

La desnaturalización con clorhidrato de guanidina de algunas deshidrogenasas seguida por medidas de fluorescencia

J. L. Iborra,* A. Manjón y J. Ferragut

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Bilbao
(España)

(Recibido el 22 de julio de 1974)

J. L. IBORRA, A. MANJON and J. FERRAGUT. *Dehydrogenase Denaturation by Guanidine Hydrochloride Measured by Fluorescence*. Rev. esp. Fisiol., 31, 29-36. 1975.

Denaturation and subsequent renaturation of the enzymes Lactate, Glucose-6-phosphate, Glutamate and Alcohol dehydrogenases, by means of fluorescence spectra and the variation of enzyme activity in each conformational state, have been studied. The denaturing agent has been Guanidine chloride in a range of concentration from 0.5 to 6 M.

Special behaviour has been observed in each enzyme in the presence of the denaturing agent. The action of this agent is compared with that of urea. The renaturation percentages obtained are relatively low. Interaction between the denaturing agent and the aminoacids producing the fluorescence of the enzymes is observed.

Cuando un enzima se somete a la acción de un agente con gran tendencia a formar puentes de hidrógeno, tal como el clorhidrato de guanidina, se observa que la transición del estado nativo al desnaturado tiene lugar dentro de un rango estrecho de concentración del agente desnaturante. Se piensa que la rotura de la conformación tridimensional es de na-

turaliza cooperativa, ya que los residuos de aminoácidos de la cadena polipeptídica de la región interna de la molécula no se exponen al exterior de uno en uno, sino que lo hacen simultánea y rápidamente.

Por métodos de fluorescencia TANFORD (7) y, posteriormente, TEIPEL y KOSHLAND (9) han estudiado dicho efecto sobre un determinado número de enzimas. El efecto de desnaturalización varía cuando se utilizan disoluciones concentradas de urea como agente desnaturante, como han demostrado PACE y TANFORD

* Dirección actual: Departamento de Química Aplicada. Centro de Estudios Universitarios de Alicante. Universidad de Valencia. Alicante.

(6) por medidas de dispersión óptica rotatoria.

En el presente trabajo se realiza, por medidas de fluorescencia, un estudio comparativo de los efectos de estos dos agentes desnaturalizantes, sobre algunos enzimas deshidrogenasas, llevando a cabo el proceso de desnaturalización y posterior renaturalización, a una temperatura de 0-5° C. La renaturalización de los enzimas, partiendo de distintos grados de desnaturalización, se consigue por el procedimiento de disminuir la actividad del agente desnaturalizante empleado. A partir de la comparación de los espectros de fluorescencia de los enzimas en los tres estados, nativo, desnaturalizado y renaturalizado, y de las actividades enzimáticas correspondientes, se explican los cambios conformacionales que sufre el enzima.

Material y métodos

Los enzimas han sido suministrados por Sigma Chem. Co., y se han utilizado sin someterlos a posteriores procesos de purificación. Se han empleado: deshidrogenasa de lactato (E.C.1.1.1.27) Type III (320 U/mg); deshidrogenasa de glutamato (E.C.1.4.1.2) Type I (60 U/mg); deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato (E.C.1.1.1.49) Type XV (330 U/mg); deshidrogenasa alcohólica (E.C.1.1.1.1) (450 U/mg).

El α -cetoglutarato (sal monosódica), nicotín adenín dinucleótido reducido (NADH), nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido (NADPH), nicotín adenín dinucleótido (NAD), clorhidrato de guanidina (ClH-Gu) y ditiotreitól, han sido suministrados análogamente por Sigma Chem. Co. Los demás reactivos son de Merck y de grado analítico.

En las medidas de fluorescencia se ha utilizado un espectrofluorómetro Hitachi Perkin-Elmer mod. MPF-3, con accesorio de corrección de espectros, dotado de célula termostatzada con un baño termos-

tático de precisión $\pm 0,1^\circ$ C. Las cubetas empleadas están exentas de fluorescencia y son de 1 cm de espesor.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Se ha realizado según una modificación del procedimiento de WILLIAMSON y CORKEY (10).

Deshidrogenasa de lactato (2). Se determina por la desaparición de la fluorescencia de NADH en una disolución tampón fosfato 0,05 M pH = 7,4, que contiene NADH $2,5 \times 10^{-4}$ M, piruvato sódico 3×10^{-4} M y enzima 0,3 μ g/ml.

Deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato. Por la aparición de la fluorescencia de NADPH en una disolución de tampón tris-acetato- Cl_2Mg 0,05 M pH = 7,4, que contiene NADP $4,5 \times 10^{-5}$, G-6-P $4,5 \times 10^{-4}$ M y enzima 13,3 μ g/ml.

Deshidrogenasa alcohólica (2). Por fluorescencia a partir de la formación de NADH en una disolución de tampón tris-hidrato de hidrazina 0,4 M pH = 8,5 que contiene NAD 10^{-3} M, etanol 0,45 M y enzima 0,6 μ g/ml.

Deshidrogenasa de glutamato (2). Por la desaparición de la fluorescencia de NADPH en una disolución de tampón tris-acetato 0,05 M pH = 7,4 que contiene α -cetoglutarato $7,5 \times 10^{-3}$ M, cloruro amónico $4,5 \times 10^{-2}$ M, NADPH 3×10^{-3} M y enzima 3,3 μ g/ml.

La aparición o desaparición de las formas reducidas de los coenzimas NADH y NADPH, se sigue a una longitud de onda de excitación de 340 nm y a una longitud de onda de emisión de 457 nm.

Todas las medidas de actividad, así como los espectros de fluorescencia, se han realizado a una temperatura de 25° C. Se ha comprobado que los enzimas son estables a la radiación ultravioleta de la lámpara de xenón del espectrofluoróme-

tro durante el tiempo en que se realizan las medidas de actividad.

DESNATURALIZACIÓN

Los enzimas se han desnaturalizado por incubación en una disolución que contiene ClH-Gu o urea en un rango variable de concentración, ditioneitol 10^{-2} M y EDTA 10^{-3} M, durante dos horas a una temperatura entre 0-5° C. Esta disolución tiene un $pH = 7$ (9). Transcurrido este tiempo, se extraía una alícuota y se medía su actividad enzimática para cada concentración de agente desnaturalizante empleada.

Asimismo se realizaban los espectros de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 280 nm para todos los enzimas estudiados excepto para la deshidrogenasa de glucosa-6-P cuya longitud de onda de excitación correspondía a 288 nm.

RENATURALIZACIÓN

La renaturalización se llevaba a cabo disminuyendo la concentración de agente desnaturalizante mediante dilución. En este procedimiento, se añade lentamente y con agitación a un volumen determinado de enzima desnaturalizado el volumen necesario de tampón de reactivación, que contiene tampón tris-acetato 0,05 M, ditioneitol 10^{-2} M y EDTA 10^{-3} M a $pH = 7,5$, hasta conseguir una dilución 1:100, en presencia o en ausencia de metabolito específico.

Se tomaban alícuotas y se ensayaba su actividad enzimática para cada concentración de agente desnaturalizante empleado. Los espectros de fluorescencia se obtenían a las longitudes de onda especificadas anteriormente.

En todos los ensayos de actividad enzimática, se ha utilizado una misma cantidad en peso (μg) de enzima, tal y como viene expresada en la medición de la actividad enzimática, tanto para el enzima nativo como para el desnaturalizado y renaturalizado.

Resultados

La figura 1 representa la variación del porcentaje de desnaturalización expresa-

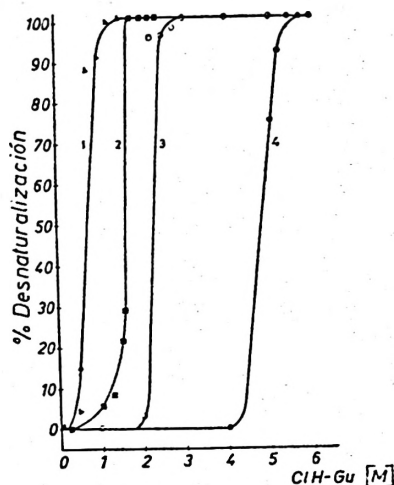


Fig. 1. Variación del porcentaje de desnaturalización con la concentración de ClH-Gu para las deshidrogenasas del alcohol (1), lactato (2), glucosa-6-P (3) y glutamato (4).

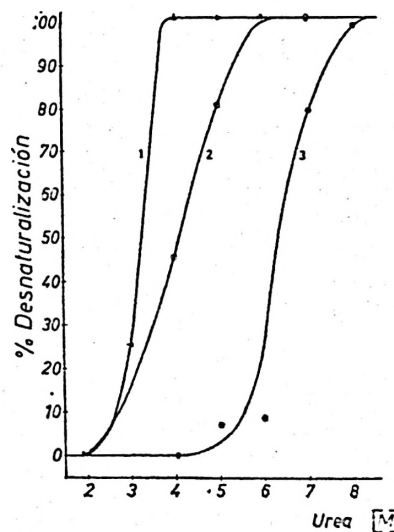


Fig. 2. Variación del porcentaje de desnaturalización frente a la concentración de urea para las deshidrogenasas de lactato (1), alcohol (2) y glucosa-6-P (3).

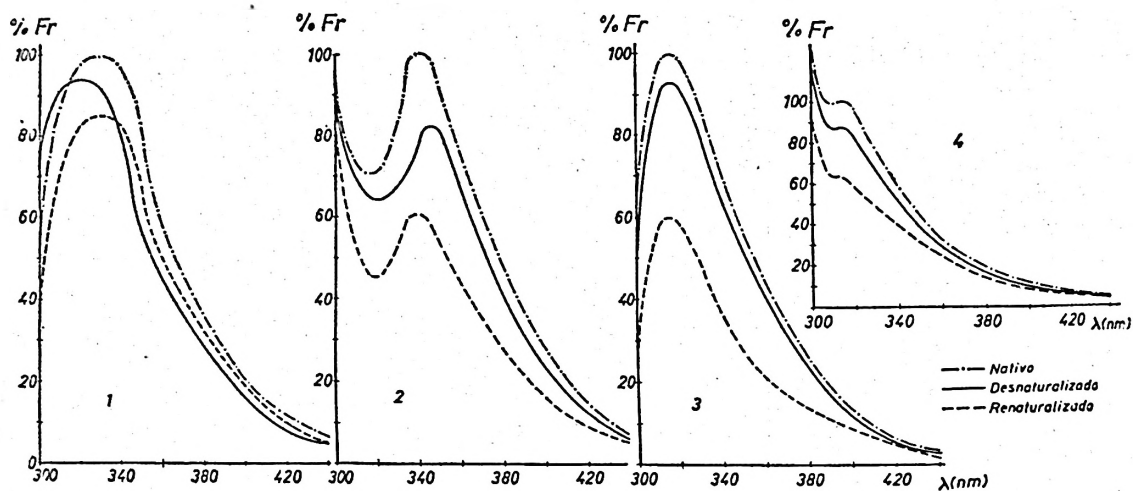


Fig. 3. Espectros de fluorescencia de las deshidrogenasas en los estados Nativo, Desnaturalizado y Renaturalizado.

En ordenadas, valores de fluorescencia referidos al máximo del enzima nativo como 100. 1: de glutamato (ClH-Gu, 6 M); 2: de glucosa-6-P (ClH-Gu, 3,85 M); 3: de alcohol (ClH-Gu 1,25 M); 4: de alcohol (urea 6 M).

do como disminución de la actividad catalítica del enzima nativo, frente a la concentración de ClH-Gu para los enzimas ensayados.

En la figura 2 se expresa la misma variación del porcentaje de desnaturalización pero con la concentración de urea para tres de los enzimas estudiados. De ambas figuras se deduce una diferente estabilidad de cada uno de los enzimas frente a la acción de estos dos agentes desnaturalizantes.

La figura 3 corresponde a los espectros de algunos enzimas en los tres estados conformacionales y en los que se ha representado la intensidad de fluorescencia relativa al cien por ciento para el enzima nativo frente a la longitud de onda de emisión. En los enzimas en los que el triptófano es el aminoácido responsable de la fluorescencia del enzima, se observa un desplazamiento del máximo de fluorescencia al pasar del estado nativo al desnaturalizado (figs. 3-1 y 3-2), mientras que en los enzimas que deben su fluorescencia principalmente a la tirosina no se

observa cambio alguno en dicho máximo (figuras 3-3 y 3-4).

En la tabla I se resumen los resultados obtenidos en la desnaturalización y renaturalización de los enzimas ensayados así como las longitudes de onda de los máximos de los espectros de fluorescencia en los tres estados conformacionales y las intensidades de fluorescencia relativas al enzima nativo del estado desnaturalizado.

En los casos en los que la desnaturalización no alcanza el 90 %, se obtiene una mayor pérdida de actividad cuando se intenta la posterior renaturalización. En aquellos otros en los que la desnaturalización es total y se ha obtenido un mínimo de recuperación de la actividad enzimática, se considera tal estado como enzima renaturalizado.

Las longitudes de onda de los máximos de fluorescencia de las deshidrogenasas de lactato y de etanol no varían al pasar del estado desnaturalizado al renaturalizado, independientemente de que la desnaturalización se lleve a cabo ClH-Gu o urea. Sin embargo, para la deshidrogenasa de

Tabla 1. *Desnaturalización y renaturalización de diversas deshidrogenasas.* Efectividad del proceso (%), λ de los máximos de los espectros de fluorescencia del enzima nativo (N), desnaturalizado (D) y renaturalizado (R) y relación de la intensidad de fluorescencia del enzima desnaturalizado a la del enzima nativo (en %). Desnaturalización con clorhidrato de guanidina (ClH-Gu) o urea.

Deshidrogenasas	Agente desnat. [M]	Desnatur. %	Renatur. %	Espectros de fluoreescencia (λ max. [nm])				
				N	D	R	% D/N	
Lactato	Urea	4,00	100	25,0	340	320	320	88,4
Lactato	ClH-Gu	1,75	100	2,15	340	320	320	81,7
G-6-P	»	3,85	100	4,6	340	345	340	92
»	»	2,75	97,7	10,8	340	345	340	94
»	»	2,50	96,2	12,7	340	345	340	94
»	»	2,25	95,8	15,0	340	345	340	96
Glutamato	»	6,00	100	12,1	330	317	317	93
»	»	5,25	92	22,8	330	320	330	73,4
Alcohol	»	1,25	100	2,8	314	314	314	90
»	»	1,00	100	5,9	314	314	314	91
»	Urea	6,00	100	36,7	314	314	314	88

glucosa-6-P la longitud de onda del máximo de fluorescencia se desplaza hacia longitudes de onda menores al pasar del estado desnaturalizado al renaturalizado. Por el contrario, para la deshidrogenasa de glutamato el desplazamiento del máximo es hacia longitudes de onda mayores para el mismo cambio conformacional.

Discusión

De los resultados obtenidos en los estudios de desnaturalización se deduce que la estabilidad de los enzimas frente a la concentración de agente desnaturalizante varía de un enzima a otro, lo que está de acuerdo con la bibliografía (7).

La mayor reactividad como agente desnaturalizante del ClH-Gu con respecto a la urea, se manifiesta por el hecho de que todos los enzimas ensayados necesitan de una mayor concentración de urea para conseguir el mismo efecto de desnaturalización. El hecho de que la pendiente en el punto de inflexión de las gráficas de las figuras 1 y 2 sea mayor para el ClH-Gu, implica que éste es un desnaturalizante más activo que la urea.

El desplazamiento hacia menores longitudes de onda del máximo de fluorescencia de las deshidrogenasas de lactato y de glutamato desnaturalizadas con ClH-Gu con respecto al máximo de fluorescencia del enzima en su estado nativo, sugiere que la aportación a la fluorescencia del enzima de los residuos de aminoácidos tirosina y triptófano es muy similar; pero, teniendo en cuenta el mayor rendimiento cuántico de fluorescencia del triptófano, debe existir una mayor proporción de residuos expuestos de tirosina que de triptófano en el espectro del enzima desnaturalizado (1).

La menor intensidad relativa del máximo de fluorescencia del enzima desnaturalizado con respecto al nativo, puede indicar que el ClH-Gu al interaccionar con los residuos de los aminoácidos, disminuye la fluorescencia de los mismos, lo que está de acuerdo con lo observado por TEIPEL y KOSHLAND (9) para los enzimas que contienen triptófano.

Cuando se emplea urea como agente desnaturalizante de la deshidrogenasa de lactato no existe desplazamiento alguno de la longitud de onda del máximo de fluorescencia del enzima desnaturalizado

con respecto a la nativa, lo que parece indicar que la interacción de la urea o bien ha afectado los residuos de tirosina pero no a los de triptófano, o bien que la cadena no se ha desplegado completamente no existiendo residuos de tirosina expuestos y produciéndose la interacción de la urea con los residuos de triptófano. Esto explicaría también la disminución de la intensidad de fluorescencia.

En el proceso de renaturalización de las deshidrogenasas del alcohol, lactato y glutamato desnaturalizadas con ClH-Gu 6 M, no existen desplazamientos del máximo de fluorescencia, lo que sugiere que la aportación de los residuos de aminoácidos a la fluorescencia de los enzimas sigue siendo la misma que en el caso de los enzimas desnaturalizados.

El máximo de fluorescencia de la deshidrogenasa de glucosa-6-P desnaturalizada con ClH-Gu se desplaza hacia longitudes de onda mayores con respecto al del enzima nativo (fig. 3-2), lo que sugiere que se trata de un enzima constituido fundamentalmente por triptófano como aminoácido fluorescente (7). Además ello está de acuerdo con la disminución de la intensidad de fluorescencia del enzima desnaturalizado con respecto al enzima nativo.

Las deshidrogenasas de glutamato y de glucosa-6-P renaturalizadas después de desnaturalización con ClH-Gu 5,25 M, presentan un máximo de fluorescencia a la misma longitud de onda que los enzimas nativos, lo que significa que la renaturalización se verifica en la misma dirección de regreso hacia el estado nativo (9) (figuras 3-1 y 3-2).

La deshidrogenasa alcohólica en sus estados nativo, desnaturalizado y renaturalizado tiene su máximo de fluorescencia a 314 nm, lo que indica que los residuos de tirosina son los únicos que contribuyen a la fluorescencia del enzima (8) (figuras 3-3 y 3-4). La menor intensidad de fluorescencia de este enzima en su estado

desnaturalizado respecto al estado nativo, indica la existencia de algún tipo de interacción entre el agente desnaturalizante y los residuos de tirosina.

De todo ello se establece que la renaturalización para los enzimas estudiados es típica de cada enzima (5). (tabla I), aun habiendo sido ensayados bajo las mismas condiciones experimentales. Asimismo los bajos porcentajes de renaturalización conseguidos constituyen una de las características comunes a todas las deshidrogenasas (4).

En los casos en que se presenta una desnaturalización parcial comprendida entre el 90-100 %, el porcentaje de renaturalización tiende hacia el estado nativo y es superior al obtenido cuando la desnaturalización es total (tabla I).

Una interpretación de este resultado basada en el mecanismo de renaturalización propuesto por TEIPEL y KOSHLAND (9), podría ser que el enzima en su estado casi completamente desnaturalizado posee todavía algún núcleo estructurado que puede dar lugar a un estado precursor intermedio, que es el responsable de que se consiga una mayor renaturalización, análogamente a como sucede cuando se añade coenzima al inicio del proceso.

Cuando se parte de un estado desnaturalizado inferior al de la desnaturalización parcial, al añadir tampón de reactivación se obtiene una pérdida mayor de actividad enzimática. Puesto que en el mecanismo anterior se parte de un enzima totalmente desnaturalizado, aquél no sería aplicable a estos casos de desnaturalización parcial. Cuando se añade el tampón de reactivación al enzima parcialmente desnaturalizado, la consecuencia de la alteración de las condiciones del medio, podría ser un cambio conformacional hacia un estado desnaturalizado del enzima, que coincidiría o no con el que se alcanza cuando la desnaturalización se lleva a cabo con concentraciones superiores de agente desnaturalizante.

Resumen

Se ha estudiado la desnaturalización y posterior renaturalización de las deshidrogenasas de lactato glucosa-6-fosfato, glutamato y alcohólica, por medio de los espectros de fluorescencia y la variación de la actividad de dichos enzimas en cada uno de los estados conformacionales. El agente desnaturalizante utilizado ha sido el clorhidrato de guanidina en un rango de concentración de 0,5 a 6 M.

Se ha observado un comportamiento particular para cada enzima frente al citado agente desnaturalizante. Se compara la acción del clorhidrato de guanidina con la de la urea. Los porcentajes de renaturalización obtenidos son relativamente bajos. Se observa la existencia de interacción entre el agente desnaturalizante y los aminoácidos causantes de la fluorescencia de los enzimas.

Bibliografía

- 1 AUER, H. E. y DOTY, P.: *Biochem.*, **5**, 1716, 1966.
2. BARMAN, T. E.: En «Enzyme Handbook». Vols. I y II (T. E. Barman, ed.). Springer Verlag. Berlín, 1969, pág. 1.
3. BIGELOW, C. C.: *J. Mol. Biol.*, **8**, 696, 1964.
4. CHEN, R. F.: En «Fluorescence: Theory, Practice and Instrumentation» (Guilbault, G. G., ed.). Marcel Dekker. Nueva York, 1967, p. 443.
5. COOK, R. A. y KOSHLAND, D. E., JR.: *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **64**, 247, 1969.
6. PACE, N. C. y TANFORD, C.: *Biochem.*, **7**, 198, 1968.
7. TANFORD, C.: *Adv. Prot. Chem.*, **23**, 123, 1968.
8. TEALE, F. W. J.: *Biochem. J.*, **76**, 381, 1960.
9. TEIPEL, J. W. y KOSHLAND, D. E., JR.: *Biochem.*, **10**, 798, 1971.
10. WILLIAMSON, J. R. y CORKEY, B. E.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.). Vol. XIII. Academic Press. Nueva York, 1969, p. 434.