($[R]_0$) a cada lado de la ecuación y de esta manera los resultados quedan expresados en unidades de concentración.

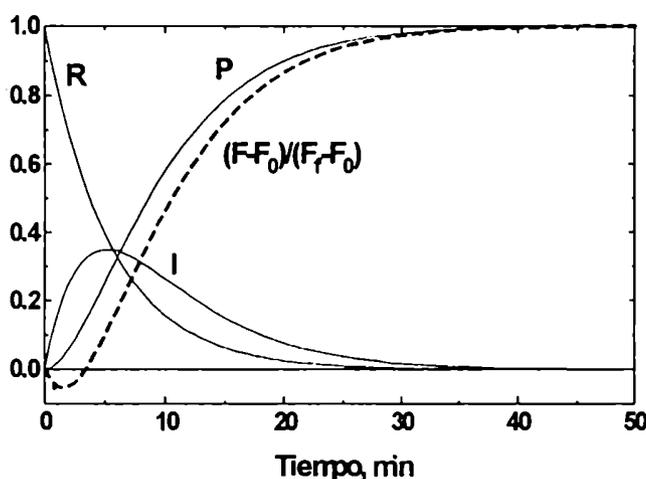


Figura A2: Cambio en la concentración de las distintas especies (líneas llenas) y de incremento relativo de fluorescencia (línea punteada) en función del tiempo de reacción según describe el modelo secuencial cuando la concentración de DTT es igual a 0.1 mM la concentración de Trx es igual a 70 nM.

Graficar de esta forma los valores de fluorescencia implica conocer el valor de F_f , para lo cual es necesario extender los tiempos de medición hasta obtener un valor constante de fluorescencia. Pero si se conocen los valores para las constantes de proporcionalidad que relacionan la fluorescencia inicial y final con la concentración de reactivo y producto (q_1 y q_3)

Tabla A1

Concentración de DTT en moles por litro.	Velocidad máxima de aparición de producto normalizada.	Velocidad máxima para el incremento relativo de fluorescencia normalizada.	Diferencia porcentual
0.0001	0.071	0.075	5.4
0.0003	0.086	0.090	5.1
0.001	0.100	0.106	5.9
0.003	0.127	0.136	6.4
0.005	0.151	0.162	6.5

$$F_0 = q_1 \times [R]_0 \quad (6) \quad \text{y} \quad F_f = q_3 \times [R]_0 \quad (21)$$

se obtiene

$$F_f = \frac{q_3}{q_1} \times F_0 \quad (22)$$

Esto permite detener la medición una vez que el incremento de la fluorescencia comienza a disminuir, y reemplazando (6) y (22) en (20) queda

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{max} \left(\frac{\mu mol}{min.l}\right) = [R]_b \times \left(\frac{0.94}{\left(\frac{q_3}{q_1} - 1\right)}\right) \times \left[\frac{d\left(\frac{F - F_0}{F_0}\right)}{dt}\right]_{max} \quad (23)$$

Para las condiciones empleadas en este trabajo, donde $(q_3/q_1 - 1) = 0.85$, la ecuación se reduce a

$$\left(\frac{dP}{dt}\right)_{max} \left(\frac{\mu mol}{min.l}\right) = [R]_b \times 1.3 \cdot 10^6 \times \left[\frac{d\left(\frac{F - F_0}{F_0}\right)}{dt}\right]_{max}$$

Donde la concentración de reactivo debe expresarse en moles por litro.

El valor $1.3 \cdot 10^6$ corresponde a la reacción efectuada a pH 7.5. Cuando se varía el pH de la misma, los valores para $(q_3/q_1 - 1)$ deben corregirse utilizando la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{q_3}{q_1} - 1\right) = -0.097 \times pH + 1.65 \quad (24)$$

según se obtuvo en 4.3.3 (Figura 14a).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Bromer W.W., Sheehan S.K., Berns A.W. & Arquila E.R. (1967) *Biochemistry* **6**, 2378-2388
- Ellman G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77
- Frost A.A. & Pearson R.G. (1961) *Kinetics and Mechanism*. Second Edition. Wiley-Toppan Eds. Chapter 8: Complex-reactions.
- Holmgren A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9627-9632
- Holmgren A. & Reichard P. (1967) *Eur. J. Biochem.* **2**, 187-196
- Johnson M.L. (1994) *Meth. Enzymol.* **240** Part B, 1-22
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
- Luthman M. & Holmgren A. (1982) *Biochemistry* **21**, 6628-6633
- Maeda H. & Kawachi H. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **31**, 188-192
- Reuntimann, H., Straub B., Luisi P.L. & Holmgren, A. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 6796-6803
- Riddles P.W., Blakeley R.L. & Zerner B. (1980) *Meth. Enzymol.* **91**, 49-60
- Schägger H. & von Jagow G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**(2), 368-379
- Tietze F., Mortimore G.E. & Lomax N.R. (1962) *Biochem. Biophys. Acta* **59**, 336-346
- Tsibris J.C.M., Hunt L.T., Ballejo G., Barker W.C., Toney L.J. & Spellacy W.N. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13967-13970

LA REACCIÓN DE INTERCAMBIO
TIOL-DISULFURO EN PROTEÍNAS

BPTI.....	inhibidor de la tripsina pancreática bovina
CAPS.....	ác. 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico
CM.....	grupo carboximetil-
Con A.....	concanavalina A
DEAE.....	grupo dietilaminoetil-
di Ins-FTC.....	di Insulina-fluoresceintiocarbamilada
DsbA, B, C o D.....	proteín disulfuro oxidoreductasa A, B, C o D respectivamente, de <i>E. coli</i> .
DTNB.....	disulfuro de 3-carboxi-4-nitrofenilo, [ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) o reactivo de Ellman]
DTT.....	DL-2,3-dihidroxi-butano-1,4-ditiol, (ditiotreitól o reactivo de Cleland). La especie oxidada se indica con el supraíndice (ox).
EDTA.....	(etilendinitrilo)tetracetato de sodio ajustado a pH 8 (etilendiaminotetraacetato de sodio)
FBPasa.....	fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos
FPLC.....	cromatografía líquida rápida para biomoléculas
GSH.....	glutathion reducido
GSSG.....	glutathion oxidado
HPLC.....	cromatografía líquida de alto rendimiento
IAA.....	iodoacetamida
Lys-C.....	endoproteasa Lys-C de <i>Lyso bacter enzymogenes</i>
MES.....	ác. 2-[morfolino] etanosulfónico
β -Met.....	2-mercaptoetanol
MOPS.....	ác. 3-[N-morfolino] propanosulfónico
n.d.....	no determinado
NP-40.....	nonilfenoxi-polietoxietanol (no confundir con Nonidet que es octilfenoxi)
PDI.....	proteín disulfuro isomerasa
PDOR.....	proteín disulfuro oxidoreductasa
PDR.....	proteín disulfuro reductasa
PNGasa F.....	enzima péptido N-glicosidasa F
PVDF.....	difluoruro de polivinilideno
QAE.....	grupo dietil-2-hidroxi-propilaminoetil-
RE.....	retículo endoplásmico
RNAse.....	ribonucleasa A. Con supraíndice se indica la forma reducida (red) o "scrambled" (scr)
SDS-PAGE.....	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.
SDS.....	duodecilsulfato de sodio
TCA.....	anión tricloroacetato
TOx.....	Tiol oxidasa
Tris-HCl.....	2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol cuyo pH se ajustó agregando ácido clorhídrico.
Trx.....	tiorredoxina



INTRODUCCIÓN

<u>Propiedades químicas del grupo sulfhidrilo (SH)</u>	36
Ionización del grupo SH.....	36
Reacciones del grupo SH.....	37
Adición a dobles enlaces.....	37
Reacción con haloácidos y sus amidas.....	38
Reacción con óxido nítrico (NO).....	39
Reacción con iones metálicos.....	39
Oxidación del grupo SH.....	39
<u>Propiedades químicas del enlace disulfuro (-S-S-)</u>	40
Reacción con sulfito.....	40
Reacción con borohidruro.....	41
Reacción con fosfinas terciarias.....	41
<u>La reacción de intercambio tiol-disulfuro</u>	42
Constantes de equilibrio condicionales.....	44
Establecimiento de una escala redox.....	45
<u>El potencial redox celular</u>	47
<u>Tiorredoxinas</u>	49
El sistema NADP/Trx.....	49
El sistema Ferredoxina/Trx.....	51
<u>Glutarredoxinas</u>	52
<u>El intercambio tiol-disulfuro en el plegamiento de las</u> <u> proteínas</u>	53
<u>DsbA</u>	54
<u>DsbB</u>	55
<u>DsbC</u>	55
<u>DsbD</u>	56
<u>Protein disulfuro isomerasa</u>	56
Estructura.....	57
Acción de la PDI.....	58
Formación de los enlaces disulfuro (oxidación).....	58
Rearreglo de los enlaces disulfuro (isomerización).....	58
Escisión de los enlaces disulfuro (reducción).....	58
Eficiencia catalítica.....	59
Sitio de unión a péptidos.....	59

Función chaperona.....	60
La PDI y el ambiente del lumen del RE.....	60
La naturaleza del oxidante.....	60
Multifuncionalidad.....	61
La PDI en los vegetales.....	61
<u>La superfamilia de las Trx.....</u>	<u>63</u>

Propiedades químicas del grupo sulfhidrilo (SH)

El estudio de moléculas pequeñas que poseen tioles ha jugado un rol importante en el desarrollo de los conocimientos acerca de la química del grupo SH en las proteínas. Sin embargo hay que tener en cuenta que los grupos SH en las proteínas poseen características diferentes a las que presentan los tioles en compuestos pequeños, haciendo muchas veces difícil extrapolar los resultados (Gilbert 1990). Por ello se describirán las propiedades del grupo SH tanto en moléculas pequeñas como en proteínas. De esta manera, luego se considerarán las reacciones utilizadas en el estudio de la química de los tioles en proteínas, como así también las reacciones que podrían estar involucradas en los procesos fisiológicos dentro de la célula.

Ionización del grupo SH

En la mayoría de las reacciones, el grupo SH actúa en su forma ionizada, tiolato (RS⁻). Por esto, para estimar la reactividad de los grupos SH en las proteínas es importante conocer a que pH se ionizará este grupo.

En los compuestos pequeños, el pKa de los tioles varía entre 8 y 10 (Tabla I), y puede modificarse por la presencia de grupos cargados en las cercanías del tiol (Torchinsky 1981).

Tabla I

Compuesto	pKa
β-Mercaptoetanol ¹	9.6
Ditiotreitol ²	9.2-10.1
Glutation ¹	8.9
L-cisteína ¹	8.4

¹ (Keire *et al* 1992). ² (Rothwarf & Scheraga 1992).

En las proteínas, el valor del pKa de los tioles varía dentro de amplios límites afectado por una variedad de factores. El arreglo espacial del SH dentro de la proteína es uno de ellos. Un SH oculto en el interior hidrofóbico de una proteína, donde no hay posibilidades de interaccionar con el solvente, esta caracterizado por

un pKa mayor que el observado cuando está expuesto en la superficie de la molécula (Torchinsky 1981). Como ejemplo podemos citar los valores de pKa para la Cys30 expuesta y la Cys 33 oculta de la proteína bacteriana DsbA (ver adelante), que son de 3.4 y 9.5 respectivamente. (Nelson & Creighton 1994, Hennecke *et al* 1997)

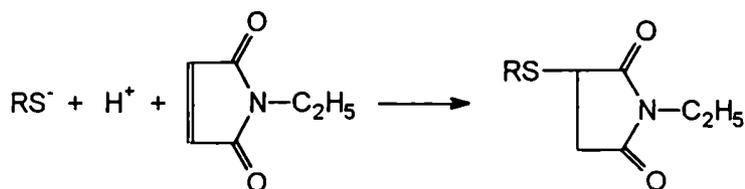
Otro factor importante que influye en las constantes de ionización del grupo SH en las proteínas es la influencia electrostática de las cargas de los grupos vecinos (Gane *et al* 1995, Grauschopf *et al* 1995). La presencia de grupos con carga positiva disminuye el pKa del tiol mientras que la presencia de cargas negativas incrementa el pKa del grupo SH de las cisteínas (Torchinsky 1981). El efecto del Asp26 y la Lys57 en la reactividad de la Trx de *E. coli* constituye un claro ejemplo de lo antedicho (Dyson *et al* 1997). La polaridad (momento dipolar) de las alfa-hélices en la estructura proteica también puede afectar el pKa del grupo SH (Kortemme & Creighton 1995). Este es el caso de la cisteína 32 en la Trx de *E. coli*, cuyo pKa alcanzaría un valor cercano a 7 (Jeng *et al* 1994). Sin embargo, en contraposición con las consideraciones anteriores, Takahashi & Creighton (1996) observaron que ambas cisteínas del sitio activo de la Trx de *E. coli* tendrían un pKa de 9-10 y la ionización de estas cisteínas no estaría ligada fuertemente a ningún otro grupo.

Reacciones del grupo SH (Torchinsky 1981, Jocelyn 1972)

Adición a dobles enlaces

Los tioles poseen la habilidad de adicionarse a dobles enlaces polarizados o fácilmente polarizables en compuestos como acrilonitrilo, acrilamida, ác. maleico, N-etilmaleimida, vinil sulfonas, etc. Estas reacciones son irreversibles y como regla, proceden más rápido en medio alcalino, hecho que indica la participación del ion tiolato.

La N-etilmaleimida (NEM) ha sido ampliamente utilizada en el estudio del grupo SH en proteínas

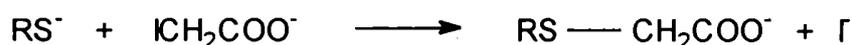


La velocidad de reacción de la NEM con la cisteína u otros tioles incrementa marcadamente con el aumento de pH. La NEM no sólo reacciona con los grupos SH, sino también con los grupos imidazol de la histidina y los grupos α -amino de aminoácidos y péptidos. Esto se evita trabajando a pH neutro (6-7) y sin grandes excesos de NEM, donde la alquilación de los grupos amino no ocurre o tiene lugar de manera extremadamente lenta. Sin embargo, no se puede descartar a priori que la NEM pueda reaccionar con algún grupo amino que posea una alta reactividad.

Se encontró que el enlace peptídico formado por el grupo carboxilo de la Cys modificada con NEM y el siguiente aminoácido en una proteína, puede ser escindido cuantitativamente por la quimotripsina.

Reacción con haloácidos y sus amidas

La alquilación de grupos tioles puede lograrse utilizando compuestos que contengan un grupo halogenuro de alquilo, (ion iodoacetato, iodoacetamida). La velocidad de reacción del tiol con estos compuestos aumenta con el incremento del pH, indicando la participación del anión RS^- . Los grupos SH de menor pKa reaccionarán más rápidamente que los de pKa mayores. La reacción aparentemente procede mediante un ataque nucleofílico tipo SN_2 del ion RS^- al carbono metilénico del haloácido liberando el ion haluro



El aislamiento de intermediarios de plegamiento de proteínas que poseen disulfuros, puede realizarse por bloqueo rápido e irreversible de todos los grupos tioles de la solución con estos reactivos. Un tiol accesible en una proteína reacciona a pH 8.7 y 25 °C con una constante de velocidad de aproximadamente $10 \text{ seg}^{-1}M^{-1}$, por lo que el tiempo medio de reducción con 0.2 M iodoacetato debería ser de 0.3 segundos (Creighton 1986).

La iodoacetamida reacciona con los grupos SH de la N-acetilcisteína más rápido que el iodoacetato. En el caso del iodoacetato, la presencia de una carga negativa puede afectar la reactividad del compuesto si en las cercanías del grupo SH hay grupos cargados.

Los haloácidos y sus amidas pueden reaccionar también con el grupo tioéter de la

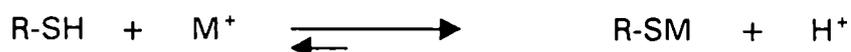
metionina, con la forma no protonada del anillo imidazol y con los grupos fenólicos y carboxílicos de las proteínas. Aunque estas reacciones tienen lugar en condiciones más vigorosas (alta concentración de reactivo, alta temperatura, etc.) que aquellas en las que participan los SH.

Reacción con óxido nítrico (NO) (Girard & Potier 1993)

El NO es una molécula-radical biatómica que posee un electrón desapareado, la cual puede considerarse como la molécula más pequeña disponible para transportar electrones. En condiciones apropiadas, el NO puede reaccionar con grupos tioles y disulfuros para formar S-nitroso compuestos, de manera más o menos reversible. La reacción de S-nitrosación y su reacción inversa podría representar una vía conveniente para almacenar, transportar y finalmente liberar NO. El NO puede unirse y liberarse por reacciones de intercambio tiol-disulfuro (ver adelante), por lo que podría considerarse como un inductor de rearrreglos en la proteína de forma duradera o reversible, dependiendo por ejemplo de las condiciones redox del medio.

Reacciones con iones metálicos

La reacción de iones metálicos con el grupo SH lleva a la formación de mercapturos



Estas reacciones son reversibles, pero el equilibrio está desplazado hacia la formación de los mercapturos. La afinidad de los iones divalentes decrece en el orden $\text{Hg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. Estos iones forman complejos más estables con aminotioles y ditiolos que con monotioles.

Oxidación del grupo SH

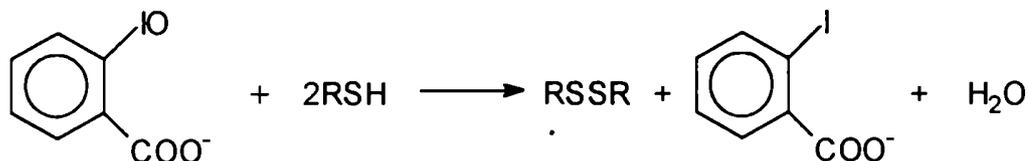
Los grupos SH de tioles pequeños y proteínas son oxidados bajo condiciones suaves con formación de disulfuros inter- o intramoleculares por la acción del iodo, ferricianuro, tetrationato, o-iodosobenzoato o peróxido de hidrógeno.



La desventaja de estos agentes oxidantes es que pueden oxidar otros aminoácidos

como tirosina, triptofano y metionina, dependiendo de la particularidad del sistema. Además, la oxidación puede conducir hasta estados más oxidados, con formación de sulfitos o sulfonatos.

De los reactivos mencionados, el más específico es el o-iodosobenzoato, cuya interacción con los SH a pH 7.0 procede de acuerdo con la siguiente ecuación



Los grupos SH también son oxidados por el oxígeno del aire de manera espontánea (autooxidación). Esta reacción está facilitada por la presencia de cantidades catalíticas de iones metálicos, especialmente cobre e hierro. Por ello, el agregado de agentes quelantes como el EDTA disminuye la velocidad de la oxidación aeróbica.

La velocidad y el carácter de la oxidación de los grupos SH depende de los potenciales de oxido-reducción relativos del grupo SH y del agente oxidante, de la concentración del reactivo, del pH y de la temperatura. Un factor importante es el arreglo espacial del grupo SH en la proteína. Cuando el contacto entre grupos SH dentro de una molécula proteica está impedido o cuando la proteína posee sólo un grupo SH, no se forman enlaces disulfuro intramoleculares. Sin embargo, bajo condiciones estéricas favorables, puede ocurrir la formación de enlaces disulfuro intermoleculares.

Grupos SH aislados o restringidos estéricamente pueden ser oxidados a ácido sulfénico, sulfínico o sulfónico dependiendo del agente oxidante.

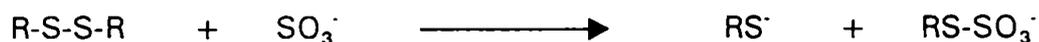
En general, los grupos SH de mayor pKa son oxidados más lentamente que los grupos con menor pKa. Esta observación indicaría que el ion tiolato es oxidado más fácilmente que su forma no disociada.

Propiedades químicas del enlace disulfuro (-S-S-). (Torchinsky 1981, Jocelyn 1972)

Reacción con sulfito

La acción del sulfito en el enlace disulfuro produce una cisteína y una cisteína-S-

sulfonato



A $\text{pH} \geq 9$ la reacción disulfuro/sulfito es un proceso bimolecular reversible, a pH menores el mecanismo es complejo. La velocidad de reacción depende en gran medida de la presencia de grupos cargados cerca del enlace disulfuro. Cargas negativas inhiben la reacción, mientras que cargas positivas incrementan la velocidad. En este contexto, la existencia de condiciones estéricas favorables es necesaria para el ataque nucleofílico del SO_3^{2-} al enlace disulfuro.

El grupo SH que proviene de la ruptura del grupo -S-S- por sulfito es frecuentemente inestable y puede ser oxidado por el oxígeno atmosférico. Para la obtención de un producto final estable en la forma de una S-sulfoproteína, la reacción debe llevarse a cabo en presencia de oxidantes suaves como ion Cu^{2+} , o-iodosobenzoato o tetrionato. El ciclo de oxidación reducción continua hasta que todos los disulfuros en la proteína son convertidos en dos grupos tiosulfonato

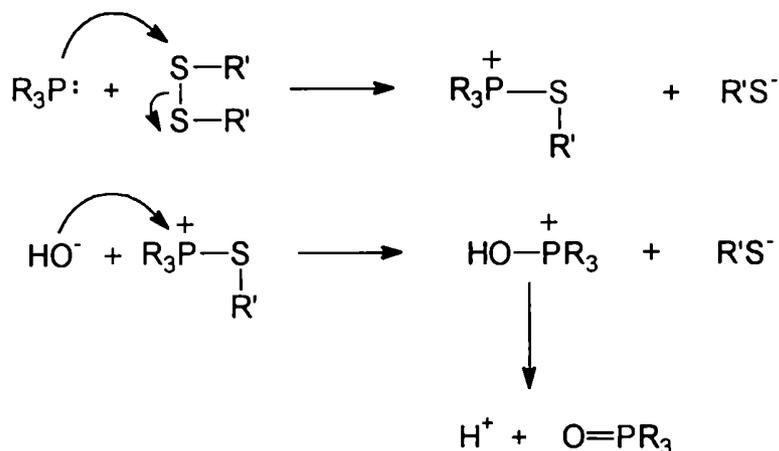


Reducción con borohidruro

La reducción por borohidruro presenta las siguientes ventajas: 1) el exceso de reactivo puede destruirse fácilmente bajando el pH de la solución, 2) el grado de reducción puede estimarse fácilmente utilizando el reactivo de Ellman, 3) la ausencia de tioles en el medio evita las complicaciones que acarrear las reacciones de intercambio tiol-disulfuro. Disminuyendo la concentración de NaBH_4 a 0.1 M y realizando la reacción en frío en presencia de EDTA, disminuye notablemente el peligro de clivaje en los enlaces peptídicos que varios autores han señalado.

Reducción por fosfinas terciarias (Rüegg & Rudinger 1977)

La modificación del enlace disulfuro con trialquilfosfinas procede aparentemente de acuerdo con el siguiente mecanismo



La reacción presenta las siguientes ventajas: 1) Estequiometría: 1 mol de tributilfosfina (PBU₃) reduce 1 mol de disulfuros, 2) Cuantitatividad: con un 5-20% de exceso molar de PBU₃, los péptidos y proteínas son reducidos completamente sin necesidad de agregar agentes desnaturalizantes como urea o cloruro de guanidinio (excepto que la proteína reducida precipite), 3) Rapidez, 4) Especificidad: con un exceso de diez veces de PBU₃ sobre los disulfuros proteicos, no se modifican otros residuos distintos de cisteína, 5) Compatibilidad con agentes alquilantes: las fosfinas y el óxido resultante no reaccionan con la 4-vinilpiridina, pudiéndose agregar simultáneamente el reactivo reductor y el alquilante en la solución. El ác. iodoacético y su amida reaccionan con PBU₃ transformando a la alquilfosfina a su sal de fosfonio cuaternaria, menos reactiva.

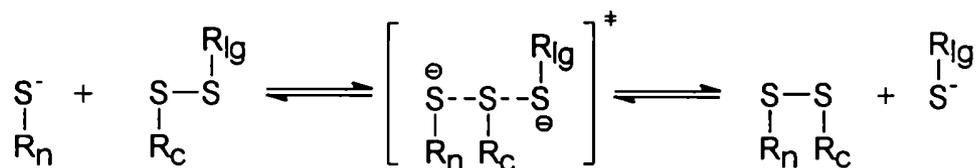
La reacción de intercambio tiol-disulfuro

Intracelularmente, las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son importantes en la distribución entre sus formas reducida y oxidada del glutation, la coenzima A, la cisteína y los enlaces disulfuro de proteínas. En las proteínas, el estado de oxidación de las cisteínas determinará su funcionalidad y estructura. Proteínas como la Ribonucleasa A (RNAsa A), el inhibidor de tripsina de páncreas bovino (BPTI) o la lisozima son activas en el estado oxidado (disulfuros formados). Por el contrario, la glucosa 6-P-deshidrogenasa, la fosfofructoquinasa o la fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos son activas cuando grupos sulfhidrilos específicos están en el estado reducido. Resulta evidente que los cambios en el estado de oxidación de las cisteínas en las proteínas constituyen un mecanismo regulatorio

de su actividad (Ziegler 1985).

La mayoría de las cisteínas que poseen las proteínas extracelulares se encuentran formando enlaces disulfuro debido a la presencia de agentes oxidantes en el ambiente. En contraste, el ambiente "reductor" del citoplasma celular disminuye la tendencia a formar enlaces disulfuro en las proteínas. Como en toda generalización hay excepciones, por lo que se pueden observar en las proteínas tanto tioles extracelulares como disulfuros intracelulares (Gilbert 1990).

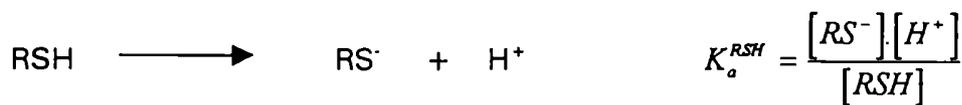
Mecanísticamente, el intercambio tiol-disulfuro ocurre por el desplazamiento nucleofílico de un anión tiolato de un disulfuro $[R_gS^-]$ causado por otro anión tiolato atacante $[R_nS^-]$

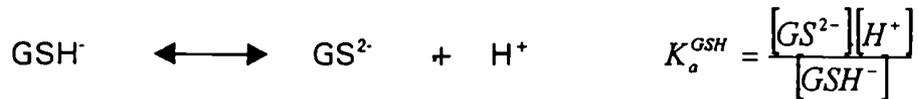


Cuando un ion tiolato ataca un disulfuro asimétrico (R_cSSR_g), el tiol liberado será el que posea el menor pKa (Szajewski & Whitesides 1980).

Basándonos en los estudios realizados con tioles pequeños, puede predecirse la reactividad de un tiol en determinada molécula. Pero en el caso de las proteínas, los efectos de carga, estéricos y de interacción entre cadenas de aminoácidos hacen imposible poder estimar la reactividad de un tiol o un disulfuro proteico. Cada caso debe tratarse individualmente.

Si se considera al par glutation reducido (GSH^-)/glutacion oxidado ($GSSG^{2-}$) como el principal buffer redox tiol-disulfuro en la célula, la distribución de tioles intracelulares entre sus formas tiol, disulfuro y disulfuro mixto dependen de su potencial de media celda al pH y temperatura intracelular, de la dinámica de la reacción de intercambio tiol-disulfuro con el glutacion y del potencial redox celular. Las reacciones correspondientes con el glutacion pueden escribirse como





donde k_1 , k_{-1} , k_2 y k_{-2} son constantes de velocidad que no dependen del pH de la solución. K_1 y K_2 son las constantes de equilibrio independientes del pH para cada reacción (Keire *et al* 1992).

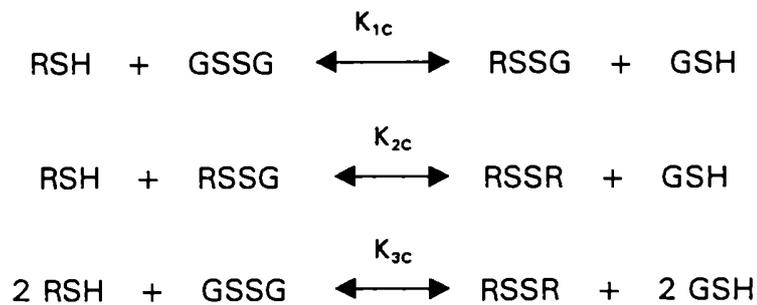
Constantes de equilibrio condicionales

Como no es fácil conocer exactamente la concentración de las especies ionizadas, es más conveniente utilizar constantes condicionales que permiten trabajar con las concentraciones totales de los reactivos.

Estas constantes condicionales se relacionan con las constantes independientes del pH a través de α_2 y α_3 , que expresan las fracciones de GSH y RSH, respectivamente, que se encuentran en la forma tiolato.

$$\alpha_2 = \frac{K_a^{\text{GSH}}}{K_a^{\text{GSH}} + [\text{H}^+]} \quad \alpha_3 = \frac{K_a^{\text{RSH}}}{K_a^{\text{RSH}} + [\text{H}^+]}$$

Sobre esta base, podemos plantear



$$K_{3c} = K_{1c} \cdot K_{2c} = \frac{[RSSR]_T \cdot [GSH]_T^2}{[RSH]_T^2 \cdot [GSSG]_T} \quad K_1 = K_{1c} \cdot \frac{\alpha_2}{\alpha_3} \quad K_2 = K_{2c} \cdot \frac{\alpha_2}{\alpha_3}$$

$$K_3 = K_1 \cdot K_2 = \frac{[RSSR] \cdot [GS^{2-}]^2}{[RS^-]^2 \cdot [GSSG^{2-}]} \quad K_3 = K_{3c} \cdot \left(\frac{\alpha_2}{\alpha_3}\right)^2$$

- Cuando K_a^{GSH} y K_a^{RSH} son $\ll [H^+]$

$$K_{1c} = K_1 \cdot \frac{K_a^{RSH}}{K_a^{GSH}} \quad K_{2c} = K_2 \cdot \frac{K_a^{RSH}}{K_a^{GSH}} \quad K_{3c} = K_3 \cdot \left(\frac{K_a^{RSH}}{K_a^{GSH}}\right)^2$$

- Cuando $[H^+] \cong K_a$ las constantes de equilibrio variaran con el pH si la $K_a^{GSH} \neq K_a^{RSH}$.

- Cuando $[H^+] \ll K_a^{GSH}$ y K_a^{RSH} , las constantes de equilibrio condicionales son iguales a las constantes definidas independientemente del pH (Keire *et al* 1992).

Establecimiento de una escala redox

Aunque cualquier par tiol-disulfuro puede utilizarse como buffer redox, el par GSH/GSSG fue considerado como el buffer redox estándar porque biológicamente es el más abundante (Meister & Anderson 1983). Esta reacción permite establecer una escala termodinámica para comparar los equilibrios de intercambio tiol-disulfuro.

Cuando el sistema analizado posee sólo un grupo sulfhidrilo, podemos escribir



La constante de equilibrio para esta reacción es

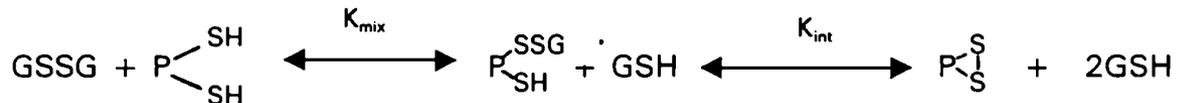
$$K_{mix} = \frac{[RSSG] \cdot [GSH]}{[RSH] \cdot [GSSG]}$$

donde K_{mix} representa la estabilidad termodinámica del disulfuro mixto comparada con la estabilidad del GSSG, (cuando RSH es GSH, la constante de equilibrio es 1 por definición). Cuanto más estable sea el disulfuro mixto comparado con el GSSG, mayor será el valor de la constante de equilibrio. K_{mix} es adimensional, por lo que el grado de formación del disulfuro mixto ($[RSSG]/[RSH]$) dependerá sólo de la constante de equilibrio (K_{mix}) y de la relación tiol/disulfuro del buffer redox ($R = [GSH]/[GSSG]$)

Si el sistema analizado posee dos grupos sulfhidrilos (como el caso de la formación

de enlaces disulfuro en proteínas), y estos grupos están lo suficientemente cercanos el uno del otro, el disulfuro mixto que se forma inicialmente es desplazado por una reacción intramolecular con el otro sulfhidrilo, llevando a la formación de un enlace disulfuro intramolecular.

La formación de un disulfuro intramolecular en un buffer redox de glutation se puede escribir como



donde

$$K_{\text{ox}} = K_{\text{int}} \cdot K_{\text{mix}}$$

Pero en la práctica, la reacción intramolecular es frecuentemente tan favorable que la concentración de las especies con disulfuros mixtos presentes en el equilibrio (intermediarios) son despreciables. Si estos intermediarios son ignorados,

$$K_{\text{ox}} = \frac{[\text{PS}_2] \cdot [\text{GSH}]^2}{[\text{P}(\text{SH})_2] \cdot [\text{GSSG}]}$$

Dado que K_{ox} es una constante condicional, su valor está condicionado al pH del medio de reacción. Si se conoce el pKa de cada uno de los tioles involucrados en la reacción, se puede obtener el valor de K^{S^-} . El valor de esta constante es independiente del pH y permite comparar valores de K_{ox} obtenidos por mediciones a distintos pH.

$$K^{S^-} = \frac{(1 + 10^{(pK_2 - pH)} + 10^{(pK_1 + pK_2 - 2 \cdot pH)})}{(1 + 10^{(pK_{\text{GSH}} - pH)})^2}$$

pK_1 y pK_2 corresponden a los valores de las constantes de ionización de cada uno de los tioles que forman el disulfuro en la proteína (Rothwarf & Scheraga 1992).

La medición directa del potencial de media celda para el sistema GSH/GSSG, y para otros sistemas redox tiol/disulfuro, no es posible por métodos electroquímicos convencionales debido a la formación de complejos estables metal-tiolato en la superficie de los electrodos. Entonces, los potenciales de media celda para GSH y

otros tioles se determinan indirectamente por medida de la constante de equilibrio del tiol con un sistema redox de potencial de hemicelda conocido. El potencial $E^{\circ}_{\text{GSSG/GSH}}$ se determina por estudio del equilibrio con el par $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, cuyo potencial de referencia con respecto al electrodo de hidrógeno es de -0.324 V a $\text{pH} = 7.0$ y $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. El valor obtenido por Millis *et al* (1993) para $E^{\circ}_{\text{GSSG/GSH}}$ es de -0.262 V a $\text{pH} 7.0$ y $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tomando como base este valor, y midiendo las K_{ox} para el equilibrio entre el par GSH/GSSG con otros tioles a $\text{pH} 7$, es posible establecer una escala redox. En la tabla II muestran los valores de E° para algunos de estos tioles a $\text{pH} 7.0$ y $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y para el NADPH y el NADH (Millis *et al* 1993).

Tabla II Potenciales de reducción

Compuesto	E° (V)
Ditiotreitol	-0.330
Glutation	-0.262
Cisteamina	-0.260
3-mercaptopropiónico	-0.257
Coenzima A	-0.256
homo Cisteína	-0.256
β -mercaptoetanol	-0.253
Cisteína	-0.245
NADPH	-0.324
NADH	-0.320

El potencial redox celular.

La actividad biológica de varias proteínas puede ser alterada por modificaciones en el estado redox de sus cisteínas. Así también, el estado redox de los buffer redox tiol/disulfuro celulares cambian en respuesta a estímulos metabólicos y en respuesta a varios estados fisiopatológicos. En consecuencia, el intercambio tiol-disulfuro sugiere una relación entre la actividad biológica de ciertas proteínas y los cambios en los buffers redox tiol-disulfuro celulares (Gilbert 1990, Gilbert 1995). En la mayoría de las células el glutatión es el buffer redox tiol-disulfuro más abundante. Su concentración total está regulada por su síntesis, su exportación y su transformación, y varía en los distintos compartimentos intracelulares (Gilbert

1990).

Para que el buffer redox introduzca cambios en el estado redox de las proteínas, el proceso de intercambio tiol-disulfuro debe ser termodinámicamente y cinéticamente competente. El cálculo de las K_{ox} para estas proteínas indica si el proceso de oxidoreducción en sus cisteínas es plausible o no. Este razonamiento lleva implícito que el proceso de intercambio tiol-disulfuro debe ser reversible.

El estudio de la concentración intracelular del glutatión en células de hibridoma CRL-1606 realizado por Hwang *et al* (1992), mostró que el potencial redox para el glutatión dentro de la célula difiere del E° (-0.262 Volts). Esta diferencia se debe a que el potencial (E°) para un tiol o una proteína depende de la relación oxidado/reducido de las especies involucradas y de la concentración total de las mismas.

$$E'_{GSSG/GSH} = -0.262V + \frac{0.059}{2} \log \left(\frac{[GSSG]}{[GSH]^2} \right)$$

La Tabla III contiene los valores límites de E° correspondientes a la relación glutatión reducido/oxidado para distintas situaciones fisiológicas y distintos compartimentos celulares.

Estas consideraciones muestran que no basta con comparar los E° de los diferentes tioles y proteínas para deducir la factibilidad de su reducción u oxidación, sino que además debe tenerse en cuenta la concentración de las especies oxidadas y reducidas presentes.

Tabla III

Relación Red/Ox GSH Total	Citoplasma		RE	
	100/1 (Volts)	30/1 (Volts)	3/1 (Volts)	1/1 (Volts)
8 mM	-0.250	-0.234	-0.199	-0.177
1 mM	-0.223	-0.207	-0.172	-0.151

Valores corregidos a pH 7.0 y 25 °C.

Una vez determinada la factibilidad del proceso debe considerarse el factor cinético. Para que el proceso de oxidoreducción sea competente, su velocidad

debe ser comparable a la que poseen los procesos metabólicos relacionados.

Esta dependencia de un factor cinético sugiere la necesidad de un mecanismo catalizado. En la actualidad se han encontrado varias proteínas capaces de acelerar las reacciones tiol-disulfuro. Entre ellas encontramos a las Trx, las Grx, el sistema Dsb bacteriano y las PDI.

Como ejemplo se pueden mencionar las constantes de velocidad para la reducción de la insulina por el DTT catalizada por la Trx: para la reacción química (DTT/insulina), la constante es $1 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, mientras que para la reducción bioquímica (Trx/insulina) y (DTT/Trx) es $10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ y $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, respectivamente (Holmgren 1979).

Tiorredoxinas (Holmgren 1989, Buchanan *et al* 1994)

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas con una masa molecular típica de 12 kDa, que están distribuidas en los animales, plantas y bacterias. El fragmento de DNA que codifica para gran variedad de tiorredoxinas de especies procarióticas y eucarióticas fue secuenciado y con ello deducida la correspondiente estructura primaria. La comparación de las mismas mostró que las Trx pueden agruparse en cuatro grandes grupos: a) las bacterias verdes fotosintéticas (*Chlorobium*), b) las bacterias heterotróficas y las bacterias púrpuras fotosintéticas, c) Cianobacterias y algas eucariotas, y d) los vertebrados.

Todas poseen un sitio activo muy conservado, cuya secuencia

- Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-

interviene en reacciones de intercambio tiol disulfuro. La estructura terciaria de la Trx humana y de *E. coli* permitieron establecer que la cisteína más cercana al extremo amino terminal se encuentra expuesta al solvente, en tanto que la cisteína cercana al carboxilo terminal está dentro de la proteína. Sobre la base de los componentes celulares capaces de suministrar los equivalentes de reducción, se pueden distinguir dos sistemas de tiorredoxinas, el sistema NADPH/Trx y el sistema Ferredoxina/Trx.

El sistema NADPH/Trx

La reducción de la Trx está ligada al NADPH vía una flavoenzima, la NADP-Trx-

reductasa (NTR), que es estructuralmente y funcionalmente similar a la glutation reductasa y la lipoamida deshidrogenasa.



Este sistema está ampliamente distribuido y presente en animales como también en plantas. La Trx participa en la reducción de i) ribonucleótidos para la síntesis de DNA, ii) de SO_4^{2-} a azufre para su incorporación a los componentes vitales. (e.g. cisteína) y iii) de metionina sulfóxido tanto en el aminoácido libre como en la reparación del daño oxidativo en las proteínas.

A través del mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, la Trx es efectiva en la reducción de disulfuros en una amplia gama de proteínas. Por ejemplo reduce un par de cisteínas ubicadas en la superficie de la enzima ribonucleótido reductasa conduciendo los electrones hacia el sitio activo para reducir los ribonucleótidos a sus correspondientes deoxiribonucleótidos.

El sistema NADPH/Trx-h (de plantas) reduce específicamente *in vitro* una serie de proteínas presentes en la semilla: las purotioninas (5 kDa), los inhibidores de hidrolasas (α -amilasa y de tripsina), y proteínas de reserva (gliadinas y glutelinas). Estos resultados sugieren que la Trx-h funcionaría como una señal temprana en la germinación obteniendo a través de la NTR la capacidad reductora del NADPH generado por la vía oxidativa de las pentosas fosfato.

Estudios recientes suministran evidencias sobre la participación del sistema NADP/Trx en:

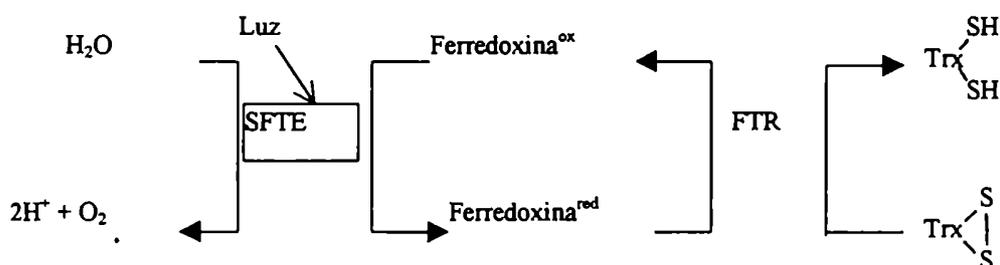
- el control de la división celular
- la replicación del DNA (sitio no identificado)
- la transcripción del DNA causada por NF Kappa β y AP-1
- la acción hormonal (receptor de glucocorticoides)
- el desarrollo del embrión y meiosis en *Drosophila*
- la reparación, mantenimiento y ensamblaje de proteínas.

Por otra parte la Trx interviene en algunos procesos biológicos donde su función

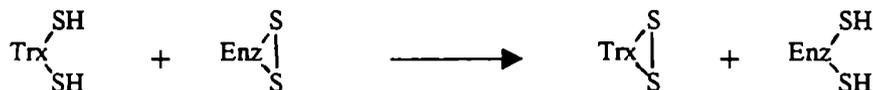
estaría ligada a interacciones no covalentes en lugar de a procesos redox. El gen 5 del fago T7 codifica para una proteína de 80 kDa cuya actividad DNA-polimerasa no es adecuada para la rápida replicación del genoma, dada su baja procesividad. Sin embargo, esta proteína forma un complejo 1:1 con la Trx(SH)₂ dentro de las células de *E. coli* infectadas por el fago, estabilizando la unión de la polimerasa con el templado de DNA y aumentando su procesividad (Wolosiuk *et al* 1993).

El sistema Ferredoxina/Trx (Frx/Trx)

El sistema fotosintético de transporte de electrones (SFTE) en las membranas tilacoides iluminadas reduce a la Trx vía una enzima con un centro de azufre e hierro: la Frx-Trx-reductasa (FTR).



Este sistema funciona como un mecanismo general para la regulación enzimática mediada por la luz. La Trx reducida cambia el estado redox de las enzimas biosintéticas del ciclo reductivo de las pentosas fosfato (ciclo de Benson-Calvin), al provocar la reducción de un disulfuro específico. En este proceso, no sólo estaría involucrado un proceso redox sino también la interacción no covalente de la Trx con su proteína sustrato (Wolosiuk *et al* 1993). En su estado reducido las enzimas son catalíticamente activas.



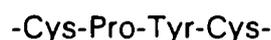
Por el contrario, las enzimas que intervienen de la degradación de hidratos de carbono son reguladas por este sistema en forma inversa, *i.e.* se desactivan por reducción y se activan por oxidación.

Los cloroplastos contienen dos Trx (filogenéticas distintas), que reciben hidrógenos ($H^+ + e$) de la FTR. La Trx-f activa selectivamente cuatro enzimas regulatorias del ciclo de Benson-Calvin: la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, la fosforribuloquinasa y la NADP-gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa. La Trx-m reducida desactiva preferentemente a la glucosa 6-P-deshidrogenasa, una enzima que regula el funcionamiento del ciclo oxidativo de las pentosas fosfato (Wolosiuk *et al* 1993). Por otra parte, la Trx-m, y en ciertas condiciones la Trx-f, activa la NADP-malato deshidrogenasa, una enzima funcional en la captación de CO_2 en las plantas C_4 y en el transporte de los equivalentes de reducción desde el cloroplasto al citosol en las especies C_3 . Ambas activan a la ATP-sintetasa de cloroplastos (CF_1 -ATPsa), la enzima clave de la fotofosforilación, y a la glutaminasintetasa, una enzima que interviene en la asimilación de amonio.

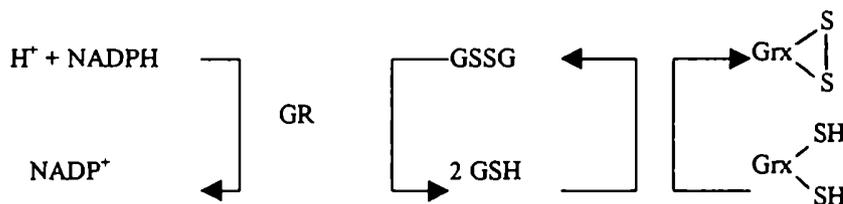
Glutarredoxinas (Holmgren 1989)

Otra categoría de enzimas capaces de acelerar las reacciones de intercambio tiol-disulfuro son las glutarredoxinas (Grx). Tienen una masa molecular de 12 kDa y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, *i.e.*, desde las bacterias hasta en los mamíferos. Su actividad biológica está en cierto grado relacionada a la que poseen las tioredoxinas. Actúa como dador de hidrógenos para a la ribonucleótido reductasa así como también para la reducción de sulfato y de metionina sulfóxido.

El sitio activo está conservado en las distintas especies y tiene la siguiente secuencia:



El sistema Grx obtiene los electrones necesarios para el proceso reductivo del NADPH, vía el par GSH/glutation reductasa (GR). El NADPH reduce al



$GSSG$ en la reacción catalizada por la flavoenzima GR, y el GSH reduce a la Grx,

mediante un intercambio tiol-disulfuro.

Aunque el porcentaje de identidad en la estructura primaria de la Grx y la Trx es muy baja, ambas comparten con la DsbA, la glutation peroxidasa y la glutation-S-transferasa la misma estructura espacial (Trx "fold"). Más aún, el sitio de unión para el GSH en la Grx es similar al existente en la glutation peroxidasa (Martin 1995, Sun *et al* 1997).

E. coli contiene 3 Grx, la Grx₁, la Grx₂ y la Grx₃. La Grx₃ (9 kDa) es ineficiente como dador de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa, mientras que la estructura y función de la Grx₂ (27 kDa) aún se desconoce (Holmgren & Aslund 1995).

El intercambio tiol-disulfuro en el plegamiento de las proteínas. (Creighton & Freedman 1993, Bardwell 1994)

En los polipéptidos nacientes, las cisteínas se hallan en estado reducido. La formación de los enlaces disulfuro de las proteínas extracelulares es concurrente con el plegamiento de la proteína en el RE de los eucariotes y en el espacio periplasmático de las bacterias. El mecanismo de este proceso es el intercambio tiol-disulfuro con tioles intracelulares. *In vitro*, las proteínas que no poseen enlaces disulfuro logran su plegamiento en el orden de los milisegundos, en tanto que las proteínas que sí los poseen pueden tardar horas o días. Dado que el proceso de formación de disulfuros y plegamiento *in vivo* toma segundos, la discrepancia llevó al descubrimiento de una proteína eucariótica capaz de acelerar los procesos de formación de enlaces disulfuro: la protein disulfuro isomerasa (PDI) (Goldberger *et al* 1963).

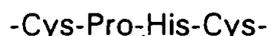
Una proteína mucho más simple, la DsbA fue identificada en *E. coli* por Bardwell *et al* (1991) a partir de mutantes defectuosas en la formación de enlaces disulfuro en proteínas extracelulares. Este estudio llevó al descubrimiento de otras proteínas periplásmicas que intervendrían en la formación de estos enlaces en la bacteria, la DsbB (Bardwell *et al* 1993), la DsbC (Shevcchik *et al* 1994, Missiakas *et al* 1994), la DsbD (Missiakas *et al* 1995), y la DsbE (Missiakas & Raina 1997). El estudio de estas proteínas ha comenzado a dar los primeros indicios sobre el mecanismo de

la formación de enlaces disulfuro durante el plegamiento de las proteínas (Freedman 1995).

DsbA

La DsbA madura es una proteína monomérica soluble (21.1 kDa), que está ubicada en el espacio periplasmático de la bacteria. *In vitro*, oxida rápidamente la RNAsa A, el BPTI y una lisozima mutante (Wunderlich *et al* 1993, Kanaya *et al* 1994, Zapun & Creighton 1994).

El sitio activo de la DsbA contiene el tetrapéptido característico de las PDOR:



El enlace disulfuro que forman estas cisteínas es inestable y tiende a reaccionar muy rápidamente con los tioles libres, (1000 veces más rápido que los disulfuros normales en las proteínas) (Zapun *et al* 1993, Wunderlich *et al* 1993).

La reacción resulta en la rápida y virtualmente unidireccional transferencia del disulfuro a la proteína sustrato.



La constante de equilibrio de la DsbA con glutation (K_{ox}) es de $1.26 \cdot 10^{-4}$ M (Hennecke *et al* 1997). Al ser una de las más pequeñas conocidas indica la gran tendencia a oxidar el glutation y en consecuencia, a las proteínas en plegamiento. Este gran poder oxidante es causado por el efecto desestabilizador del disulfuro y el bajo pKa de la Cys30 (Grauschopf *et al* 1995). El pKa de la primera cisteína de la DsbA (Cys 30) tiene un valor extremadamente bajo (3.4) (Hennecke *et al* 1997), lo cual explica la habilidad inusual de catalizar el intercambio tiol-disulfuro a pH ácido (Wunderlich *et al* 1993, Zapun & Creighton 1994).

Respecto a la PDI eucariota, la menor eficiencia de la DsbA en la interconversión de los disulfuros incorrectos sugiere que su rol primario sería la formación de disulfuros en las proteínas en lugar de su isomerización (Zapun & Creighton 1994). Aparentemente, la capacidad de la DsbA para actuar en cantidades catalíticas en el plegamiento de proteínas *in vitro*, se debería a su habilidad para unir péptidos

(Wunderlich *et al* 1993).

La estructura tridimensional de la DsbA sugiere que es un miembro de la superfamilia de las tiorredoxinas, a pesar de la baja identidad en secuencia (Martin *et al* 1993, Martin 1995).

DsbB

Es componente de la vía que lleva a cabo la formación de los enlaces disulfuros en las proteínas dentro del periplasma de *E. coli*. Inserta en la membrana, la atraviesa cuatro veces, quedando el extremo amino terminal y el carboxilo terminal del lado citoplasmático (Bardwell *et al* 1993, Missiakas *et al* 1993). De las seis cisteínas presentes en el polipéptido (20 kDa), sólo cuatro son necesarias para su función *in vivo* y ellas residen de a pares, en cada uno de los dominios periplasmáticos que posee la proteína. Las dos cisteínas del primer dominio periplasmático poseen la configuración -Cys-Val-Leu-Cys- característica de las proteínas involucradas en los procesos de intercambio tiol-disulfuro (Jander *et al* 1994).

La adición de 0.33 mM cistina o 6.5 mM GSSG al medio de cultivo rescata las células defectivas en el gen *dsbB*, pero no las defectivas en el gen *dsbA*. Por otra parte se ha mostrado la interacción selectiva entre la DsbA y la DsbB (Kishigami *et al* 1995). Estos resultados sugieren que la DsbB sería la proteína encargada de reoxidar a la DsbA en el periplasma. En este contexto, aunque el oxígeno fue descartado, se desconoce cual sería la fuente de equivalentes de oxidación (Missiakas *et al* 1993, Bardwell 1994).

DsbC

Es una proteína periplásmica homodimérica (subunidad: 23.4 kDa) que posee el sitio activo característico de la superfamilia de las tiorredoxinas:

-Cys-Gly-Tyr-Cys-

Además, contiene otras dos cisteínas formando un enlace disulfuro, que no es reducido al incubar la proteína durante 30 minutos con 10 mM DTT bajo condiciones nativas.

Al igual que en la DsbA, el disulfuro del sitio activo es inestable y rápidamente transferido a proteínas sustrato reducidas.

La inactivación del gen *dsbC* produce un efecto fenotípico que es relativamente independiente de los genes *dsbA* y *dsbB*, sugiriendo que funcionaría en forma independiente de la reoxidación por la DsbB. Si bien es reoxidada por la DsbA(S₂) *in vitro*, la velocidad es considerablemente menor a la reacción de la DsbA(S₂) con otros tioles proteicos. Por ello la DsbA(S₂) reaccionaría primariamente con las proteínas que están siendo traslocadas al periplasma en lugar de la DsbC(SH)₂. Actualmente se especula que la DsbA transfiere equivalentes de oxidación al azar para la formación de los enlaces disulfuro, mientras que la DsbC participaría en la isomerización de los enlaces formados incorrectamente (Zapun *et al* 1995).

DsbD

Es una proteína de membrana cuya función sería proveer los equivalentes de reducción necesarios para mantener un potencial redox apropiado dentro periplasma. Deleciones en el gen *dsbD* presentan algunos, pero no todos, los defectos fenotípicos observados en otras mutaciones *dsb*; *e.g.* sensibilidad al DTT. A diferencia de los otros genes *dsb*, el gen *dsbD* es esencial para el crecimiento bacteriano a temperaturas superiores a 42 °C. La carencia de la DsbD afecta el estado redox de la DsbA y la DsbC (Missiakas *et al* 1995).

Llamativamente su extremo carboxilo terminal contiene un dominio de 16 kDa cuya secuencia posee un 45% de identidad con la PDI eucariota.

Protein disulfuro isomerasa (PDI)

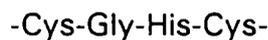
La PDI es una proteína homodimérica (subunidad: 56-60 kDa) residente en el lumen del RE por poseer la secuencia de retención H/KDEL (Munro & Pelham 1987). Constituye aproximadamente el 0.4% de las proteínas totales en la célula pero su concentración es milimolar en el RE. Su vida media en el RE de hepatocitos de rata es *ca.* 96 hrs y el tratamiento de las células con agentes inductores de estrés (tunicamicina, alta temperatura) incrementa su síntesis (Terada *et al* 1995).

La característica fundamental de la PDI es catalizar las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, - *i.e.* la reducción, la formación y la isomerización de los enlaces disulfuro - con una amplia variedad de proteínas sustrato. Acelera la reducción de la insulina por el GSH, el plegamiento oxidativo de proteínas reducidas y

desnaturalizadas, y la conversión de la RNAsa^{cr} (forma inactiva por tener sus enlaces disulfuro mal formados) a su forma activa (Freedman 1991, Gilbert 1994). La PDI no alteraría sustancialmente la vía de plegamiento o la distribución de los intermediarios específicos de las proteínas (Creighton *et al* 1980).

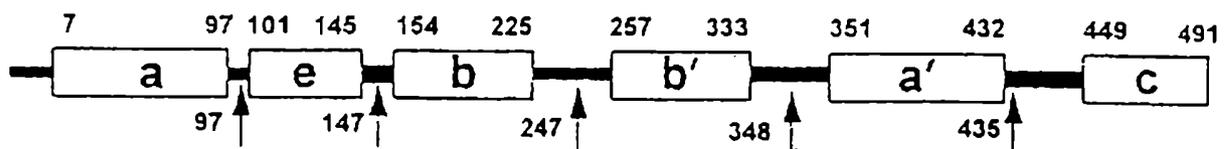
Estructura

El fragmento de DNA que codifica para la PDI ha sido clonado y secuenciado a partir de levaduras, vegetales y mamíferos. El análisis de la estructura primaria indica que el sitio activo homólogo al de la tiorredoxina está repetido dos veces: una unidad cerca del extremo amino terminal y otra cerca del carboxilo terminal. Estos sitios activos cuya secuencia característica es



actuarían de manera independiente (Vouri *et al* 1992) y no poseerían propiedades catalíticas equivalentes (Lyles & Gilbert 1994a).

En mamíferos, varias regiones de la secuencia muestran homología con otras proteínas conocidas, sugiriendo que la PDI sería una proteína modular.



Dominios estructurales de la PDI humana. Los números de residuos indicados sobre los rectángulos abiertos indican los límites correspondientes al dominio mínimo. Las barras que los unen indican las regiones interdominio y las flechas numeradas indican la máxima extensión probable para estos dominios. (Freedman *et al* 1994)

Los dominios **a** y **a'** (47% de identidad entre sí) corresponden a los dominios homólogos a la Trx, **e** es una región con homología al receptor de estrógenos, codificada por un solo exon, **b** y **b'** (28% de identidad en parte de su secuencia) representan una duplicación interna y **c** es una región muy acídica, que posiblemente constituya un dominio de unión de calcio (Freedman *et al* 1994).

La estructura terciaria del dominio **a** ha sido recientemente determinada (Darby *et al* 1996, Kemmink *et al* 1996) y asemeja a la Trx. Estos dominios participan en algunas de las reacciones catalizadas por la PDI, principalmente las relacionadas

con la formación de enlaces disulfuros, pero son ineficientes en la isomerización de disulfuros (Darby & Creighton 1995). La actividad isomerasa depende de la presencia de los dominios **b** y **b'**. Aparentemente el dominio **b'** sería similar al **b** y la estructura terciaria de ambos es muy similar a la Trx (Kemnick *et al* 1997). Esta similitud es sorprendente ya que las secuencias primarias no presentan homología, y la estructura carece del motivo Cys-X-Y-Cys característico de esta superfamilia (ver adelante).

Acción de la PDI.

- Formación de los enlaces disulfuro (oxidación)

Cuando la proteína sustrato está totalmente reducida, en presencia de un oxidante suave (O_2 disuelto, mezclas de GSSG/GSH, etc.), la PDI cataliza la formación de los enlaces disulfuro nativos. Esta característica fue observada no sólo en una gran variedad de proteínas pequeñas y monoméricas (RNAsa, BPTI), sino también en proteínas de múltiples dominios (BSA), y compuestas por más de un polipéptido (inmunoglobulinas, procolágeno) (Freedman 1984).

- Rearreglo de los enlaces disulfuro (isomerización)

Cuando la proteína sustrato está oxidada pero contiene los puentes disulfuro incorrectos (*e.g.* RNAsa^{scr}), la PDI cataliza el rearreglo de estos enlaces. Aunque los estados redox inicial y final son similares, la isomerización de las cistinas tiene lugar en condiciones reductoras suaves (10 μ M DTT o 1 mM GSH); *e.g.* en la renaturalización de la RNAsa^{scr} la K_m del DTT, el GSH y la cistamina se encuentra en el rango de 4-600 μ M. En este proceso, un exceso de tiol inhibe la reacción presumiblemente por crear un ambiente redox demasiado reductor para la correcta formación de los enlaces disulfuros (Lambert & Freedman 1983). Estudios recientes con mutantes de las cisteínas del sitio activo de la PDI, indicarían que la función principal de la PDI *in vivo* sería la isomerización de los enlaces disulfuros formados incorrectamente (Laboissiere *et al* 1995).

- Escisión de los enlaces disulfuro (reducción)

Cuando la proteína sustrato está oxidada, en medio reductor (*e.g.* GSH 10 mM), causa la reducción de los enlaces disulfuro. En estas condiciones, la enzima acelera

la aparición de los grupos sulfhidrilos (Freedman 1984).

En la reducción de la insulina, el K_m para varios monotioles (incluido el GSH) fluctúa entre 1-20 mM, mientras que para ditioles (cinéticamente mejores reductores), el K_m se encuentra entre 10-500 μ M (Chandler & Varandani 1975). Es interesante destacar que el NADPH reduce a la PDI vía la NADP-Trx-reductasa y con ello la capacita para la reducción de las cistinas (Lundstrom & Holmgren 1990).

- Eficiencia catalítica

Comparada con la mayoría de las enzimas, la PDI no es un catalizador muy eficiente. El bajo número de intercambio de sustrato, las altas K_m y la falta de especificidad no concuerda con las características comunes de una enzima: rapidez y especificidad. Sin embargo, no se espera que una enzima "normal" reconozca una amplia variedad de sustratos, halle los sitios de formación de enlaces disulfuro en secuencias aminoacídicas con bajo porcentaje de identidad, y actúe en presencia de la alta concentración de sustratos que son transferidos por el ribosoma hacia el interior del RE. La PDI posee las características requeridas para su presunto rol biológico, y tal vez la carencia de eficiencia catalítica, especificidad y afinidad esté contrarrestada por su alta concentración en el RE (Weissman & Kim 1993, Gilbert 1994).

- Sitio de unión a péptidos

Varios péptidos inhiben la acción catalítica de la PDI tanto en la reducción de la insulina por el GSH como en el plegamiento oxidativo de la RNAsa. El grado de inhibición depende principalmente de la longitud de los péptidos (6 o más residuos). Sin embargo, péptidos conteniendo residuos cisteína son 4 a 8 veces más efectivos que los de igual longitud desprovistos de cisteínas (Morjana & Gilbert 1991, Noiva *et al* 1991). Estos resultados sugieren que la PDI tendría un sitio de unión a péptidos que no reconocería secuencias específicas y cuya localización en la enzima se desconoce. En este aspecto, la PDI actuaría como chaperona, al igual que otras proteínas residentes en el RE (*e.g.* BiP). La relevancia que la unión de péptidos tiene con la catálisis del intercambio tiol-disulfuro no está clara, pero ambas propiedades estarían relacionadas (Yao *et al* 1997).

- Función chaperona

En adición a sus propiedades catalíticas en los procesos redox, la PDI estaría dotada de una función de chaperona (Wang & Tsou 1993, Cai *et al* 1994, Song & Wang 1995, Yao *et al* 1997). Esta posibilidad surge de su capacidad para acelerar el proceso de plegamiento y evitar la agregación en proteínas que no poseen cisteínas. Sin embargo, en ciertas condiciones la PDI puede estimular la formación de agregados inactivos de proteínas en un proceso denominado actividad anti-chaperona (Puig & Gilbert 1994, Primm *et al* 1996).

La PDI y el ambiente del lumen del RE.

La presencia de glutatión en el RE es claramente muy importante para el funcionamiento de la PDI, y en la introducción del capítulo se discutió la relevancia de la relación GSH/GSSG en la regulación del intercambio tiol-disulfuro en las proteínas (Wittrup 1995). Sin embargo, la concentración del oxidante o el reductor no es el único factor que determina la actividad de la PDI.

Por su habilidad para almacenar Ca^{2+} el lumen del RE contiene una alta concentración de este catión bivalente (aproximadamente 5 mM), que contribuye a la regulación de procesos metabólicos (Helenius *et al* 1992). Es particularmente llamativo que la PDI como otras proteínas del RE, una Ca^{2+} (Van *et al* 1993). Además existen evidencias sobre la afinidad de la PDI por el ATP. Por otra parte, trabajos recientes (Quemeneur *et al* 1994) sugieren que la PDI puede autofosforilarse en los dominios b y b'. Sin embargo, no existen evidencias sobre la modificación de la actividad por el Ca^{2+} o por el ATP (Guthapfel *et al* 1996).

- La naturaleza del oxidante

La traslocación de cadenas nacientes en el RE importa a este compartimento equivalentes de reducción (residuos Cys). Por ello, debe existir en el RE algún mecanismo para transportar equivalentes de oxidación para suplir la demanda creada por la formación de los enlaces disulfuro. Ziegler & Poulsen (1977) sugirieron que una amino oxidasa microsomal convierte la cisteamina en su disulfuro, cistamina, la cual podría constituir la fuente del oxidante.

Por otro lado, la actividad dehidroascorbato reductasa que la PDI tiene (Wells *et al*

1990), sugiere que la importación de dehidroascorbato al RE proveería un mecanismo para oxidar la PDI y en consecuencia a otros tioles.

Vale destacar que a pesar de los recientes hallazgos realizados en organismos procariotas, donde existirían proteínas encargadas de transportar equivalentes de oxidación (DsbB) y de reducción (DsbD) entre el citosol y el periplasma, en organismos superiores se desconoce la existencia de proteínas equivalentes, aunque se están realizando esfuerzos para verificar su existencia (Gilbert, comunicación personal).

Multifuncionalidad

Además de su función primaria como catalizador de la transformación de los enlaces disulfuro y del plegamiento de las proteínas, la PDI posee otras dos funciones bien establecidas. Es un componente de la enzima prolil-4-hidroxilasa, que cataliza la formación de 4-hidroxiprolinas en las cadenas nacientes del procolágeno. Esta enzima es un tetrámero del tipo $\alpha_2\beta_2$, donde la subunidad α constituye el sitio activo y la subunidad β corresponde a la PDI (Kivirikko *et al* 1989). También es componente de la enzima que transfiere triglicéridos, para facilitar la incorporación de lípidos en las lipoproteínas nacientes en el RE. La proteína es un heterodímero, donde la PDI se identifica como la subunidad β (Wetterau *et al* 1991a). Se postula que el rol de la PDI en estos complejos, sería mantener a las subunidades α en forma activa y soluble (Wetterau *et al* 1991b, Vouri *et al* 1992, John *et al* 1993).

La PDI en los vegetales

Las primeras evidencias sobre la caracterización de una PDI vegetal data de los trabajos de Grynberg *et al* (1977 y 1978), Roden *et al* (1982) y de De Azevedo *et al* (1984) en trigo, aunque recién fue purificada a homogeneidad por Shimoni *et al* (1995a). En los últimos años se reportaron varias secuencias de cDNA de distintas fuentes vegetales: de alfalfa (Shorrosh *et al* 1993), de avena (Chen & Hayes 1994), de trigo (Shimoni *et al* 1995b) y de maíz (Li & Larkins 1995).

Como se discutió anteriormente, la PDI ha sido estudiada tanto estructural como funcionalmente en una variedad de especies animales. Sin embargo, muy poco es

lo que se conoce sobre su regulación y expresión durante el desarrollo de la planta, y sobre su función en los procesos donde existe una gran movilización de proteínas (e.g. formación de la semilla, germinación).

Las plantas contienen una gran variedad de proteínas con enlaces disulfuro residentes en vacuolas, cuyo plegamiento sería asistido por la PDI. Entre estas proteínas encontramos a las proteínas de reserva, hidrolasas, proteasas e inhibidores de α -amilasa, como así también proteínas involucradas en la defensa de las plantas. El rol de la PDI en la formación de enlaces disulfuro en las proteínas vegetales durante su plegamiento fue estudiado por Bulleid & Freedman (1988) utilizando una proteína de reserva de trigo (la γ -gliadina). Estos resultados sugirieron que la formación de los enlaces disulfuro de la γ -gliadina estaría asistido por la PDI (Bulleid 1993).

En las plantas, existen dos estadios donde hay una gran movilización de proteínas que poseen abundantes enlaces disulfuro. El primero transcurre durante la formación de la semilla, y consiste en la síntesis, plegamiento y acumulación de proteínas de reserva en los cuerpos proteicos (Richard *et al* 1996, Galili *et al* 1996). El segundo tiene lugar durante la germinación, donde esta gran reserva de proteínas es catabolizada (Shutov & Vaintraub 1987, Bewley & Black 1994). Durante la formación de la semilla en trigo, los niveles de PDI aumentan hasta alcanzar un máximo a los 17 días luego de la fertilización (Shorrosh *et al* 1993, Shimoni *et al* 1995a). Estos resultados sugieren que la PDI participaría activamente durante la formación de la semilla (Grimwade *et al* 1996).

Durante la germinación, el proceso de intercambio tiol-disulfuro estaría involucrado tanto en la degradación de inhibidores de proteasas y α -amilasas (Kobrehel *et al* 1991, Jiao *et al* 1992, Jiao *et al* 1993) como así también en la degradación de proteínas de reserva (Kobrehel *et al* 1992). La Trx-h cataliza la reducción de los enlaces disulfuro presentes en las proteínas que son degradadas vía la NADP-Trx-reductasa, y se ha propuesto que funcionaría en la germinación como una señal temprana para el incremento de los procesos metabólicos (Kobrehel *et al* 1992). Una observación interesante fue que las gliadinas y glutelinas en el endosperma del

trigo, son reducidas por la Trx-h antes de su degradación proteolítica.

Aparentemente, la reducción de los enlaces disulfuro en estas proteínas de reserva incrementaría su susceptibilidad a la proteólisis enzimática. Las proteínas de reserva en el endosperma hidratado no se encuentran almacenadas en cuerpos proteicos, por lo cual estarían en contacto con las enzimas localizadas en el citoplasma. Actualmente se desconoce si en el endosperma de cereales, donde las proteínas de reserva están almacenadas en cuerpos proteicos (e.g. maíz), operaría un sistema reductivo similar al observado en el endosperma de trigo (Bewley & Black, 1994). Si bien se ha mostrado que la PDI está presente en los cuerpos proteicos (Shimoni *et al* 1995a), se desconoce su participación en los procesos antes mencionados.

La superfamilia de las Trx

La Trx, al igual que la Grx contienen en su sitio activo una secuencia conservada que consiste en dos residuos cistina separados por dos aminoácidos

- Cys X Y Cys -

Otras PDOR bacterianas involucradas en la formación de enlaces disulfuro en el periplasma, también contienen este motivo. Entre ellas encontramos

- La DsbA de *E. coli* (o PrfA) y sus homólogos en *Vibrio cholerae* (TcpG) (Yu *et al* 1992), en *Haemophilus influenzae* (Por) (Tomb 1992) y en *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al* 1995).
- La DsbB de *E. coli*.
- La DsbC de *E. coli* (o XpRA) y sus homólogos en *Erwinia chrysanthemi* (Shevchik *et al* 1994) y *Haemophilus influenzae*.
- La DsbE de *E. coli* (o CcmG) y sus homólogos en *Haemophilus influenzae*, *Rhodobacter capsulatus* (HelX) (Beckman & Kranz 1993) y *Rhizobiaceae* (CycY y TlapA) (Loferer & Hennecke 1994)

En los organismos eucariotas, varias secuencias de cDNA codifican para proteínas que semejan a la PDI y poseen no sólo el motivo -Cys-X-Y-Cys- característico de las PDOR, sino también dos o tres dominios tipo Trx (ca. 100 residuos). Si bien estas características involucran a las PDOR bacterianas antes mencionadas y a la

PDI en una gran superfamilia, la presencia del motivo -CXYC- implica a otras proteínas presentes en el RE: la Erp60, la Erp72 y la P5 (Freedman *et al* 1994). Otras proteínas con similares características fueron identificadas en levaduras (Tachibana & Stevens 1992, Gunther *et al* 1993, Tachikawa *et al* 1995) y *Trypanosoma cruzi* (Moutiez *et al* 1997).

Similar en tamaño a la PDI, la Erp60 posee también dos dominios Trx. Sin embargo, el porcentaje de identidad en la estructura primaria es menor al 50% (Srivastava *et al* 1991). *In vitro*, esta proteína del RE cataliza la reducción de la insulina por el GSH, pero a una velocidad menor que la PDI (Kozaki *et al* 1994, Iida *et al* 1996). Urade *et al* (1992) y Otsu *et al* (1995) han sugerido que la Erp60 estaría involucrada en la degradación de las proteínas mal plegadas en el RE. La Erp72 posee tres dominios Trx con los cuales cataliza la formación, isomerización (Rupp *et al* 1994) y la reducción de los enlaces disulfuro en las proteínas (Van *et al* 1993). Aunque se desconoce su rol, su expresión está relacionada con la respuesta celular al estrés (Srinivasan *et al* 1993, Iida *et al* 1996). La proteína P5 posee dos dominios Trx adyacentes. Al igual que la Erp72, cataliza la reducción de la insulina en presencia no sólo de tioles de bajo peso molecular (GSH, DTT y cisteamina) sino también de NADPH vía la NADP-Trx-reductasa. Una característica adicional de la P5 y la Erp72 es su afinidad por el Ca^{2+} . De hecho, fueron purificadas en base a su capacidad para unir este catión por lo que fueron consideradas como proteínas que unen calcio (Lundstron *et al* 1995).

La gran variedad de proteínas relacionadas que fueron encontradas en idénticas especies y tejidos, sugiere que debería existir alguna diferencia funcional entre ellas. A priori, es posible que estas isoformas difieran en la distribución celular, la especificidad de sustrato, la inducción y la expresión (Freedman *et al* 1994).

Si bien las proteínas de la gran familia de las Trx están caracterizadas por el motivo -CXYC- en su estructura primaria, dos propiedades de este sitio activo muestran una amplia variación cuantitativa; *i.e.*, el potencial redox (Tabla IV) y el pKa de la cisteína cercana al extremo amino terminal (Tabla V).

Tabla IV

Proteína	K _{ox} (mM)	E ^{0'} (V) [*]
Trx	3770	-0.279 ⁵
Grx	82	-0.230 ⁴
DsbA	0.126 ¹	-0.147
DsbC	0.195 ⁶	-0.153
PDI	7.3	-0.199 ⁸

*Valores corregidos a pH 7.0 y 25 °C utilizando los E^{0'} reportados en la tabla II.

1) Hennecke *et al* 1997; 2) Nelson & Creighton 1994; 3) Gan & Wells 1987; 4) Salomon *et al* 1992; 5) Krause *et al* 1991; 6) Zapun *et al* 1995; 7) Hawkins & Freedman 1991a; 8) Lundstrom & Holmgren 1993; 9) Ruddock *et al* 1996; 10) Takahashi & Creighton 1996; 11) Dyson *et al* 1997

Tabla V

Proteína	pKa (C _N)	pKa (C _C)
Trx	7.1 ¹¹ /9-10 ¹⁰	9.9 ¹¹ /9-10 ¹⁰
Grx	2.5 ³	n.d.
DsbA	3.4 ¹	> 9.5 ²
PDI	6.7 ⁷ /5.6 ⁹	n.d.

C_N : Cys cercana al extremo amino terminal.
C_C : Cys cercana al extremo carboxi terminal.

Mientras que el bajo pKa de la Cys cercana al amino terminal garantiza el activo funcionamiento de la enzima al pH fisiológico, el potencial redox de la proteína determina la función de la enzima. Un potencial redox alto (-0.130/-0.150 V) es característico de las proteínas que catalizan la oxidación y/o la isomerización de los enlaces disulfuro en las proteínas sustrato, mientras que las que poseen menores potenciales (<-0.230 V) catalizan eficientemente la reducción de estos enlaces.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

Ribonucleasa A tipo III de páncreas bovino (Lot. 61H7025), ác. ribonucleico tipo IV de "Torula Yeast", Concanavalina A unida a Sepharose, Aglutinina de germen de trigo unida a Sepharose, el reactivo de Ellman (DTNB), Glutation reductasa (Tipo IV), NADPH, ditioneitol, ditioneitol oxidado, glutatión reducido, glutatión oxidado, iodoacetamida y Trizma Base eran productos de Sigma (St.Louis,MO). La iodoacetamida [$1\text{-}^{14}\text{C}$] (4.65 mM en etanol, 0.1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) fue adquirida a New England Nuclear. Los demás reactivos provenían de fuentes comerciales y su calidad era pro-análisis. En todos los casos se utilizó agua destilada.

MÉTODOS

HPLC: Estos experimentos fueron efectuados en un equipo LKB con un detector de longitud de onda variable. Para la filtración por geles se utilizó una columna BioSil Sec-250 (BioRad), con tamaño de partícula de 10 μm (600 x 7.5 mm). La cromatografía de fase reversa (C18) fue realizada en una columna Superpaq Spherisorb (ODS2) (Pharmacia) con tamaño de partícula de 5 μm (4 x 250 mm) y (C8) LiChrosorb (RP-8) (Merck) con tamaño de partícula de 5 μm (4 x 250 mm).

FPLC: Estos experimentos fueron llevados a cabo en un equipo FPLC System de Pharmacia equipado con un detector de longitud de onda fija en 280 nm y una columna de intercambio catiónico mono-S HR 5/5 (Pharmacia), sustituida con grupos (-CH₂-SO₃⁻) y con tamaño de partícula de 10 μm .

Preparación de la Ribonucleasa A en sus formas reducida (RNAsa^{red}) y "scrambled" (RNAsa^{scr})

Para estos fines se tomaron como base los procedimientos planteados por Hawkins *et al* (1991b) Se incubó la RNAsa (50 mg) a pH alcalino (pH 8-9), con concentraciones altas de reductor (DTT 130 mM) en condiciones desnaturalizantes (Urea 10 M) y anaeróbicas (atmósfera de N₂), durante 20 hrs a 20 °C en un volumen final de 4 ml. El exceso de reductor fue eliminado por filtración por gel (Sephadex G-25) eluyendo con 0.1 M ácido acético. Un tercio de la preparación se almacenó a -15 °C hasta su utilización (RNAsa^{red}). Esta RNAsa^{red} contenía *c.a.* 6.5 residuos de cisteínas reducidos por molécula según la titulación con DTNB en presencia de cloruro de guanidina. (Ellman 1959)

El pH del resto de la preparación fue ajustado a 8.5 con Trizma base, y luego de agregar sarcosina sólida (concentración final 100 mM), urea (concentración final 9 M) fue incubada por 14 días en obscuridad a 18-25 °C en un volumen final de 17 ml. Producida la oxidación aeróbica en condiciones desnaturalizantes, la reacción fue detenida llevando la solución a pH 4 con ác. acético. Para concentrar el preparado, la RNAsa^{scr} fue precipitada con sulfato de amonio a saturación y resuspendida en buffer bicarbonato de sodio 20 mM agitando en hielo por 2 hrs. El pH de la solución fue ajustado a 4 con ác. acético y finalmente la preparación dializada exhaustivamente contra ác. acético 1 mM fue almacenada a -15 °C. Así preparada, la RNAsa^{scr} no contenía tioles que reaccionaran con el DTNB.

SDS-PAGE

Las muestras se incubaron a 95 °C por 5 minutos en buffer Tris-HCl 100 mM pH 6.8 conteniendo β -Met 300 mM, Urea 6 M, SDS 1% (p/v) y azul de bromofenol 0.025% (p/v). En un sistema modular mini-Protean II (BioRad) se preparó un gel de concentración 4.5% T, 2.6% C y un gel de separación 10% T, 2.6% C, empleando espaciadores de 0.75 mm y el sistema de buffer discontinuo descrito por Laemmli (1970). Luego de la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución 0.05% (p/v) de Coomassie blue R-250 en metanol / ác. acético / agua [5:1:4 (en volumen)] y desteñidos con la misma solución libre del colorante.

Determinación de secuencias aminoacídicas parciales de la PDI

Con el fin de caracterizar la secuencia aminoacídica de la PDI, luego de marcar los grupos -SH libres con [1-¹⁴C]-IAA, la enzima fue digerida con Lys-C y los productos de la proteólisis fueron separados por HPLC. Los péptidos radioactivos aislados fueron secuenciados por el método de Edman.

- Marcación de la PDI con [1-¹⁴C]-Iodoacetamida

La PDI purificada (180 μ g) se redujo con DTT 20 mM en presencia de Urea 7 M durante 20 min. a 45 °C. El exceso de reductor y desnaturizante fue removido en una columna de Sephadex G-25 eluyendo con buffer acetato de sodio 20 mM pH 5.5. Las fracciones de mayor absorbancia a 280 nm fueron reunidas y concentradas por evaporación a presión reducida. El pH se ajustó a 7.0 con NaOH 1 M, se agregó [1-¹⁴C]IAA (concentración final 0.5 mM) y se incubó 30 minutos a 25 °C. Se ajustó la concentración de IAA a 6.5 mM y se incubó a 25 °C por 30 minutos adicionales. El exceso de IAA y reductor se separó eluyendo con buffer bicarbonato de sodio 20 mM pH 8.5 en una columna de Sephadex G-25. Las fracciones conteniendo la proteína marcada con ¹⁴C se concentraron por evaporación a presión reducida hasta un volumen de 100 μ l.

- Digestión con la proteasa Lys-C

A los 100 μ l de solución precedente, se agregó 0.5 μ g de proteasa Lys-C y se incubó por 19 horas a 25 °C. La mezcla de reacción se congeló a -15 °C hasta su utilización.

- Aislamiento de péptidos marcados con [¹⁴C]IAA

Los productos de proteólisis fueron aplicados en una columna de fase reversa (C18) equilibrada con buffer A (0.06% (v/v) ác. trifluoroacético en agua) y eluidos sucesivamente con i) un gradiente lineal de buffer B [0.052% (v/v) ác. trifluoroacético en acetonitrilo 80% (v/v) en agua] desde 2 a 37.5% (v/v) en buffer A durante 60 minutos. ii) un gradiente lineal de buffer B (desde 37.5 a 75% v/v) en buffer A durante 30 min. y iii) un gradiente lineal de buffer B (desde 75 a 98% v/v) en buffer A durante 15 min. (flujo de 0.5 ml/min.). Se tomaron 50 μ l de cada fracción y se determinó la radioactividad. Sobre la base de los perfiles de absorbancia a 220 nm y radioactividad fueron seleccionadas las fracciones cuya elución fue a los 67 min. Luego de evaporar en corriente de nitrógeno, la muestra fue disuelta en buffer A (200 μ l), sembrada en una columna de fase reversa (C8) para HPLC, y eluida sucesivamente con i) un gradiente lineal de buffer B (desde 2 a 30% v/v) en buffer A durante 15 min. , ii) un gradiente lineal de buffer B (desde 30 a 60 % v/v) en buffer A durante 20 min. y iii) un gradiente lineal de buffer B

(desde 60 a 78% v/v) en buffer A durante 15 minutos. La radioactividad eluyó en un único pico simétrico.

Las fracciones constituyentes fueron llevadas a seco en corriente de nitrógeno, y el residuo disuelto en 100 μ l de buffer B. La solución obtenida fue sembrada gota a gota sobre una membrana de Immobilon-P.

- Secuenciación de aminoácidos. Método de Edman

La muestra (120 pmoles, 0.005 μ Ci) depositada en la membrana de Immobilon-P, fue secuenciada por el método de Edman en un Applied Biosystems Procise Secuencer (Procise-HT) según las instrucciones del fabricante.

Análisis de la reducción de napina por SDS-PAGE

Las reacciones de reducción de la napina con distintos reductores y distintas PDORs fueron realizadas como se describe en las leyendas respectivas y detenidas agregando una solución de igual volumen que contenía buffer Tris-HCl 200 mM pH 7.9, Urea 8 M y IAA 10 mM. Luego de una incubación de 20 minutos, las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE utilizando la técnica de Schägger & von Jagow (1987) como se describió en el capítulo 1.

Transferencia de proteínas corridas en SDS-PAGE a membranas de PVDF

Finalizada la corrida electroforética en condiciones reductoras, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante un transferidor semiseco B2529 (Sigma). Este proceso fue llevado a cabo en buffer CAPS 10 mM (pH 10) conteniendo metanol 20 % durante 20 minutos a 150 mA.

Análisis de la secuencia amino terminal de la napina

La membrana de PVDF conteniendo las proteínas transferidas fue teñida con Coomassie blue como se describió para geles obtenidos por SDS-PAGE. La banda correspondiente al polipéptido de 7.9 kDa fue recortada (20 pmoles de proteína) y secuenciada por degradación de Edman como se describió anteriormente.

Desglicosilación de la PDI con PNGasa F

La preparación de PDI fue desnaturalizada por incubación a 100 °C durante 10 minutos en SDS 0.1%, β -Met 140 mM. Luego de enfriar, se agregó 1/10 (v/v) de NP-40 10% y se ajustó el pH a 7.5 con citrato de sodio (concentración final 50 mM). Se agregó 2000 unidades de PNGasa F y se incubó a 37 °C durante 1 hora. El ensayo control contenía agua en lugar de la PNGasa F.

Determinación de proteínas

El ensayo basado en el procedimiento descrito por Bradford (1976) fue utilizado rutinariamente empleando la albúmina sérica bovina como standard. La concentración de la RNasa A fue determinada espectrofotométricamente para las formas nativa y "scrambled" [$\epsilon(277.5\text{nm}) = 9.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$], como así también para la forma reducida [$\epsilon(277.5 \text{ nm}) = 9.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$]. (Lyles & Gilbert 1991a)

Determinaciones espectrofluorométricas

Todas las mediciones fueron realizadas en un espectrofluorómetro Jasco modelo FP-770 utilizando cubetas plásticas de 3 ml (paso de luz 1 cm). Los datos fueron

adquiridos cada 0.2 nm con una velocidad de barrido de 50 nm/min. manteniendo el ancho de banda fijo en 5 nm tanto para la excitación como para la emisión.

Determinaciones espectrofotométricas

Las mediciones de actividad RNAsa fueron llevadas a cabo en un espectrofotómetro Hitachi 220 A. (Response 1 seg., slit 2.0 nm). Para los espectros de absorbancia se utilizaron cubetas de 0.5 ml y 1 cm de paso de luz. La velocidad de barrido fue de 60 nm/min. y los datos se adquirieron a intervalos de 0.1 nm en un espectrofotómetro Gilford Response II equipado con termostatizador de celdas por efecto Peltier.

Estudios del efecto de la temperatura en la estructura de la napina

0.45 mg de napina se disolvieron en 0.5 ml de buffer MOPS 50 mM pH 7.6. Comenzando a una temperatura de 10 °C y aumentándola hasta 80 °C en intervalos de a 10 °C, los espectros de absorbancia para las distintas temperaturas fueron obtenidos de la siguiente manera: i) estabilización de la muestra a la temperatura deseada por 15 minutos, ii) medición de cuatro espectros sucesivos y promedio de los datos para eliminar variaciones de la línea de base, y iii) obtención de la derivada cuarta sobre los datos promedio.

Análisis de la cuarta derivada de los espectros de absorbancia

Las derivadas de los espectros fueron hechas con intervalos sucesivos de 1.0, 1.4, 1.8 y 2.2 nm como aconseja Buttler (1979). Previamente los espectros fueron suavizados por el método de Savitsky y Golay (Steiner *et al* 1972) utilizando 51 puntos de promediación (grado 2). (Ballícora 1993)

Actividades enzimáticas

A) Actividad Protein disulfuro isomerasa (PDI) (Freedman 1984)

La muestra fue incubada en una solución que contenía buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, DTT 20 μ M y RNAsa^{ser} 6.5 μ M (vol. final: 0.1 ml). A distintos tiempos (entre 3 y 4 puntos dentro de los primeros 10 min.), se tomaron alícuotas de 5 μ l y fueron inyectadas en 1.3 ml de una solución conteniendo buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.9, MgCl₂ 5 mM, KCl 25 mM y 60 μ g de RNA. La actividad de la RNAsa fue determinada por el incremento de la absorbancia a 260 nm que produce la hidrólisis del RNA (efecto hipercrómico). La actividad PDI se calculó determinando la velocidad inicial de reactivación de la RNAsa.

B) Actividad Tiol Oxidasa (TOx)

La muestra fue incubada en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, GSSG 200 μ M y RNAsa^{red} 3 μ M (volumen final 0.1 ml). La velocidad de reactivación de la RNAsa en estas condiciones, se determinó como se indica en A).

C) Actividad Protein disulfuro reductasa (PDR)

La actividad PDR fue determinada por el aumento en la fluorescencia originado en la reducción de Ins-FTC. La muestra (0.01 a 0.1 ml) fue incubada en una solución buffer fosfato de potasio 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, DTT 0.1 mM, y de Ins-FTC 0.2 μ M (volumen final: 3 ml). El incremento de la fluorescencia fue

medido entre los 0.5 y los 10.5 minutos de incubación (emisión: 519 nm, excitación: 495 nm).

1 Unidad PDI o TOx representa 1 μmol de RNAsa regenerado por minuto. (Hawkins *et al* 1991b)

1 Unidad PDR se definió como la velocidad de aparición de 1 μmol de producto (cadenas A y B separadas de la di Ins-FTC) por minuto, por litro de solución.

Ensayo de medición para proteínas oxidantes de la PDI

La fracción correspondiente fue incubada en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 3 mM, PDI 9 μg y RNAsa^{red} 1.2 μM (volumen final: 0.1 ml). A los distintos tiempos de reacción, la actividad RNAsa fue medida en alícuotas (5 μl) como se describe para la actividad Tiol oxidasa.

Preparación de los buffers para analizar los efectos de pH

El pH de las soluciones conteniendo 50 mM Tris y 50 mM fosfato de potasio fue ajustado hasta el valor deseado con HCl o KOH según corresponda.

Estudios a potencial redox constante

La concentración de GSH y DTT fue determina con DTNB. La concentración de GSSG se midió en presencia de Glutation reductasa, siguiendo la disminución en la absorbancia a 340 nm debida a la oxidación del NADPH ($\epsilon = 6.23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Las soluciones de DTT oxidado se prepararon por pesada. Las soluciones de tioles preparadas en HCl 0.1 mM y EDTA 0.5 mM para evitar oxidación aeróbica fueron almacenadas por no más de una semana a $-15 \text{ }^\circ\text{C}$. La enzima fue preincubada durante 10 minutos en el buffer redox correspondiente previo a la reacción.

Ajuste matemático de los datos experimentales

Las regresiones no lineales para el ajuste de las ecuaciones a los datos experimentales fueron realizadas con una computadora personal utilizando el programa Table Curve (Jaendel Scientific).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD Y
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LA PDI DE
SEMILLAS GERMINADAS DE COLZA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1	<u>Purificación de la PDI de semillas germinadas de colza.....</u>	71
1.1	Homogeneización.....	72
1.2	Fraccionamiento con sulfato de amonio.....	72
1.3	Cromatografía de intercambio catiónico (CM celulosa)..	72
1.4	Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE celulosa).	73
1.5	Cromatografía de afinidad (Con A Sepharose).....	74
1.6	HPLC (Biosil Sec-250).....	75
1.7	Purificación de la PDI.....	75
1.8	Análisis de la composición proteica de las distintas fracciones obtenidas durante la purificación.....	77
1.9	Secuencia parcial de amino ácidos y su comparación con otras PDI.....	78
2	<u>Análisis estructural de la PDI de colza.....</u>	79
2.1	Determinación de la masa molecular.....	79
2.2	Caracterización de las cadenas de oligosacáridos.....	80
2.2.1	Digestión con glicosidasas.....	80
2.2.2	Afinidad por las lectinas unidas a Sepharose...	80
2.3	Análisis espectrofluorométrico.....	81

1 Purificación de la PDI de semillas germinadas de colza.

El estudio de las modificaciones en los enlaces disulfuro de las proteínas implica comprender tanto las características de las enzimas que intervienen en estos procesos (PDOR) como las propiedades de sus proteínas sustrato. En los vegetales, la PDOR mejor caracterizada en la actualidad es la Trx, tanto su forma citosólica (Trx-h) como sus variantes cloroplásticas (Trx-f y Trx-m). En cuanto a las proteínas sustrato, la Trx-h reduce (*in vitro*) varias proteínas solubles de semilla como las tioninas, α -amilasa, el inhibidor de tripsina y proteínas de reserva presentes en el grano de trigo. Mientras que las Trx del cloroplasto, modulan la actividad de varias enzimas del ciclo reductivo de las pentosas fosfato, mediante la reducción/oxidación de enlaces disulfuro en la proteína sustrato, (*e.g.* la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa, la malato deshidrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) (Schurman 1993).

Por otra parte, la PDI (una PDOR de localización microsomal) acelera el plegamiento y la formación de los enlaces disulfuro correctos en las proteínas importadas al retículo endoplásmico. Ha sido caracterizada extensamente en mamíferos y hongos, y recientemente se inició su caracterización en los vegetales. (Freedman *et al* 1994) Se desconoce su rol en procesos tales como la formación de la semilla y en la germinación donde existe una gran movilización de proteínas requiere la interconversión tiol-disulfuro. Dado su potencial participación en estos procesos, se decidió purificar la PDI de una fuente vegetal para estudiar sus características estructurales y cinéticas y con ello inferir su rol en el metabolismo de las plantas superiores.

Dentro de los tejidos vegetales plausibles para encarar la purificación de la PDI, las semillas son un material atractivo por su disponibilidad ilimitada en cualquier época del año. Por ello, se analizó inicialmente la presencia de actividad PDR y TOx en las fracciones solubles provenientes del fraccionamiento con sulfato de amonio (20-80% de saturación) de los homogenatos de semillas germinadas (colza, soja, arveja, lenteja, maíz y maní). Tanto en colza como en arveja se encontraron niveles altos de ambas actividades. Dado que el laboratorio dispone de una biblioteca de

cDNA de hojas de colza (Rodriguez-Suarez & Wolosiuk 1993) y su manipulación genética está bastante desarrollada, se decidió utilizar las semillas germinadas de esta especie como material de partida para la purificación de la PDI.

Además de disponer de una apropiada fuente de material, el éxito del proceso de purificación depende de la eficacia del método utilizado para detectar la presencia de la proteína de interés. Por lo descrito en el capítulo anterior, la di Ins-FTC constituye un sustrato conveniente para detectar la presencia de la PDI por cuanto minimiza las interferencias de otras PDOR (por ejemplo la Trx) al trabajar a pH 6.5-7.0 con el GSH como reductor.

1.1 Homogeneización

Se colocaron las semillas (100 gr) durante 17 horas en corriente de agua a una temperatura de 22-27 °C. Se decantó el líquido y las semillas germinadas se homogeneizaron en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7.9, EDTA 5 mM. La suspensión se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos y se descartó el precipitado. El pH de la fracción sobrenadante se ajustó en 6.5 con ácido acético glacial, para facilitar la separación de cuerpos lipídicos (Huang 1992).

Se centrifugó reiteradas veces a 16000 x g durante 15 minutos hasta eliminación completa del precipitado y el sólido flotante (cuerpos lipídicos), recuperando el sobrenadante (fracción H).

1.2 Fraccionamiento con sulfato de amonio

La fracción H se llevó a 30 % de saturación con sulfato de amonio sólido, se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos y se descartó el precipitado. La concentración de sulfato de amonio en el sobrenadante se elevó a 80 % de saturación, y el precipitado resultante fue sucesivamente resuspendido en buffer fosfato de potasio 30 mM pH 7.5 y dializado contra buffer C (acetato de sodio 30 mM pH 5.5, EDTA 0.5 mM), (fracción SA).

1.3 Cromatografía de intercambio catiónico (CM celulosa)

Luego de equilibrar la columna de CM celulosa (5 x 15 cm) con buffer C y sembrar la fracción SA (106.5 ml), se eluyó con i) 200 ml de buffer C, ii) 500 ml de un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.6 M) en buffer C y iii) 200 ml de NaCl 1 M en buffer

C. (Figura 1) Dado que la fracción no retenida por la columna poseía la mayor actividad PDR, fue concentrada a la mitad de su volumen por ultrafiltración y guardada a $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior análisis, (fracción CM).

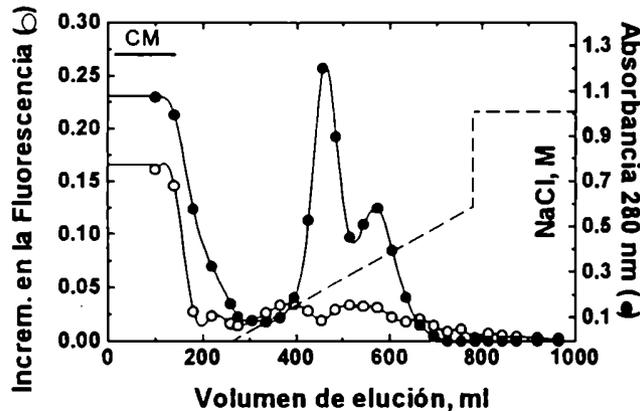


Figura 1: Cromatografía de la fracción SA en columnas de CM celulosa. La actividad PDR se midió a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1mM, GSH 5 mM y di Ins-FTC 0.1 μM . La reacción se inició agregando a la solución 100 μl de la fracción analizada. (Volumen final 2 ml). Luego de incubar por 30 minutos, se determinó la fluorescencia de cada fracción. Los círculos vacíos indican la diferencia entre el valor medido y valor para la reducción química. La línea punteada indica la concentración de NaCl en el buffer de elución. (eje derecho)

1.4 Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE celulosa)

Se equilibró la columna de DEAE celulosa (4.5 x 22 cm) con buffer C, se sembró la fracción CM (110 ml) y se eluyó sucesivamente con i) 300 ml de NaCl 50 mM en buffer C, ii) 500 ml de un gradiente lineal de NaCl (0.05 a 0.5 M) en buffer C y iii) con 250 ml de NaCl 1 M en buffer C. A 0.15 M NaCl eluyó una fracción activa (datos no mostrados). Dado que una proporción considerable de la actividad no fue retenida por la columna, se evaluó si la capacidad de la misma había sido saturada. Para ello las fracciones no retenidas fueron recromatografiadas en una columna similar, cuya elución consistió en 250 ml de buffer C, seguidos de 450 ml de un gradiente lineal de NaCl (0 a 0.5 M) en buffer C. (Figura 2)

La elución de la actividad PDR con 0.15 M NaCl indica que la retención de la enzima por la matriz es débil y deben extremarse los cuidados en cuanto al tamaño de la columna y las concentraciones de NaCl en el lavado previo al gradiente. La actividad PDI mantuvo su perfil de elución en columnas de intercambio aniónico tanto a pH 5.5 como a pH 7.6. El tratamiento de la muestra con DTT o GSSG (para modificar el estado redox de las cisteínas) no alteró la afinidad de la proteína por la matriz.

Las fracciones con actividad PDR retenidas por ambas columnas, se concentraron 10 veces por ultrafiltración; se agregó 60 ml de buffer Tris-HCl 30 mM pH 7.9, EDTA 0.1 mM y se ultrafiltró nuevamente hasta recuperar el volumen original (30 ml). (fracción DEAE)

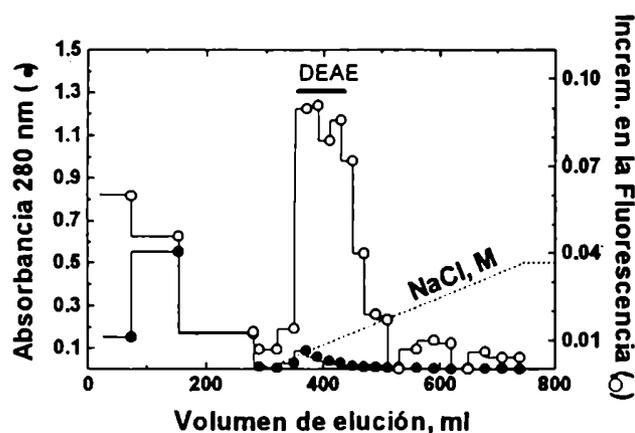


Figura 2: Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE celulosa) de la fracción CM. La actividad PDR se determinó como se indica en la leyenda de la figura 1 salvo que el pH se fijó en 6.5 y se incubó durante 25 minutos. La línea punteada indica la concentración de NaCl en el buffer de elución (eje izquierdo) en moles por litro.

1.5 Cromatografía de afinidad (Con A Sepharose)

La columna de Con A Sepharose fue equilibrada con buffer D (Tris-HCl 30 mM pH 7.9, NaCl 150 mM y 3 mM de CaCl_2 , MnCl_2 y MgCl_2). A la fracción DEAE se agregó, CaCl_2 , MnCl_2 y MgCl_2 con el fin de llevar la concentración final de cada catión a 5 mM. Se sembró en la columna indicada a 4 °C y la fracción proteica no retenida fue sembrada nuevamente. La elución iniciada a 4 °C con buffer D hasta que la absorbancia a 280 nm en el eluido fuese nula, seguido de 50 ml de α -metilglucósido (α -met-Glc) 2 % en buffer D. La temperatura de la columna fue elevada a 37 °C y la elución continuó con 40 ml de α -metilmanósido (α -met-Man) 8 % en buffer D. (Figura 3)

Las fracciones con actividad PDR que eluyeron con α -met-Man fueron dializadas exhaustivamente contra buffer acetato de sodio 10 mM pH 5.5, EDTA 2 mM y posteriormente contra buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6.5, EDTA 1.5 mM. El dializado se concentró por ultrafiltración hasta un volumen de 5.5 ml (fracción CA).

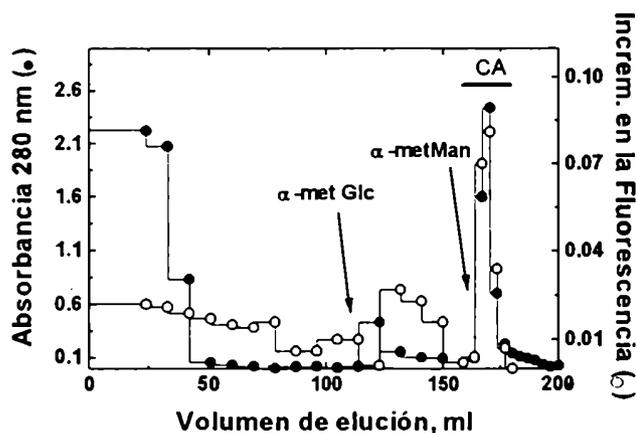


Figura 3: Cromatografía de la fracción DEAE en columnas de Con A Sepharose. La actividad PDR se midió como se indica en la leyenda de la figura 2. Se indica el comienzo de la elución con los metilglucósidos.

1.6 HPLC. (BioSil Sec-250)

La fracción CA (en alícuotas de 200 μ l) se sembró en una columna de filtración por gel BioSil Sec-250 y se eluyó con buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6.5, EDTA 0.5 mM y NaCl 150 mM con un flujo de 0.8 ml/min (Figura 4). Las fracciones con actividad PDR (15 ml) se dializaron exhaustivamente contra buffer acetato de sodio 10 mM pH 5.5, y luego se concentraron por ultrafiltración hasta un volumen de 8.5 ml (fracción HPLC).

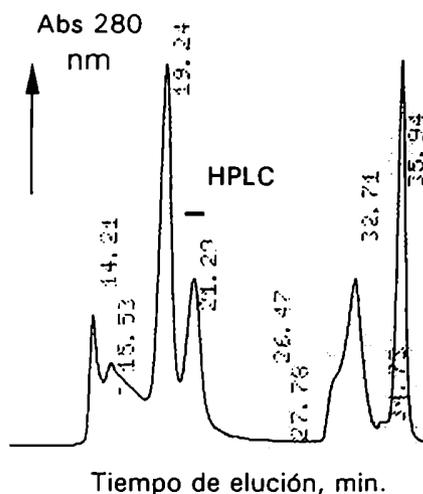


Figura 4: Filtración en geles por HPLC de la fracción CA. La actividad se midió como se indica en la leyenda de la figura 2. Solo se detectó actividad PDR en el pico que eluyó a los 21.29 minutos. Se detectó absorbancia a 280 nm.

1.7 Purificación de la PDI

La concentración proteica de las distintas fracciones fue estimada mediante el método de Bradford (1976). La actividad PDR se midió a pH 6.5 y 25 °C preincubando las fracciones por 20 minutos en buffer redox GSH/GSSG cuyo potencial se fijó en 300 mV y la concentración de GSH en 5 mM. (Tabla I)

Sobre la base de la concentración de proteína determinada por el método de Bradford, el coeficiente de extinción molar (ϵ) a 280 nm para la PDI (por monómero, masa molecular relativa 57 kDa) fue $113.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Tabla I

Fracción (volumen en ml)	Concentración proteica (mg/ml)	Proteína total (mg)	Concentración de actividad (unidad/ml)	Actividad (unidades)	Actividad específica (unidad/mg)	Purificación	Rendimiento (%)
SA (106.5)	17.4	1853	0.27	29.5	0.016		
CM (110)	6.5	725	0.20	21.8	0.030	2	74
DEAE (30)	3.3	100	0.38	11.4	0.11	7	39
CA (5.5)	2.7	15.4	1.68	9.6	0.62	39	33
HPLC (8.5)	0.18	3.2	0.30	5.4	1.66	104	18

El análisis de la Tabla I presenta los siguientes inconvenientes:

- i) Además de la PDI, en la célula existe un gran número de PDOR (Trx, Grx, Erp72, Erp60, P5). Si bien el empleo del GSH como agente reductor y un pH de 6.5 minimizan la interferencia de la Trx, tanto la Grx como las otras PDOR del RE sobreestiman la actividad.
- ii) Dado que la PDI no posee especificidad de sustrato, y su actividad es inhibida por diversos péptidos, es posible que la gran cantidad de proteínas, sobre todo en las primeras fracciones de la purificación, interfieran con el ensayo de actividad.
- iii) Los enlaces disulfuro presentes en otras proteínas (*e.g.* napina), pueden consumir parte del reductor empleado. Si bien esto fue minimizado por preincubación con un buffer redox GSH/GSSG, tanto la variación del

potencial redox como la del reductor afectan sensiblemente la actividad medida (ver sección 2).

De manera que los valores informados son relativos porque la multiplicidad de factores que interfieren en la medición de actividad de una PDOR es muy grande.

1.8 Análisis de la composición proteica en las distintas fracciones obtenidas durante la purificación

Las distintas fracciones obtenidas durante la purificación fueron analizadas por SDS-PAGE 10% bajo condiciones reductoras. (Figura 5)

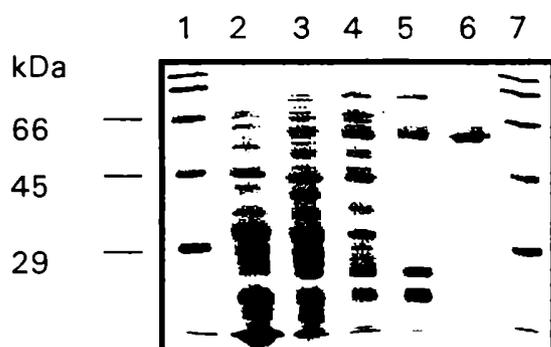


Figura 5: Análisis de las fracciones correspondientes a los distintos estados de la purificación (ver Tabla I) por SDS-PAGE. El gel se tiñó con Coomassie blue. Línea 2: 35 μg de la fracción SA, línea 3: 30 μg de la fracción CM, línea 4: 15 μg de la fracción DEAE, línea 5: 5.4 μg de la fracción CA, línea 6: 3.6 μg de la fracción HPLC., líneas 1 y 7: marcadores de peso molecular.

La fracción proveniente de la cromatografía de intercambio catiónico (línea 3), mostró un aumento en la intensidad para la banda que migra con una masa molecular de 57 kDa. Este procedimiento disminuyó un 60 % la cantidad total de proteína, mejorando la resolución de la cromatografía de intercambio aniónico siguiente y el rendimiento de la cromatografía en Con A Sepharose. A partir de este paso, la banda de 57 kDa fue aumentando en proporción (línea 4) hasta convertirse en única (línea 6).

La capacidad de unirse a Con A que mostró la actividad PDR permitió utilizar a esta lectina acoplada a Sepharose para separar gran cantidad de contaminantes. (línea 5) En particular, el lavado con α -met-Glc (que desorbe las proteínas débilmente unidas) previo a la elución con α -met-Man realizada a 37 °C, incrementó la resolución de este procedimiento notablemente.

Finalmente, el uso de HPLC de filtración por geles en las condiciones descriptas, condujo a una preparación homogénea de la PDI (línea 6).

1.9 Secuenciación parcial de amino ácidos y su comparación con otras PDI.

En general, la forma funcional de la PDI es un homodímero cuyo polipéptido constituyente contiene dos sitios activos con una secuencia aminoacídica altamente conservada: (Cys-Gly-His-Cys).

Para caracterizar la proteína purificada, inicialmente se intentó secuenciar el extremo amino terminal por el método de Edman. Como los ensayos preliminares sugirieron que el N-terminus estaría bloqueado, se encaró la preparación de péptidos internos. La proteína homogénea fue reducida con DTT en condiciones desnaturalizantes y sus sulfhidrilos libres marcados con [1-¹⁴C]-IAA. Luego de la derivatización y tratamiento con Lys-C, los productos de la digestión fueron separados en HPLC de fase reversa; primero en una columna C18 y luego en C8. La fracción radioactiva que eluyó de la última columna fue utilizada para la secuenciación por el método de Edman.

La secuenciación mostró más de un pico por ciclo, por lo que aparentemente la muestra contenía más de un péptido. La intensidad de los picos obtenidos permitió establecer una serie de secuencias aminoacídicas que fueron comparadas con el programa Blast, utilizando una base de datos no redundante y una matriz BLOSUM 62 para los péptidos 1 y 2, y BLOSUM 100 para el péptido 3. (Altschul *et al* 1990). Este procedimiento indicó la existencia de tres péptidos. Los mismos se presentan a continuación alineados con la secuencia de aminoácidos de la PDI de alfalfa (Shorosh & Dixon 1992).

	1	MAKNVAIFGL	LFSLLVLVPS	QIFAEESSTD		
	31	AKEFVLTLDN	TNFHDTVKKH	DFIVVEFYAP	<u>WCGHC</u>	<u>KKLAP</u>
PEP.1		<u>EFVLTLD</u>	<u>VAFPD</u>	<u>TVNKH</u>	<u>EFIVVEFYA</u>	
	71	EYEKAASILS	THEPPVLAK	VDANEEHNKD	LASENDVKGF	PTIKIFRNGG
PEP.2		<u>AASELS</u>	<u>SHYPPV</u>	<u>LAK</u>	<u>VDASEEK</u>	
	121	KNIQEYKGR	EAEGIVEYLK	KQSGPASTEI	KSADDATAFV	GDNKVVIVGV
	171	FPKFSGEEYD	NFIALAEKLR	SDYDFAHTLN	AKHLPKGDSS	VSGPVVRLFK
	221	PFDELFDVDSK	DFNVEALEKF	IEESSTPIVT	VFNNEPSNHP	FVVKFFNSPN
	271	AKAMLFINFT	TEGAESFKTK	YHEVAEQYKQ	QGVSLVGDV	ESSQGAFAQYF
	321	GLKEEQVPLI	IIQHNDGKKF	FKPNLELDQL	PTWLKAYKDG	KVEPFVKSEP
	371	IPETNNEPVK	VVVGQTLEDV	VFKSAKNVLI	EFYAP <u>WCGHC</u>	<u>KQLAPILDEV</u>
PEP.3				<u>NVLI</u>	<u>EFYAP</u>	
	421	AVSFQSDADV	VIAKLDATAN	DIPTDTFDVQ	GYPTLYFRSA	SGKLSQYDGG
	471	RTKEDIIEFI	EKNKDKTGAA	QQEVEQPKAA	AQPEAEQPKD	<u>EL</u>

Las secuencias de los péptidos analizados no contenían cisteínas, pero eran homólogos a la región que precede al sitio activo cercano al amino terminal [péptido 1] y a la región equivalente del sitio activo situado en la región carboxilo terminal [péptido 3].

La Tabla II muestra el porcentaje de identidad de las secuencias parciales respecto a las conocidas para las PDI vegetales, humana, levadura y una proteína de la superfamilia de las tiorredoxinas (Erp72). Este análisis fue efectuado con el programa Blast.

Los tres polipéptidos mostraron el mayor porcentaje de identidad con el conjunto de las PDI vegetales. En cambio, las PDI de mamíferos y hongos poseen un bajo porcentaje de identidad aunque las regiones cercanas a los sitios activos de la proteína estén altamente conservadas. La proteína Erp72, que posee tres sitios homólogos al sitio activo de la PDI, fue incluida en el análisis porque sorpresivamente la identidad con la PDI de colza es mayor que las contrapartes de mamíferos y levaduras. Estos estudios establecieron claramente que la proteína purificada era una PDI.

Tabla II

	Alfalfa	Ricino	Maíz	Trigo	Avena	Soja	ERp72	Humana	Levadura
péptido 1	81	70	62	59	55	65	48	37	30
péptido 2	79	75	75	66	66	---	58	46	12
péptido 3	100	89	100	100	100	89	89	78	55

2 Análisis estructural de la PDI.

2.1 Determinación de la masa molecular

El análisis de la enzima en geles de poli(acrilamida), tanto en condiciones reductoras, como no reductoras indicó que la masa molecular relativa de las subunidades es de 57 kDa (Figura 5). Este valor fue semejante a los reportados para otras PDI. En cambio, la filtración por gel, estableció que el peso molecular de la forma nativa es 114.500 ± 1500 (Figura 6).

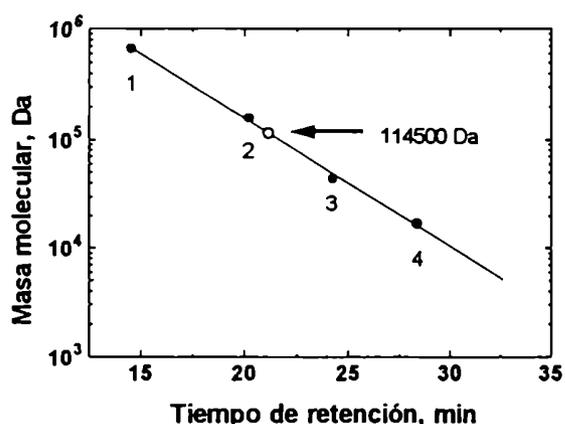


Figura 6: Cálculo de la masa molecular de la PDI por filtración por geles (HPLC). Para el cálculo de regresión lineal se utilizó los valores obtenidos para los siguientes estándares de masa molecular: 1. Tiroglobulina (670 kDa), 2. Gama globulina bovina (158 kDa), 3. Ovoalbumina de pollo (44 kDa) y 4. Mioglobina equina (17 kDa). El resultado obtenido está representado por la línea recta y la flecha señala el valor calculado para la masa molecular de la PDI sobre la base de su tiempo de retención en la columna.

En conjunto, estos resultados indicaron que en coincidencia con otros organismos la PDI de colza está constituida por dos subunidades idénticas.

2.2 Caracterización de las cadenas de oligosacáridos

2.2.1 Digestión con glicosidasas

La PNGasa F es una amidasa obtenida de *Flavobacterium meningosepticum* (Tarentino *et al* 1990) que cataliza la hidrólisis del enlace entre la N-acetilglucosamina (GlcNAc) interna y el residuo de asparagina de las glicoproteínas de alta manosa, híbridas y complejas. (Figura 7a)

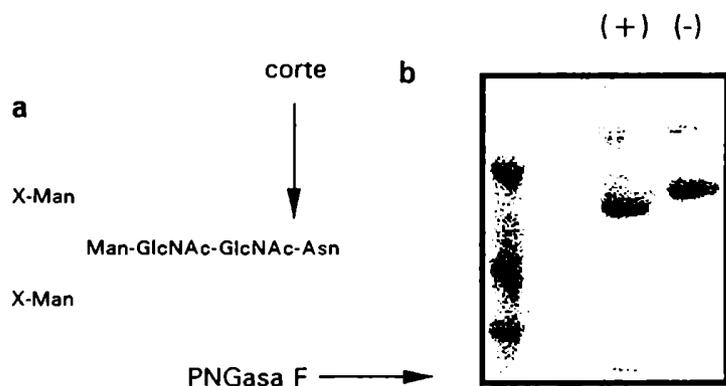


Figura 7: Desglicosilación de la PDI por tratamiento con la PNGasa F. a) Esquema del sitio de corte para la glicosidasa. b) análisis por SDS-PAGE de la PDI tratada con PNGasa F (+) y del control sin deglicosilar (-). La banda que aparece por debajo de la enzima deglicosilada corresponde a la PNGasa F.

El SDS-PAGE mostró que la masa molecular de la PDI tratada con PNGasa F era 2 kDa inferior a la enzima nativa. Esta disminución sugirió la presencia de un oligosacárido unido vía asparagina a la PDI. (Figura 7b)

2.2.2 Afinidad por las lectinas unidas a Sepharose.

La PDI de colza mostró una alta afinidad por las columnas de Con A unida a Sepharose, pero no fue retenida por columnas de [aglutinina de germen de trigo]-Sepharose (Wheat germ agglutinin- Sepharose). En consecuencia, la cadena glicosídica contendría oligosacáridos del tipo alta manosa y no poseería residuos de ác. N-acetil Neuramínico (no descrito en vegetales) y/o D-GlcNAc (Allen *et al* 1973). Por otra parte, algunos oligosacáridos complejos en plantas poseen un residuo de fucosa combinado (α 1-3) a la GlcNAc que está unida a la asparagina de la proteína. Dado que la PNGasa F no escinde este oligosacárido, el liberado por el tratamiento con esta glicosidasa en la PDI de colza no contendría este residuo de fucosa (Lerouge & Faye 1996).

2.3 Análisis espectrofluorométrico.

El espectro de emisión de fluorescencia mostró un máximo a 308 nm cuando de la PDI nativa de colza fue excitada a 280 nm. Sin embargo, la incubación con DTT 5 mM durante 1 hora a 25 °C, desplazó el espectro de emisión levemente hacia el rojo ($\lambda_{em}^{max} = 315$ nm) y concurrentemente incrementó un 10 % la intensidad de fluorescencia. (Figura 8) Aparentemente, la reducción de las cistinas produjo una modificación del entorno en que se encuentran los amino ácidos fluorescentes (triptofano, tirosina).

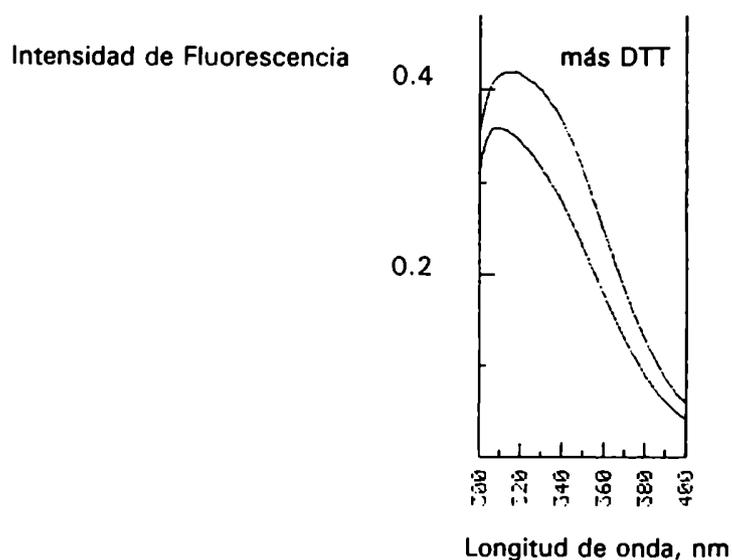


Figura 8: Efecto del DTT sobre el espectro de emisión de la PDI. La PDI fue reducida durante 60 minutos en buffer acetato de sodio 100 mM pH 5.1, DTT 10 mM. El efecto Raman del H₂O fue corregido restando el espectro correspondiente a la solución en ausencia de PDI.

ANÁLISIS CINÉTICO DE LA PDI DE COLZA.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1 <u>Características generales de la formación, ruptura e isomerización de los enlaces disulfuro en las proteínas.....</u>	82
2 <u>Caracterización de una PDOR.....</u>	83
3 <u>Actividad PDR.....</u>	84
3.1 Efecto del pH.....	85
3.2 Efecto de la concentración de agente reductor.....	86
3.3 Efecto del potencial redox.....	87
3.4 Efecto de la concentración de tiol a potencial redox regulado constante.....	89
3.5 Efecto de los iones divalentes.....	89
3.6 Efecto de la temperatura.....	90
3.7 Efecto de la glicosilación sobre la estabilidad térmica.....	90
3.8 Discusión.....	92
4 <u>Actividad TOx.....</u>	96
4.1 Efecto de la concentración de sustrato.....	96
4.2 Efecto del pH.....	96
4.3 Efecto del potencial redox.....	97
4.4 Efecto de la concentración de GSSG a potencial redox regulado constante.....	98
4.5 Oxidación de la RNAsa ^{red} con insulina catalizada por PDI.....	98
4.6 Discusión.....	99
5 <u>Actividad PDI.....</u>	102
5.1 Efecto de la concentración de sustrato.....	102
5.2 Efecto del pH.....	103
5.3 Efecto del potencial redox.....	104
5.4 Efecto de la concentración de GSH a potencial redox regulado constante.....	105
5.5 Discusión.....	106

1 Características generales de la formación, ruptura e isomerización de los enlaces disulfuro en las proteínas

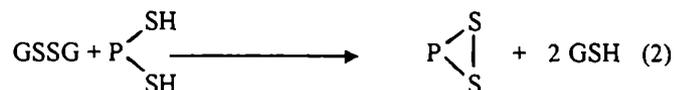
El proceso de oxido-reducción que involucra a los residuos cisteína de una proteína puede esquematizarse mediante la siguiente reacción:



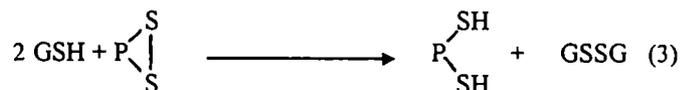
Si bien existe una gran variedad de agentes dadores o aceptores de electrones, existió consenso en elegir al glutation para ejemplificar de forma general el proceso por cuanto constituye el tiol intracelular más abundante.

Las PDOR son proteínas que catalizan la oxidación, la reducción y la isomerización de los enlaces cistina en otras proteínas.

Si la proteína sustrato se encuentra en estado reducido y existe una cantidad apreciable de oxidante, la reacción evolucionará hacia la formación del enlace disulfuro. La capacidad de la PDOR para catalizar este proceso se denominará actividad tiol oxidasa (TOx) y se representará mediante la siguiente ecuación:



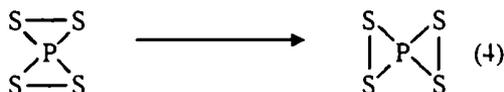
Por el contrario, la actividad de la PDOR que facilita la reducción de la proteína sustrato



será denominada actividad protein disulfuro reductasa (PDR).

Es de notar que la oxidación (actividad tiol oxidasa) o la reducción (actividad protein disulfuro reductasa) de la proteína sustrato quedan inequívocamente definidas por el estado inicial en que se encuentran los SH de los residuos cisteína.

Existe una tercera reacción de intercambio tiol-disulfuro que, si bien conduce a una especie diferente, mantiene invariable el estado redox de la proteína. Este proceso, la isomerización de enlaces disulfuro dentro de una proteína, es catalizado por la actividad protein disulfuro isomerasa (PDI) de la PDOR.



La tendencia a la formación o reducción de un enlace disulfuro en una proteína estará determinada por el potencial redox de este enlace y por el potencial redox del compuesto utilizado como aceptor o dador de electrones. En cambio, la isomerización estará determinada por el potencial redox del enlace formado y del escindido. En este contexto, la PDOR modifica la velocidad con la cual el proceso de oxido-reducción se lleva a cabo; *i.e.* altera las características cinéticas de la reacción. La eficiencia con que es catalizada la reducción, oxidación o isomerización en la proteína sustrato, estará dada no sólo por las características termodinámicas de las especies reaccionantes, sino también por las propiedades de la PDOR. Así por ejemplo las tioredoxinas y la DsbA de *E. coli* son muy eficientes para catalizar la reducción y la formación, respectivamente, de enlaces disulfuro, pero ambas son menos eficientes que la PDI de mamíferos en la isomerización de estos enlaces.

2 Caracterización de una PDOR

Numerosos ejemplos en la literatura muestran que varios factores determinan el efecto catalítico de una PDOR en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro.

- la proteína sustrato

Ha sido demostrado en numerosos laboratorios que bajas concentraciones de la Trx-f reducen eficientemente a la FBPasa de cloroplastos, pero mayores concentraciones de Trx-m o Trx de *E. coli* son necesarias para lograr un efecto equivalente. Sin embargo, esta afinidad de las Trx varía al modificar la conformación de la proteína sustrato (Ballícora & Wolosiuk 1994, Mora-García *et al* 1996). Por otra parte, la Trx-m es la más eficiente en la activación de la malato deshidrogenasa. De manera que no sólo la proteína sustrato, sino también su conformación, determinan la velocidad del intercambio tiol-disulfuro.

- el dador o aceptor de electrones

Aunque las condiciones termodinámicas favorezcan la realización del intercambio tiol-disulfuro, en numerosas ocasiones la PDOR condiciona su factibilidad. Cuando se utiliza DTT como dador de electrones, tanto la PDI de mamíferos como la Trx de *E. coli* aceleran la reducción de la insulina. En cambio, sólo la PDI de mamíferos es efectiva en la escisión de las cadenas de la insulina cuando se utiliza glutatión.

- el pH del medio de reacción

Una rasgo notable del motivo -Cys-X-Y-Cys- presente en el sitio activo, es que el pKa del tiol cercano al extremo N-terminal es menor que el comúnmente observado en compuestos de bajo peso molecular y en otros tioles proteicos. Por este motivo, el pH al cual procede la reacción de intercambio tiol-disulfuro determinará la concentración efectiva del grupo nucleofílico tiolato. Por este hecho la DsbA bacteriana cataliza la reactivación de la RNAsa A a pH ácidos, en tanto que la PDI de mamíferos es efectiva a pH neutro o alcalino.

Teniendo en cuenta las consideraciones descritas en los ítems 1 y 2 de esta sección, la PDI purificada de semillas de colza fue analizada en sus tres actividades, PDR, TOx y PDI.

3 Actividad PDR

Los tioles de bajo peso molecular como el DTT, el β -Met y el GSH son generalmente eficientes en la reducción de enlaces disulfuro en proteínas. Dado que la especie activa en la reacción es el ion tiolato, su pKa determinará el rango de pH donde la reacción de reducción estará favorecida. Utilizando una concentración total de tiol igual a 10 mM, y los valores de pKa reportados en la introducción (ver ionización del grupo SH), la concentración de ion tiolato fue calculada en función del pH de la solución. La figura 1 muestra que la especie ionizada del GSH aparece a pH mayores de 7, mientras que para el DTT recién lo hace a pH mayores de 7.5. A pH 8, cerca de un 20% y un 8% del GSH y del DTT, respectivamente, constituyen la especie reactiva en la reacción de intercambio tiol-disulfuro.

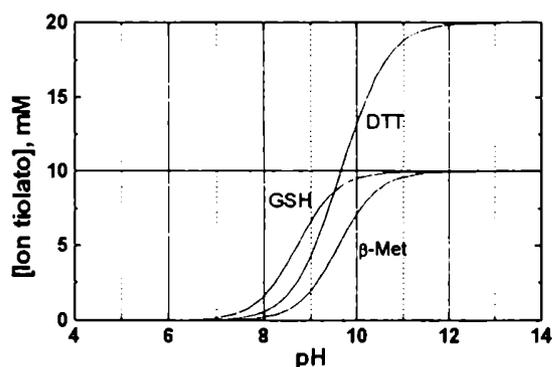
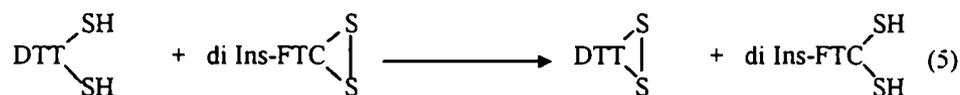


Figura 1: Concentración de la especie ionizada (ion tiolato) para distintos tioles en función del pH del medio. Se calculó la concentración del ion tiolato utilizando una concentración total de 10 mM. (ver Apéndice 2)

En principio, se utilizó la reducción de la di Ins-FTC para caracterizar la actividad PDR de la PDI de colza. Para ello se utilizó a) la fracción enzimática post Con A en la cual la PDI constituye más del 80 % de la masa total de proteínas y b) una concentración de DTT de 0.1 mM y un pH de 7.6 de manera que la reducción en ausencia de la PDOR sea mínima.



El aumento en la velocidad del proceso reductivo fue linealmente dependiente de la masa de proteína agregada desde 9 hasta 72 μg y se alejó de la linealidad con cantidades mayores. (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteína en la fracción utilizada equivalen aproximadamente a una concentración de enzima de 1.4 nM, tomando como base la masa molecular del monómero, 57 kDa).

3.1 Efecto del pH

El efecto del pH sobre la reacción de reducción fue analizado utilizando DTT y GSH como agentes reductores (Figura 2).

En ausencia de enzima, la reducción de la di Ins-FTC con ambos tioles ocurrió a pH mayores a 7.5 por cuanto la especie activa aumenta con la alcalinización del medio (*c.f.* Figura 1). Sorprendentemente, la reducción bioquímica ocurrió a un pH óptimo por debajo del rango donde aparece la especie ionizada de los reductores. La actividad alcanzó el máximo a pH 6.7 y 6.3 en presencia de GSH y DTT, respectivamente.

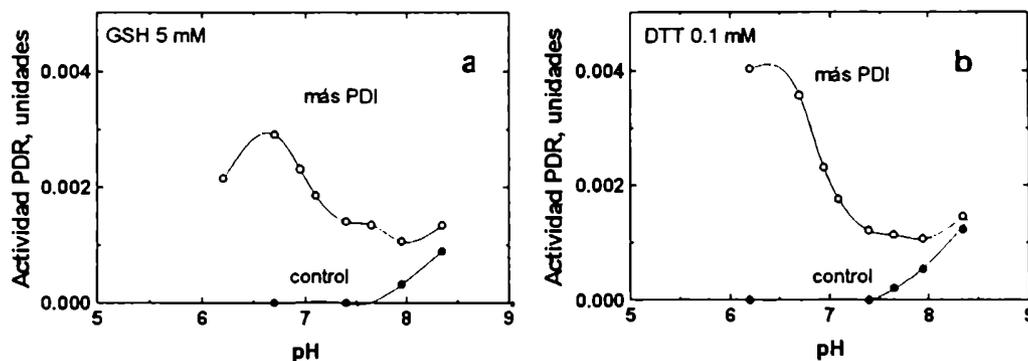


Figura 2: Efecto del pH en la actividad reductasa de la PDI de colza. Se analizó la reducción de la di Ins-FTC utilizando como agente reductor: a) GSH y b) DTT. Las reacciones iniciadas con el agregado de reductor se efectuaron en un volumen de 3 ml conteniendo, buffer tris-fosfato 50 mM, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.1 μ M y 18 μ g de la fracción enzimática.

Es de destacar que la fluorescencia del reactivo también depende del pH. Sin embargo los valores de actividad fueron corregidos para superar este efecto, como se indica en el capítulo 1.

3.2 Efecto de la concentración de agente reductor

En base a la despreciable reducción química observada con GSH y DTT, 6.7 fue elegido como pH para analizar la influencia del reductor sobre la actividad PDR. Bajo estas condiciones, el efecto catalítico fue detectado a concentraciones de DTT tan bajas como 0.2 μ M, incrementándose la actividad de manera aproximadamente lineal en un rango de concentraciones que abarcó 4 órdenes de magnitud (0.2 μ M a 5 mM). (Figura 3a) Para el GSH, el proceso reductivo fue observable a concentraciones mayores a 0.1 mM. (Figura 3b)

En ambos casos, la concentración del reductor no superó 10 mM porque causa una disminución del rendimiento cuántico de la di Ins-FTC ("quenching").

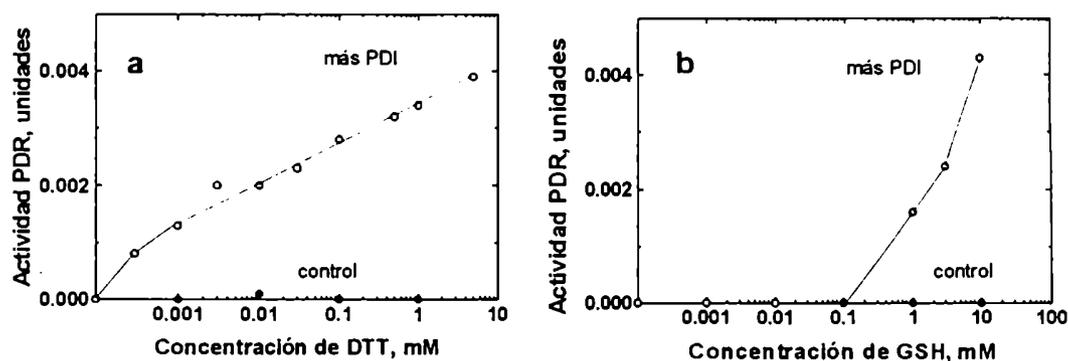


Figura 3: Efecto de la concentración de agente reductor en la actividad reductasa de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron en un volumen final de 3 ml conteniendo buffer Tris-fosfato 50 mM pH 6.7, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.1 μ M, fracción enzimática 18 μ g y se iniciaron con el agregado de a) DTT y b) GSH en la concentración indicada.

3.3 Efecto del potencial redox

Como se discutió anteriormente, la reacción de reducción tiol-disulfuro ocurrirá si es termodinámicamente favorable. Variando la relación tiol reducido/tiol oxidado es posible regular el potencial redox de las soluciones y con ello determinar el efecto sobre la reducción de la di Ins-FTC.

Dado que la reacción de reducción dependía de la concentración de tiol reducido (Figura 3), se mantuvo constante la concentración de esta especie (5 mM para el GSH y 10 μ M para el DTT) mientras variaba la concentración de la especie oxidada. De esta manera las soluciones abarcaban un amplio rango de potenciales. Además, con el fin de evitar las correcciones de los potenciales redox standard (E°), las reacciones se efectuaron a pH 7.0 y 25 $^\circ$ C.

La fluorescencia de la di Ins-FTC permaneció invariable en ausencia de la enzima. En cambio, la actividad PDR alcanzó valores máximos cuando los potenciales eran inferiores a -0.30 V, tanto para DTT como para GSH. El 50% de la actividad máxima fue observado a -0.22 V y -0.24 V para el GSH y para el DTT, respectivamente (Figura 4).

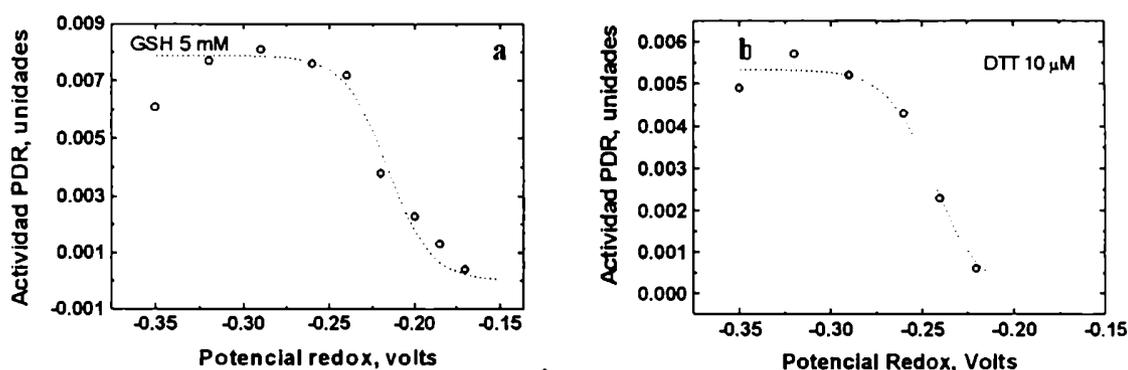


Figura 4: Efecto del potencial redox en la actividad reductasa de la PDI de colza. a) buffer redox GSH/GSSG y b) buffer redox DTT^{red}/DTT^{ox}. La reacción se efectuaron a 25 °C en un volumen final de 2 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.15 μM y el buffer redox correspondiente manteniendo la concentración de la especie reducida constante indicada en el gráfico. La reacción fue iniciada con el agregado de la fracción enzimática (preincubada en buffer redox durante 10 min.) 16.2 μg. Las líneas punteadas indican el resultado obtenido al modelar la actividad en función del potencial redox como se describe en la discusión.

Las reacciones de oxido-reducción para los tioles involucran protones en sus hemireacciones. Dado que el E' considera un pH de 7.0 para la reacción, los valores de potencial a otro pH deben corregirse utilizando la siguiente ecuación

$$E_{pH} = E^{0'} + \frac{0.059}{2} \times \log\left(\frac{Ox}{Red}\right) - 0.059 \times (pH - 7) \quad (6)$$

Si el equilibrio entre la PDI y el buffer redox es rápido (ver discusión), la proporción de enzima reducida estará determinada por el potencial redox del buffer utilizado. Si la actividad fuera dependiente de la concentración de enzima en estado reducido, el 50% de la actividad máxima obtenida a los distintos pH analizados debería diferir en 0.059 V por cada unidad de pH.

La dependencia de la actividad PDR con el potencial redox fue analizada a pH 6.0 utilizando GSH como regulador del potencial. El valor de $E^{0'}$ obtenido fue -0.16 V. La diferencia de 0.06 V entre pH 7 (-0.22) y pH 6, mostró claramente la correlación entre el potencial redox de la solución y la actividad enzimática (Figura 5).

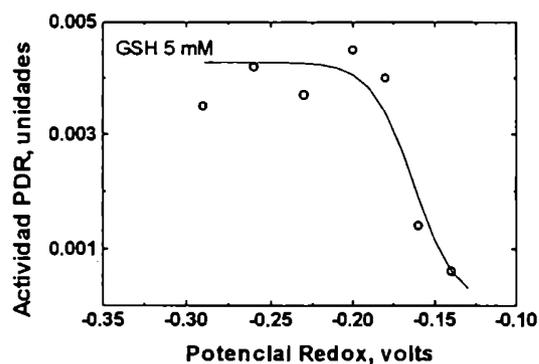


Figura 5: Efecto del potencial redox en la actividad reductasa de la PDI de colza a pH 6.0. Las reacciones se efectuaron como se indica en la figura 4 salvo que el pH del buffer fue 6.0. La línea llena indica el resultado del modelado descrito en la discusión.

3.4 Efecto de la concentración de tiol a potencial redox regulado constante.

Dado que el potencial redox modula la actividad enzimática, se analizó si el efecto dependía sólo de este factor termodinámico o la concentración de tiol reducido contribuía también al mismo.

Para ello la actividad PDR fue medida a concentraciones crecientes de tiol (forma reducida), variando la concentración de la especie oxidada de manera que el potencial se mantenga constante en -0.35 V, (para el DTT), y en -0.30 V (para el GSH).

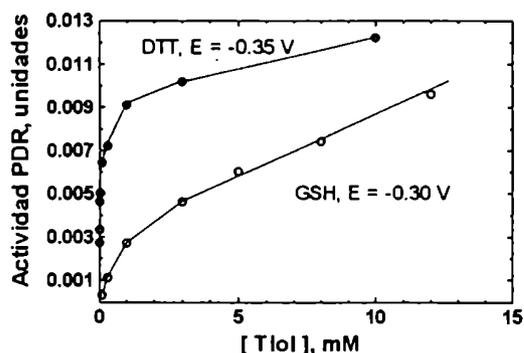


Figura 6: Efecto de la concentración de GSH y DTT en la actividad reductasa de la PDI de colza a potencial redox constante. Las reacciones se efectuaron como se indica en la figura 4 variando la concentración de los tioles según se indica en el gráfico.

La figura 6 muestra que no sólo es importante el potencial redox en la efectividad de la catálisis, sino que la misma depende sensiblemente de la concentración total del tiol reducido. Este efecto estaría directamente relacionado con el mecanismo catalítico, ya que en las condiciones utilizadas para los ensayos, no se observó reducción química en ninguno de los casos.

3.5 Efecto de los iones divalentes

La PDI de mamíferos une iones Ca^{2+} (19 mol Ca^{2+} /mol proteína) con baja afinidad (Lebeche *et al* 1994). Esta unión aparentemente induce cambios conformacionales en la estructura de la proteína por cuanto modifica levemente el espectro de absorbancia de la enzima. El efecto iones bivalentes (0.3 μM a 1 mM) fue analizado a un potencial redox regulado (GSH/GSSG) de -0.330 V (GSH 5 mM) en buffer MES 50 mM pH 6.5, di Ins-FTC 0.2 μM y PDI 1.8 $\mu\text{g/ml}$. Ni el Ca^{2+} ni el Mg^{2+} modificaron la actividad PDR de la PDI en el rango de concentraciones mencionado.

3.6 Efecto de la temperatura

El incremento de la temperatura es un factor que perturba la estructura proteica con la concurrente perdida de la funcionalidad. En general, la actividad de las enzimas disminuye a medida que la proteína pierde su estructura nativa.

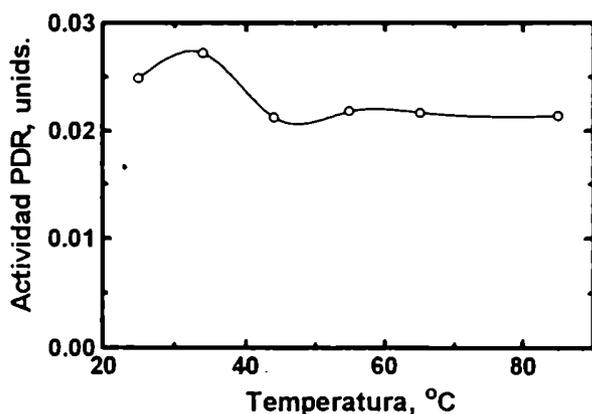


Figura 7: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la PDI. Se incubó 15.3 μg de enzima en buffer acetato de sodio 5 mM, EDTA 0.1 mM en un volumen final de 0.2 ml a distintas temperaturas. Luego se midió la actividad a 22 °C en un volumen final de 2 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.7 μM y se inició la reacción con el agregado de DTT (concentración final 0.5 mM)

Con el fin de analizar el efecto de la temperatura, la PDI de colza fue incubada durante 5 minutos a diferentes temperaturas, guardada en hielo y ensayada su actividad PDR de acuerdo a materiales y métodos (Figura 7). La actividad PDR disminuyó un 20% entre 30 °C y 40 °C, pero sorprendentemente, luego mantuvo su capacidad catalítica hasta 85 °C.

3.7 Efecto de la glicosilación sobre la estabilidad térmica

Una de las funciones que desempeñarían las cadenas de oligosacáridos unidas covalentemente a proteínas, sería la estabilización de la estructura terciaria ante variaciones extremas en las condiciones del medio. Una variación a la cual son

sensibles las proteínas es el incremento de la temperatura. Wang *et al* (1996) mostraron que la estabilidad térmica de varias glicoproteínas disminuye al ser desglicosiladas y simultáneamente aumenta su tendencia a la agregación cuando los polipéptidos están parcialmente o totalmente desplegados.

Para analizar como afecta la glicosilación a la estabilidad de la PDI de colza ante el incremento de temperatura, la enzima fue deglicosilada con PNGasa F en condiciones no desnaturalizantes. Los análisis por SDS-PAGE mostraron que la desglicosilación fue completa (*c.f.* figura 7, sección 1). La PDI fue separada de los oligosacáridos liberados y de la PNGasa F mediante filtración por gel. Paralelamente, una alícuota idéntica de enzima fue sometida a los mismos tratamientos, en ausencia de PNGasa F (control sin deglicosilar). La concentración de proteína en estas preparaciones fue 65 ± 12 $\mu\text{g/ml}$ para la muestra control y 86 ± 2 $\mu\text{g/ml}$ para la muestra deglicosilada. La Tabla III muestra que la desglicosilación no afectó la formación del dímero pero causó una disminución del 61% en la actividad catalítica.

Tabla III

	Control	Deglicosilada
Masa molecular de la subunidad determinada por SDS-PAGE (kDa)	57	55
Actividad específica (unidades/mg proteína)	0.186	0.072
Masa molecular de la enzima determinada por filtración por gel. (kDa)	114.2	111.4

Luego de purificadas, las proteínas fueron tratadas a tres diferentes temperaturas como se indicó en la sección 3.6, salvo que la incubación fue de 7 minutos.

Incrementando la temperatura de 30 °C a 90 °C disminuyó la actividad PDR sólo un 14% en la forma glicosilada y un 18% en la forma deglicosilada (Figura 8).

Estos resultados en conjunto sugieren que el efecto de la presencia de oligosacáridos en la PDI de colza estaría más relacionado con su función catalítica que con la estabilidad de la proteína.

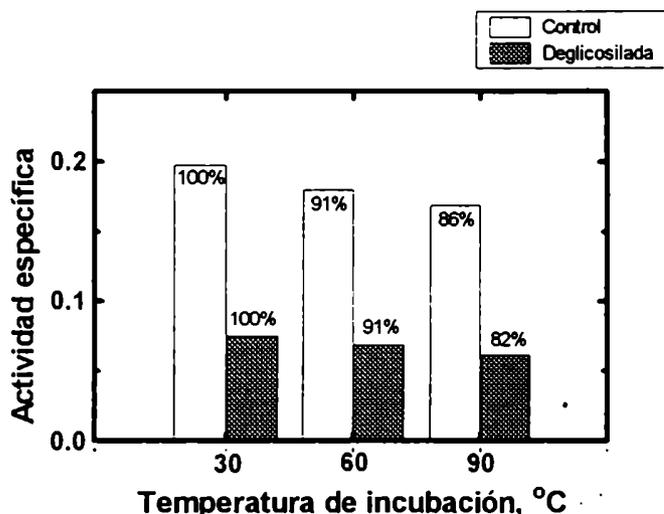


Figura 8: Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la PDI purificada (control) y sobre la misma PDI deglicosilada por tratamiento con PNGasa F. Luego de incubada la enzima por 7 minutos a las distintas temperaturas, se midió la actividad en un volumen final de 2 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7.0, EDTA 1 mM, di Ins-FTC 0.7 μ M, PDI 130 μ g (control) o 172 μ g (deglicosilada) y se iniciaron con el agregado de DTT (concentración final 0.5 mM). La actividad específica se expresa en unidades por mg de proteína y sobre las barras se indican los valores porcentuales para la actividad (respecto a 30 °C) de cada una de las formas.

3.8 Discusión

Dado que la especie activa en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro es el ion tiolato, es de esperar que el aumento del pH incremente la concentración de la especie ionizada y por lo tanto la velocidad de reducción del sustrato. Este efecto fue claramente visible en ausencia de enzima, donde la velocidad de reducción comenzó a ser apreciable por encima de pH 7.5 y aumentó a pH mayores. Sin embargo la reducción bioquímica de la di Ins-FTC mostró perfiles que no correlacionaron con estas consideraciones químicas. En presencia de Trx la reducción fue apreciable a pH 6.2 y aumentó notablemente con el incremento del pH (ver fig. 14, capítulo 1). Por otra parte, la PDI mostró una clara diferencia con respecto al comportamiento de la Trx. La reacción catalítica fue más eficiente a pH levemente ácido (6.5), disminuyendo la velocidad a medida que aumentaba el pH del medio. En los estudios previos, la falta de métodos para la medición de la actividad PDR que permitieran evaluar un amplio rango de pH condujo a la ausencia de datos similares para otras PDOR. Si bien la variación del entorno que rodea a las cisteínas del sitio activo de esta superfamilia modifica la concentración efectiva de los tioles y con ello su capacidad nucleofílica, llama la atención que la eficiencia reductora de la PDI disminuya con el aumento del pH. Posiblemente la disminución

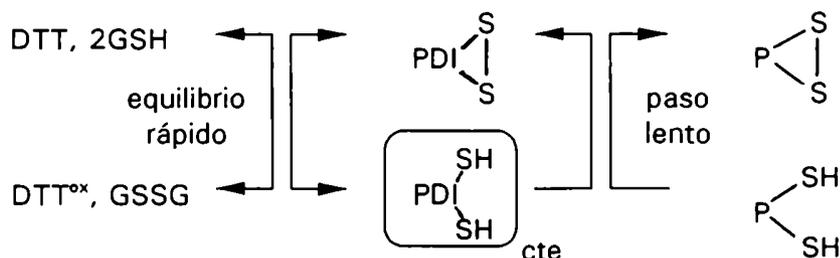
de las cargas positivas o un aumento en las cargas negativas en el entorno que rodea las cisteínas afecta la interacción entre la PDI y la di Ins-FTC.

Si suponemos que la reducción de la di Ins-FTC mediada por la PDI sigue un mecanismo similar al propuesto para la Trx (ver Apéndice 1, Capítulo 1), el efecto observado corresponde al aporte de la reducción bioquímica más la reducción no enzimática. En este contexto, la especie que causa la reducción de la di Ins-FTC es la forma reducida de la PDI. Como el pH de la reacción se encuentra por debajo de 7.0, la reducción química es despreciable frente a la enzimática (figura 3) en un amplio rango de concentraciones de reductor, porque la proporción del ion tiolato es muy baja (Figura 1). Esto permitió analizar diversas variables sobre el efecto catalítico de la PDI sin interferencias de la reducción química del sustrato.

En presencia de PDI, el DTT fue un eficiente reductor desde 0.2 μ M hasta 5 mM. En cambio, el intervalo de concentraciones del GSH (0.1 a 10 mM) fue más pequeño que el de DTT, aunque la variación de la actividad de la PDI fue más pronunciada. Si bien existe una amplia diferencia en los potenciales redox de estos 2 reductores, es de destacar que la reducción de la di Ins-FTC implica la oxidación intramolecular del DTT o intermolecular del GSH. En consecuencia la concentración efectiva del segundo tiolato en el intercambio tiol-disulfuro es mucho mayor en el primer caso que en el segundo. Esta mayor efectividad del DTT como reductor fue observada para la PDI de mamíferos por Chandler & Varandani (1975) utilizando insulina como sustrato; el K_m del DTT y del GSH fueron a pH 7.4, 10-500 μ M y 1-20 mM, respectivamente.

Hawkins *et al* (1991a) determinaron que la PDI bovina se equilibra con el buffer redox GSH/GSSG en menos de 10 min. Si el equilibrio tiol-disulfuro de la PDI de colza con los reductores (GSH, DTT) es rápido, el uso de soluciones reguladoras a distintos potenciales redox permitiría regular la cantidad total de enzima en forma reducida presente en el medio de reacción.

La preincubación de la PDI de colza con el buffer redox durante 10 minutos, no alteró la actividad respecto a ensayos donde la preincubación fue omitida.



El rápido establecimiento del equilibrio PDI-tiol implica que la concentración total de PDI en estado reducido estará dada por

$$[PDI^{red}] = \frac{[PDI_{Total}]}{\left(10^{\frac{2 \times (E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059}} + 1 \right)} \quad (7)$$

(ver Apéndice 2). Si la actividad PDR depende linealmente de la concentración total de enzima reducida,

$$\text{Actividad PDR} = k \cdot [PDI^{red}] \quad (8)$$

es de esperar que la actividad sea modificada por el potencial redox.

Reemplazando (7) en (8), y utilizando métodos computacionales de ajuste no lineal, se calculó el valor del E° para la PDI utilizando los datos experimentales de actividad en función del potencial redox (*c.f.* líneas llenas en las figuras 4 y 5). El valor obtenido para el E°_{PDI} correspondió a -0.24 ± 0.01 V cuando se utilizó DTT y de -0.22 ± 0.01 V cuando se utilizó GSH. A pH 6.0, utilizando GSH como tiol regulador del potencial redox, el valor obtenido fue de -0.16 ± 0.01 V. Este guarda la relación predicha (0.059 volt/unidad de pH) con el obtenido a pH 7.0.

En resumen, la actividad PDR de la PDI de colza es sensiblemente modificada por el pH, el potencial redox y por la concentración del reductor en el medio de reacción. Por otra parte, varias PDOR presentes en el retículo endoplásmico poseen la propiedad de unir iones Ca^{2+} . La P5 (CaBP1) y la ERp72 (CaBP2) de rata unen calcio. La primera con un K_{D1}^* de $2.8 \mu M$ (5 sitios de unión) y la última con un K_{D1} de $5.0 \mu M$ (1 sitio de unión) y un K_{D2} de 0.4 mM (12 sitios de unión) (Van *et al*/ 1989). La PDI de conejo une calcio con un K_{D2} de 4.7 mM (19 sitios de unión)

* K_{D1} se refiere a la constante de disociación de baja afinidad y K_{D2} a la de alta afinidad.

(Lebeche *et al* 1994). Si bien el calcio participa en varios procesos regulatorios dentro de la célula, poco se conoce con respecto a su efecto en la actividad de estas proteínas. Kainuma *et al* (1995) reportaron que 0.1 y 1 mM Ca^{2+} , disminuyen la actividad isomerasa de la PDI de soja (RNAsa^{scr} como sustrato) 35% y 43%, respectivamente mientras que, 1 mM de Mg^{2+} disminuyó la actividad un 33%. Sin embargo, los resultados publicados no informan la acción de los cationes bivalentes sobre la actividad PDR de las PDOR. El presente trabajo estableció los iones divalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+}) no afectan la actividad PDR de la PDI de colza cuando su concentración se encuentra comprendida entre 0.3 μM y 1 mM.

Los oligosacáridos unidos a las proteínas pueden modificar tanto las propiedades fisicoquímicas como propiedades biológicas de estas biomoléculas. Dentro de las propiedades fisicoquímicas que varían se encuentran la solubilidad, la carga eléctrica, la masa, el tamaño y la viscosidad en solución. Estos parámetros afectan el plegamiento y la estabilidad conformacional, y en consecuencia alteran la estabilidad térmica y la sensibilidad a la proteólisis. Estas modificaciones afectan el tráfico intracelular, la localización, las propiedades inmunológicas y la actividad de enzimas (Lis & Sharon 1993). El estudio de la actividad PDR de la PDI de colza mostró que la cadena de oligosacáridos constituye un componente importante; *i.e.* la remoción del oligosacárido disminuyó un 60% la actividad. En este contexto, es necesario conocer si la modificación post-traducciona altera la estabilidad del sitio activo o modifica la interacción de la enzima con la proteína sustrato.

Con respecto a la estabilidad térmica, Wang *et al* (1996), estudiaron el rol de los oligosacáridos en cinco proteínas distintas. Los autores encontraron que la desglicosilación, no afectó sustancialmente la conformación de las mismas, pero disminuyó su estabilidad al aumento de la temperatura. Esta desestabilización era mayor cuando mayor era el número de oligosacáridos removidos.

La PDI de colza es estable a la desnaturalización térmica, a juzgar por la actividad remanente luego del tratamiento térmico. La incubación a 90 °C por 7 minutos causó una disminución del 14% en la actividad PDR de la forma nativa y del 18% en la enzima desglicosilada. Aparentemente la remoción del único oligosacárido que

posee la PDI de colza no afectó sensiblemente su estabilidad a la desnaturalización térmica.

4 Actividad TOx

La oxidación de las cisteínas de la RNAsa^{red} constituye un ensayo conveniente para el estudio del proceso oxidativo en el intercambio tiol-disulfuro debido a que la enzima recupera la actividad una vez oxidada y plegada correctamente.



Similar a la PDI de rata (Walker *et al* 1996), la actividad TOx de la PDI de colza varió linealmente con la concentración de proteína entre 0.9 y 45 μg de la fracción post concanavalina A.

4.1 Efecto de la concentración de sustrato

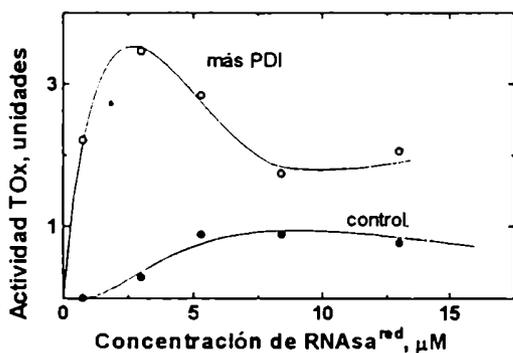


Figura 8: Efecto de la concentración de RNAsa^{red} en la actividad TOx de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 100 μl conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, GSSG 0.2 mM, fracción enzimática 13.5 μg y RNAsa^{red} en la concentración indicada. A distintos tiempos se tomó una alícuota de 10 μl y se ensayó la actividad de la RNAsa según se indica en materiales y métodos.

Ensayada a pH 7.6 y con GSSG 200 μM , la actividad TOx aumentó hasta que la concentración de la RNAsa^{red} fue de 3 μM . Concentraciones mayores de la proteína sustrato causan una disminución de la actividad que se estabiliza finalmente en el 50% del valor máximo (Figura 8). Por el contrario, concentraciones crecientes de RNAsa^{red} estimularon la oxidación química pero no presentaron un comportamiento bifásico.

4.2 Efecto del pH

La curva de actividad enzimática en función del pH no presentó un máximo en el rango ensayado (5.6 a 9.0) (Figura 9). Aunque con valores sensiblemente inferiores, la oxidación química mostró un perfil semejante.

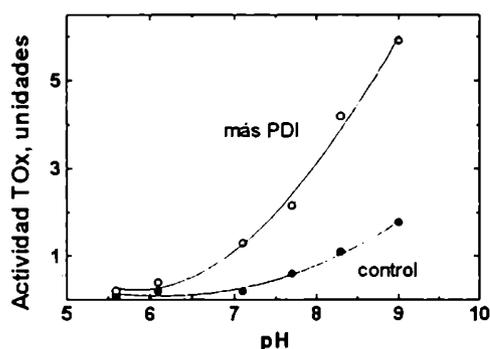


Figura 9: Efecto del pH en la actividad TOx de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron como se indica en la figura 8 salvo que se utilizó buffer Tris-fosfato 50 mM al pH indicado y se utilizó la RNAsa^{red} en una concentración final de 3 μ M.

La respuesta al pH del proceso oxidativo catalizado por la PDI de colza procede eficientemente en solución alcalina en tanto que el proceso reductivo lo hace en soluciones ácidas, (ver figura 2). En cambio, el medio alcalino facilita ambos eventos cuando la PDI es omitida.

Aparentemente, los tioles involucrados en el paso determinante de la velocidad de reacción para la actividad TOx, tendrían un pKa superior a 8. Este valor es congruente con el pKa de las cisteínas de la RNAsa desplegada. En general la reactividad del GSSG y de los sitios activos oxidados de la PDI no varían con el pH, salvo que la ionización de un grupo aminoacídico presente en estas especies afecte la reactividad de los disulfuros.

4.3 Efecto del potencial redox

A pH 7.0 y 25 °C, la relación tiol reducido/tiol oxidado fue modificada manteniendo la concentración de GSSG constante (1 mM). Potenciales mayores de -0.25 V provocaron un aumento de la actividad TOx de la PDI de colza que alcanza su máximo valor a -0.15 V (Figura 10). En este rango el potencial redox correspondiente al 50% de la actividad máxima fue -0.214 V.

Consideraciones similares a las realizadas para la actividad PDR, donde el equilibrio rápido PDI-tiol regula la relación PDI^{ox}/PDI^{red} sugieren que la especie enzimática involucrada en la reacción sería la PDI oxidada. (Ver discusión)

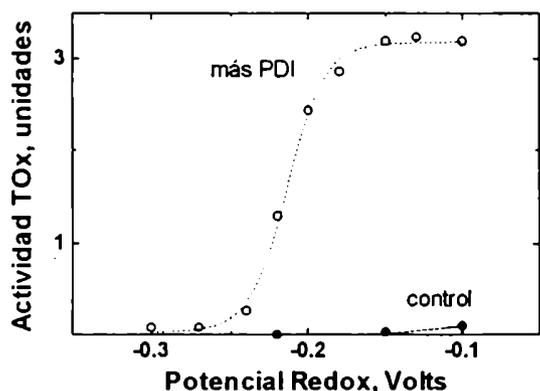


Figura 10: Efecto del potencial redox en la actividad TOx de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 25 °C en un volumen final de 100 μ l conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, RNAsa^{red} 2.94 μ M, fracción enzimática 13.5 μ g, GSSG 1mM y GSH a la concentración adecuada de manera de fijar el potencial redox indicado. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos.

4.4 Efecto de la concentración de GSSG a potencial redox regulado constante

Fijando el potencial redox de la solución en -0.15 V, se varió la concentración de GSSG desde 0.03 mM hasta 30 mM, manteniendo el pH en 7.0 y la temperatura en 25 °C. Un máximo en la actividad se observó cuando la concentración de GSSG fue de 1 mM (Figura 11). La actividad TOx fue sensiblemente inferior a concentraciones mayores y menores a 1 mM GSSG. Si bien es de esperar un aumento de actividad al incrementar la concentración de GSSG, el descenso en la actividad a concentraciones altas de GSSG sugiere la formación de disulfuros mixtos entre la RNAsa y el glutatión, que tendrían escasa reactividad para la formación de los enlaces disulfuros intramoleculares.

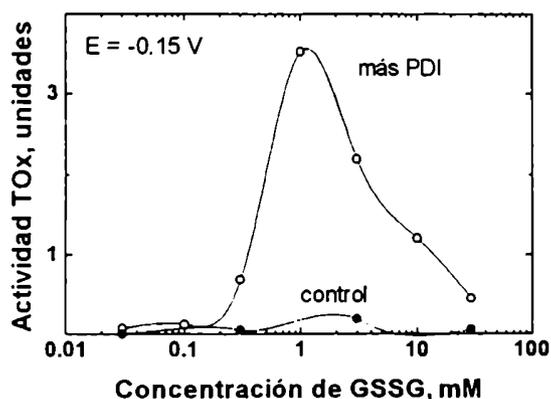


Figura 11: Efecto de la concentración de GSSG en la actividad TOx de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron como se indica en la figura 10, salvo la concentración de GSSG que se varió según se indica y la concentración de GSH que se fijó de manera que el potencial redox quede regulado en -0.15 Volts.

4.5 Oxidación de la RNAsa^{red} con insulina catalizada por PDI

Si bien el GSSG es un excelente oxidante en la reacción que causa la formación de enlaces disulfuro en la RNAsa, es factible que proteínas conteniendo cistinas

actúen como aceptores de electrones en el plegamiento oxidativo de esta proteína catalizado por la PDI.

La insulina posee tres enlaces disulfuro capaces de aceptar electrones y reducirse a sulfhidrilos. La incubación de la RNAsa^{red} con la insulina no aceleró su oxidación y plegamiento (reactivación) (Figura 12a), mientras que en presencia de GSSG se observa una moderada reactivación de la RNAsa. (figura 12b)

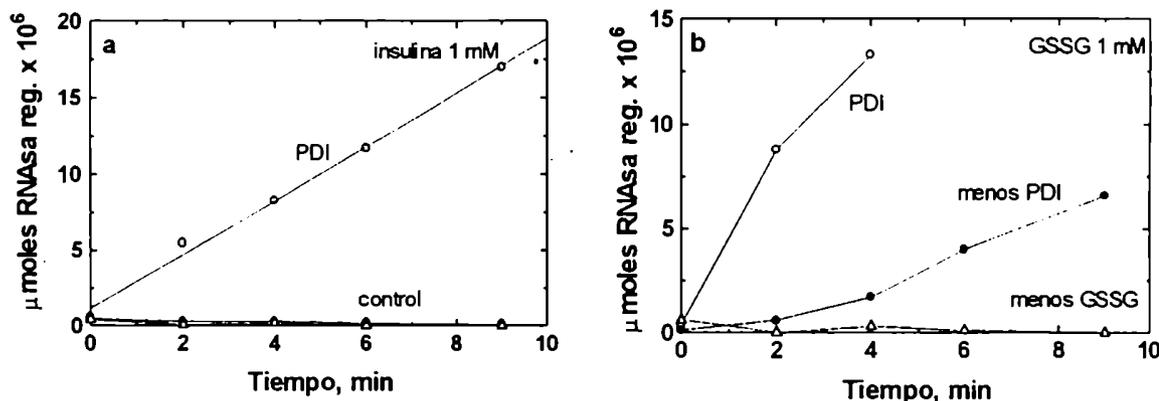


Figura 12: Regeneración de la RNAsa^{red}. a) Utilizando insulina como oxidante. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 0.1 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 3 mM, RNAsa^{red} 2.8 μM , insulina 1 mM y PDI 13.5 μg (círculos vacíos), Los controles corresponden a la reacción sin PDI (círculos llenos) y sin insulina (triángulos vacíos). b) Utilizando GSSG como oxidante. Las reacciones se efectuaron como se indica para a), salvo que en lugar de insulina se utilizó GSSG. A distintos tiempos de reacción, se midió la actividad RNAsa como se indica en materiales y métodos.

Sin embargo, la adición de la PDI de colza ambos ensayos incrementó notablemente la reactivación de la RNAsa. De manera que esta PDOR no sólo transporta equivalentes de reducción hacia moléculas pequeñas (GSSG) sino también hacia proteínas.

4.6 Discusión

El mecanismo del plegamiento oxidativo de la RNAsa A es altamente complejo. Incluyendo disulfuros mixtos proteína-SSG pueden existir hasta 7193 especies intermediarias. Las condiciones redox del medio modifican las poblaciones de los intermediarios que participan en este proceso (Konishi *et al* 1981). El potencial redox, ajustado apropiadamente, optimiza la velocidad de reacción modificando la acumulación del intermediario involucrado en el paso determinante de la velocidad. En principio se eligió una concentración de GSSG lo suficientemente baja para que el proceso no enzimático sea mínimo y lo suficientemente alta para proveer los

equivalentes redox necesarios para la completa renaturalización de la RNAsa. En estas condiciones, la concentración óptima de RNAsa fue 2-4 μM (Figura 8). A concentraciones mayores de RNAsa^{red}, la velocidad de reactivación disminuyó más de un 50% de la velocidad máxima. Dado que este ensayo se efectuó en ausencia de un buffer redox, la relación GSH/GSSG varía durante el proceso oxidativo. La relación GSH/GSSG modifica la distribución de los intermediarios durante el proceso de reactivación, por lo cual, a altas concentraciones de RNAsa^{red}, podría estar favorecida la formación de especies que no conducen a la estructura nativa de la enzima (Konishi *et al* 1981, Lyles & Gilbert 1991b).

A diferencia con el ensayo reductivo, la actividad TOx aumentó con la alcalinización. Estudios efectuados por Laboissiere *et al* (1995) y Walker *et al* (1996) revelaron que estos residuos cisteína de los sitios activos de la PDI de rata son indispensables para la catálisis del plegamiento oxidativo de la RNAsa A, debido a que la formación del enlace disulfuro en la enzima es necesaria para que sea catalíticamente activa. La dependencia del pH mostró que el pKa del tiol involucrado en el paso determinante de la velocidad sería cercano a 9. Si bien este valor podría corresponder a la cisteína del glutatión, también las cisteínas de la RNAsa, pueden estar implicadas, ya que la formación de un enlace disulfuro en la RNAsa involucra el ataque nucleofílico de alguna de sus cisteínas sobre un enlace disulfuro.

A una concentración constante de GSSG, la actividad TOx mostró una dependencia sigmoidea del potencial redox, con los máximos valores a potenciales superiores a -0.2 V. En conjunción con los estudios de la actividad PDR, estos resultados sugieren que la especie activa de la PDI en el proceso oxidativo sería la forma oxidada.

Como se discutió anteriormente, el equilibrio tiol-disulfuro de la PDI con el GSH es rápido comparado con la velocidad de reducción de la di Ins-FTC. Si lo mismo ocurre con respecto al plegamiento oxidativo de la RNAsa, el desarrollo similar que condujo a las ecuaciones 7 y 8 permitió ajustar la curva de actividad TOx versus potencial redox

$$v = k' \cdot [PDI^{ox}] = k' \cdot \frac{[PDI_{Total}]}{\left(10^{\frac{-2 \cdot (E'_{GSSG} - E'_{PDI})}{0.059}} + 1 \right)} \quad (10)$$

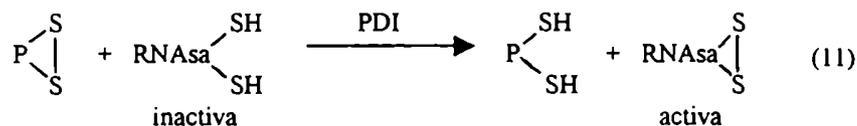
(Ver Apéndice 2).

El valor obtenido para el E'_{PDI} en la actividad TOx fue -0.214 ± 0.002 V, el cual semeja al obtenido en el ensayo reductivo (-0.22 ± 0.01 V).

Fijando el potencial redox de la solución en -0.15 V, el aumento de la concentración de GSSG incrementó la velocidad de reacción hasta alcanzar un valor máximo cercano a 1 mM. Aparentemente, la efectividad de la reacción a concentraciones superiores al valor óptimo, disminuye por la formación de disulfuros mixtos que no conducen a la formación de la enzima nativa.

Los resultados de la figura 12 muestran claramente que una proteína oxidada (insulina) reemplaza a un hexapéptido (GSSG) como aceptor de hidrógeno en la reacción de intercambio tiol-disulfuro. Sin embargo, este estudio plantea el interrogante de como evita la célula que proteínas ya plegadas con sus cistinas formadas, sean reducidas por aquellas que aún se están sintetizando (con sus tioles disponibles). La insulina se sintetiza como proproteína, en la que los enlaces disulfuro serían lo suficientemente estables para asegurar que no sean reducidos dentro del retículo endoplásmico. Una vez procesada a la forma madura en el Golgi, el potencial redox de estos enlaces la harían susceptible de ser reducida. Pero la ausencia de la PDI o un ambiente redox oxidante en el Golgi, garantizarían la correcta exportación de la insulina.

Independientemente de estas consideraciones, la oxidación de la RNAsa con insulina constituye una evidencia clara de la efectividad de la PDI para transferir equivalentes redox entre proteínas.



Sobre esta base se desarrolló un método para la detección de proteínas que actúan

como oxidantes de la PDI que permitió purificar, a partir de semillas germinadas de colza, una proteína de reserva: la napina (ver sección 3).

5 Actividad PDI

Para analizar esta actividad, se utiliza como proteína sustrato una RNAsa cuyas cisteínas forman enlaces disulfuro incorrectos (RNAsa^{scr}), con lo cual la enzima es funcionalmente inactiva. Mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro, catalizadas por las PDOR, la RNAsa adquiere su estado nativo y recupera su funcionalidad.



Similar a lo reportado por Lambert & Freedman (1983) para la PDI de rata, la actividad aumentó en forma hiperbólica cuando la concentración de la enzima de colza incrementó de 1 a 60 μg (aprox. 0.14 a 8.4 μM) (Figura 13). Nótese que por encima de 30 μg de proteína, la concentración de la enzima supera la concentración de sustrato.

En este ensayo, una concentración pequeña de DTT (20 μM) es necesaria para la reducción inicial del enlace disulfuro que promueve la iniciación de isomerización. A concentraciones mayores de reductor, el proceso reductivo compite con el de isomerización, y aparta al último de la linealidad (Lambert & Freedman 1983).

5.1 Efecto de la concentración de sustrato

La catálisis aumentó de manera sigmoidea cuando la actividad PDI fue ensayada a concentraciones crecientes de RNAsa^{scr} (Figura 14). La velocidad máxima se obtuvo cuando las concentraciones de sustrato fueron superiores a 10 μM , siendo el $S_{0.5}$ aproximadamente 4 μM .

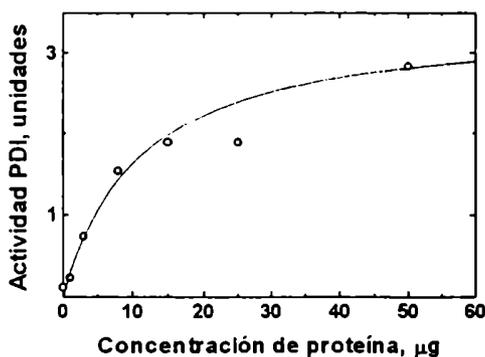


Figura 13: Actividad isomerasa de la PDI de colza en función de la masa de proteína utilizada. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 100 µl conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, DTT 20 µM, RNAsa^{scr} 4 µM y fracción enzimática en la concentración indicada. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos

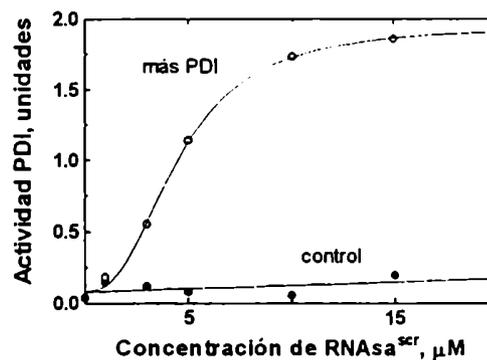


Figura 14: Efecto de la concentración de la RNAsa^{scr} en la actividad isomerasa de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 100 µl conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, DTT 20 µM, fracción enzimática 2.7 µg, y RNAsa^{scr} en la concentración indicada. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos.

Mientras que el aumento en la concentración de sustrato (RNAsa^{red}) por encima de 5 µM disminuyó la actividad TOx de la PDI de colza (Figura 8), el incremento en la concentración de la RNAsa^{scr} causó el aumento en la actividad PDI, alcanzando un valor máximo para concentraciones mayores a 10 µM. Una alternativa congruente con estos procesos disímiles reside en las características del mecanismo de reacción subyacente. En el proceso oxidativo, cada disulfuro formado genera dos moléculas de GSH y consume una de GSSG, con la respectiva variación de la relación tiol oxidado/reducido. Como se muestra en la figura 10, la velocidad de reacción depende de esta relación, por lo cual es de esperar que cantidades crecientes de RNAsa (utilizando una concentración constante de GSSG, ver figura 8) alteren la velocidad de renaturalización de la RNAsa^{red}. En cambio, la característica intramolecular de la isomerización la independiza de este efecto, ya que no se altera el potencial redox del medio durante la reacción.

5.2 Efecto del pH

En consonancia con los valores hallados para otras PDI, (Mizunaga *et al* 1990, Kainuma *et al* 1995) el pH óptimo para la reacción fue pH 8.5 (Figura 15).

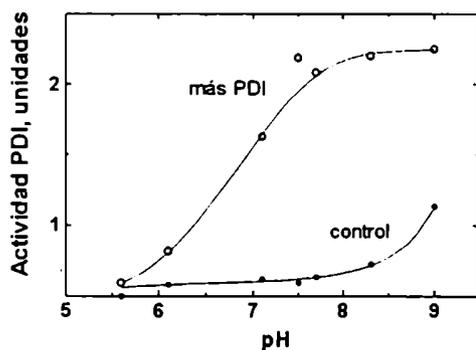


Figura 15: Efecto del pH en la actividad isomerasa de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 100 μ l conteniendo: buffer Tris-fosfato 50 mM al pH indicado, EDTA 1 mM, DTT 20 μ M, RNAsa^{scr} 6.8 μ M y fracción enzimática 2.7 μ g. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos.

Nuevamente la reactivación de la RNAsa^{scr} sólo es apreciable a pH alcalinos para el proceso no catalizado. En cambio, la actividad fue apreciable a pH 6 y aumentó hasta alcanzar un valor máximo a pH 8 para el proceso bioquímico. El bajo pKa de la cisteína expuesta en el sitio activo de las PDOR permitiría que el proceso tenga lugar en condiciones fisiológicas.

5.3 Efecto del potencial redox

Los procesos de reducción y oxidación fueron claramente dependientes del potencial redox de la solución (Figuras 4 y 10). Mientras que para el primer proceso la actividad máxima se alcanzó a potenciales menores a -0.25 V (ambiente reductor), para el segundo la actividad fue máxima a potenciales mayores a -0.15 V (ambiente oxidante). El proceso de isomerización no varía el estado redox de la proteína sustrato, ya que se parte de una especie oxidada (inactiva) para obtener otra especie oxidada (activa). Termodinámicamente el proceso global no dependerá del potencial redox del medio, sino de los potenciales intrínsecos de los enlaces que se rompen y se forman. Pero dado que el proceso global involucra la reducción y la oxidación de cisteínas, la relación GSH/GSSG podría alterar sensiblemente la cinética de la reacción.

Manteniendo una concentración de GSH constante de 1 mM, se analizó el efecto en la actividad por variaciones en el potencial redox a pH 7.0 y 25 °C.

La velocidad de catálisis aumentó con la disminución del potencial redox hasta que se alcanzó un valor de -0.20 V, variando levemente a potenciales comprendidos entre -0.20 V y -0.30 V (Figura 16). Sorprendentemente, a potenciales muy

reductores (-0.35 V), la reactivación de la RNAsa fue máxima tanto para el proceso catalítico como para el ensayo control.

Dado que la actividad aumenta a potenciales menores (medio más reductor), sería necesaria la presencia de la PDI reducida para que sea efectiva la catálisis. Si se compara el perfil de actividad PDI con el perfil obtenido para la actividad TOx (Figura 10), se puede apreciar que la primera aumenta cuando comienza a disminuir la última. Pero una vez que la relación PDI^{red}/PDI^{ox} alcanzó la unidad, la actividad PDI se mantuvo constante.

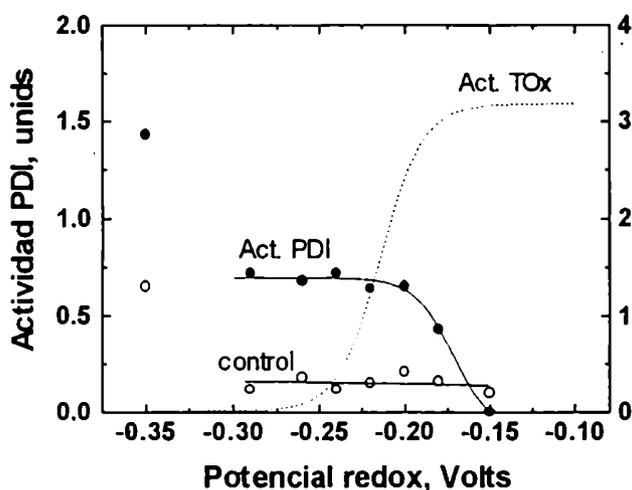


Figura 16: Efecto del potencial redox en la actividad isomerasa de la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 25 °C en un volumen final de 100 μ l conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, RNAsa^{acr} 4 μ M, fracción enzimática 3.6 μ g, GSH 1 mM y GSSG en concentración tal que resulte el potencial redox indicado. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos. Con respecto al eje derecho y en línea punteada se graficó la actividad TOx mostrada en la figura 10.

5.4 Efecto de la concentración de GSH a potencial redox regulado constante

La concentración absoluta del reductor modificó tanto la actividad isomerasa de la enzima como la acción química, cuando la renaturalización de la RNAsa^{acr} fue estudiada a un potencial redox constante de -0.24 V. Sin embargo, la sustracción del control (efecto químico) muestra que la acción de la enzima (efecto bioquímico) fue constante hasta 5 mM GSH. (Tabla I)

[GSH], mM	control	más PDI	diferencia
5	0.37	0.94	0.57
1	0.22	0.79	0.57
0.5	n.d.	0.55	n.d.

Tabla I: Efecto de la concentración de GSH en la actividad isomerasa de la PDI de colza a potencial redox constante igual a -0.24 Volts. Las reacciones se efectuaron a 25 °C en un volumen final de 100 μ l conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.0, EDTA 1 mM, RNAsa^{acr} 6 μ M, fracción enzimática 9 μ g, GSH según se indica y la concentración de GSSG se fijó de manera que el potencial redox permanezca constante. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos. La actividad se expresó en unidades PDI.

5.5 Discusión

El plegamiento oxidativo de la RNAsa involucra una rápida formación de 3 o 4 enlaces disulfuro que son funcionalmente inactivos. La posterior isomerización de estos enlaces conduce finalmente a la forma activa de la enzima. La inactividad de la forma oxidada de la RNAsa cuyos enlaces disulfuro están incorrectamente formados, denominada "scrambled", permite estudiar el proceso de isomerización siguiendo la recuperación de la capacidad catalítica (Walker *et al* y referencias citadas, 1996).

Como la RNAsa^{scr} no posee cisteínas libres, resulta evidente que el primer paso en la isomerización es la reducción de un enlace disulfuro por el agente reductor o la PDI en su estado reducido. Los estudios con mutantes del sitio activo de la PDI de mamíferos, revelaron que la cisteína más cercana al N-terminus es necesaria y suficiente para catalizar esta isomerización. Sobre esta base, el primer paso catalítico sería el ataque nucleofílico de esta cisteína a los enlaces disulfuro de la RNAsa^{scr} (Chivers *et al* 1996).

El efecto del pH en la actividad PDI mostró una respuesta sigmoidea, la actividad aumenta a medida que se incrementa el pH. Si suponemos que la velocidad de reacción depende linealmente de la concentración de la especie ionizada de la enzima (ion tiolato de la cisteína atacante), y se utiliza una concentración total de enzima (0.04 mM) tal que las variaciones en la especie ionizada den una respuesta lineal con respecto a la actividad observada, la velocidad de la reacción estará dada por

$$v = k \cdot [PDI^{RED}]_{total} \left(\frac{Ka}{[H^+] + Ka} \right) \quad (13)$$

donde k es la constante de velocidad aparente y Ka es la constante ácido-base de la cisteína nucleofílica de la PDI (Ver Apéndice 2). Modelando la actividad en función de la concentración de la PDI^{red} los datos experimentales son congruentes con que el pKa de la cisteína es 6.8±0.1. Este valor coincide con el pKa calculado en la inactivación de la PDI bovina con iodoacetamida (Hawkins & Freedman 1991a). Sin embargo, utilizando un péptido sintético en el estudio de la catálisis de

la formación de enlaces disulfuro, trabajos recientes reportaron un valor de 5.6 ± 0.1 para la cisteína reactiva la PDI de mamíferos (Ruddock *et al* 1996). Más allá de las discrepancias en los pKa de la cisteína reactiva, los resultados obtenidos plantean el siguiente interrogante: ¿si tanto la catálisis reductiva como la de isomerización involucran la acción del ion tiolato de la cisteína reactiva, por que la dependencia de estas actividades difiere en más de 1 unidad de pH?

En estudios similares sobre otra PDOR (la Trx) Takahashi & Creighton (1996) sugieren que los datos cinéticos obtenidos previamente son inconsistentes y no reflejan simplemente la ionización del grupo tiolato atacante. Esta inconsistencia podría deberse a que la Trx es un catalizador, y como tal, estabiliza el estado de transición de la reacción. El pKa del tiol obtenido de los datos cinéticos, reflejaría las propiedades del estado de transición en lugar de la proteína en su estado basal. Sobre esta base, las propiedades del estado de transición de la PDI difieren con cada uno de los sustratos. De ser así, el pH óptimo para cada reacción catalizada por la PDI dependería de la interacción con la proteína sustrato.

Dado que se desconoce el mecanismo de reacción para el intercambio tiol-disulfuro catalizado por la PDI, resulta difícil encontrar una explicación sencilla para los efectos de las variables (pH, potencial redox, tioles) sobre la velocidad de reacción observadas. En el caso de la actividad isomerasa es todavía mas complicado, pues si bien el paso inicial en la reacción es la reducción de un enlace disulfuro, una posterior oxidación lleva finalmente a la RNAsa a su forma enzimática activa.

La velocidad de reacción para la actividad PDI, aumentó al disminuir el potencial redox por debajo de los -0.15 V, y alcanzó un valor constante entre los -0.2 V y -0.3 V. Esto indica claramente la enzima debe hallarse en su estado reducido para catalizar el proceso de isomerización.

Más aun, la velocidad fue independiente de la concentración total de tiol reducido presente (a potencial redox regulado (GSH/GSSG) constante en -0.24 V).

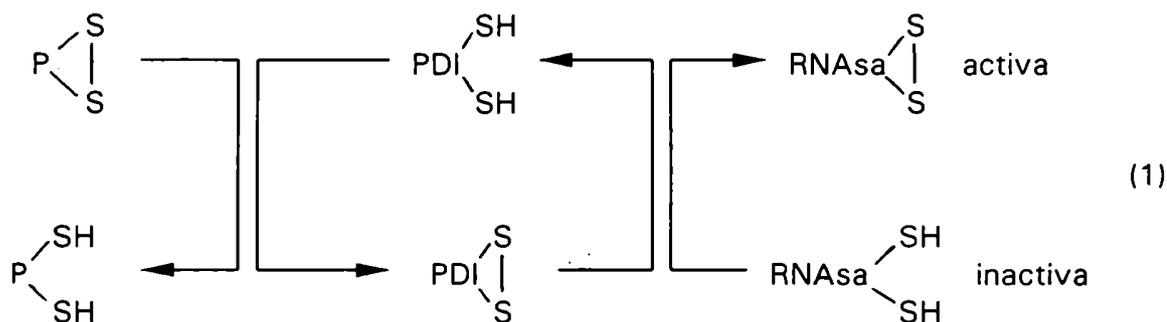
PURIFICACIÓN A HOMOGENEIDAD Y
CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE
RESERVA DE SEMILLAS DE COLZA (NAPINA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1	<u>Ensayo de detección para una proteína oxidante de la PDI.....</u>	108
2	<u>Purificación de la proteína oxidante de la PDI.....</u>	108
3	<u>Identificación de la proteína purificada.....</u>	110
4	<u>Efecto del agente reductor en la reducción de la napina catalizada por Trx y PDI.....</u>	111
5	<u>La napina como oxidante de la PDI.....</u>	113
6	<u>Efecto del pH en la reducción de la napina.....</u>	114
7	<u>Discusión.....</u>	115

1 Ensayo de detección para una proteína oxidante de la PDI.

Como se mencionó anteriormente, la PDI cataliza el plegamiento oxidativo de la RNAsa^{red} en presencia de la insulina. Esta característica plantea que otras proteínas podrían actuar como oxidante en la siguiente reacción



P: proteína cuyo enlace disulfuro es reducido por la PDI.

La presencia de una proteína funcional en este mecanismo indica un sustrato para la PDI, cuyos enlaces disulfuro serían reducidos.

Utilizando este ensayo fue purificada a homogeneidad una proteína de semillas de colza, con capacidad para activar la RNAsa^{red} en un mecanismo dependiente de PDI. La caracterización posterior reveló que la misma era uno de los componentes mayoritarios de las proteínas de reserva: la napina.

2 Purificación de la proteína oxidante de la PDI.

En la homogenización de las semillas, el fraccionamiento con sulfato de amonio y la cromatografía de intercambio catiónico (figura 1-a) fueron mantenidas las condiciones descritas para la purificación de la PDI (Capítulo 2, Sección 1).

Las fracciones con capacidad para activar la RNAsa^{red} correspondientes al pico mayoritario obtenido en la cromatografía en columnas de CM celulosa (99 ml), fueron concentradas por ultrafiltración (22 ml) y dializadas exhaustivamente contra buffer E (Tris-HCl 30 mM pH 7.9).

El dializado fue sembrado en una columna de QAE Sephadex (3x6 cm) preequilibrada en buffer E y eluído sucesivamente con i) 100 ml de buffer E y ii) 500 ml de un gradiente lineal de NaCl (0 a 1 M) en buffer E (Figura 1-b). Las fracciones activas (25 ml) no fueron retenidas por la columna. Para cambiar la composición del buffer, las mismas fueron diluidas con buffer F (acetato de

sodio 30 mM pH 5.5) y concentradas por ultrafiltración hasta alcanzar un volumen de 12.5 ml.

Dos ml del ultrafiltrado fueron sembrados en una columna mono-S (FPLC) equilibrada con buffer F y eluidos sucesivamente con i) 8 ml de buffer F y ii) 20 ml de un gradiente lineal de NaCl (0 a 1 M) en buffer F (Figura 1-c). Las fracciones que eluyeron con 0.3 M de NaCl (6 ml), fueron dializadas exhaustivamente contra buffer F. En esta etapa se seleccionaron estas fracciones por contener la mayor proporción de actividad.

Dos ml fueron recromatografiados en la misma columna, equilibrada con buffer F, eluyendo sucesivamente con i) 3 ml de NaCl 0.05 M en buffer F y ii) 20 ml de un gradiente lineal de NaCl (0.05 a 0.75 M) en buffer F (Figura 1-d).

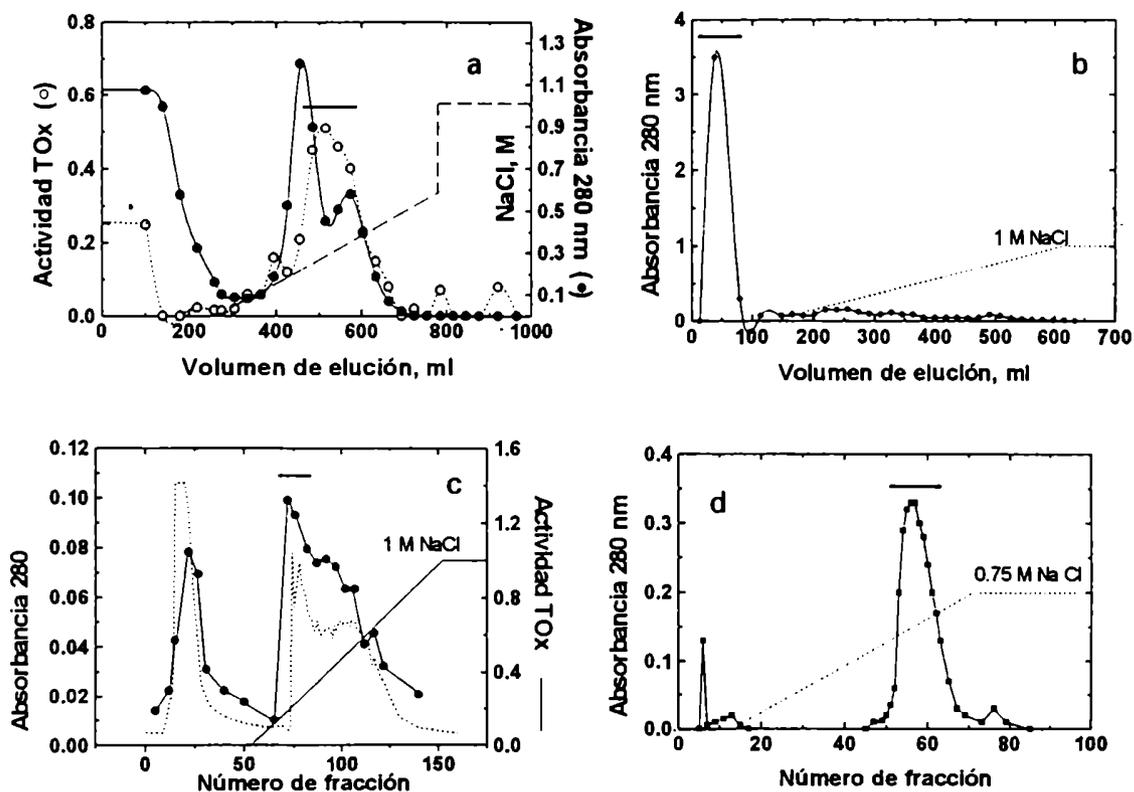


Figura 1: Perfiles cromatográficos correspondientes a las distintas columnas de intercambio iónico utilizadas durante la purificación de la napina. a) CM celulosa, b) QAE Sephadex, c) mono-S (FPLC) y d) mono-S (FPLC).

El pico mayoritario (6 ml) que eluyó con 0.6 M de NaCl fue i) dializado exhaustivamente contra buffer fosfato de potasio 10 mM pH 6.8 y ii)

concentrado 3 veces por evaporación al vacío. Este procedimiento permitió obtener 70 mg de proteína de 100 gr de semillas.

En ausencia de β -Met, la proteína mostró una sola banda de masa molecular 16.6 kDa en un SDS-PAGE (no reductor), (Figura 2). Sin embargo, dos polipéptidos -7.9 kDa y 3.5 kDa- aparecieron cuando la proteína fue preincubada con 300 mM β -Met.

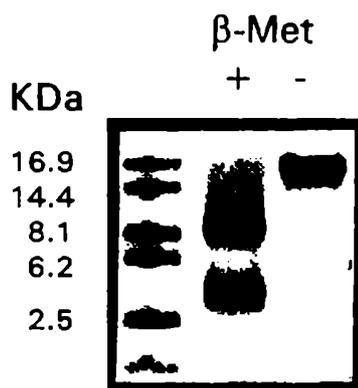


Figura 2: SDS-PAGE de la napina purificada (12 μ g). Se indica la presencia o ausencia de β -Met en el tratamiento desnaturalizante previo a la corrida.

El análisis por filtración por geles reveló una masa molecular de 17 ± 0.5 kDa para la forma nativa (Figura 3).

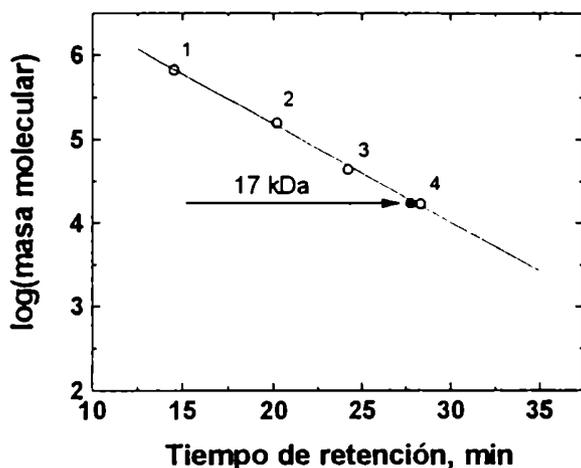


Figura 3: Cálculo de la masa molecular de la napina por filtración en geles (HPLC). Para el cálculo de regresión lineal se utilizó los valores obtenidos para los siguientes estándares de masa molecular: 1) Tiroglobulina (670 kDa), 2) Gama globulina bovina (158 kDa), 3) Ovoalbumina de pollo (44 kDa) y 4) mioglobina equina (17 kDa). El resultado obtenido está representado por la línea recta, y la flecha señala el valor calculado para la masa molecular de la napina sobre la base de su tiempo de retención en la columna.

3 Identificación de la proteína purificada

La proteína purificada fue sometida a una SDS-PAGE en condiciones reductoras y transferida a una membrana de PVDF como se indica en materiales y métodos. La secuencia aminoacídica del extremo N-terminal establecida mediante la

degradación de Edman (P Q G P Q), correspondió a la reportada para uno de los polipéptidos constituyentes de la napina (masa molecular 7.9 kDa) (Murén *et al* 1995, *c.f.* figura 11).

Sobre la base de i) el análisis electroforético de sus constituyentes, ii) la secuencia obtenida y iii) la abundancia de la proteína en la semilla, se concluyó que la proteína purificada correspondía a la napina, una de las proteínas mayoritarias en la semilla de *B. napus*.

4 Efecto del agente reductor en la reducción de la napina catalizada por Trx y PDI.

La napina está constituida por dos polipéptidos unidos mediante 2 enlaces disulfuro intercatenarios. El polipéptido de menor masa molecular posee 2 cisteínas y el de mayor masa molecular 6 cisteínas. La estructura primaria de la subunidad mayor ha sido deducida del fragmento de DNA que codifica este polipéptido y con ello fue establecida la posición de los correspondientes residuos de cisteína. Sin embargo, no fueron caracterizadas las cisteínas que constituyen los enlaces intercatenarios. Las cuatro cisteínas restantes formarían enlaces disulfuro intracatenarios en el polipéptido mayor (Ericson *et al* 1986).



La figura 2 muestra que la SDS-PAGE diferencia los estados oxidado (nativo) y reducido de la napina. Esto permite analizar, al menos cualitativamente, el efecto catalítico de distintas PDORs en presencia de bajas concentraciones de reductor. La incubación de la napina con GSH (5 mM) o DTT (0.5 mM) por 60 minutos produjo una banda única en la SDS-PAGE (Figura 4, líneas 1 y 3). Por otra parte, sólo el DTT provocó la reducción parcial cuando la reacción se efectuó en presencia de PDI (líneas 2 y 4). Estos resultados contrastan con la reducción total de la napina por la acción concertada de la Trx y el DTT (línea 5). En cambio, la RNAsa^{red} (5.6 μ M), tanto en ausencia (línea 6) como en presencia de

PDI (línea 7), fue inefectiva en causar la escisión de los polipéptidos constituyentes.

Este último resultado estaría en contradicción con el ensayo usado para la detección de la napina; *e.g.* adquisición de la capacidad catalítica de la RNAsa^{red}. Dado que algún enlace disulfuro de la napina tiene que ser reducido durante la activación de la RNAsa, aparentemente los dos enlaces disulfuros intercatenarios de la napina no participarían conjuntamente en este proceso. De manera que la ausencia de una separación de los polipéptidos constituyentes en la SDS-PAGE, indica que los enlaces disulfuro que oxidan a la PDI en la reacción de detección de la napina serían enlaces intracatenarios y/o un solo enlace intercatenario

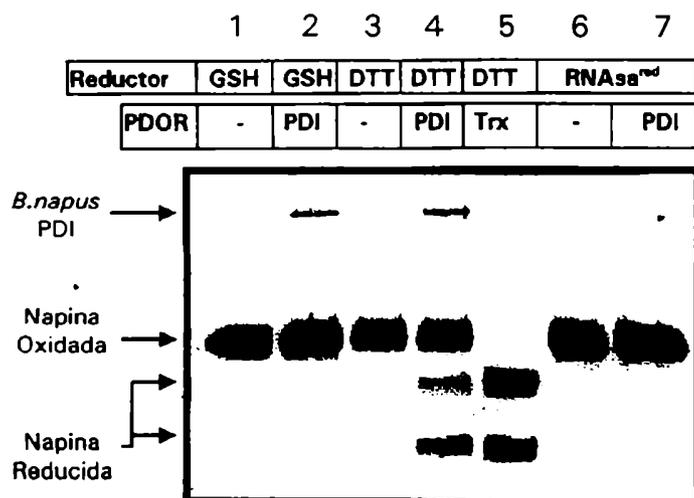


Figura 4: Análisis de la reducción de la napina por el DTT, el GSH y la RNAsa^{red} catalizada por PDI o Trx. La reacción se efectuó en buffer fosfato de potasio 200 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, napina 6 µg y PDI 4.5 µg o Trx 3 µg donde se indica. Las reacciones se iniciaron con la adición de DTT, GSH o RNAsa^{red} (concentración final 0.5 mM, 5 mM y 5.6 µM respectivamente). Volumen final 0.05 ml, temperatura 25 °C, tiempo de incubación 60 minutos.

Estos resultados muestran claramente que la PDI y la Trx son efectivas en la reducción de los enlaces intercatenarios de la napina solamente cuando se utiliza DTT como reductor. Otros reductores (GSH, RNAsa^{red}) no fueron funcionales en producir la separación de los polipéptidos constituyentes de la napina. Este resultado negativo no excluye la posibilidad, de que la reducción afecte disulfuros intracatenarios o solamente un disulfuro intercatenario.

La variación temporal del proceso reductor (figura 5), ilustra la menor efectividad de la PDI respecto a la Trx en la reducción de la napina. A los 20 min de incubación, una alta proporción de la napina fue escindida en sus polipéptidos constituyentes pero permanece prácticamente inalterada en presencia de la PDI.

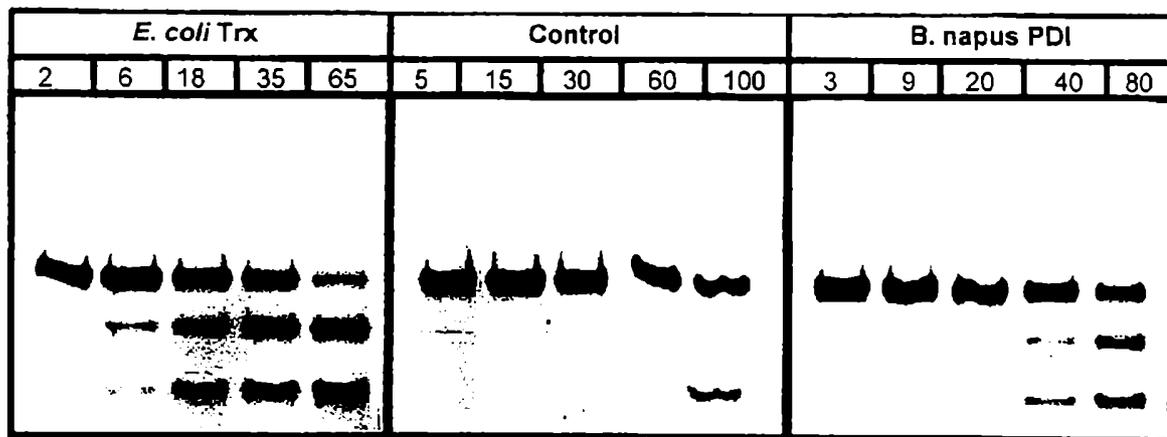


Figura 5: Reducción de la napina a distintos tiempos de reacción. La reacción se efectuó en un volumen final de 0.06 ml a 25 °C conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, napina 27 μ g y PDI 5 μ g o Trx 2 μ g. La misma se inició con el agregado de DTT (concentración final 0.5 mM). Se tomaron alícuotas de 0.01 ml a los tiempos indicados y se analizaron por SDS-PAGE en condiciones no reductoras.

5 La napina como oxidante de la PDI

Como se mostró anteriormente, el GSSG y la insulina son reducidos por la PDI según el mecanismo descrito en la ecuación (1). Si bien la napina es reducida por la PDI mediante un mecanismo similar, esta reducción no involucra la separación de las cadenas constituyentes de esta proteína.

En la figura 6 se compara la eficiencia del GSSG, la insulina y la napina en el ensayo de reactivación de la RNAsa^{red}.

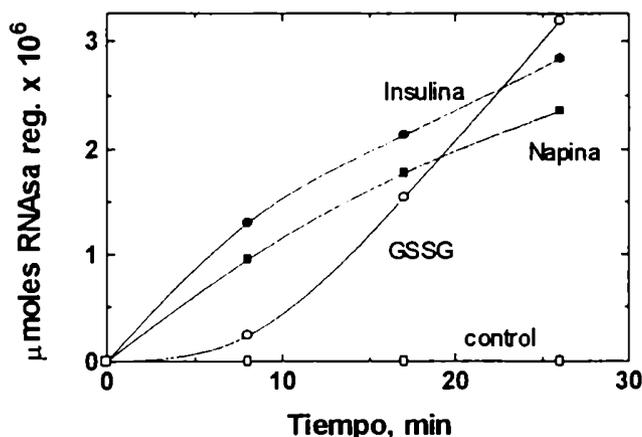


Figura 6: Efecto de distintos oxidantes en la renaturalización de la RNAsa^{red} catalizada por la PDI de colza. Las reacciones se efectuaron a 30 °C en un volumen final de 100 μ l conteniendo: buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 3 mM, RNAsa^{red} 5 μ M, fracción enzimática 22 μ g y napina, insulina o GSSG 0.1 mM. La actividad RNAsa se midió como se indica en materiales y métodos. A los valores graficados se les restó el valor obtenido en ausencia de PDI.

Claramente, los 3 factores ensayados activan (oxidan) a la RNAsa^{red} pero su cinética es diferente. El GSSG presentó una fase lag seguida de un brusco aumento de la actividad. En cambio, la actividad aumentó progresivamente desde el principio cuando los enlaces disulfuro residían en una proteína. Aparentemente, la renaturalización de la RNAsa^{red} por el GSSG procedería en 2 etapas sucesivas: 1) la oxidación rápida al azar que conduce a la formación de enlaces disulfuro incorrectos y origina especies inactivas, y 2) la isomerización lenta de estos enlaces disulfuro que genera la forma activa de la RNAsa (Lyles & Gilbert 1991b). En este contexto, la oxidación mediada por las proteínas disminuiría la contribución de la oxidación inespecífica al proceso de renaturalización y la generación de la RNAsa activa procedería de manera concertada.

6 Efecto del pH en la reducción de la napina

La PDI de colza y la Trx de *E. coli* comparten la capacidad de escindir los puentes disulfuro de las proteínas sustrato. Sin embargo, cuando la di Ins-FTC es el sustrato, la PDI y la Trx mostraron diferentes pH óptimos en su actividad PDR (cf. Sección 2, Capítulo 2). Con el fin de establecer si este efecto es debido a las propiedades de la proteína sustrato o a las características de la enzima, se analizó la actividad PDR para la PDI y la Trx sobre otra proteína, la napina.

La figura 7 muestra que al igual que cuando se utilizó la di Ins-FTC (cf. figura 14 Capítulo 1, figura 2 Sección 2), la reducción de la napina fue escasamente detectable a pH 7.7, y aumentó a mayores pH cuando el catalizador estaba ausente. La marcada dependencia de la actividad Trx con el pH, fue similar a la observada con la di Ins-FTC (cf. figura 14 Capítulo 1). En cambio la PDI mostró un perfil de reducción invariable con el pH. La característica semicuantitativa del procedimiento impidió la cuantificación del proceso reductivo. Sin embargo, el pH óptimo para la reducción catalizada por la PDI se encontraría entre 6.7 y 7.1 si substraemos el aporte de la reducción química a la reducción total de la napina.

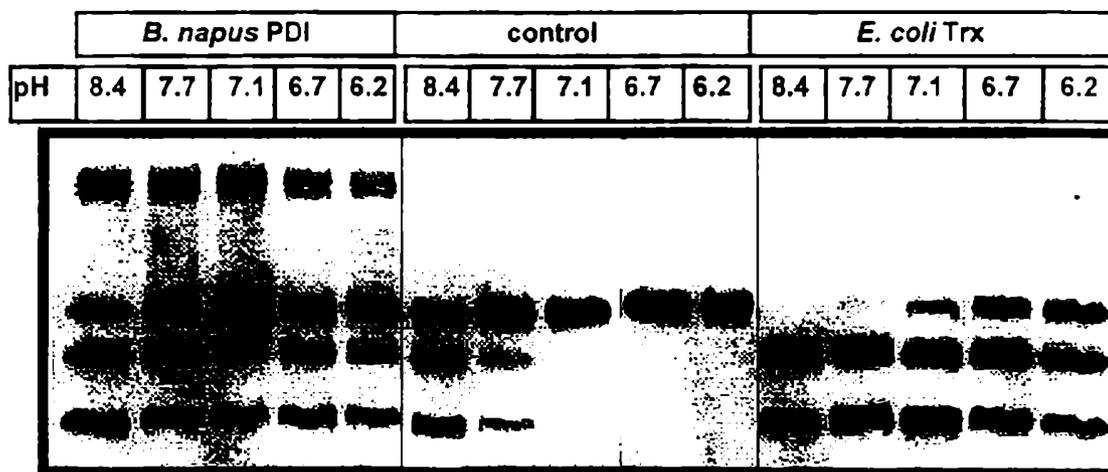


Figura 6: Efecto del pH en la reducción de la napina. Las reacciones se efectuaron a 25 °C durante 55 min. en un volumen final de 0.05 ml conteniendo buffer Tris-fosfato 50 mM al pH indicado, EDTA 5 mM, napina 4.5µg, PDI 4.7 µg o Trx 2.1 µg donde se indica, y se iniciaron con el agregado de DTT (concentración final 0.5 mM).

7 Discusión.

La oxidación de la RNAsa^{red} (figura 12, sección 2) permitió desarrollar un ensayo con el cual se purificó una proteína oxidante de la PDI. Esta proteína fue caracterizada como napina por su abundancia en las semillas, su masa molecular y la de los polipéptidos constituyentes, y la secuencia amino terminal de su subunidad mayor.

El carácter básico y la abundancia relativa de la napina permitieron obtener de manera sencilla una preparación homogénea. La napina (pI = 11) fue retenida por columnas de matriz aniónica (CM, Mono-S), pero eluyó en el V_0 en las columnas de matriz catiónica (QAE-Sephadex). Esto permitió ajustar el pH del buffer de elución convenientemente para maximizar el rendimiento de cada uno de los pasos. En la primera elución en Mono-S, el perfil de absorbancia a 280 nm fue similar al de actividad. Posiblemente, saturada la capacidad de la columna la retención fue inhomogénea durante la elución con el gradiente de NaCl. Por ello, se tomó el pico de mayor actividad y se recromatografió en la misma columna

Cadena menor

BngNAP1, napB (1,2) (R)IPKCRKEFQQAHLKACQQWLHKQAMQ--SGGGPS
 gNa (3) (.).....R.....PGG.S....
 napA, pNAP1 (4,5) (.).....R.....
 pN1 (6)
 pN2 (6)R.....N

Cadena mayor

napA, pNAP1, pN2 PQGPPQRPPLLQCCNELHQEELCVCTLLKGASKAVKQIQQQGQQG-----
 pN1 Q.....H..Y...Q.....R.....E.....
 BngNAP1
 gNA <QQQ.....PP.....VR..QG...QQ--
 napBR..VR..QG..M-QGQQ-----

KQQMVSRIYQTATHLPKVCNIPQVSVCFQKTMGP (S)
N.....
 L..VI.....
 M..VI..V.....R...R...I.....
 .L.....K.....

Figura 7: Secuencias primaria reportadas para los polipéptidos constituyentes de la napina. Los puntos indican que el aminoácido indicado es idéntico al reportado para BngNAP1 en la cadena menor y para napA en la cadena mayor. Los guiones indican espacios introducidos para maximizar la identidad entre secuencias. Los aminoácidos entre paréntesis pueden o no encontrarse presentes.

con un gradiente más suave. Las fracciones mayoritarias obtenidas, analizadas por filtración por geles (HPLC), SDS-PAGE y la degradación de Edman, fueron congruentes con una forma homogénea de la napina.

La napina está constituida por varios polipéptidos diferentes que son expresados por una familia de al menos 10 genes (Josefsson *et al* 1987) y tal vez más de 16 genes (Scofield & Crouch 1987). Se han reportado 4 secuencias genómicas: napA (Josefsson *et al* 1987), napB (Ericson *et al* 1991), gNa (Scofield & Crouch 1987) y BngNAP1 (Baszczynski & Fallis 1990), y 3 secuencias de cDNA: pN1 y pN2 (Crouch *et al* 1983) y pNAP1 (Ericson *et al* 1986). La masa molecular de la forma nativa varía entre 13.2 y 14.8 kDa. Los estudios de espectrometría de masa mostraron que la masa molecular promedio para el polipéptido pequeño es 3.9 kDa (33-35 residuos aminoacídicos). En tanto que, la masa molecular promedio del polipéptido mayor es 9.8 kDa (86-91 residuos aminoacídicos) (Gehrig *et al* 1996) (Figura 7).

En el presente análisis, la masa molecular para la forma nativa obtenida en SDS-PAGE en ausencia de reductor fue similar a la observada en la filtración por geles (16-17 kDa). El valor esperado sobre la base de las secuencias aminoacídicas debería ser 13.7 kDa. El fuerte carácter básico y la compacta estructura terciaria de la proteína (ver Apéndice 3) podrían causar alteraciones en la unión del SDS y en la interacción con la matriz de la columna. Por otra parte, la masa molecular de los polipéptidos reducidos estimada por SDS-PAGE fue de 3.5 y 7.9 kDa (esperada: 3.9 y 9.8 kDa).

En general, la mayor parte de los estudios ponen énfasis en la capacidad de la PDI para generar y reordenar los enlaces disulfuro. Sin embargo, el nuevo reactivo -di Ins-FTC- permitió descubrir la capacidad de la PDI para reducir estos enlaces con mayor efectividad a pHs neutros o ligeramente ácidos. Esta propiedad también fue observada sobre una proteína distinta, la napina, la cual constituye un potencial sustrato para la PDI durante la germinación de la semilla. Algunas evidencias indican que la reducción de ciertos enlaces disulfuro precedería la degradación proteolítica de las proteínas de reserva durante la

germinación. Así también, la desactivación de los inhibidores de proteasas y α -amilasas constituiría una señal temprana en la germinación. La Trx-h, vía la NADP-Trx-reductasa fue efectiva en la reducción de las proteínas antes mencionadas (Lozano *et al* 1996, Besse & Buchanan 1997). En el presente trabajo se mostró claramente que la PDI de colza, al ser efectiva en la reducción de la napina, constituye una ruta alternativa para la reducción de enlaces disulfuro durante la germinación. En este aspecto, la PDI ha sido detectada en los cuerpos proteicos pero se desconoce si la Trx-h está presente en las mismas. Por otra parte, las características cinéticas de la PDI (*e.g.* su efectiva actividad PDR a pH ácido y la utilización del GSH como fuente de equivalentes de reducción), constituyen mecanismos alternativos para la reducción de enlaces disulfuro.

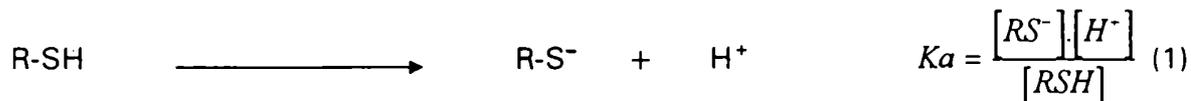
La PDI cataliza la reducción de la di Ins-FTC cuando el reductor es tanto GSH como DTT. Sin embargo la escisión de los puentes disulfuro intercatenarios de la napina sólo tiene lugar en presencia de DTT. Al menos un enlace disulfuro es reducido por la PDI, según se deduce del ensayo de reactivación de la RNAsa^{red} (Figura 6). La incapacidad del GSH para provocar la separación de los polipéptidos constituyentes de la napina se debería a que ni la PDI ni el GSH pueden escindir un enlace disulfuro poco expuesto. Esta reducción sería necesaria para relajar la compacta estructura de la napina (ver Apéndice 3) y permitir la posterior reducción de los enlaces disulfuro restantes por la PDI. En cambio el DTT, dada sus características de ditiol y pequeño volumen molecular, reduciría este enlace poco expuesto.

Recientemente se ha demostrado que pueden reducirse enlaces disulfuro en el RE a pesar del ambiente oxidante. La acción de la RNAsa^{red}, como dador de equivalentes de reducción para la PDI, sugiere que las cisteínas de los polipéptidos nacientes interferirían con el plegamiento de las proteínas que forman enlaces disulfuro. Aparentemente, la generación de estos enlaces y el correcto plegamiento estaría garantizado por la biosíntesis de las proproteínas,

e.g. la proinsulina y la pronapina. En ellas, la estabilidad de los enlaces disulfuro sería mayor que en la proteína madura y evitaría la reducción prematura.

APENDICE 2**1. Cálculo de la concentración de ion tiolato en función del pH**

Del equilibrio ácido-base para un grupo SH tenemos



El balance de masa para el tiol es

$$C_{\text{total}} = [\text{RSH}] + [\text{RS}^-] \quad (2)$$

Donde C_{total} representa la concentración total de tiol agregado.

Despejando la concentración de tiol no disociado ($[\text{RSH}]$) de (1) y reemplazando en (2) tenemos

$$C_{\text{total}} = \frac{[\text{RS}^-][\text{H}^+]}{K_a} + [\text{RS}^-] \quad (3)$$

Despejando la concentración de ion tiolato queda

$$[\text{RS}^-] = \frac{C_{\text{total}} \cdot K_a}{K_a + [\text{H}^+]} \quad (4)$$

En base a la ecuación (4) fueron calculadas las concentraciones de ion tiolato para una concentración total de 10 mM tiol. (Figura 1, Sección 2, Capítulo 2)

2 Cálculo de la concentración de PDI oxidada en función del potencial redox

El potencial redox para el glutatión en función de la concentración de las especies oxidada y reducida está dado por la ecuación de Nerst

$$E'_{\text{GSH}} = E_{\text{GSH}}^{\circ'} + \frac{0.059}{2} \times \log \left(\frac{[\text{GSSG}]}{[\text{GSH}]^2} \right) \quad (5)$$

Mientras que para la PDI

$$E'_{\text{PDI}} = E_{\text{PDI}}^{\circ'} + \frac{0.059}{2} \times \log \left(\frac{[\text{PDI}^{\text{ox}}]}{[\text{PDI}^{\text{red}}]} \right) \quad (6)$$

Dado que $\Delta G = -nF\Delta E$ y en el equilibrio $\Delta G = 0$, entonces $\Delta E' = 0$ y en consecuencia

$$E'_{GSH} = E'_{PDI} = E^{\circ}_{PDI} + \frac{0.059}{2} \times \log \left(\frac{[PDI^{OX}]}{[PDI^{RED}]} \right) \quad (7)$$

reordenando la ecuación (7) obtenemos

$$10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} = \frac{[PDI^{OX}]}{[PDI^{RED}]} \quad (8)$$

La concentración total de PDI está dada por

$$[PDI]_{Total} = [PDI^{OX}] + [PDI^{RED}] \quad (9)$$

Despejando la concentración de PDI^{RED} de (9) y reemplazando en (8) queda

$$10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} = \frac{[PDI^{OX}]}{[PDI]_{Total} - [PDI^{OX}]} \quad (10)$$

Reordenando la ecuación (10) obtenemos

$$10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} + 1 = \frac{[PDI]_{Total}}{[PDI^{OX}]} \quad (11)$$

y finalmente despejando la $[PDI^{OX}]$ de la ecuación (11)

$$[PDI^{OX}] = \frac{[PDI]_{Total}}{10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} + 1} \quad (12)$$

3 Cálculo de la concentración de PDI reducida en función del potencial redox

Despejando la concentración de PDI^{OX} de (9) y reemplazando en (8) queda

$$10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} = \frac{[PDI]_{Total} - [PDI^{RED}]}{[PDI^{RED}]} \quad (13)$$

Reordenando la ecuación (13) obtenemos

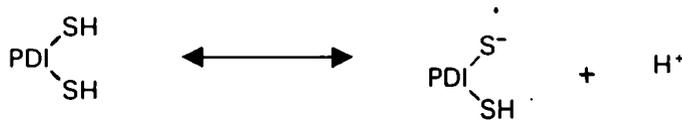
$$10^{\left(\frac{2(E'_{GSH} - E^{\circ}_{PDI})}{0.059} \right)} + 1 = \frac{[PDI]_{Total}}{[PDI^{RED}]} \quad (14)$$

y finalmente despejando la $[PDI^{RED}]$ de la ecuación (14)

$$[PDI^{RED}] = \frac{[PDI]_{Total}}{10^{\left(\frac{2(E_{GSH}^{\cdot} - E_{PDI}^{\cdot})}{0.059}\right)} + 1} \quad (15)$$

4 Cálculo de la concentración de PDI^{RED} ionizada (tiolato) en función del pH

Suponiendo pH menor que 8 y considerando que en estas condiciones sólo se ionizará la cisteína del sitio activo más cercana al extremo amino terminal, el equilibrio ácido-base para la PDI^{RED}



indica que

$$K_a = \frac{[PDI(S^-)][H^+]}{[PDI(SH)_2]} \quad (16)$$

La concentración total de PDI^{RED} estará dada por

$$[PDI^{RED}]_{Total} = [PDI(SH)_2] + [PDI(S^-)] \quad (17)$$

De manera que despejando $[PDI(SH)_2]$ de la ecuación (16) y sustituyendo en (17) obtenemos

$$[PDI^{RED}]_{Total} = \frac{[PDI(S^-)][H^+]}{K_a} + [PDI(S^-)] \quad (18)$$

Finalmente, despejando $[PDI(S^-)]$ de la ecuación (18) resulta

$$[PDI(S^-)] = [PDI^{RED}]_{Total} \times \frac{K_a}{(K_a + [H^+])} \quad (19)$$

APENDICE 3

Estudios parciales sobre la estabilidad estructural de la napina.

A3.1 Estabilidad térmica de la napina.

Aunque la napina fue caracterizada genéticamente y se ha estudiado el mecanismo de procesamiento proteolítico postraducciona, poco es lo que se conoce respecto a su caracterización estructural:230. i.e., estabilidad, identidad de los enlaces disulfuros, sensibilidad a los perturbantes proteicos químicos y físicos. Para determinar la sensibilidad de la napina a las perturbaciones, se analizó el efecto de la temperatura sobre la estructura terciaria.

A3.1.1 Introducción al análisis espectroscópico de las proteínas

Las propiedades espectrales de las proteínas dependen del ambiente molecular y de la movilidad de sus cromóforos. La absorbancia de las proteínas en el rango comprendido entre los 230 y 300 nm está determinada por los residuos aromáticos de los aminoácidos tirosina, triptofano y fenilalanina. Esta sensibilidad al entorno resulta en el ensanchamiento de las bandas, desplazamientos en los máximos de absorción o cambios en la intensidad de los picos. En general predominan los corrimientos de los máximos de absorción: *e.g.* el espectro de un cromóforo en solución se desplaza hacia el rojo cuando decrece la polaridad del solvente, y hacia el azul cuando aumenta la polaridad. Los cambios producidos por la variación del entorno son en general pequeños en relación al ancho de las bandas por lo cual, la información que aporta el espectro de absorción sobre la conformación está enmascarada por la superposición de las bandas. En este contexto, el análisis de los espectros por su cuarta derivada amplifica la contribución de las pequeñas variaciones y con ello provee mayor información respecto a los cambios estructurales en las proteínas (Padrós *et al* 1982, Duñach *et al* 1983).

A3.1.2 Análisis del espectro de cuarta derivada.

La napina posee 1 triptofano, 1 tirosina y 2 fenilalaninas. La figura A3.1 muestra el espectro de absorbancia para la napina y su correspondiente espectro de cuarta

derivada. λ_1 indica la longitud de onda en que aparece el primer mínimo del espectro de cuarta derivada (de longitudes de onda mayores a menores).

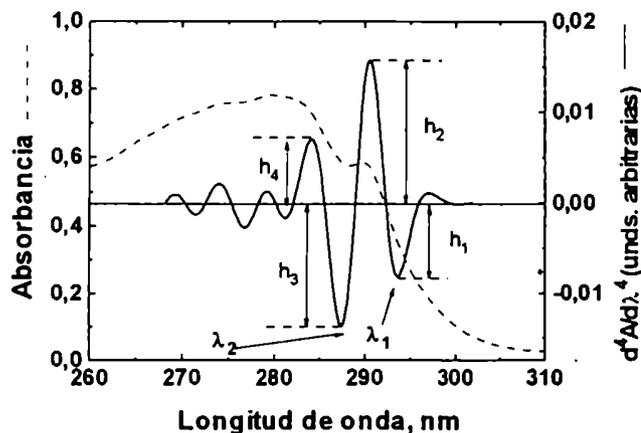


Figura A3.1: Espectro de absorción para la napina (0.9 mg/ml en buffer MOPS 50 mM pH 7.6) y el correspondiente espectro de derivada cuarta. Sobre este último espectro se indican los parámetros utilizados para el cálculo de $R=(h_1+h_2)/(h_3+h_4)$ y el mínimo utilizado para la obtención de λ_1 .

Un valor de λ_1 cercano a 292 nm es típico de un triptofano en un ambiente acuoso, mientras que un valor superior a 293 nm caracteriza un triptofano en un ambiente no acuoso. El segundo mínimo, λ_2 , indicativo de los grupos tirosilo, oscila entre 280.6 nm (agua) y 290.4 nm (n-butanol). Si bien las variaciones en λ_1 y λ_2 permiten detectar cambios conformacionales, Duñach *et al* (1983) definieron también el parámetro R como $(h_1+h_2)/(h_3+h_4)$ para estimar los cambios conformacionales originados por desnaturalizaciones ácidas o térmicas.

A3.2.3 Efecto de la temperatura sobre el espectro de cuarta derivada.

La figura 10a muestra los espectros de cuarta derivada para la napina efectuados a distintas temperaturas, desde 10 °C hasta 80 °C con intervalos de 10 °C. El incremento de la temperatura no introdujo grandes variaciones en el λ_1 , ni en el R, indicando la ausencia de cambios conformacionales alrededor del triptofano (Figura A3.2b). Este triptofano estaría ubicado en un entorno no acuoso, que no es alterado por el aumento de la temperatura.

Luego de medido el espectro a 80 °C, la disminución de la temperatura a 30 °C produjo un espectro de cuarta derivada indistinguible del obtenido inicialmente a esta temperatura. Estos resultados sugieren una estructura relativamente estable a la desnaturalización térmica, cuyas pequeñas modificaciones conformacionales serían reversibles.

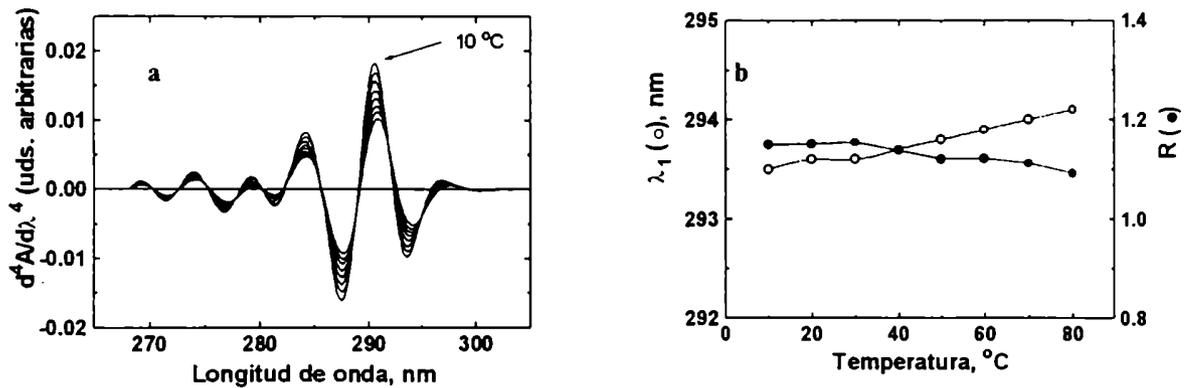


Figura A3.2: Análisis de la desnaturalización térmica de la napina. a) Espectros de cuarta derivada para la napina a distintas temperaturas. La flecha indica la dirección de desplazamiento del pico b) Gráfico de los valores obtenidos para λ_1 y R en función de la temperatura.

A3.2 Efecto del TCA y el 2-PrOH en la reducción de la napina.

Los agentes caotrópicos (*e.g.* anión tricloroacetato), y los solventes orgánicos (*e.g.* 2-propanol), afectan la estructura de las proteínas. Estas perturbaciones en la FBPasa de cloroplastos de espinaca sensibilizaron el proceso reductivo promoviendo la enzima a un estado más activo (Ballícora & Wolosiuk 1994).

Si la acción de estos perturbantes alterara la estructura de la napina, podría modificarse la accesibilidad a enlaces disulfuro poco expuestos. Por ello se analizó si el 2-PrOH y el TCA modificaban la velocidad de reducción de la napina catalizada por la Trx. Como estos perturbantes no modifican apreciablemente la estructura de la Trx (Mora-García *et al* 1996), cualquier alteración detectable en los patrones electroforéticos de la napina se deberían a cambios en la estructura de esta última. Ni el TCA, para concentraciones comprendidas entre 5 y 200 mM, ni el 2-PrOH, en el rango de 1 a 20 % (v/v) modificaron el perfil de la reducción de la napina

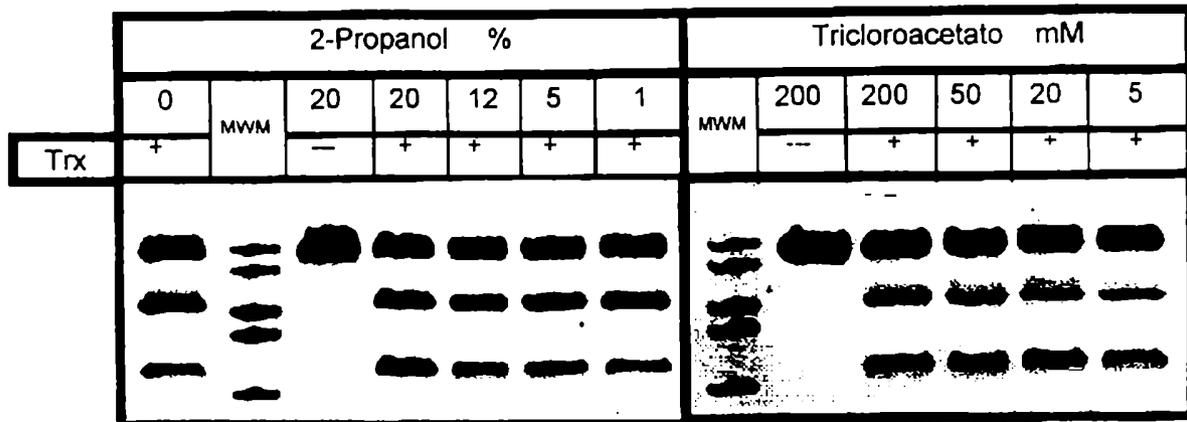


Figura A3.3: Efecto del TCA y el 2-PrOH en la reducción de la napina catalizada por Trx. Las reacciones se efectuaron a 25 °C durante 20 min. en un volumen final de 0.02 ml conteniendo buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7.5, EDTA 5 mM, napina 4.5 µg, Trx 0.6 µg, TCA o 2-PrOH según se indica y se iniciaron con el agregado de DTT (concentración final 0.5 mM). Los marcadores de masa molecular se indican con la abreviatura MWM.

catalizada por la Trx (Figura A3.3).

La escasa variabilidad en el entorno de los aminoácidos aromáticos detectada en los espectros de cuarta derivada frente a la variación de la temperatura, indica que la estructura de la napina sería compacta y muy estable. Esta estabilidad estaría dada por los enlaces disulfuro que entrelazan covalentemente distintas regiones de los polipéptidos pequeños. Por este motivo los perfiles de reducción permanecieron invariables en presencia de los perturbantes proteicos (2-PrOH y el TCA).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias Bibliográficas

- Allen A.K., Neuberger A. & Sharon N. (1973) *Biochem.J.* **131**, 155-162
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myeus E.W. & Lipman D.J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410
- Ballícora M.A. (1993) Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires.
- Ballícora M.A. & Wolosiuk R.A. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 467-474
- Bardwell, J.C.A., McGovern, K., Beckwith, J. (1991) *Cell* **67**, 581-589
- Bardwell, J.C.A., Lee, J.-O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. & Beckwith, J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1038-1042
- Bardwell, J.C.A. (1994) *Molec. Microbiol.* **14**, 199-205
- Baszczynski C.L., & Fallis L. (1990) *Plant Mol. Biol.* **14**, 633-635
- Beckman D.L. & Kranz R.G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2179-2183
- Besse I. & Buchanan B.B. (1997) *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 1-11
- Bewley J.D. & Black M. (1994) *in Seeds. Physiology of development and germination.* pp 326. 2nd edition. Plenum Press.
- Bradford M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Buchanan, B.B., Schurman, P., Decottignies, P. & Lozano, R. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 257-260
- Bulleid N.J & Freedman, R.B. (1988) *Nature* **335**, 649-651
- Bulleid N.J. (1993) *Adv. Prot. Chem.* **44**, 125-150
- Buttler W.K. (1979) *Meth. Enzymol.* **56**, 501-515
- Cai H., Wang C. & Tsou C. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 24550-24552
- Chandler M.L. & Varandani P.T. (1975) *Biochemistry* **14**, 2107-2115
- Chen, F. & Hayes, P.M. (1994) *Plant Physiol.* **106**, 1705-1706
- Chivers P.T., Laboissiere M.C.A. & Raines R.T. (1996) *EMBO J.* **15**, 2659-2667
- Creighton, T.E., Hillson D.A. & Freedman R.B. (1980) *J. Mol. Biol.* **142**, 43-62
- Creighton, T.E. (1986) *Meth. Enzymol.* **131**, 83-106
- Creighton, T.E. & Freedman, R.B. (1993) *Curr. Biol.* **3**, 790-793
- Crouch M.L., Tenbarga K.M., Simon A.E. & Ferl R. (1983) *J. Mol. Appl. Genet.* **2**, 273-

283

- Darby N.J. & Creighton T.E. (1995) *Biochemistry* **34**, 11725-11735
- Darby N.J., Kemmink K.J. & Creighton T.E. (1996) *Biochemistry* **35**, 10517-10528
- De Azevedo G.M.V., Brockway B.E., Freedman R.B., Greenwell P. & Roden L.T. (1984) *Biochem. Soc. Trans.* **12**, 1043
- Duñach M., Sabés M. & Padrós E. (1983) *Eur. J. Biochem.* **134**, 123-128
- Dyson H.J., Jeng M., Tennant L.L., Slaby I., Lindell M., Cui D., Kuprin S. & Holmgren A. (1997) *Biochemistry* **36**, 2622-2636
- Ellman G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77
- Ericson M.L., Rodin J., Lenman M., Glimelius K., Josefsson L-G. & Rask L. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 14576-14581
- Ericson M.L., Murén E., Gustavsson H.O., Josefsson L-G. & Rask L. (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 741-746
- Freedman R.B. (1984) *Trends Biochem. Sci.* **9**, 438-441
- Freedman, R.B. (1991) in *Conformation and Forces in Protein Folding*, eds. Nall, B.T. & Dill, K.A. (Am. Assoc. Adv. Sci., Washington, DC), pp. 204-214
- Freedman R.B., Hirst T.R. & Tuite M.F. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 331-336
- Freedman, R.B. (1995) *Curr. Biol.* **5**, 85-91
- Galili G., Shimoni Y., Giorini-Silfen S., Levanomy H., Altschuler Y. & Shani N. (1996) *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 245-252
- Gan Z.R. & Wells W.W. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 6704-6709
- Gane P.J., Freedman R.B. & Warwicker J. (1995) *J. Mol. Biol.* **249**, 376-387
- Gehrig P.M., Krzyzaniak A., Barciszewski J. & Bieman K. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **93**, 3647-3652
- Gilbert, H.F. (1990) *Adv. Enzymol.* **63**, 69-172
- Gilbert, H.F. (1994) in *Mechanisms of protein folding*, Chapter 5 pag. 104-136. Edited by R.H. Pain. IRL Press
- Gilbert, H.F. (1995) *Meth. Enzymol.* **251**, 8-28
- Girard, P. & Potier, P. (1993) *FEBS Letters*, **320**, 7-8
- Goldberger, R.F., Epstein, C.J. & Anfinsen, C.B. (1963) *J. Biol. Chem.* **239** 628-635

- Grimwade B., Tatham A.S., Freedman R.B., Shewry P.R. & Napier J.A. (1996) *Plant Mol. Biol.* **30**, 1067-1073
- Grauschopf U., Winther J. R., Korber P., Zander T., Dallinger P. & Bardwell J.C.A. (1995) *Cell* **83**, 947-955
- Grynberg A., Nicolas J., Drapron R. (1977) *C.R. Acad. Sc. Paris* **248**, 235-238
- Grynberg A., Nicolas J., Drapron R. (1978) *Biochimie* **60**, 547-551
- Gunther R., Srinivasan M., Haugejorden S., Green M., Ehbrecht I.M. & Kuntzel H. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 7728-7732
- Guthapfel, R., Guéguen P. & Quéméneur E. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 2663-2666
- Hawkins H.C., de Nardi M. & Freedman R.B. (1991a) *Biochem. J.* **275**, 341-348
- Hawkins H.C., Blanckburn, E.C. & Freedman, R.B. (1991b) *Biochem. J.* **275**, 349-353
- Helenius A., Marquardt T. & Braakman (1992) *Trends Cell Biol.* **2**, 227-231
- Hennecke J., Spleiss C. & Glockshuber R. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 189-195
- Holmgren A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9627-9632
- Holmgren, A. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13963-13966
- Holmgren, A & Aslund R. (1995) *Meth. Enzymol.* **252**, 283-292
- Huang A.H.C. (1992) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**, 177-200
- Hwang, C., Sinskey, A.J., & Lodish, H.F. (1992) *Science* **257**, 1496-1502
- Iida K., Miyashi O., Iwata Y., Kozaki K., Matsuyama M. & Saga S. (1996) *J. Histochem. Cytochem.* **44**, 751-759
- Jander G., Martin N.L. & Beckwith J. (1994) *EMBO J.* **13**, 5121-5127
- Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., Dyson H.J. (1994) *Structure* **2**, 853-868
- Jiao J., Yee B.C., Kobrehel K. & Buchanan B.B. (1992) *J. Agric. Food Chem.* **40**, 2333-2336
- Jiao J., Yee B.C., Wong J.H., Kobrehel K. & Buchanan B.B. (1993) *Plant Physiol. Biochem.* **31**, 799-804
- Jocelyn, P.C. (1972) in *Biochemistry of the SH group*. Academic Press
- John D.C.A., Grant M.E. & Bullied N.J. (1993) *EMBO J.* **12**, 1587-1595
- Josefsson L.G., Lenman M., Ericson M.L. & Rask L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12196-

12201

- Kainuma K., Ookura T. & Kawamura Y. (1995) *J. Biochem.* **117**, 208-215
- Kanaya E., Anaguchi H. & Kikuchi M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 4273-4278
- Keire D.A., Strauss E., Guo W., Noszel B. & Rabenstein D.L. (1992) *J. Org. Chem.* **57**, 123-127
- Kemmink J., Darby N.J., Dijkstra K., Nilges M. & Creighton T.E. (1996) *Biochemistry* **35**, 7684-7691
- Kemmink J., Darby N.J., Dijkstra K., Nilges M. & Creighton T.E. (1997) *Curr. Biol.* **7**, 239-245
- Kishigami S., Kanaya E., Kikuchi M. & Ito K. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17072-17074
- Kivirikko K.I., Myllyla R. & Pihlajaniemi T. (1989) *FASEB J.* **3**, 1609-1617
- Kobrehel K., Yee B.C. & Buchanan B.B. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 16135-16140
- Kobrehel K., Wong J.H., Balogh A., Kiss F., Yee B.C. & Buchanan B.B. (1992) *Plant Physiol.* **99**, 919-924
- Konishi Y., Ooi T. & Scheraga H.A. (1981) *Biochemistry* **20**, 3945-3955
- Kortemmè T. & Creighton T.E. (1995) *J. Mol. Biol.* **253**, 799-812
- Kozaki K., Miyaishi O., Asai N., Iida K., Sakata K., Hayashi M., Nishida T., Matsuyama M., Shimizu S., Kaneda T. & Saga S. (1994) *Exp. Cell Reserch* **213**, 348-358
- Krause G., Lundstrom J., Barea, J.L., Pueyo de la Cuesta C. & Holmgren A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 9494-9500
- Laboissière M.C.A., Sturley S.L. & Raines R.T. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 28006-28009
- Laemmli U.K. (1970) *Nature*, **227**, 680-685
- Lambert, N. & Freedman, R.B. (1983) *Biochem. J.* **213**, 225-234
- Lebeche D., Lucero H. & Kaminer B. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **202**, 556-561
- Lerouge P. & Faye L. (1996) *Plant Phys. Biochem.* **34**, 263-271
- Li C.P. & Larkins B.A. (1995) EMBL/GENBANK/DDBJ DATA BANKS , AC P52588
- Lis H. & Sharon N. (1993) *Eur. J. Biochem.* **218**, 1-27
- Loferer H. & Hennecke H. (1994) *Trends Biochem. Sci.* **19**, 169-171

- Lozano R.M., Wong J.H., Yee B.C., Peters A., Kobrehel K. & Buchanan B.B. (1996) *Planta* **200**, 100-106
- Lundstron J. & Holmgren A (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 9114-9120
- Lundstron J. & Holmgren A. (1993) *Biochemistry* **32**, 6649-6655
- Lundstron J., Birnbach U., Rupp K., Soling H. & Holmgren A. (1995) *FEBS Letters* **357**, 305-308
- Lyles M.M. & Gilbert, H.F. (1991a) *Biochemistry* **30**, 613-619
- Lyles M.M. & Gilbert, H.F. (1991b) *Biochemistry* **30**, 619-625
- Majoul J., Ferrari D. & Soling H. (1997) *FEBS Letters* **401**, 104-108
- Martin, J.C.L., Bardwell, J.C.A & Kuriyan, J. (1993) *Nature* **365**, 464-468
- Martin, J.C.L. (1995) *Structure* **3**, 245-250
- Meister A. & Anderson M.E. (1983) *Annu. Rev. Biochem.* **52**, 711
- Millis, K.K., Weaver, K.H., & Rabenstein D.L. (1993) *J. Org. Chem.* **58**, 4144-4146
- Missiakas, D., Georgopoulos C. & Raina S. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **90**, 7048-7088
- Missiakas, D., Georgopoulos, C. & Raina, S. (1994) *EMBO J.* **13**, 2013-2020
- Missiakas D., Schwager F. & Raina S. (1995) *EMBO J.* **14**, 3415-3424
- Missiakas D. & Raina S. (1997) *Trends Biochem. Sci.* **22**, 59-63
- Mizunaga T., Katakura Y., Miura T. & Maruyama Y. (1990) *J. Biochem.* **108**, 846-851
- Mora-García S., Ballícora M.A. & Wolosiuk R.A. (1996) *FEBS Letters* **380**, 123-126
- Morjana N.A. & Gilbert H.F (1991) *Biochemistry* **30**, 4985-4990
- Moutiez M., Quéméneur E., Sergheraert C., Lucas V., Tartar A. & Davioud-Chavert E. (1997) *Biochem. J.* **322**, 43-48
- Munro S. & Pelham H.R.B. (1987) *Cell* **48**, 899-907
- Murén E., Ek B. & Rask L. (1995) *Eur. J. Biochem.* **227**, 316-321
- Nelson J.W. & Creighton T.E. (1994) *Biochemistry* **33**, 5974-5983
- Noiva, R., Kimura H., Roos J. & Lennarz W.J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19645-19649
- Otsu M., Urade R., Kito M., Omura F. & Kikichi M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 14958-14961
- Padrós E., Morros A., Mañosa J. & Duñach M. (1982) *Eur. J. Biochem.* **127**, 117-122

- Primm T.P., Walker K.W. & Gilbert H.F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 33664-33669
- Puig A. & Gilbert H.F. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25889-25896
- Quéméneur E., Guthapfel R. & Gueguen P. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 5485-5488
- Richard G., Turner M.P.F., Napier J.A. & Shewry P.R. (1996) *Plant Physiol. Biochem.* **34**, 237-243
- Roden L.T., Mifflin B.J. & Freedman R.B. (1982) *FEBS Letters* **138**, 121-124
- Rodriguez-Suarez R. J. & Wolosiuk R.A. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 1453-1454
- Rothwarf, D.M. & Scheraga, H.A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 7944-7948
- Ruddock L.W., Hirst T.R. & Freedman R.B. (1996) *Biochem. J.* **315**, 1001-1005
- Ruegg U.T. & Rudinger J. (1977) *Meth. Enzymol.* **47**, 111-126
- Rupp K., Birnbach U., Lundstrom J., Van P.N. & Soling H. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 2501-2507
- Salomon Z., Gleason F.K. & Tollin G. (1992) *Arch. Biochem. Biophys.* **299**, 193-198
- Schägger H. & von Jagow G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**(2), 368-379
- Schürmann P. (1993) *Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants*, Edited by L.J. de Kok et al. Pp 153-160. SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.
- Scofield S.R. & Crouch M.L. (1987) *J. Biol. Chem.* **262**, 12202-12208
- Shevchik, V.E., Condemine, G. & Robert-Baudouy, J. (1994) *EMBO J.* **13**, 2007-2012
- Shevchik V.E., Bortoli-German I., Robert-Baudouy J., Robinet S., Barras F. & Condemine G. (1995) *Mol. Microbiol.* **16**, 745-753
- Shimoni, Y., Segal, G., Zhu, X. & Galili, G. (1995a) *Plant Physiol.* **107**, 281.
- Shimoni Y., Zhu X., Levanomy H., Segal G. & Galili G. (1995b) *Plant Physiol.* **108**, 327-335
- Shorrosh B.S. & Dixon R.A. (1992) *Plant Mol. Biol.* **19**, 319-321
- Shorrosh B.S., Subramaniam J., Schubert K.R. & Dixon R.A. (1993) *Plant Physiol.* **103**, 719-726
- Shutov A.D. & Vaintraub J.A. (1987) *Phytochemistry* **26**, 1557-1566
- Srinivasan M., Lenny N. & Green M. (1993) *DNA & Cell Biol.* **12**, 807-822
- Srivastava S.P., Chen N.Q., Liu Y.X. & Holtzman J.L. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**,

20337-20344

- Song J. & Wang C. (1995) *Eur. J. Biochem.* **231**, 312-316
- Steiner J., Termonia Y. & Deitour J. (1972) *Anal. Chemistry* **44**, 1906-1909
- Sun C.H., Holmgren A. & Bushweller F. (1997) *Protein Science* **6**, 383-390
- Szajewski, R.P. & Whitesides, G.M. (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 2011
- Tachibana C. & Stevens T.H. (1992) *Molec. Cellular Biol.* **12**, 4601-4611
- Tachikawa H., Takeuchi Y., Funahashi W., Miura T., Gao X., Fujimoto D., Mizunaga T. & Onodera K. (1995) *FEBS Letters* **369**, 212-216
- Takahashi N. & Creighton T.E. (1996) *Biochemistry* **35**, 8342-8353
- Tarentino, A.L., Quinones G., Trumble A., Changehien L.M., Dueeman B., Maley F., & Plummer T.H. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 6961-6966
- Terada K., Manchikalapudi P., Noiva R., Jauregui H.O., Stockert R.J. & Schilsky M.L. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20410-20416
- Tomb J.-F. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 10252-10256
- Torchinsky, Yu.M. (1981) in *Sulfur in Proteins*, Pergamon Press
- Urade R., Nasu M., Moriyama T., Wada K. & Kito M. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**, 15152-15159
- Van P.N., Peter F. & Söling H-D. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 17494-17501
- Van P.N., Rupp K., Lampen A. & Soling H. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 789-795
- Vouri K., Pihlajaniemi T., Marttila M. & Kivirikko K. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**, 7467-7470
- Walker K.W., Lyles M.M. & Gilbert H.F. (1996) *Biochemistry* **35**, 1972-1980
- Wang C. & Tsou C. (1993). *FASEB J.* **7**, 1515-1517
- Wang C., Eufemi M., Turano C. & Giartosio A. (1996) *Biochemistry* **35**, 7299-7307
- Wells W.W., Yu D.P., Yang Y. & Rocque P.A. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 15361-15364
- Weissman J.S. & Kim P.S. (1993) *Nature* **365**, 185-188
- Wetterau J.R., Aggerbeck L.P., Laplaud M. & McLean (1991a) *Biochemistry* **30**, 4406-4412
- Wetterau J.R., Combs K.A., McLean L.R., Spinner S.N. & Aggerbeck L.P. (1991b)

Biochemistry 30, 9728-9735

Wittrup K.D. (1995) *Curr. Biol.* 6, 203-208

Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A. & Hagelin, K. (1993) *FASEB J.* 7, 622-637

Wunderlich M., Otto A., Seckler R. & Glockshuber R. (1993) *Biochemistry* 32, 12251-12256

Yao Y., Zhou Y. & Wang C. (1997) *EMBO J.* 16, 651-658

Yu J., Webb H., Hirst T.R. (1992) *Mol. Microbiol.* 6, 1949-1958

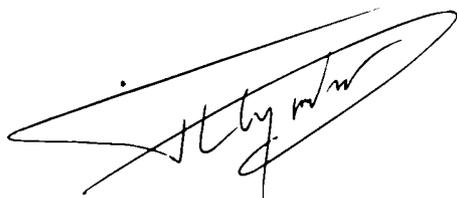
Zapun, A., Bardwell, J.C.A. & Creighton, T.E. (1993) *Biochemistry* 32, 5083-5092

Zapun, A. & Creighton, T.E. (1994) *Biochemistry* 33, 5202-5211

Zapun A., Missiakas D., Raina S. & Creighton T.E. (1995) *Biochemistry* 34, 5075-5089

Ziegler D.M. & Poulsen L.L. (1977) *Trends Biochem. Sci.* 2, 79

Ziegler D.M. (1985) *Annu. Rev. Biochem.* 54, 305-329



Lic MEVCK. A.P.



Dr. RICARDO A. WOLOSIUK