

BIBLIOTECA UCM



5301690539

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DPTO. BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

CONTROL DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DEL COMPLEJO RNasa-INHIBIDOR DE RNasa DE TESTÍCULO DE CERDO

Director: Dr. Juan Manuel García Segura



TESIS DOCTORAL

por

MERCEDES FERRERAS GÓMEZ

Madrid, 1994

18 245 10

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERIZACIÓN DEL INHIBIDOR DE RIBONUCLEASA (IR)	3
1.1.1 Características generales	3
1.1.2 Estudios de secuencia	3
1.1.3 Unidades repetitivas ricas en leucina. Homología con otras oteínas.	4
1.1.4 Estudios de mutagénesis	7
1.1.5 Inactivación del IR por oxidación de sus cisteínas	10
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LA INHIBICIÓN POR IR	10
1.2.1 Tipo de inhibición	10
1.2.3 Constantes de inhibición	11
1.3 FUNCIONALIDAD DEL IR	12
1.4 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE RNasas	14
1.4.1 Control por el estado rédox celular	15
1.5 REGULACIÓN DE ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS POR EL ESTADO RÉDOX CELULAR. HIPÓTESIS DEL TERCER MENSAJERO O DE GILBERT	16
1.5.1 Estudios cinéticos teóricos	19
1.6 METABOLISMO DEL GLUTATION	22
1.6.1 Síntesis del glutation	22
1.6.2 Transporte del glutation. Flujo interórganos	22
1.6.3 Reacciones rédox que implican glutation	24

OBJETIVOS

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PURIFICACIÓN DE IR DE TESTÍCULO DE CERDO	30
3.1.1 Material biológico	30
3.1.2 Homogeneización	30
3.1.3 Doble precipitación con sulfato amónico	30
3.1.4 Cromatografía de afinidad en Sepharose 4B-RNasa A	31
3.1.4.1 Preparación de la Sepharose 4B-RNsa A	31
3.1.5 Diálisis del IR en Sephadex G-25	32
3.1.6 Desgasificado de tampones y condiciones de conservación en atmósfera inerte	32
3.2 FORMACIÓN DEL COMPLEJO ENTRE EL IR DE TESTÍCULO Y LA RNasa A.	32
3.2.1 Eliminación del exceso de RNasa A	33
3.3 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS	33
3.4 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	33
3.4.1 Oxidación con ácido perfórmico	33
3.4.2 Hidrólisis ácida	34
3.4.3 Análisis automático	34
3.4.3.1 Método de Beaven y Holiday	34
3.4.3.1 Método de Bencze y Schimid	35
3.5 VALORACIÓN DE GRUPOS SH	35

3.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD RIBONUCLEOLÍTICA	36
3.6.1 Ensayo de precipitación con RNA de levadura	36
3.6.1.1 Procedimiento	36
3.6.1.2 Unidades de actividad	38
3.6.1.3 Preparación del sustrato	38
3.6.2 Ensayo de actividad con 2',3'-CMPc	39
3.6.2.1 Procedimiento	39
3.6.2.2 Unidades de actividad	40
3.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS	40
3.7.1 Polimerización del gel	40
3.7.2 Preparación de las muestras y desarrollo de la electroforesis	40
3.7.3 Localización de proteínas	41
3.7.3.1 Tinción con plata	41
3.7.3.2 Tinción de Coomassie	42
3.7.3.3 Tinción con zinc	42
3.7.3.3.1 Tinción negativa	42
3.7.3.3.2 Viraje	43
3.7.4 Densitometrado de geles	43
3.7.5 Fotografiado de geles	44
3.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS. HPLC	44
3.8.1 Cromatografía de intercambio catiónico	44
3.8.2 Cromatografía de intercambio aniónico	45
3.8.3 Cromatografía de filtración en gel	45
3.8.3.1 Evaluación de pesos moleculares. Recta de calibrado	48
3.8.3.2 Cuantificación de RNasa A. Recta de calibrado	50
3.8.4 Cromatografía en fase reversa	50
3.8.4.1 Cromatografía en soporte C ₄	50
3.8.4.2 Cromatografía en soporte C ₁₈	50
3.8.4.2.1 Cuantificación de GSH/GSSG	53
3.9 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	55
3.9.1 Espectros de absorción UV/VIS	55
3.9.2 Espectros de dicroísmo circular	55
3.10 ESTUDIOS DE SECUENCIA AMINOÁCIDICA	56
3.10.1 Reducción y carboximetilación	56
3.10.2 Hidrólisis con bromuro de cianógeno	56
3.10.3 Separación de los péptidos mediante electroforesis PAGE-SDS	56
3.10.4 Electrotransferencia	57
3.10.5 Secuenciación automática	57
3.11 ESTUDIOS DE INTERCAMBIO TIOL-DISULFURO DEL COMPLEJO IR-RNasa A	57
3.11.1 Oxidación por cantidades subestequiométricas de DTNB	58
3.11.2 Oxidación por disulfuros biológicos	58
3.11.3 Reducción de preparaciones de complejo sometidas a tratamientos oxidantes	59

RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL IR DE TESTÍCULO DE CERDO	61
4.2 FORMACIÓN DEL COMPLEJO	64
4.2.1 Eliminación del exceso de RNasa A	64

4.3 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS	66
4.4 ESTRUCTURA PRIMARIA PARCIAL	68
4.5 INHIBICIÓN DE LA RNasa POR EL IR DE TESTÍCULO: ESTUDIOS CINÉTICOS	69
4.6 OXIDACIÓN DEL IR E INACTIVACIÓN: Estudios electroforéticos	74
4.7 EFECTOS DEL DTNB EN LA MOLÉCULA DE COMPLEJO IR-RNasa A	76
4.7.1 Evaluación del grado de oxidación	79
4.7.2 Evaluación del grado de activación	79
4.7.3 Evaluación del grado de disociación	81
4.7.4 Estudios cinéticos sobre la reactividad del complejo ir-rnASA A hacia el DTNB	98
4.7.5 Estudios mediante DC de la oxidación del complejo IR-RNasa por el DTNB	103
4.7.6 Reversibilidad de la oxidación por DTNB	106
4.8 OXIDACIÓN DEL COMPLEJO IR-RNasa POR DISULFUROS BIOLÓGICOS	107
4.8.1 Tratamiento cinético de la activación por disulfuros biológicos	107
4.8.2 Oxidación por disulfuros biológicos vs DTNB	110
4.8.3 Cinéticas de la oxidación del complejo IR-RNasa por cistina, cistamina y GSSG	111
4.8.4 Recversibilidad de la oxidación por GSSG	116

DISCUSIÓN

5.1 MODELIZACIÓN DEL MECANISMO DE INACTIVACIÓN DEL IR	118
5.1.1 Tratamiento oxidante secuencial del complejo IR-RNasa con DTNB	119

APÉNDICE

6.1 MÉTODO PERMANENTE DE TINCIÓN NEGATIVA CON ZINC PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	127
6.1.1 Consideraciones experimentales sobre al protocolo	127
6.1.2 Sensibilidad	132
6.1.3 Cuantificación de proteínas	134

<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	137
---------------------	-----

INTRODUCCIÓN

El control celular de los niveles de RNA e, indirectamente, de la biosíntesis de proteínas, es normalmente considerado en términos de control de la síntesis de RNA, tanto a nivel de la activación génica, como a nivel de la síntesis de nucleótidos. Por el contrario, poco se ha estudiado sobre el control de la degradación del RNA, vía regulación de las actividades ribonucleolíticas presentes en la célula.

Los sistemas biológicos contienen una gran variedad de actividades ribonucleolíticas, clasificadas en función de su mecanismo de acción en tres grandes grupos (Barnard, 1969); para revisión ver García-Segura, 1985):

- i) Fosfotransferasas o RNasas ciclantes. Su acción enzimática, que transcurre a través de intermedios 2'-3'-cíclicos, para llegar finalmente a la formación de oligo- y mononucleótidos 3'-fosforilo, no depende de la presencia en el medio de cationes.
- ii) Fosfodiesterasas. Enzimas que catalizan un ataque directo del agua al enlace fosfodiéster 3'-5', dando lugar a la formación de oligo- y mononucleótidos 3'-' ó 5'-fosforilo.
- iii) Fosforilasas. Capaces de catalizar de forma reversible la síntesis de polinucleótidos a partir de los correspondientes nucleósidos-5'-pirofosfatos.

Las RNasas ciclantes se han clasificado de forma clásica en dos grupos, en función del pH óptimo de hidrólisis. Así, se definen como RNasas neutras o alcalinas (RNasas tipo I) las que poseen un pH óptimo alrededor de 7.5, y como RNasas ácidas (RNasas tipo II) aquellas cuyo pH óptimo está en torno a 5.5. Las ribonucleasas ácidas se encuentran ubicadas en la fracción lisosomal, mientras que las RNasas alcalinas se hallan distribuidas a lo largo de la célula, tanto en la fracción soluble como en la fracción particulada. Esto implica que las RNasas alcalinas se encuentran potencialmente en contacto con el RNA citoplasmático, lo que, de ocurrir, se traduciría en la degradación inmediata de éste, y en la imposibilidad de que la biosíntesis de proteínas tuviera lugar. Teniendo en cuenta que las ribonucleasas alcalinas se han encontrado en la fracción soluble de todos los tejidos encontrados, fuera cual fuera su estado metabólico, resulta obvia la idea de la existencia de algún mecanismo que regule la actividad de dichas enzimas.

En este sentido, se encontró, también en fracción soluble (Roth, 1956), una proteína capaz de unirse a las ribonucleasas alcalinas con una afinidad especialmente elevada, dando así lugar a un complejo en el que la ribonucleasa se encuentra en estado inactivo (ribonucleasa latente). A esta proteína se la conoce como inhibidor de ribonucleasa (IR), y se encuentra en un exceso molar, sobre la RNasa, de 3-8 veces (Brokdorf y Knowler, 1986). Como resultado de la elevada afinidad de la unión, al menos el 90%-95 % de la RNasa presente en el citoplasma celular se encuentra en forma latente (Kraft y Shortman, 1970a,b).

El IR resultó ser una proteína muy lábil, sensible a proteasas, pH ácido, calor (incubaciones a 55 °C durante 30 minutos conducen a su inactivación total), y especialmente a reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilo, aún en bajas concentraciones (Goto y Mizuno, 1971). El tratamiento con ácido *p*-hidroximercuribenzoico (pHMB)(Roth, 1956; Shortman, 1962; Bishay y Nichols, 1973) o con *N*-etilmaleimida (NEM)(Girija y Sreenivasan, 1966; Bates *et al.*, 1985) inactiva al IR de forma irreversible. El posterior tratamiento con agentes reductores en exceso no recupera la actividad inhibidora (Blackburn *et al.*, 1977; Little y Meyer, 1981). Esto indica la necesidad de un estado reducido en sus grupos SH para el mantenimiento de su actividad. De hecho, la manipulación de esta proteína requiere la presencia de agentes reductores, tales como 2-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT), con el fin de preservar su actividad inhibidora frente a la oxidación ambiental. Por el contrario, la ribonucleasa es, por sí misma, una proteína muy estable frente a las condiciones ambientales.

La elevada sensibilidad del IR a las condiciones del medio hizo, pensar en la posibilidad de que ésta fuera una proteína con misión reguladora, y que realmente ejerciera, *in vivo*, el papel de mecanismo de regulación de la actividad de las ribonucleasas alcalinas citoplasmáticas, y, en último término, de los niveles de RNA y biosíntesis de proteínas (Kraft y Shortman, 1970a,b; Liu *et al.*, 1975a,b; McGregor *et al.*, 1981). Dicho mecanismo de regulación tendría un carácter general, al menos en lo que a mamíferos se refiere, puesto que el IR ha sido encontrado en prácticamente todos los tejidos y organismos estudiados (Roth, 1956; Roth *et al.*, 1958; Shortman, 1961; Bishay y Nichols, 1973; Cohen, 1976; Bloemendal *et al.*, 1977; Burton *et al.*, 1980; Button *et al.*, 1982; Kiyohara y Menjo, 1983; Bates *et al.*, 1985; Czajkowska *et al.*, 1986).

Existen algunos datos que apoyan esta idea: el aislamiento de polisomas intactos depende de la presencia de IR en los medios empleados (Blobel y Potter, 1966), y, en general, es comunmente utilizado para inhibir actividades ribonucleolíticas en estudios sobre RNA (Lawford *et al.*, 1966; Gribnau *et al.*, 1969; Scheele y Blackburn, 1979; Hiranyavasit y Kusamran, 1983). Por otro lado, en varias ocasiones se han hecho estudios de correlación entre los niveles de RNasa alcalina, de IR y de RNA citoplasmáticos, relacionándolos a su vez con el estado metabólico del tejido en estudio. Se ha podido observar la existencia de una estrecha dependencia entre todos estos parámetros, de forma que, tejidos caracterizados por un estado metabólico activo, como tejidos en proceso de desarrollo o regeneración, tumores, órganos con elevada tasa de proliferación celular (gónadas), etc, contienen niveles altos de RNA citoplasmático, mientras la actividad RNasa permanece en estado latente, debido a una concentración especialmente elevada de IR (Shortman, 1962; Kraft y Shortman, 1970a,b; Greif y Eich, 1972; Kraus y Scholtissek, 1974; Liu *et al.*, 1975a,b; Kyner *et al.*, 1979). Por el contrario, aquellos tejidos en los que no existe un estado metabólico activo, o en tejidos en proceso de degeneración, como tejidos altamente diferenciados (corazón, cerebro), tejidos envejecidos, los afectados por la enfermedad de Alzheimer, cataratas, etc. presentan niveles mínimos de RNA citoplasmático, encontrándose, por contra, una elevada actividad ribonucleolítica, posibilitada por niveles muy bajos de IR (Brewer *et al.*, 1969; Greif y Eich, 1972; Liu y Matrisian, 1977; Cavalli *et al.*, 1979; Bates *et al.*, 1985; Jones y Knowler, 1989; Marlat *et al.*, 1981).

A mediados de los años 80 fue descubierta, aislada y caracterizada una nueva proteína secretada por células de adenocarcinoma humano, la angiogenina, capaz de inducir el crecimiento de vasos sanguíneos (Fett *et al.*, 1985; Strydom *et al.*, 1985; Kurachi *et al.*, 1985). Estudios posteriores revelaron la presencia de propiedades ribonucleolíticas en esta molécula, aunque de carácter bien diferente a las de las RNasas alcalinas citoplasmáticas. La actividad de la angiogenina se limita a la hidrólisis del RNA ribosómico 18S y 28S, mientras que no es capaz de actuar sobre sustratos como C>p o polímeros de homonucleótidos (Shapiro *et al.*, 1986). La secuenciación de la angiogenina puso de manifiesto una elevada homología con las ribonucleasas de tipo pancreático (RNasas I, alcalinas), con un 33 % de identidad, manteniéndose incluso los residuos esenciales del centro activo: His-13, Lys-40 e His-114 de la angiogenina, se corresponden con His-12, Lys-41 e His-119 de la RNasa. Estos hechos justifican la inclusión de la angiogenina en la llamada superfamilia de ribonucleasas. Además, a la angiogenina se le ha encontrado otra actividad: es capaz de activar las fosfolipasas C y A₂ en células endoteliales, si bien no tiene propiedades mitogénicas sobre ellas (Bicknell y Vallee, 1988, 1989).

La homología existente entre las RNasas alcalinas citoplasmáticas y la angiogenina, condujo a la realización de estudios de interacción de esta última con el IR. Efectivamente, se comprobó que el IR, no sólo es capaz de unirse a la angiogenina, con una afinidad 60 veces superior a la de unión a la RNasa A, sino que además inhibe tanto su actividad ribonucleolítica como angiogénica (Shapiro y Vallee, 1987). La elevada afinidad con que el IR se une a la angiogenina, hace pensar en la existencia de algún papel fisiológico del inhibidor en los procesos de angiogénesis, si bien este punto resulta totalmente desconocido hasta el momento.

Parece, pues, que el IR está implicado en procesos de desarrollo y crecimiento en general, si bien no se conoce exactamente el modo en que lo hace.

CARACTERIZACIÓN DEL INHIBIDOR DE RIBONUCLEASA (IR)

Características generales

Hasta la fecha, muchos han sido los estudios realizados sobre la molécula de IR, con vistas a su caracterización estructural (para revisión ver Fominaya, 1989; Cid, 1992; Lee y Vallee, 1993). Por el contrario, los mecanismos mediante los cuales el IR ejerce su actividad reguladora son absolutamente desconocidos.

Fue detectado por primera vez en 1952 por Pirotte y Desreux, si bien no fue hasta 1956 cuando se determinó su naturaleza química (Roth, 1956) y hasta 1977 cuando se consiguió purificar a homogeneidad a partir de placenta humana (Blackburn *et al.*, 1977, 1979a). Desde entonces, se han purificado otros inhibidores de RNasa de mamíferos: de hígado (rata, ratón, ternera, cerdo y oveja) (Burton y Fucci, 1982), de cerebro (ternera, por Burton *et al.*, 1980, y de cerdo, por Cho y Joshi, 1989), de cristalino bovino (Ortwerth y Byrnes, 1972) y de testículo de rata (Fominaya *et al.*, 1988a). Algunos de estos IR han sido secuenciados. Por el contrario, ningún IR de no mamífero ha sido purificado hasta homogeneidad aún, si bien ha sido detectada su presencia en diversos organismos: microorganismos (Hartley, 1988), insectos (Aoki y Natori, 1981; García-Segura *et al.*, 1985a,b; Konichev *et al.*, 1986), anfibios (Malika-Blaskiewicz, 1978), aves (Dijkstra *et al.*, 1978) y mamíferos primitivos (Kraft y Shortman, 1970a). Recientemente se ha conseguido la cristalización del IR procedente de hígado de cerdo (Kobe y Deisenhofer, 1993; Neumann *et al.*, 1993).

El IR es una proteína de 50 kD, de carácter ácido (pI alrededor de 5), capaz de unirse a ribonucleasas alcalinas intracelulares y extracelulares con una estequiometría 1:1, a juzgar por el peso molecular calculado para el complejo: 64kD para el formado por IR-RNasa de placenta humana (Blackburn *et al.*, 1977).

La composición de aminoácidos del IR presenta algunas peculiares características, como el elevado contenido en residuos hidrofóbicos (20 % de leucinas y 2 % de isoleucinas), en residuos cargados (13 % de glutámico y aspártico y 8 % de glutamina y asparagina) y en cisteínas (entre 30 y 32 por molécula, generalmente) todas ellas en estado reducido. Estos tres grupos de residuos parecen jugar un papel esencial en el mecanismo de acción del IR. Se sabe que las fuerzas mediante las que se une a la ribonucleasa son tanto de tipo hidrofóbico como electrostático: un aumento en la fuerza iónica del medio conduce a una disminución en la constante de asociación del IR a la RNasa y a un aumento en la constante de inhibición de la angiogenina; de igual modo, variaciones en el pH del medio provocan variaciones en los valores de K_i (Lee *et al.*, 1989a,b,c).

Estudios de secuencia

La secuencia de aminoácidos de la molécula está compuesta por 7 unidades repetitivas de 57 residuos, con un promedio de identidad entre ellas del 39 %. El conjunto de aminoácidos comprendidos en estas unidades repetitivas da cuenta del 87 % de la molécula. Los extremos N-terminal y C-terminal, de 34 y 28 residuos respectivamente, son de composición más variable, aunque relativamente similar a la de los segmentos repetitivos (Lee *et al.*, 1988; Hofsteenge *et al.*, 1988)). Las 7 unidades de repetición constan a su vez de dos tipos de módulos, denominados A y B, de 27

y 28 residuos respectivamente, y bastante conservados entre las distintas unidades. En cualquier caso, el grado de conservación de estos módulos A y B es considerablemente menor que el que presentan las 7 unidades superiores entre sí.

Si alineamos la secuencia de aminoácidos de la proteína superponiendo las 7 unidades repetitivas (figura 1A), se comprueba que tanto las leucinas como las cisteínas se encuentran, en su mayoría, situadas en posiciones conservadas entre los distintos módulos. Si en lugar de analizar la identidad entre los diferentes fragmentos repetitivos, analizamos el grado de homología, encontramos que prácticamente toda la secuencia es una alternancia de residuos hidrofóbicos (principalmente leucinas) y polares (cisteínas, serinas, treoninas, aspárticos y glutámicos fundamentalmente, y, en menor grado, lisinas y argininas).

La característica estructura primaria del IR se ve reflejada en su estructura secundaria, según las predicciones hechas para el IR de placenta humana con el algoritmo de Chow y Fasman (1978) (Lee *et al.*, 1988). Alineando la secuencia en la forma en la que lo hicimos para analizar la estructura primaria (figura 1B), se observa que los giros β aparecen localizados en posiciones prácticamente constantes entre las 7 unidades de repetición. El resto de estructuras secundarias predichas resultan igualmente altamente conservadas.

Por lo tanto, como consecuencia del análisis de las estructuras primaria y secundaria, puede concluirse que el IR está compuesto por 7 dominios internos.

Unidades repetitivas ricas en leucina. Homología con otras proteínas

La estructura primaria del IR presenta gran similitud con un grupo de proteínas de función diversa, y caracterizadas todas ellas por poseer igualmente repeticiones ricas en leucina. En este grupo, que se conoce como LRM ("leucine rich motifs"), se incluían, hasta fechas recientes, las siguientes proteínas: subunidad α de la glicoproteína 1b, glicoproteína de membrana de plaquetas humanas implicada en la interacción con el factor von Willebrand y en la adhesión de plaquetas al subendotelio (Titani *et al.*, 1987; López *et al.*, 1987); glicoproteína α_2 de suero humano, de función desconocida (Takahashi *et al.*, 1985); chaoptina de *Drosophila*, proteína integral de membrana implicada en la adhesión entre células R en el ojo (Reinke *et al.*, 1988); *Toll*, proteína de *Drosophila*, posiblemente unida a membrana, que interviene en la diferenciación embrionaria (Hashimoto *et al.*, 1988) y adenilato ciclasa de levadura, proteína unida a membrana que convierte ATP en AMPc (Kataoka *et al.*, 1985).

En todas estas proteínas existen unidades repetitivas de alrededor de 24 residuos, ricas en leucina, y con un carácter anfifílico, al igual que el IR. Estas unidades de repetición guardan una gran homología con los módulos A o B del IR, si bien son más cortas y en ninguna de ellas se da la alternancia de dos motivos diferentes. Como se ha mencionado, ninguna de estas proteínas tiene localización citoplasmática, a excepción del IR. En un principio se atribuyó a esta peculiar estructura anfifílica la capacidad de unión a membranas. Un análisis más detallado llevó a la conclusión de que no presentaban la adecuada disposición espacial anfifílica capaz de llevar a cabo esta interacción (Eisenberg, 1984; Reinke *et al.*, 1988). Schneider (1988) propone que la misión más probable para este tipo de estructuras, es la de mediar interacciones proteína-proteína. Todas las proteínas de este grupo, aún siendo en algunos casos moléculas unidas a membrana, participan igualmente en interacciones con otras proteínas.

Recientemente ha sido encontrado un nuevo componente de este grupo. Se trata de la proteína RNA1 de levadura, implicada en los mecanismos de procesamiento de RNA en el citoplasma

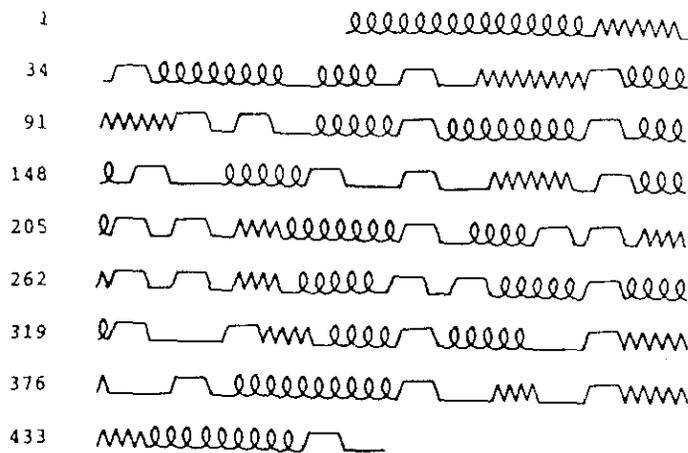
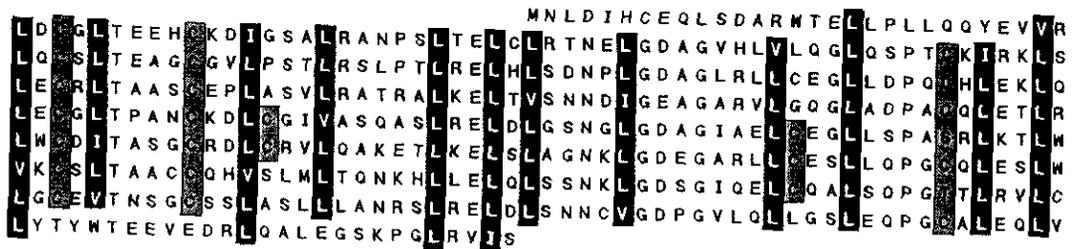


FIGURA 1. (A) Estructura primaria del IR de placenta humana (Lee *et al.*, 1988). El alineamiento se ha hecho de forma que se consiga el mayor grado de homología entre las posiciones de los distintos segmentos. **(B)** Predicción de estructura secundaria para el mismo IR (Lee *et al.*, 1988) basada en el algoritmo de Chow y Fasman (1978). La estructura en α -hélice se representa con una hélice (el número de vueltas no indican el número de giros), la lámina β con zig-zag, y los giros β por horquillas.

(Schneider y Schweiger, 1992). El estudio de esta molécula ha supuesto un gran avance, no sólo en la elucidación de la misión de las estructuras repetitivas ricas en leucina, sino más especialmente en la comprensión de la posible funcionalidad del IR.

La proteína RNA1 de levadura, resulta ser, con mucho, el miembro del grupo que guarda una mayor semejanza estructural con el IR. Esta afirmación está avalada por varios hechos:

- 1.- Está formada por repeticiones de 28-35 residuos de longitud; es decir, son, junto con las del IR, los módulos de repetición de mayor tamaño.
- 2.- Los patrones de conservación de residuos son los más similares a los del IR de entre todas las proteínas del grupo (figura 2).
- 3.- Son las dos únicas proteínas de localización citoplasmática.
- 4.- Tanto el IR como la proteína RNA1 están implicadas, directa o indirectamente, en el metabolismo del RNA.
- 5.- Los módulos de la molécula de RNA1 pueden subdividirse en dos grupos diferentes, atendiendo al patrón de repetición de residuos, y que resultan ser extraordinariamente similares a los módulos A y B del IR. Así, RNA1 e IR son los únicos miembros del grupo con alternancia de dos patrones de repetición diferentes, aunque manteniendo similitudes entre sí.

RNA1	x x x P x L E x L x D N x X x x x x S E x L X K x X x
IR módulo A	r x k P s L r e L x X s d N x L g d X g X x x L c x s X 1
IR módulo B	x p x c x L E x L x L x x C x X t x a x c x x L x -g L 1
Superfamilia LRM	x x x x x L x x L x X x xN/Cx X x x x x x x x x

Figura 2. Alineamiento de patrones de repetición ricos en leucina del IR (módulos A y B)(Schneider *et al.*, 1988), de la proteína RNA1 y de la secuencia consenso de los módulos de las proteínas de la familia LRMS. Los residuos que se repitan más de cuatro veces en el alineamiento se especifican en mayúsculas. Cuando se repiten más de cuatro veces residuos similares, se representan en minúsculas. Las posiciones expresadas con X están ocupadas, en al menos un 70 % de los casos, por residuos hidrofóbicos similares al grupo LIVMAF.

Estos autores proponen, no sólo una funcionalidad común en el control del metabolismo del RNA, sino incluso un origen común para ambas proteínas. El curso evolutivo habría conducido a la pérdida de una región de carácter ácido en el extremo C-terminal de la molécula del IR, que en RNA1

Estudios de mutagénesis

La existencia de estos dominios en la molécula del IR, a primera vista, resulta sorprendente, habida cuenta de la estequiometría 1:1 de la unión a RNasa/angiogenina. Inmediatamente surgen las preguntas: ¿son necesarios tantos módulos, de casi idénticas características, para unir una única molécula?. ¿Qué sentido funcional tiene la repetición de unidades?. En general se sabe que la duplicación de secuencias en proteínas es una estrategia comúnmente empleada por la naturaleza para generar estructuras macromoleculares (McLachlan, 1987). El uso de las duplicaciones es diverso e incluye, por ejemplo, la generación de espaciadores, de dominios de unión a ligandos, o de múltiples sitios activos en la proteína.

La determinación de la contribución de cada dominio de la molécula de IR a la funcionalidad de la misma posibilitaría la definición del sitio de unión de la RNasa/angiogenina, lo que permitiría, a su vez, el diseño de agentes antiangiogénicos, así como la comprensión de la tan sorprendentemente elevada afinidad del IR por aquellas enzimas.

Con esta finalidad, se llevaron a cabo recientemente estudios de mutagénesis dirigida con la molécula de IR de placenta humana, en los que se comprobó el efecto que, en términos tanto de capacidad de unión como de capacidad de inhibición, tenía la supresión de distintos módulos repetitivos de la molécula del IR (Lee y Vallee, 1990a,b)(figura 3). Estos autores comprobaron que:

- Delecciones en los módulos 3,4 ó 6 se traducían en la formación de mutantes que mantenían tanto la capacidad de unión como de inhibición de RNasas y de angiogenina; pero, si bien la afinidad de la unión era considerablemente inferior (el valor de K_i pasaba de ser del orden de fM a pM o nM), la unión seguía siendo de alta afinidad. Este hecho indica que, o bien estos fragmentos están implicados en la interacción, aunque no son los más esenciales, o que, aunque no se hallen en el sitio de unión, contribuyen a la estabilización del conjunto de la estructura de la proteína. Si se compara el grado de conservación de estos módulos entre IR de diferentes fuentes (Kawanamoto *et al.*, 1992), se comprueba que resultan ser las unidades repetitivas menos conservadas, lo que implica una menor presión evolutiva, que estaría justificada por el hecho de ser las unidades con menor repercusión en la funcionalidad del IR.
- Aquellos mutantes en los que había sido eliminada la unidad 5, sola o de forma conjunta con 3 ó 6, mantenían la capacidad de unión a RNasas, lo que implica que, en la interacción, la unidad 5 no es la única implicada. Más aún, puesto que la delección del fragmento 5 originaba mutantes sin capacidad inhibidora de RNasa, parecía claro que esta unidad no era imprescindible para interacción, pero si era esencial su presencia para que el IR ejerza su actividad inhibidora de RNasas, bien porque en esta región se hallen los residuos implicados en la ejecución de tal actividad, o bien porque esta región determine una interacción productiva. Los estudios llevados a cabo recientemente por Crevel-Thieffry *et al.* sobre el IR de placenta humana aportaron nueva luz sobre este fragmento de la secuencia (Crevel-Thieffry *et al.*, 1992). Tras digerir la molécula del IR con tripsina, consiguieron aislar un péptido de tan solo 15 residuos que era capaz de inhibir a la RNasa A en un 70 %. Este péptido fue localizado entre las posiciones 287-301 de la secuencia del IR, zona ubicada en el módulo de repetición 5 (figura 4).
- Según Lee y Valle (1990 a,b), la delección de los segmentos 1,2 ó 7 conduce a la pérdida de la actividad inhibidora del IR; estudios llevados a cabo posteriormente por el grupo de Hosteenge (Hofsteenge *et al.*, 1991a) con la molécula de IR de hígado de cerdo indican que existen mutantes carentes de la región que comprende los residuos 1-93 (unidad de repetición

1), denominado IR truncado, que siguen manteniendo su actividad, incluso con una afinidad en la unión igual a la del IR nativo. Otro trabajo de este último grupo (Hofsteenge *et al.*, 1991b) en el que modificaban químicamente las cisteínas del IR libre y unido a RNasa A aporta nuevos argumentos: 6 cisteínas del IR que resultan protegidas de la modificación por la RNasa se encuentran entre las posiciones 1 y 93. Por lo tanto, la significación del segmento 1 aún no está clara. Lo que sí se ha comprobado, por comparación de las secuencias de IR de distintas procedencias, es que los fragmentos 1 y 7, son zonas altamente conservadas (Kawanamoto *et al.*, 1992), lo que está más en consonancia con la idea de que se trate de módulos importantes para la funcionalidad de la proteína.

- En los estudios llevados a cabo con el IR de placenta humana, la delección de entre un 6 % y un 86 % de los extremos N o C-terminales conducía a la pérdida tanto de la capacidad de unión del IR, como de su actividad inhibidora, en los estudios llevados a cabo con el IR de placenta humana. Los estudios realizados con la molécula de IR truncado de origen porcino, como ya se ha comentado, aportaban datos opuestos en lo que a la región N-terminal se refiere, mientras que los trabajos posteriores de modificación química de proteínas daban nuevamente importancia a esta zona en la unión del IR a la RNasa.

Por lo tanto, lo que sí parece claro es que las unidades de repetición 2, 5 y 7, así como el extremo C-terminal, median la inhibición de RNasas. Mientras que al segmento 5 se le asigna la ubicación del centro activo, el resto de estas regiones debe estar involucrado en otras funciones importantes, tales como el mantenimiento de la conformación correcta de la molécula. Resulta sorprendente el hecho de que en el péptido de 15 residuos localizado en el módulo 5 no se encuentre ninguno de los residuos de cisteína que posee el IR. Estos residuos como ya se ha comentado, resultan ser esenciales para el mantenimiento de la actividad inhibidora; su oxidación conduce a la disociación del complejo IR-RNasa A. De los hechos expuestos puede deducirse que quizá los grupos SH de las cisteínas se hallan implicados en los fenómenos de interacción entre el IR y la RNasa. De hecho, el número máximo de SH modificables por reactivos alquilantes en la molécula de complejo nativo es de 7, mientras que en la molécula de IR libre resultan modificados un número máximo de 22 (Cid, 1992). Ello indica la presencia de, al menos, 15 residuos de cisteína en la zona de unión entre el IR y la RNasa. La implicación del extremo N-terminal así como la del segmento 1 en la funcionalidad del IR no está clara en la actualidad.

De este modo, la presencia de varios módulos repetitivos en la molécula del IR tendría como finalidad el mantenimiento de una estructura que, en su conjunto, presenta una afinidad extraordinariamente elevada por la RNasa/angiogenina, lo suficiente como para llevar a cabo con éxito la misión fisiológica que desempeña (Hofsteenge *et al.*, 1988; Lee y Vallee, 1990a).

Las zonas, tanto de la RNasa A como de la angiogenina, a través de las cuales se produce la interacción con el IR, son mejor conocidas (Blackburn y Gavilanes, 1980, 1982; Lee y Vallee, 1989; Shapiro *et al.*, 1989a; Shapiro y Valle, 1989b; Bond y Vallee, 1990; para revisiones, ver Fominaya, 1989; Cid, 1992; Lee y Vallee, 1993). Dicha interacción transcurre no por un único punto, sino que en el contacto participa una zona de la superficie de ambas moléculas, especialmente extensa en el caso de la RNasa A. Dichas zonas de unión resultan ser las que presentan una mayor grado de identidad u homología entre ambas enzimas. Los puntos de contacto en la molécula de RNasa A se agrupan en tres dominios separados en la estructura tridimensional de la molécula, y compuestos por los siguientes residuos: (A) Lys-7, Lys-41, Pro-42, Val-43, Lys-91, Tyr-92 y Pro-93; (B) Lys-31 y Lys-37 (C) Lys-61 y los residuos adyacentes. En el caso de la angiogenina, las zonas de contacto son menos extensas, y comprenden: los tres residuos esenciales del centro activo (Lys-40, His-13 e His-114), así como el Trp-89.

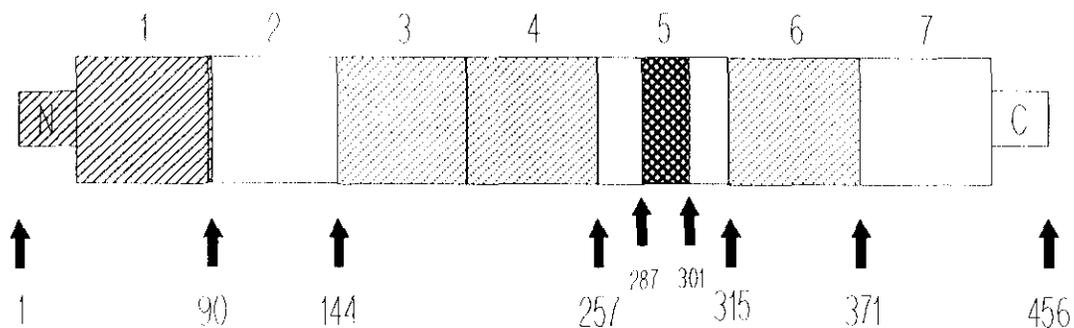


Figura 4. Mapeo del sitio de unión en el IR. Los números se refieren a los módulos repetitivos. Las zonas en blanco son zonas no esenciales. Las zonas rayadas son esenciales para la unión. El sitio de unión a RNasa reside, fundamentalmente, en las repeticiones 2, 5, 7 y en el extremo C-terminal, o en una combinación de ellos. El módulo 5, punteado con fondo negro, resulta esencial para la actividad inhibitoria.

Inactivación del IR por oxidación de sus cisteínas

La oxidación de los residuos de cisteína del IR se traduce en la pérdida irreversible de la actividad inhibitoria. Recientemente, Fominaya y Hofsteenge (1993) llevaron a cabo un estudio en el que comprobaron los cambios que sufre la molécula de IR libre cuando sus grupos SH son oxidados por cantidades subestequiométricas del reactivo de Ellman. Dedujeron que, tras la modificación inicial de un pequeño número de grupos tiólicos, la molécula de IR debe sufrir un cambio conformacional que causa un incremento en las reactividades de sus grupos SH restantes. En consecuencia, cada molécula de IR "tocado" por el reactivo de Ellman se vuelve más susceptible a seguir reaccionando, de manera que se llegan a modificar sus 30 grupos sulfhidrilo (oxidación total). Tal oxidación de las moléculas inicialmente modificadas se produce de forma preferente a la del resto de moléculas que no han llegado a dicho umbral. Esta conclusión fue extraída del hecho de no encontrar ninguna molécula de IR con estados intermedios de modificación. La reacción del inhibidor con el reactivo de Ellman sigue un mecanismo "todo o nada", observándose una relación lineal entre el grado de modificación introducido y el de pérdida de actividad inhibitoria alcanzada. La oxidación de la totalidad de los grupos SH conduce a la pérdida total de la actividad del IR.

CARACTERÍSTICAS DE LA INHIBICIÓN POR IR

Tipo de inhibición

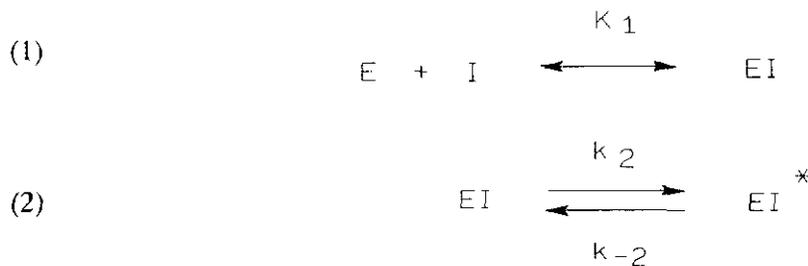
Los estudios cinéticos sobre la inhibición que ejerce el IR en la RNasa, llevaron a clasificar a ésta como de alta afinidad o unión estrecha (*tight-binding*) (Turner *et al.*, 1983). Previamente, a la luz de los resultados obtenidos mediante los tratamientos cinéticos clásicos (Greif y Eich, 1972; Ortwerth y Byrnes, 1972; Bishay y Nichols, 1973; Burton *et al.*, 1980), se consideró al IR como un inhibidor de tipo no competitivo. Sin embargo, esta clasificación no concuerda con el hecho de que los sitios de unión del IR y del RNA a la RNasa solapan. Según esto, se trataría de un inhibidor

de tipo competitivo, si bien un valor de K_m para esta enzima superior al valor de K_i en 6-9 órdenes de magnitud hace que, a efectos prácticos, nunca llegue a establecerse dicha competencia. Por lo tanto, nuestro grupo propuso un nuevo tipo de inhibición para el IR: inhibidor sin competición (Fominaya *et al.*, 1988b). Aunque se ajustan a la definición de inhibidores competitivos, la extraordinaria afinidad por la enzima descarta toda posibilidad de competencia.

Constantes de inhibición

El IR es un potente inhibidor de RNasas, presentando unos valores de K_i excepcionalmente bajos, que reflejan tanto elevadas velocidades de asociación como muy pequeñas constantes de disociación. Como hemos mencionado, los tratamientos cinéticos clásicos no son capaces de definir el comportamiento de los inhibidores de este tipo, ni permiten el cálculo correcto de sus constantes de inhibición. Parten de un planteamiento en el que la concentración de inhibidor es muy superior a la de la enzima, pudiéndose entonces hacer la suposición de que la concentración de inhibidor libre es aproximadamente igual a la del inhibidor total. En el caso de inhibidores de alta afinidad, estos supuestos no se cumplen, puesto que las condiciones de ensayo incluyen una concentración de inhibidor aproximadamente igual a la de la enzima. Los métodos cinéticos clásicos aplicados a inhibidores de unión estrecha obtienen unos valores de las constantes de inhibición por exceso. Esto fue lo que ocurrió con los primeros estudios cinéticos llevados a cabo con la molécula del IR (Blackburn *et al.*, 1977; Burton *et al.*, 1980), que dieron como resultado valores de K_i del orden de 10^{-10} - 10^{-8} M.

Los estudios cinéticos llevados a cabo con la angiogenina y el IR de placenta humana (Lee *et al.*, 1989a) indican un mecanismo de unión del IR a la enzima en dos pasos. El primero de ellos implica la formación rápida de un complejo enzima-IR, (EI), mientras que el segundo consiste en una lenta isomerización del complejo hacia una forma EI^* de unión estrecha.



Un mecanismo similar, en dos pasos, ha sido descrito para diversas enzimas con inhibidores de unión estrecha o alta afinidad, por lo que parece ser un mecanismo común para este tipo de inhibición (Morrison y Walsh, 1988). Algunos ejemplos son: la inhibición de tripsina por el inhibidor de tripsina de soja (Luthy *et al.*, 1973), o de α -quimotripsina por inhibidor de tripsina pancreático (Quast *et al.*, 1974).

Algunos autores afirman que en el transcurso de la segunda de las etapas del mecanismo, puede darse cierta competencia del sustrato con el IR, por el sitio de unión (Vicentini *et al.*, 1990).

La evaluación de las constantes de asociación y de disociación del IR de placenta humana a la angiogenina, de forma independiente (Lee *et al.*, 1989a), permitió el cálculo de un valor de K_i de 0.7×10^{-15} M, similar al obtenido para la unión del mismo IR a la RNasa de placenta, pero 60 veces inferior al calculado para su asociación a la RNasa A (Lee *et al.*, 1989; Shapiro y Vallee, 1991).

FUNCIONALIDAD DEL IR

A pesar de los muchos estudios que se han realizado sobre la actividad del IR, poco se conoce hasta la fecha sobre su posible funcionalidad *in vivo*.

Los primeros datos apuntaban hacia un papel regulador del metabolismo del RNA. En la célula existe un gran número de ribonucleasas con diferentes propiedades y especificidades. Nuestro grupo formuló una hipótesis (García-Segura, 1985), según la cual el conjunto de RNasas alcalinas, de localización citoplasmática, y con actividad endonucleolítica, serían responsables de la degradación inicial del RNA. La hidrólisis de una molécula de RNA por un único punto generaría un producto no funcional, de modo que quedaría interrumpida la traducción del mensaje genético a proteínas. Estas hidrólisis iniciales darían como resultado fragmentos de RNA de tamaño medio, provocando, además, una disminución en el valor del pH del microentorno. La acidificación del medio activaría las RNasas de tipo ácido, que degradarían los fragmentos intermedios de RNA hasta nucleótidos, que podrían así, ser incorporados en nuevas moléculas de RNA.

La presencia en el citoplasma celular de RNasas de tipo alcalino supone un grave peligro para el mantenimiento de la integridad del RNA. Por lo tanto, se hace evidente la necesidad de un sistema que regule la actividad de dichas RNasas, papel que le ha sido adjudicado al IR, debido a su localización igualmente citoplasmática, y a su elevada afinidad por ellas. Una constante de inhibición, K_i , del orden de 10^{-13} - 10^{-15} M se traduce en la existencia de, prácticamente, el total de la RNasa presente en el citoplasma en forma libre, en condiciones fisiológicas normales.

Existen múltiples estudios que relacionan el estado metabólico celular con los niveles de RNA, de IR y de RNasas alcalinas.

- Aquellos tejidos caracterizados por una importante actividad anabólica presentan un alto contenido en IR, lo que implica la existencia de la RNasa en forma latente, y la posibilidad de elevados niveles de RNA citoplasmático. Esto ocurre en en órganos en proceso de desarrollo (Liu *et al.*, 1975b; Suzuki *et al.*, 1970), en órganos adultos con elevada tasa de proliferación celular, como en testículo (Fominaya *et al.*, 1988a), o en tejidos tumorales (Kraft y Shortman, 1970a).

- Por el contrario, situaciones que implican una potenciación del catabolismo celular, cursan con bajos niveles de RNA, debido a una disminución en los niveles de IR. Esta situación se ha encontrado en tejidos envejecidos (Kraft y Shortman, 1970a,b), en músculos tras un periodo de inmovilización (Kiss y Guba, 1979), en hipertiroidismo (Greif y Eich, 1977) o en situaciones patológicas caracterizadas por procesos de degeneración tisular, como en la corteza cerebral de individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer (Sajdel-Sulkowska y Marotta, 1984; Marotta *et al.*, 1986), o en cristalino afectado por cataratas (Cavalli *et al.*, 1979; Orthwerth y Byrnes, 1971).

Sin embargo, la correlación entre estados anabólicos o catabólicos y niveles elevados o disminuídos de IR, respectivamente, no se ha encontrado en todos los casos estudiados. Por ejemplo, en la autopsia de la corteza cerebral de algunos individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer,

no se han encontrado alterados los niveles de RNA (Morrison *et al.*, 1987), de RNasa (Maschoff *et al.*, 1989) o de IR (Jones y Knowler, 1989).

Las RNasas identificadas como sensibles a la inhibición por el IR que mejor han sido caracterizadas, tienen una localización no citoplasmática: RNasa A (Blackburn y Moore, 1982), RNasa alcalina hepática (Shapiro y Vallee, 1991; Hofsteenge *et al.*, 1989), angiogenina (Fett *et al.*, 1985), RNasas derivadas de tumores (Shapiro *et al.*, 1986b), proteína catiónica de eosinófilos (Gleich *et al.*, 1986), o RNasa seminal en su estado monomérico (Murthy y Sideshmukh, 1992), entre otras. Todas estas RNasas ven inhibida su actividad por el IR con constantes de inhibición K_i del orden de 10^{-14} - 10^{-15} M, lo que, obviamente, supone una interacción no casual.

Además de la protección del RNA, el IR puede estar implicado en la regulación de diferentes actividades fisiológicas asociadas a otras enzimas sensibles a su inhibición. Por ejemplo: la neurotoxina derivada de eosinófilos, idéntica a la RNasa alcalina hepática (Hamann *et al.*, 1989; Rosemberg *et al.*, 1989), y la proteína catiónica de eosinófilos son potentes neurotoxinas que inducen el fenómeno de Gordon, un síndrome neurológico caracterizado por ataxia y parálisis, cuando son inyectadas en conejo (Gleich *et al.*, 1986). La RNasa seminal, un miembro de la familia de las RNasas pancreáticas, es una enzima dimerica con actividad antiespermatogénica, antitumoral e inmunosupresiva (Leone *et al.*, 1973; Matousek, 1973; D'Alessio *et al.*, 1991).

En el último caso, el de la RNasa seminal, se ha propuesto recientemente el mecanismo que podría regular el metabolismo del RNA (Murthy y Sideshmukh, 1992), y que se resume esquemáticamente en la figura 5. La forma dimerica de la RNasa seminal, con actividad ribonucleolítica, es estabilizada por altos niveles de RNA, y resulta insensible a la inhibición por IR. De este modo, en las situaciones en que los niveles de RNA fueran lo suficientemente elevados, se activaría la RNasa, que procedería a la regularización de dichos niveles de RNA. Por el contrario, cuando la concentración de RNA disminuye suficientemente, se desestabiliza la forma dimerica de la RNasa, lo que conduce a su disociación. Los monómeros de RNasa seminal no tienen actividad ribonucleolítica, y son sensibles a la inhibición por el IR. Este aseguraría la permanencia de la enzima en estado monomérico en tanto en cuanto los niveles de RNA no vuelvan a incrementarse.

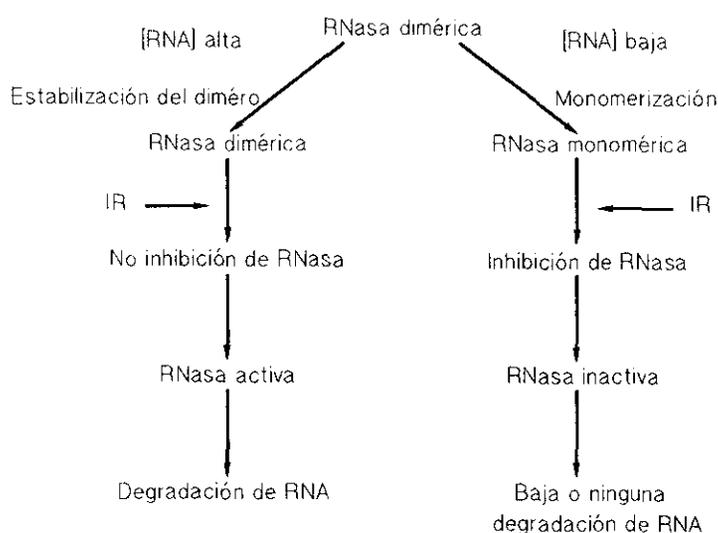


Figura 5. Diagrama esquemático de la inhibición de la RNasa seminal, BS-1, por el IR en condiciones de altas o bajas concentraciones de RNA (Murthy y Sideshmukh, 1992). Control de la actividad enzimática neta, y, por ende, de la concentración de RNA.

Pero, de todos estos casos, sin duda el más estudiado, a excepción de la RNasa A, es el de la angiogenina.

Como ya se apuntó anteriormente, la angiogenina es una proteína extracelular, aislada inicialmente de cultivos de células tumorales humanas y, posteriormente de plasma humano (Fett *et al.*, 1985; Shapiro *et al.*, 1987). Pertenece a la superfamilia de ribonucleasas de tipo pancreático, si bien su actividad más característica es la de promover la formación de vasos sanguíneos, permitiendo, así, la progresión y difusión de tumores. El IR es capaz de unirse a esta enzima siguiendo una estequiometría 1:1, con una K_i 60 veces inferior a la que presenta por la RNasa A, inhibiendo, como consecuencia, tanto su actividad ribonucleolítica como la angiogénica (Shapiro y Vallee, 1987). La elevada afinidad de la unión hace pensar en la existencia de un posible papel regulador de los procesos de angiogénesis por parte del IR (Lee *et al.*, 1989a,b). Un valor tan extremadamente bajo para la K_i es apropiado para la inhibición de una proteína capaz de inducir neovascularización en niveles femtomolares (Fett *et al.*, 1985). La angiogenina podría existir en forma de complejo con el IR en condiciones normales.

Recientemente ha sido mapeado el gen que codifica para la proteína IR (Crawford *et al.*, 1989; Weremowicz *et al.*, 1990; Zneimer *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1992). Se trata de un único gen que se transcribe a 5 mRNAs, cuyas diferencias se encuentran en los extremos 5', regiones que no son traducidas, dando así lugar a una única especie proteica. Este gen ha sido localizado en la región 11p15.5, la región terminal del brazo corto del cromosoma 11, mediante técnicas de hibridación *in situ*. Esta posición resulta estar ubicada en una región del cromosoma, que se sabe está implicada en la regulación del crecimiento y en el desarrollo de tumores tales como el tumor de Wilms' rhabdomyosarcoma, hepatoblastoma o carcinoma adrenal. Aquí se han localizado los genes de la hormona paratiroidea (PTH), de la β -globina, el del factor de crecimiento 2 similar a insulina (IGF2), el protooncogen HRAS (a menos de 90kb del gen del IR) etc (para revisión ver Junien y McBride, 1989). Por tanto, la situación del gen del IR en esta zona apoya la implicación de esta proteína en procesos de crecimiento y desarrollo en general, y de la proliferación de tumores en particular.

Pero, ¿cómo podría explicarse que el IR, proteína de localización citoplasmática, pueda constituir un mecanismo de regulación de enzimas cuya ubicación es extracelular?. Una explicación para esta aparente paradoja, sería que el IR tuviera la misión de proteger a la célula y a su RNA, no sólo frente a la presencia de RNasas intracelulares, sino también frente a la invasión de RNasas de origen extracelular (Roth, 1958; Imrie y Hutchison, 1965; Beintema, 1987; Beintema *et al.*, 1988; Shapiro y Vallee, 1991). Esto explicaría la existencia de niveles de IR libre tan elevados. Por otro lado, hay que destacar el hecho de que se haya encontrado material reactivo frente a anticuerpos anti-IR en suero (Feldman *et al.*, 1988), aunque no haya sido aún concretada la naturaleza de dicho material. Su identificación como IR abriría todo un abanico de posibles implicaciones funcionales de esta proteína. Por el momento, sólo podemos adjudicarle al IR la misión de sistema regulador de RNasas en el interior celular.

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD INHIBIDORA DE RNasas

Recientemente se ha publicado la caracterización de la proteína RNA1 de levadura que, como ya se comentó, pertenece al grupo de proteínas con dominios repetitivos ricos en leucina, siendo, de todas ellas, la que guarda mayor semejanza con el IR (Schneider y Schweiger, 1992). Esta proteína participa en los mecanismos de procesamiento del RNA. Los autores de este trabajo proponen, tanto para la proteína RNA1 como para el IR la función de "ancla" intracelular, puesto que el IR es una proteína que se une e inhibe a una gran variedad de enzimas, cada una de las cuales, como ya se ha visto, es capaz de inducir procesos de muy diversa índole, y, en muchos casos, francamente drásticos

(hidrólisis de RNA citoplasmático con la consiguiente inhibición de su traducción a proteínas, neovascularización, inducción de síndromes neurológicos, etc.). El IR se mantendría unido a estas enzimas, inhibiéndolas hasta el momento en el que, tras la aparición una adecuada señal, fueran liberadas para ejercer su misión en el citoplasma (RNasas alcalinas citoplasmáticas) o en dianas nucleares, reprogramando así las funciones celulares. Las drásticas alteraciones que estas enzimas provocan, justifica la extraordinariamente elevada afinidad que el IR presenta por ellas. La unión es tan fuerte, que, por sí misma, resulta prácticamente irreversible. Esta situación es poco probable, hablando en términos de economía celular. Se piensa, más bien, que el complejo IR-RNasa sea un reservorio de la enzima en espera de un tercer elemento, la señal, que, modificando la naturaleza de alguno de los dos miembros del complejo, determina la liberación de la enzima.

En este sentido podrían apuntar los datos acumulados acerca de las alteraciones observadas en los tejidos neuronales de individuos afectados por la enfermedad de Alzheimer. Se ha comprobado que en dichos tejidos se produce una acumulación de aluminio, catión que, por otro lado, se sabe que es capaz de impedir la unión entre la RNasa alcalina y el IR de cerebro bovino (Cho y Kim, 1991). El aluminio se une a la RNasa alcalina con una estequiometría 1:1 incapacitándola para unirse al IR, pero manteniendo íntegra su actividad ribonucleolítica. Estos hechos podrían apoyar la hipótesis de Schneider *et al.*, en el sentido de que la RNasa alcalina permanecería unida al IR e inhibida en condiciones fisiológicas normales. La acumulación de aluminio en las células neuronales dispararía la liberación de la RNasa y la consiguiente degeneración celular, en último término.

Control por el estado rédox celular

Ya se ha comentado la presencia de un gran número de residuos de cisteína en la molécula del IR, así como la necesidad de que se encuentren en estado reducido para el mantenimiento de la actividad inhibitoria. De hecho, los tratamientos del IR con agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo, como *p*HMB (Roth, 1956; Bishay y Nichols, 1973) o *N*-etilmaleimida (Girija y Sreenivasan, 1966; Bates *et al.*, 1985) conducen a su inactivación. Los trabajos realizados *in vitro* con esta molécula, requieren la inclusión de agentes reductores, tales como el β -mercaptoetanol o el DTT en todos los medios. El papel que los grupos SH juegan en la funcionalidad del IR no ha sido bien determinado hasta la fecha, si bien se sabe que al menos 15 de ellos se encuentran en la zona de unión del IR a la RNasa, pues resultan protegidos de la modificación con agentes alquilantes (Hofsteenge *et al.*, 1991b; Cid, 1992). No está claro si las cadenas laterales de estos residuos de cisteína participan o no de forma directa en la interacción con la RNasa. Sea cual fuere la misión de los grupos SH de la molécula de IR, lo que sí está claro es resultan esenciales para el mantenimiento de su actividad. Es por este motivo por lo que se ha postulado que el estado rédox celular puede ser, en último término, quien module la actividad del complejo IR-RNasa, actuando sobre la molécula del IR. En condiciones fisiológicas normales, el inhibidor se encontraría unido a la RNasa alcalina, gracias a unas condiciones ambientales de carácter reductor. Una disminución del poder reductor del medio sería la señal que determinaría la liberación de la actividad RNasa. Por su propia naturaleza, esta regulación de la actividad inhibitoria, presentaría un carácter reversible.

El glutatión en equilibrio entre las formas reducida y oxidada (GSH, GSSG), constituye el principal regulador y exponente del estado rédox celular (Meister, 1981). En menor medida, otros componentes, presentes en concentraciones inferiores (CoASSG y CoASSCoA; cisteína y cistina; cisteamina y cistamina, etc.), pueden intervenir también en los equilibrios de oxidación-reducción.

El hecho de que el IR pueda ser regulado por el estado rédox celular no sería novedoso. Antes al contrario, dicha regulación quedaría enmarcada dentro de la denominada hipótesis de Gilbert, según la cual, las fluctuaciones fisiológicas de la relación GSH/GSSG pueden determinar la regulación

metabólica de enzimas con grupos sulfhidrilo o puentes disulfuro esenciales para su actividad (Gilbert, 1982). Existen diversos estudios que correlacionan fluctuaciones en la relación GSH/GSSG con cambios metabólicos que implican a su vez variaciones en la relación IR/RNasa, y que podrían apoyar indirectamente la hipótesis de la regulación de este último sistema por el estado rédox del medio:

- Así como en tejidos afectados por la enfermedad de Alzheimer o en los cristalinos con cataratas se han encontrado disminuídos los niveles de RNA y de IR, con el consiguiente aumento en la actividad RNasa libre, también se ha visto alterada, en algunas ocasiones, la relación GSH/GSSG, si bien las conclusiones no están perfectamente claras.
- Los tejidos envejecidos suelen presentar potenciales de reducción menores, habiéndose encontrado bajos niveles de RNA y de IR.
- Estados metabólicos caracterizados por una elevada actividad biosintética, como en el caso de tumores, o, en general, tejidos con elevada tasa de proliferación celular, presentan fuertes potenciales reductores (McCormack y Palmer, 1980; Noelle y Lawrence, 1981; Bajardi *et al.*, 1983; Gascoyne, 1986).

Una evidencia más directa la constituye el hecho de que el sistema GSH/GSSG sea capaz de inducir *in vitro* la liberación de la actividad RNasa que forma complejo con el IR (García-Segura *et al.*, 1985; Cid, 1992).

Para comprender mejor la regulación del sistema IR-RNasa, objetivo fundamental del presente trabajo, vamos a revisar previamente los aspectos más importantes que se conocen acerca de la regulación de enzimas por el estado rédox, en general, y por el sistema GSH/GSSG en particular.

REGULACIÓN DE ACTIVIDADES FISIOLÓGICAS POR EL ESTADO RÉDOX CELULAR. HIPÓTESIS DEL TERCER MENSAJERO O DE GILBERT

Se conocen un gran número de proteínas que dependen de la presencia de grupos tiólicos en sus estructuras para exhibir su actividad (Jocelyn, 1971). Estas proteínas son inactivadas cuando se tratan con agentes químicos bloqueantes de grupos sulfhidrilo, tales como NEM, ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) (DTNB) (Connellan y Folk, 1969; Tian *et al.*, 1985), o con disulfuros biológicos, como GSSG, CoASSCoA, cistina, cistamina, etc. En la Tabla I se recogen algunos ejemplos de este último tipo de estudios. Por el contrario, existen otras proteínas, minoritarias, que son activadas por la oxidación de sus grupos tiólicos a puentes disulfuro (Tabla I).

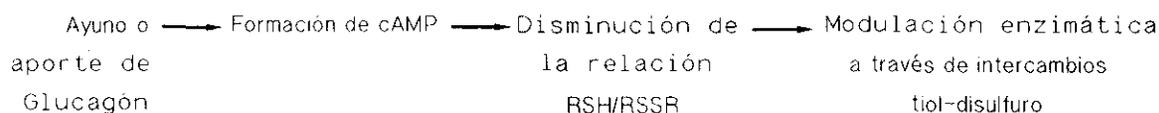
Estos datos hicieron plantear la posibilidad de que tanto el control de algunas funciones biológicas, como el mantenimiento de estructuras macromoleculares, estuviesen mediados por el estado rédox celular, a través de reacciones de intercambio tiol-disulfuro (Kosower y Kosower, 1976a,b). Este modo de regulación vendría a engrosar el grupo de mecanismos de regulación enzimática por modificación covalente. El esquema general de la reacción sería como sigue:



Enzima	Disulfuro	Efecto	Referencia
Hexokinasa Eritrocitos humanos	Cistamina	Inhibición	Eldjarn y Bremer, 1962
Glutation reductasa	CoASSG	Inhibición	Ondarza, 1966
Glucógeno sintetasa D	GSSG	Inhibición	Ernest y Kim, 1973
Piruvato Kinasa	GSSG	Inhibición	van Berkel et al., 1973
γ -glutamylcisteína sintetasa	Cistamina	Inhibición	Griffith et al., 1977
Adenilato ciclasa	GSSG	Inhibición	Baba et al., 1978
Fosforilasa/fosfatasa	GSSG y otros	Inhibición	Shimazu et al., 1978
Ribonucleótido reductasa	GSSG	Inhibición	Holmgren, 1978
Hidroximetil glutaril-CoA reductasa	CoASSCoA	Inhibición	Gilbert y Stewart, 1981
Fosfofructokinasa	GSSG, CoASSG, CoASSCoA	Inhibición	Gilbert, 1982
Glucógeno depolimerasa	GSSG	Inhibición	Cappel et al., 1986
Ácido graso sintetasa	GSSG, CoASSG, CoASSCoA	Inhibición	Walters y Gilbert, 1986
15 HO-prostaglandina deshidrogenasa	GSSO ₂ G y disulfuros biológicos	Inhibición (irreversible)	Chung et al., 1987
Guanidinoacetato metil transferasa	GSSG	Inactivación	Konishi u Fujioka, 1991
S-adenosil metionina sintetasa	GSSG	Inactivación	Pajares et al., 1992
Glutation S-transferasa	Cistamina, Cistina	Inactivación	Terada et al., 1993
Fructosa 1,6-bifosfatasa	GSSG, CoASSG, CoASSCoA, Cistamina	Activación	Nakashima et al., 1969
γ -aminolevulinato sintetasa	GSSG, Homocistina	Activación	Tubio y Hayasaka, 1972
Fosfatasa ácida	GSSG	Activación	Buchanan et al., 1979
Glucosa-6-fosfatasa	GSSG y otros disulfuros	Activación	Burchell y Burchell, 1980

Tabla I. Relación de algunas enzimas que son inhibidas o activadas por disulfuros biológicos. (Ondarza, 1989). Junto con la enzima en cuestión aparece el disulfuro con el que se ha llevado a cabo el estudio y el efecto provocado.

Si las fluctuaciones en la relación RSH/RSSR, en general, y GSH/GSSG en particular, pueden controlar la regulación de proteínas *in vivo*, ha de existir también un mecanismo que a su vez regule el estado redox celular, adecuándolo a los estímulos celulares externos, así como a los requerimientos metabólicos en cada momento. Esta transmisión de información al interior de la célula hace que la relación RSH/RSSR se constituya en el tercer mensajero celular, tal y como se define en la hipótesis de Gilbert (Gilbert, 1982).



Esta hipótesis se basa en los estudios llevados a cabo por Isaacs y Binkley (1977) sobre enzimas implicadas en el metabolismo de la glucosa. Estos autores encontraron que muchas de estas enzimas resultaban activadas o inhibidas por diversos agentes disulfuro *in vitro* (figura 6). Además, comprobaron que tanto el ayuno como la administración de glucagón u otros compuestos que estimulan la adenilato ciclasa, con el consiguiente aumento en los niveles de AMPc (segundo mensajero celular), causan una significativa disminución en la relación tiol/disulfuro celular en hígado de rata (Isaacs y Binkley, 1977a,b). En tal estado, se ven estimuladas las enzimas que catalizan el metabolismo de glucosa, tanto en el sentido de gluconeogénesis como en el de glucogenolisis. El resultado último es la producción de glucosa libre. Estos resultados apoyan la hipótesis del tercer mensajero, puesto que la relación RSH/RSSR adapta el metabolismo celular a los estímulos externos.

A pesar de estos hechos, se precisa apoyo experimental directo, antes de considerar como cierta tal hipótesis.

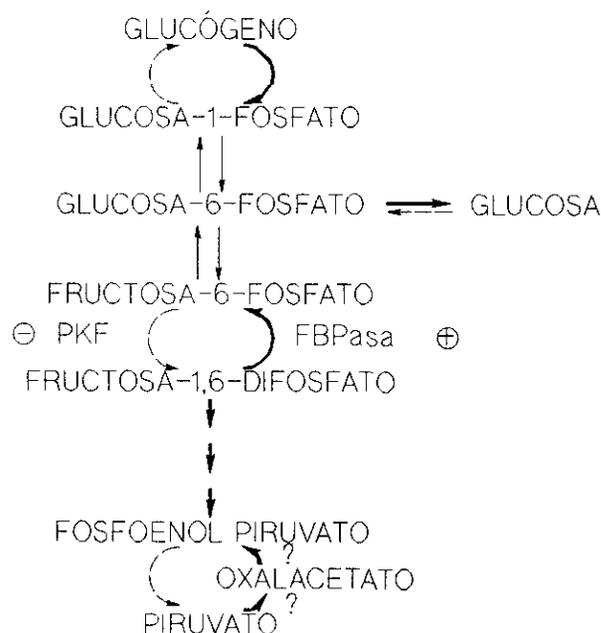


Figura 6. Actividades enzimáticas implicadas en el metabolismo de glucosa que se ven afectadas por reacciones de intercambio tiol-disulfuro. (Ondarza, 1989). Los estudios con estas enzimas fueron realizados *in vitro* con compuestos disulfuro biológicos como GSSG. La activación se representa con línea sólida, y la inhibición con línea discontinua.

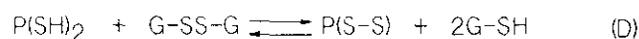
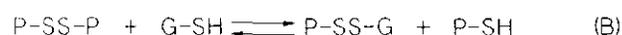
Estudios cinéticos teóricos

Si dichos mecanismos de regulación por reacciones de intercambio tiol-disulfuro pueden ser viables o no a nivel fisiológico, no solamente depende de la susceptibilidad de la proteína para sufrir oxidación, sino también de la susceptibilidad que presente a la reducción (Walters y Gilbert, 1986a). La relación entre las constantes de velocidad en el sentido de la oxidación y en el sentido de la reducción es la constante de dicho equilibrio (Frost y Pearson, 1961), y está relacionada con el potencial de oxidación termodinámico de la enzima con relación al agente oxidante. La posibilidad de observar regulación rédox de la actividad de una enzima por reacciones de intercambio tiol/disulfuro en respuesta a cambios en la relación GSH/GSSG estará, relacionada con el potencial de oxidación de la proteína en cuestión. Así, se hace necesario estudiar la reacción en ambos sentidos así como en el equilibrio, con el fin de poder determinar las propiedades cinéticas y termodinámicas en cada caso concreto, y comprobar si esa proteína puede responder en su regulación a variaciones del estado rédox.

Para que una proteína pueda existir en un estado de equilibrio funcional entre sus formas oxidada y reducida, la oxidación de sus grupos sulfhidrilos por el GSSG ha de ser más rápida que la reducción de la proteína oxidada por el GSH. En efecto, los valores que la relación GSH/GSSG puede tomar en el interior celular no están establecidos de forma indiscutible, si bien los últimos estudios determinan valores entre 300 y 400 (Akerboom *et al.*, 1982; Alpert y Gilbert, 1985). En este caso, si la reacción de oxidación de la proteína transcurre mediante la formación de disulfuros mixtos con el glutatión, P-S-S-G, la constante de velocidad de segundo orden para la oxidación de las proteínas por GSSG ha de ser, por ejemplo, 300-400 veces mayor que la del proceso de reducción, para que la proteína presente tan sólo un 50 % de sus moléculas en estado oxidado. Estos cálculos, tan drásticos, han llevado a muchos autores a deshechar la idea de una regulación fisiológica de ciertos procesos mediante reacciones de intercambio tiol/disulfuro. El mismo Gilbert, tras comprobar que la enzima fosfofructoquinasa se inactivaba por oxidación con el GSSG dando un disulfuro mixto enzima-S-S-G, y calculando la K_{ox} aparente para tal proceso, dedujo que, dados los valores fisiológicos normales de la relación GSH/GSSG, esta enzima siempre se encontraría en estado reducido. Por tanto, la regulación de su actividad no podía estar determinada por el estado rédox celular (Walters y Gilbert, 1986b).

Gascoyne demostró posteriormente, de forma teórica, que el control tanto de actividades enzimáticas como de estructuras macromoleculares por el estado rédox celular, sí es posible (Gascoyne, 1986). Este autor planteó las posibles reacciones rédox en las que podía participar el glutatión, así como las ecuaciones cinéticas que definen dichos equilibrios.

Las reacciones son las siguientes:



Las ecuaciones cinéticas derivadas de estas reacciones son:

[1]

$$\frac{[P-SS-G] [G-SH]}{[G-SS-G] [P-SH]} = K_1 = e^{\frac{q\Delta E_1}{kT}}$$

$$\frac{[P-SS-P] [G-SH]}{[P-SS-G] [P-SH]} = K_2 = e^{\frac{q\Delta E_2}{kT}}$$

$$\frac{[P-SS-P] [G-SH]^2}{[G-SS-G] [P-SH]^2} = K_3 = e^{\frac{2q\Delta E_3}{kT}}$$

$$\frac{[P(SH)_2] [G-SS-G]}{[P(S-S)] [G-SH]^2} = K_4 = e^{\frac{2q\Delta E_4}{kT}}$$

Existen muchos grupos tiólicos de proteínas incapaces de participar en la formación de puentes disulfuro internos. Estos sulfhidrilos participan en cambio en la formación de puentes disulfuro mixtos con moléculas de glutatión (P-S-S-G). Los puentes disulfuro intermoleculares suelen estar implicados en la estabilización de estructuras supramacromoleculares. Son los denominados disulfuros estructurales (un 1 % de los tioles celulares); por contra, los puentes -S-S- internos se denominan no estructurales, puesto que suelen estar implicados en los mecanismos de actividad de enzimas.

En el caso de que una reacción transcurra mediante la formación de un disulfuro mixto interno, por cada molécula de GSSG que reaccione, se formarán dos moléculas de GSH. Esto queda reflejado en la ecuación que define el estado de equilibrio, donde el término [GSH] está elevado al cuadrado. El valor de ΔE de esta reacción de oxidación de proteínas fue estimado por comparación con compuestos tiólicos típicos que se emplearon como modelos (por ejemplo, con DTT). El valor obtenido ($\Delta E=0.083$ V), permitió el cálculo de la constante teórica del equilibrio ($4.65 \cdot 10^{-2}$ M). Considerando una concentración de glutatión total de 5 mM, valor habitual en condiciones normales, este autor calculó la relación teórica proteína oxidada/proteína reducida que resultaría, para los diferentes valores que la relación GSH/GSSG puede tomar *in vivo*. Suponiendo que dicha proteína sea una enzima cuya oxidación conduce a su inactivación, se obtendría la representación en línea discontinua de la figura 7. En el caso de que la enzima resultara activada tras su oxidación, el comportamiento sería el descrito por la línea continua de dicha figura.

Como se puede observar, según este estudio, para que un 50 % de la proteína esté en forma oxidada, tan sólo se precisa un 0.1 % del glutatión total en forma de GSSG. La presencia del término [GSH]² en la ecuación que define la constante del equilibrio de la reacción, hace que variaciones realmente pequeñas en la relación GSH/GSSG se traduzcan en grandes variaciones en la proporción

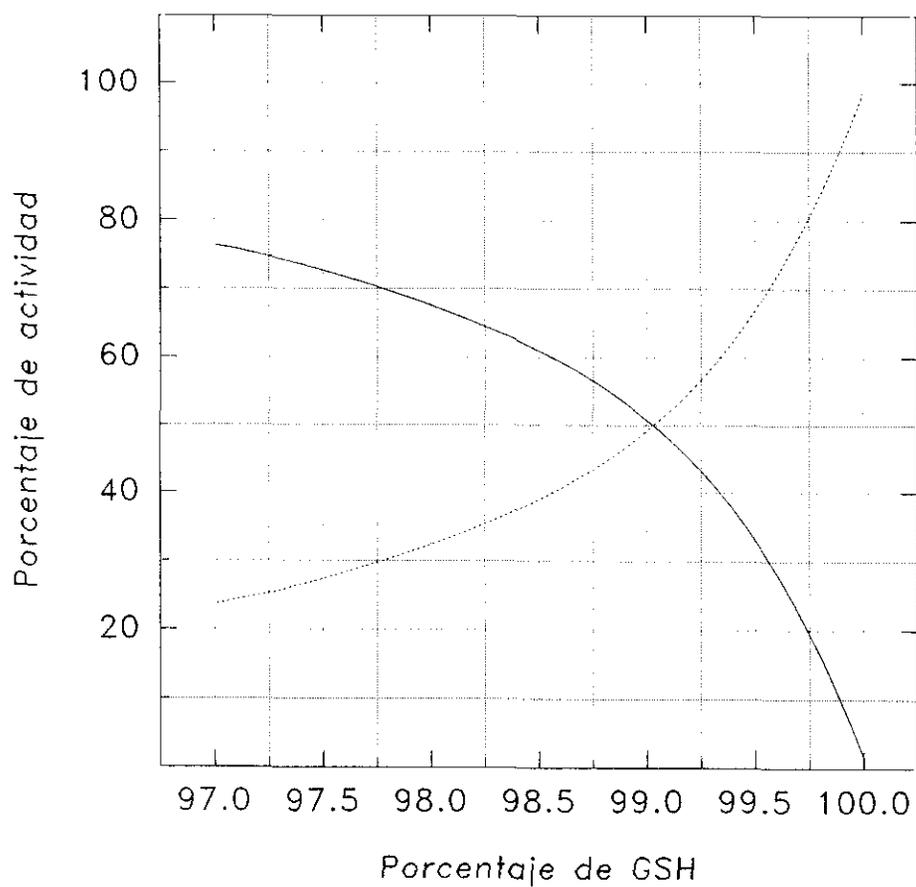


Figura 7. Variación de la actividad enzimática de enzimas conteniendo dos grupos tiólicos esenciales, y oxidables a un puente disulfuro interno, en función del contenido celular en glutatión en forma reducida (expresado en %). En línea continua se representa el caso de una enzima que resulta inhibida tras la formación del puente disulfuro interno. En línea discontinua, el caso de una enzima activable por la formación de dicho puente disulfuro. (Gascoyne, 1986).

de enzima activa/enzima inactiva, haciendo posible, por tanto, que la regulación de dicha actividad enzimática pueda ser llevada a cabo por las fluctuaciones fisiológicas que experimenta el estado redox celular.

Llegados a esta conclusión, se hace obvia la necesidad de un sistema que regule los niveles RSH/RSSR celulares, adecuándolos a las necesidades metabólicas en cada momento. Además, ha de existir un medio de recuperar el GSH que se oxida o el GSSG que se reduce en las diferentes reacciones redox en las que participan. La comprensión de estos mecanismos se hará evidente tras conocer un poco mejor el metabolismo del glutatión.

METABOLISMO DEL GLUTATION. REGULACIÓN

El glutatión es el más abundante péptido de bajo peso molecular en la célula. Su presencia en cantidades apreciables se ha detectado en todas las células eucariotas estudiadas. Este péptido juega un papel importante en la protección celular frente a los daños ocasionados por la exposición a ambientes oxidantes, tales como hiperoxia, oxígeno hiperbárico, u ozono (DeLucia *et al.*, 1975; Deneke *et al.*, 1983, 1985a,b; Hagen *et al.*, 1988), y también frente a la exposición a radiaciones, luz ultravioleta o efectos fotodinámicos (Arrick *et al.*, 1982; Revesz y Edgren, 1984; Miller y Henderson, 1986; Connor y Wheeler, 1987).

En el control de los niveles celulares de glutatión están implicados varios procesos: síntesis y degradación, transporte y circulación interórganos, y, por último, reacciones de intercambio tiol/disulfuro en las que participa.

Síntesis del glutatión

El proceso de síntesis de glutatión consta de dos reacciones consecutivas, esquematizadas en la figura 8:

- En la primera de ellas, la enzima γ -glutamil cisteinil sintetasa cataliza la formación del dipéptido γ -glutamil cisteína. La enzima está sujeta a un mecanismo de retroinhibición por GSH, si bien dicha inhibición puede ser impedida por niveles elevados de glutamato (Meister y Anderson, 1983; Richman y Meister, 1975).
- En una segunda reacción, la glutatión sintetasa añade el residuo de glicocola, con lo que queda constituida la molécula de glutatión (GSH).

Transporte de glutatión. Flujo interórganos

La regulación de los niveles de glutatión *in vivo* ha de ser estudiada en términos del organismo completo. Algunos órganos son sintetizadores netos de GSH, como el hígado. Este es el órgano clave en el metabolismo del tripéptido. No sólo sintetiza y consume GSH en mayor proporción que otros órganos, sino que, además, es el exportador de la mayor parte del GSH que circula en sangre, si bien todos los órganos son potencialmente capaces de exportar tanto GSH como GSSG (Hagen *et al.*, 1986,1988; Lash *et al.*, 1986).

En cambio, sólo un número limitado de órganos es capaz de importar GSH, tomándolo del medio externo: células epiteliales tipo II de pulmón, células del epitelio intestinal, y células de riñón (Anderson *et al.*, 1980; Anderson y Meister, 1983; Meister, 1984; Meister *et al.*, 1986). En la

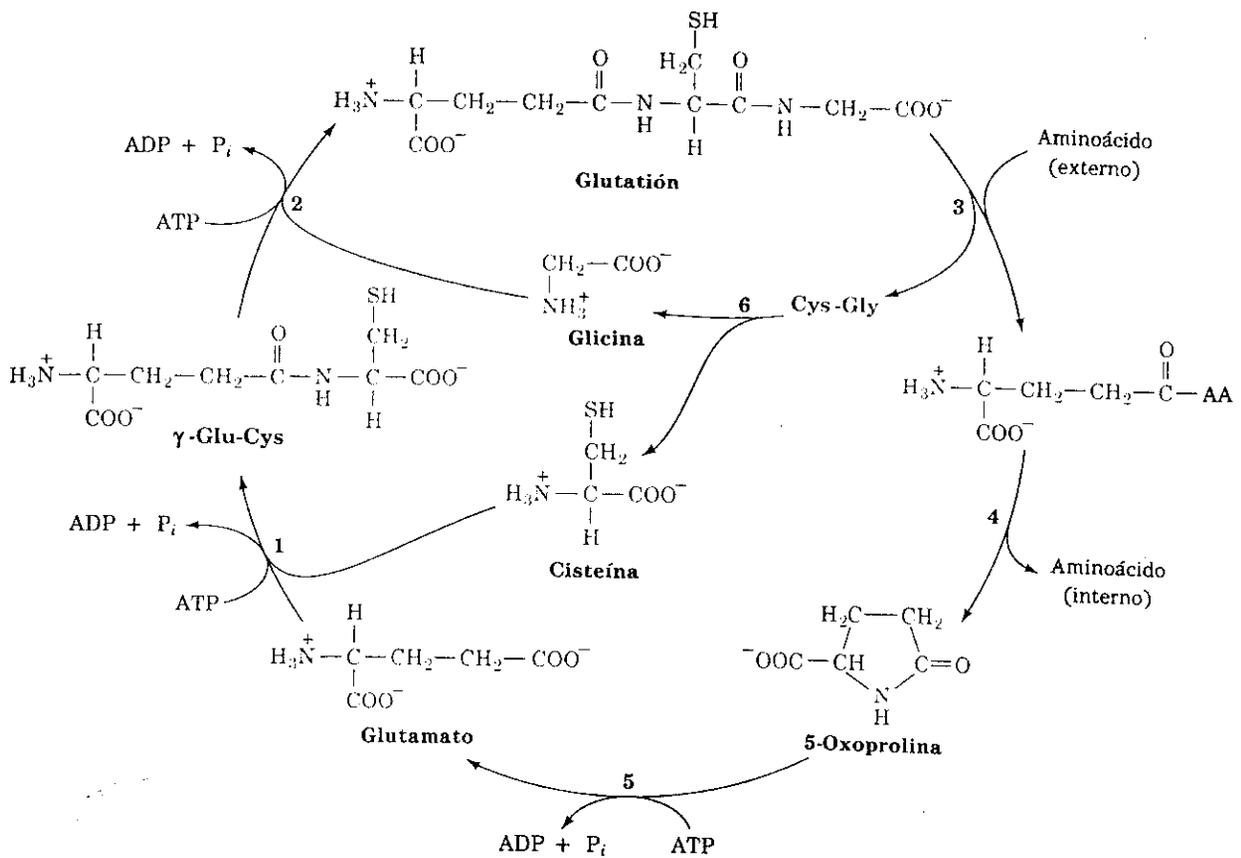


Figura 8. Esquema de la síntesis y metabolismo del glutatión. Las reacciones que intervienen en el ciclo son: 1 γ -glutamilcisteína sintetasa, 2 glutatión sintetasa, 3 γ -glutamil transpeptidasa, 4 γ -glutamil ciclotransferasa, 5 5-oxoprolinasa y 6 proteasa intracelular.

membrana plasmática de todas estas células existe una enzima, la γ -glutamil transpeptidasa, capaz de transferir el grupo γ -glutamilo del GSH circulante a un aminoácido receptor, fundamentalmente cisteína (Anderson y Meister, 1983; Meister *et al.*, 1984). Tanto el γ -glutamilaminoácido resultante, como el dipéptido cisteinilglicocola, son transportados simultáneamente al interior de la célula, e incorporados al ciclo de síntesis del GSH (Anderson y Meister, 1983). Si el derivado γ -glutamilo aminoácido está compuesto por cisteína, directamente se incorpora en la segunda de las etapas de la ruta de síntesis. Si la transferencia del γ -glutamilo se hizo a un aminoácido diferente, ambos residuos han de ser separados por una enzima γ -glutamil ciclotransferasa, resultando en la liberación del aminoácido y 5-oxoprolina. Esta última se convertirá en ácido glutámico mediante una oxoprolinasa, y se incorporará en la primera de las etapas de la ruta de síntesis de GSH (figura 8).

Reacciones rédox que implican glutatión

Los niveles relativos de GSH y GSSG vienen determinados por una serie de reacciones que se recogen esquemáticamente en la figura 9.

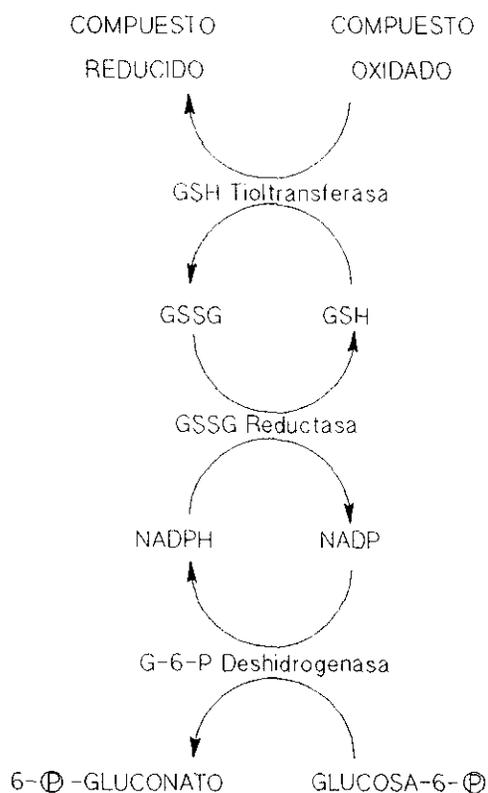


Figura 9. Reacciones de intercambio tiol-disulfuro en las que participa el glutatión. reducida.

El GSH participa en reacciones de reducción de grupos SH pertenecientes a distintas proteínas, catalizadas por enzimas tioltransferasas (GSH transferasa y GSH peroxidasa), dando como resultado la formación de GSSG. Éste, a su vez, ha de regenerarse de nuevo a la forma GSH, reacción catalizada por la enzima glutatión reductasa, que emplea NADPH como fuente del poder reductor. Este se convertirá a su vez en NADP^+ , y será regenerado a la forma NADPH en diversas rutas metabólicas, como la glicólisis o la ruta de las pentosas fosfato. De esta forma se mantienen las condiciones fuertemente reductoras que determinan el estado redox celular en condiciones fisiológicas normales. Cuando el organismo se ve sometido a un estímulo oxidante intenso que genera compuestos tóxicos, el GSH, se combina con ellos, pudiendo llegar a disminuir fuertemente su concentración,

acumulándose entonces el GSSG (Moron *et al.*, 1979; Kraus y Kloft, 1980; Issels *et al.*, 1988). Este, participará en reacciones de oxidación de proteínas celulares, con lo que ciertas enzimas resultarán inhibidas, mientras que otras se verán activadas. De este modo, las condiciones fisiológicas y metabólicas se verán alteradas.

La tioltransferasa se ha localizado en multitud de tejidos (pulmón, intestino, eritrocitos, etc), aunque estas reacciones de detoxificación tienen lugar de forma especialmente importante en hígado.

Además de participar en reacciones de detoxificación de compuestos extraños, las glutatión transferasas participan en varias rutas metabólicas endógenas, como la formación de esteroides y leucotrienos (Kaplowitz, 1980; Parker *et al.*, 1980).

El balance global GSH/GSSG en la célula en cada momento, vendrá definido por el estado global de todas las rutas mencionadas. Este balance, como ya se ha comentado, varía en respuesta a, o como inductor de, diferentes estados metabólicos.

Como consecuencia de todo lo expuesto, este metabolismo del glutatión podría participar en la regulación de la actividad del IR, tanto en el sentido de su inactivación como en el de su reactivación. No resulta lógico pensar que la inactivación de una molécula de IR dé como resultado su destrucción definitiva. Antes parece más probable que, al igual que la inactivación es la consecuencia de la participación de la molécula en una reacción redox en el sentido de la oxidación, la posterior reducción de los puentes disulfuro formados conduzca a su reactivación. No obstante, si bien se han hecho estudios de inactivación del IR mediante reacciones de oxidación con distintos agentes (Fominaya y Hofsteenge, 1993), no existen evidencias hasta la fecha de la posible reversibilidad de dicha inactivación.

OBJETIVOS

La proteína citoplasmática IR participa tanto en el control de la biosíntesis de proteínas a través de su capacidad inhibidora de RNasas, como en los procesos de neovascularización por su actividad inhibidora de angiogenina. Estas propiedades hacen que el estudio de esta molécula resulte de gran interés con vistas a profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la activación celular así como en los de crecimiento y diseminación tumoral.

Sus propiedades estructurales han sido establecidas con cierta profundidad, mientras que, por el contrario, el desconocimiento sobre los mecanismos que regulan su actividad es prácticamente total. Los únicos datos existentes en este sentido son los que relacionan la forma reducida de los numerosos residuos de cisteína de la molécula de IR con el estado activo de la misma. Los estudios de oxidación drástica de los grupos SH de la proteína ponen de manifiesto, además, la disociación del complejo IR-RNasa de forma paralela a la inactivación del IR. El conocimiento preciso de los mecanismos que regulan la actividad del IR resultan de especial interés, por cuanto supondría no sólo una mayor comprensión del metabolismo celular, sino también la posibilidad, en último término, de controlar exógenamente dicho estado metabólico así como el nivel de proliferación celular. Estos motivos justifican nuestro objetivo general de profundizar en el conocimiento de los mecanismos mediante los cuales se regula fisiológicamente la actividad de la proteína IR.

Nuestros estudios se basan en unas hipótesis formuladas previamente por nosotros, y que en todo momento han guiado nuestro trabajo. Dichas hipótesis son las que se formulan a continuación:

i) La molécula de IR se encontraría en el citoplasma celular unida de permanentemente a RNasas alcalinas, formando así un complejo multienzimático en el que la molécula de RNasa constituiría la subunidad catalítica, mientras que el IR ejercería una misión meramente reguladora. Esta idea surge tras analizar los estudios cinéticos que se han llevado a cabo con el IR procedente de distintas fuentes. Dichos estudios han permitido la clasificación del IR como un inhibidor de alta afinidad, con constantes de inhibición del orden de 10^{-15} M. Considerando esta especialmente elevada afinidad, y puesto que tanto el IR como las RNasas alcalinas se hallan en el citoplasma celular, parece lógico pensar que ambas moléculas han de permanecer unidas en condiciones normales. El control de la actividad ribonucleolítica vendría determinada por la modulación de la actividad del IR en respuesta a las condiciones fisiológicas concretas de la célula en cada momento preciso. Nosotros pensamos que dicha regulación ha de ejercerse siempre bajo la forma de complejo IR-RNasa; es decir, que una modificación limitada, no drástica, del IR permitiría la aparición de actividad ribonucleolítica sin que ello supusiera la disociación de los dos constituyentes del complejo. Esta molécula de complejo fluctuaría así entre dos estados, uno denominado RNasa latente, en el cual la subunidad catalítica estaría totalmente inhibida, y un estado que hemos llamado de "complejo activo", y que permitiría a la RNasa exhibir su actividad. Este planteamiento surgió al considerar que una regulación de la actividad inhibidora en la que inactivación fuera sinónimo de pérdida irrecuperable de la molécula, supondría una regulación poco eficaz, en términos de economía celular. Hay que tener en cuenta que la molécula de IR posee una masa molecular 3.6 veces superior a la de la propia RNasa.

ii) La regulación de la actividad inhibidora de RNasa sería ejercida por el estado redox celular, mediante reacciones de intercambio tiol-disulfuro entre los grupos SH del IR y los diversos pares redox que existen en la célula, como son GSH/GSSG, cisteína/cistina o cisteamina/cistamina. Puesto que de todos estos pares redox el más abundante en la célula, con gran diferencia, es el GSH/GSSG, suponemos que es el estado de equilibrio entre estas dos especies moleculares quien, en último término, ejercería la regulación de la actividad ribonucleolítica citoplasmática a través de la regulación de la actividad del IR.

Tomando estos supuestos como referencia, y su comprobación como finalidad, el objetivo central que ha guiado el presente trabajo consiste en la profundización en el conocimiento de los

mecanismos que regulan la actividad del sistema IR-RNasa. En concreto, abordaremos como primera etapa el estudio de los mecanismos de inactivación que sufre el IR del complejo. Se trata de modelizar cómo transcurriría dicha inactivación, y, por tanto, de demostrar que los complejos IR-RNasa pueden fluctuar entre los dos estados comentados: RNasa latente y complejo activo. Para ello se han de establecer las condiciones mínimas de oxidación en la molécula del IR que permitan la activación de la subunidad catalítica, sin determinar su disociación. Como primera aproximación se empleará como agente oxidante un compuesto no biológico, el DTNB, por permitir un fácil seguimiento de la reacción. Estos estudios irán acompañados de una caracterización de los efectos que dichas modificaciones químicas suponen para la molécula del complejo IR-RNasa. Desglosamos a continuación los pasos que se han de seguir para cubrir este objetivo:

1.1 Aislamiento y purificación del IR de testículo de cerdo. Esencialmente el procedimiento seguido es el ya puesto a punto por nuestro grupo, tanto para el IR de testículo de rata (Fominaya *et al.*, 1988a) como para el de testículo de cerdo (Cid, 1992), si bien hemos introducido algunas modificaciones con el objeto de acortar el tiempo de aislamiento, así como de mejorar el rendimiento final.

1.2 Reconstitución del complejo IR-RNasa entre el IR aislado y RNasa A comercial. Este complejo ha de ser caracterizado a distintos niveles:

1.2.1. Caracterización a nivel cinético. Se empleará el método puesto a punto por nuestro grupo para la cuantificación de inhibiciones del tipo "tight binding" (Fominaya *et al.*, 1988b).

1.2.2 Determinación de grupos SH. Para la cuantificación se empleará el reactivo de Ellman (DTNB), y se hará en condiciones desnaturalizantes, en presencia de SDS.

1.2.3 Caracterización conformacional. En concreto se analizará su estructura secundaria mediante dicroísmo circular.

1.2.4 Establecimiento de métodos cromatográficos que permitan la evaluación del grado de asociación o disociación del complejo. Para ello se precisa que dichos métodos sean capaces de separar los tres componentes en estudio: IR, RNasa y complejo, o, cuando menos, el complejo del IR o de la RNasa, puesto que cualquiera de estas dos últimas especies moleculares por si misma sería un reflejo de la disociación del complejo aparecida.

1.3 Tratamientos oxidantes de la molécula de complejo reconstituído con DTNB, y evaluación del efecto producido en la primera. Como un primer paso para el establecimiento de los mecanismos de regulación a que está sometido el sistema IR-RNasa *in vivo*, vamos a estudiar cómo transcurre el proceso de inactivación del mismo. Para ello hay que establecer las condiciones experimentales que permitan llevar a cabo oxidaciones suaves y perfectamente controladas que nos permitan llevar a cabo el seguimiento de los fenómenos que están teniendo lugar tras dichas modificaciones. En concreto, la modificación ha de ser gradual con el fin de establecer el mecanismo de inactivación del IR de forma secuencial. De este modo podremos conocer no sólo qué tipo de inactivación sufre el IR dentro de la molécula del complejo, sino también los mecanismos que conducen a tal inactivación. La evaluación de los efectos provocados en la molécula de complejo IR-RNasa se hará a varios niveles:

1.3.1 Evaluación del grado de modificación introducido, es decir, del número de SH que hayan resultado oxidados tras el tratamiento.

1.3.2 Valoración de la reactividad de los grupos SH de la molécula del complejo IR-RNasa que vayan siendo modificados.

1.3.3 Caracterización conformacional de los complejos sometidos a oxidación, mediante dicroísmo circular.

1.3.4 Evaluación del grado de disociación del complejo en IR y RNasa libres provocado por la oxidación. Este método nos permitirá averiguar si la inactivación

del IR determina la disociación del complejo, así como comprobar la existencia del llamado complejo activo.

1.3.5 Intentaremos reactivar la molécula del IR mediante tratamientos con agentes reductores. Si se confirma la existencia de complejo activo, dicha reactivación se evaluará tanto en esta especie molecular como en la del IR totalmente oxidado. Si no observamos en ningún momento la existencia del complejo activo, la reactivación se hará sobre la especie inactiva de IR libre.

1.4 Determinación de la reactividad del complejo IR-RNasa frente a los principales disulfuros biológicos. De este modo podremos comprobar si se confirma el mecanismo de inactivación modelizado con el empleo de DTNB como posible mecanismo de inactivación del IR *in vivo*. La comparación de las reactividades calculadas para los diferentes compuestos disulfuro biológicos nos permitirá discutir sobre el papel que cada uno de ellos pudiera ejercer en la inactivación del IR a nivel fisiológico, e intentar deducir a cual/cuales de ellos se les puede asignar tal misión.

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 PURIFICACIÓN DE IR DE TESTÍCULO DE CERDO

El procedimiento seguido se basa en el descrito por Blackburn *et al.* (1977) para el IR de placenta humana. Se han introducido, sin embargo, algunas modificaciones con vistas a su optimización y adecuación a nuestro material biológico.

Todos los medios empleados a lo largo del proceso contenían 2-mercaptoetanol 10 mM o DTT 5 mM añadidos en el preciso momento de su utilización. Las diferentes etapas se llevaron a cabo a 4°C, salvo cuando se especifique lo contrario.

3.1.1 Material biológico

Los testículos de cerdo utilizados como material biológico de partida procedían de ganado destinado al consumo humano, y fueron suministrados por el matadero GYPISA (Pozuelo de Alarcón, Madrid) inmediatamente después de su sacrificio. La edad media del ganado porcino destinado al consumo humano es superior a 6 meses. Con tal edad, los machos han iniciado ya su actividad sexual, lo que permite asegurar una elevada actividad biosintética testicular y, por ende, un contenido en IR aceptable. Además, sólo se seleccionaron aquellos testículos con un peso superior a los 200 g/unidad, a fin de mejorar los rendimientos finales. Una vez seleccionados, los testículos eran inmediatamente congelados en aire líquido y almacenados a -80°C hasta el momento de su homogeneización. Bajo estas condiciones de almacenamiento no se observaron pérdidas de actividad inhibitoria, durante al menos seis meses.

3.1.2 Homogeneización

El material biológico se deja descongelar superficialmente con objeto de facilitar la retirada de la piel, y se trocea. La homogeneización se realiza en un homogeneizador de aspas durante 120 segundos, frente a dos volúmenes (2 ml/g de tejido) de un tampón tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 2mM y sacarosa 0.25 M.

El homogeneizado se centrifuga a 27000 g durante 80 minutos. El sobrenadante, correspondiente a la fracción postmitocondrial, es decantado a través de una gasa en la que se quedan retenidos los componentes grasos que flotan en las condiciones de centrifugación empleadas.

3.1.3 Doble precipitación fraccionada con sulfato amónico

El anterior sobrenadante se somete a una doble precipitación fraccionada con sulfato amónico, entre el 30 y el 60 % de saturación en la sal en ambos casos. Con el fin de mejorar el rendimiento de la etapa, previamente se añade glicerol hasta una concentración final del 10 % (v/v). La precipitación se lleva a cabo añadiendo la sal, finamente pulverizada, de forma lenta y continua durante aproximadamente 30 minutos, manteniendo la disolución en baño de hielo y bajo agitación magnética. Una vez finalizada la adición del sulfato amónico, se continúa la agitación durante una hora más, y posteriormente se centrifuga la preparación a 27000 g durante 35 minutos.

En las condiciones de homogeneización descritas, el volumen de homogeneizado necesario para purificar cantidades de IR aceptables resulta sumamente inconveniente (5 kg de testículos, 10 l de tampón de homogeneización). Por este motivo se hacía recomendable llevar a cabo el proceso de purificación, homogeneizando por partes el material biológico. Cada homogeneización venía seguida

de la primera de las precipitaciones con sulfato amónico. Los respectivos precipitados 30-60 % así obtenidos se mantienen almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalmente, todos los sedimentos acumulados en diferentes jornadas se reúnen y se redisuelven en un tampón tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 2 mM, y se dializan frente a 20 volúmenes del mismo tampón (2 cambios, durante 6 y 12 horas respectivamente). Esta disolución se somete a la segunda de las precipitaciones fraccionadas con sulfato amónico, en idénticas condiciones que la primera, y previa adición, de nuevo, de glicerol al 10 % (v/v). El sedimento resultante de esta segunda precipitación se conserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de ser sometido al resto del proceso de purificación. Bajo estas condiciones, el sedimento puede permanecer almacenado durante meses sin detectarse pérdidas significativas de actividad inhibidora de RNasa.

3.1.4 Cromatografía de afinidad en Sepharose 4B-RNasa A

El sedimento procedente de la doble precipitación fraccionada con sulfato amónico se redisuelve en un tampón conteniendo fosfato sódico 45 mM pH 6.4, EDTA 2 mM y azida 0.02 %, y se dializa frente a 20 volúmenes del mismo tampón (2 cambios de 6 y 12 horas respectivamente). Tras la diálisis, el material se centrifuga a 27000 g durante 20 minutos.

La disolución resultante se aplica a razón de 40-50 ml/h, en una columna de Sepharose-RNasa A preparada como se describe en el siguiente apartado, y equilibrada en el tampón fosfato anteriormente descrito. El volumen de lecho se calcula de forma que sea exactamente el necesario para retener el IR presente en el material dializado. Una vez cargada la disolución, se hace pasar a través de la columna el tampón fosfato anterior, conteniendo ahora NaCl 0.5 M. Este lavado se mantiene hasta que la A_{280} del eluyente se hace nula. En ese momento se procede a la elución del IR retenido.

La elución se lleva a cabo a temperatura ambiente, empleando un tampón que contiene acetato sódico 20 mM, pH 5.5, EDTA 2 mM, NaCl 3 M, glicerol 30 % (v/v). El flujo de elución se mantiene en torno a 30 ml/hora, aproximadamente. El material eluido se recoge en fracciones de 2.0 ml, cuya A_{280} se va midiendo inmediatamente después de su recolección.

Tras cada proceso cromatográfico, la columna puede ser reutilizada previa regeneración. Para ello, se le hacen pasar 5 volúmenes de una disolución de pHMB 1 mM. De este modo eluye el IR que hubiera podido quedar aún retenido. Posteriormente, la columna se equilibra de nuevo en el tampón fosfato y se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización. Cada columna tratada en estas condiciones puede ser utilizada durante al menos 6 procesos de purificación sin degradación de los resultados.

3.1.4.1. Preparación de la Sepharose 4B-RNasa A

El procedimiento seguido para la unión covalente de la RNasa A al soporte de Sepharose se basa en el descrito por Blackburn *et al.* (1977). Todos los tratamientos de que consta se realizan en vaso de precipitados, suspendiendo el sólido en las distintas disoluciones, y terminando cada tratamiento filtrando a vacío, a través de placa de vidrio sinterizado. Consta de las siguientes etapas:

50 ml de Sepharose 4B activada con bromuro de cianógeno (Sigma) se lavan con 10 volúmenes de HCl 1 mM, con el fin de eliminar los aditivos que acompañan al soporte comercial. A continuación, se lava con otros 10 volúmenes de un tampón NaHCO_3 0.1 M pH 9.5. Posteriormente se resuspende en 40 ml del mismo tampón y se le añaden 75 mg de RNasa A. La mezcla se mantiene en agitación orbital continua durante 20 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizada esta incubación en la que se produce la unión covalente de la ribonucleasa, se filtra el sólido y se resuspende en

tampón tris-HCl 0.1 M pH 7.5, en el que se mantiene durante 4 horas a 4°C con el fin de bloquear los grupos activos que puedan haber quedado libres. Por último, se hacen una serie de lavados consecutivos con 20 volúmenes de: NaHCO₃ 0.1 M primero, y NaCl 2 M después. Finalmente, el sólido se lava abundantemente con agua destilada, quedando listo para su uso

El rendimiento obtenido para el anclaje de la RNasa A al soporte fue de un 99 %; valor calculado mediante ensayo de la actividad ribonucleolítica de todos los filtrados recogidos a lo largo del proceso.

La capacidad de unión del soporte resultó ser de 84000 UI/ml (Cid, 1992). Este valor es el que se emplea para el cálculo del volumen de lecho cromatográfico, mencionado en el apartado anterior.

3.1.5 Diálisis del IR en Sephadex G-25

Las fracciones de la cromatografía de afinidad que contienen IR se dializan inmediatamente después de su elución mediante cromatografía de filtración en gel. Para tal fin se utilizan columnas comerciales de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), equilibradas en un tampón tris-HCl pH 6.5, NaCl 25 mM, glicerol 15 %. Cada fracción se dializa por separado.

El eluido de estas cromatografías en Sephadex G-25 se recoge en fracciones de 1 ml. Las fracciones correspondientes a material excluido (IR), procedentes de las diferentes cromatografías, se combinan en función de su A₂₈₀. De esta forma se obtienen diferentes disoluciones de IR, con distinta concentración proteica, que se almacenan en viales herméticos a 4°C hasta su utilización. En estas condiciones, y guardando las precauciones que se comentan en el siguiente apartado, no se han detectado pérdidas de actividad inhibidora en, al menos 3 meses de conservación.

3.1.6 Desgasificado de tampones y condiciones de conservación en atmósfera inerte

La extremada susceptibilidad del IR a la oxidación por el oxígeno atmosférico, obliga a tomar precauciones al respecto desde el mismo momento en que se eluye de la cromatografía de afinidad.

Con tal finalidad, el tampón de diálisis empleado en las cromatografías en Sephadex G 25 (PD-10) era previamente desgasificado por ebullición, y posteriormente gaseado con argón durante su enfriamiento. Idéntico tratamiento se aplica a todos los tampones que se emplean en los estudios posteriores del IR o de su complejo con la RNasa A.

Adicionalmente, las disoluciones de IR purificado, o del complejo, se conservan en viales herméticamente cerrados, provistos de válvulas minINERT (Wheaton Scientific), con septum, a través de las cuales se procede al gaseado periódico con argón. Todo ello con el fin de mantener al mínimo la oxidación ambiental.

3.2 FORMACIÓN DEL COMPLEJO ENTRE EL IR DE TESTÍCULO Y LA RNasa A

El complejo IR-RNasa se formó a partir del inhibidor purificado de testículo de cerdo y de RNasa A comercial (Sigma tipo XII-A). La mayor estabilidad del complejo en comparación con el IR libre, hace aconsejable la formación de aquel inmediatamente después de la elución del IR de la cromatografía de afinidad; el IR eluido de la cromatografía de afinidad, y cuantificado a partir de

su A_{280} , se mezcla con un ligero exceso de RNasa A. Para ello, teniendo en cuenta la estequiometría 1:1 de la unión, se calcula la cantidad de RNasa necesaria para formar complejo con todo el IR presente en cada una de las fracciones del eluido de afinidad. A cada una de ellas, se le añade una cantidad de enzima 1.2 veces superior a la calculada, con el fin de asegurar que todo el IR quede en forma de complejo. La RNasa A se prepara en el tampón de elución de la cromatografía de afinidad, a una concentración de 10 mg/ml; de este modo, la dilución del IR se puede considerar mínima.

Las fracciones conteniendo el IR y la RNasa A no unidos (la fuerza iónica de 3 M NaCl y el pH 5.5 lo impiden) se dializan en columnas de Sephadex G-25, tal y como se describió anteriormente en la obtención del IR libre. En el volumen de exclusión quedarán el IR y la RNasa a baja fuerza iónica, y, por tanto, asociados. Las fracciones de estas cromatografías en Sephadex se combinan y conservan de forma análoga a la descrita para el IR libre.

3.2.1 Eliminación del exceso de RNasa A

Cuando se van a realizar estudios sobre el complejo IR-RNasa obtenido en las condiciones descritas, es necesario eliminar el exceso de RNasa A presente en las disoluciones almacenadas. Con tal finalidad se acude a cromatografía de intercambio catiónico, que se realiza mediante HPLC en columna MA7S de BioRad, según las condiciones que se describen más adelante, en el apartado de métodos cromatográficas.

3.3 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La determinación de la concentración de proteínas se realiza siguiendo el método de Bradford (1976), utilizando como estándar albúmina de suero bovino. La cuantificación se efectúa midiendo absorción a 595 ó 750 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-7, empleando cubetas de 1 cm de paso óptico.

La evaluación de la concentración de proteína en disoluciones de IR puro, se efectúa también mediante análisis de aminoácidos, empleando un estándar externo, o a partir del espectro de absorción UV/VIS de la muestra, corregido para la dispersión, y considerando un coeficiente de extinción $E_{280}^{0.1\%}$ de $0.88 \text{ mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$.

3.4 ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

El equipo utilizado es un analizador automático Beckman modelo 6300. El proceso consta de las siguientes etapas:

3.4.1 Oxidación con ácido per fórmico

Cuando se precisa la cuantificación exacta de las cisteínas totales (reducidas y oxidadas), se procede, de forma previa a la hidrólisis ácida, a la oxidación de las muestras con ácido per fórmico, lo que permite la evaluación de las cisteínas en forma de ácido cisteico. La preparación del ácido per fórmico se lleva a cabo mezclando 0.1 ml de H_2O_2 (de 100 volúmenes) con 0.9 ml de ácido fórmico al 99 %. Esta disolución se incuba a temperatura ambiente durante 2.5 horas, al cabo de las cuales el reactivo está listo para su utilización, previo enfriamiento a -10°C .

La proteína, liberada de sales y aditivos por diálisis frente a agua destilada mediante

cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), se deseca en un desecador centrífugo Speed-Vac, y se disuelve en el ácido per fórmico, a una concentración de 1 mg/ml. La incubación se prolonga durante 2.5 horas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, transcurridas las cuales, la mezcla se liofiliza. El residuo se disuelve en agua y se deseca de nuevo, repitiéndose esta operación de lavado varias veces, a fin de eliminar completamente el exceso de reactivo.

3.4.2 Hidrólisis ácida

La proteína en forma de residuo seco se disuelve en HCl tridestilado azeótropo (5.7 N), conteniendo fenol 0.1 % (p/v). La hidrólisis se lleva a cabo a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ sometiendo a diferentes alícuotas de la proteína a tiempos de incubación crecientes: 24, 48 y 72 horas, en tubos cerrados a la llama bajo presión reducida. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se llevan a sequedad en un desecador a vacío con un lecho de NaOH. El residuo seco se lava con agua destilada y, de nuevo, se lleva a sequedad, esta vez en un desecador centrífugo a vacío (Speed-Vac). Los lavados se repiten dos veces más.

3.4.3 Análisis automático

El residuo seco se disuelve en $50\ \mu\text{l}$ de un tampón constituido por 19.6 g de citrato sódico dihidratado, 20 ml de tiodiglicol, 16.5 ml de ácido clorhídrico concentrado y 1 ml de fenol, todo ello llevado a un volumen final de 1 litro. El pH alcanzado resulta ser de 2.20 ± 0.01 . La disolución de muestra se lleva a un tubo de Teflón (4 x 0.3 cm) y, tras ser centrifugada en una microfuga (Microfuge-E, Beckman), se aplica en la columna del analizador un volumen comprendido entre 10 y $40\ \mu\text{l}$ del sobrenadante. Tanto el tampón de elución como el reactivo de ninhidrina son de Pierce Ch.

La duración del análisis es de aproximadamente 100 minutos. Una vez finalizado, la resina de la columna se regenera mediante un lavado con una disolución de NaOH 0.3 N, conteniendo EDTA 0.25 g/l.

A partir de los cromatogramas obtenidos, se determina la fracción molar de cada aminoácido presente en los hidrolizados, por integración de los picos de elución y comparación con un estándar externo. Tal análisis se lleva a cabo de forma automática mediante el paquete de software System Gold de Beckman. Cada análisis fue repetido por duplicado. La evaluación del contenido en cisteínas, en forma de ácido cisteico, se determina asumiendo que el producto coloreado de su reacción con ninhidrina presenta un coeficiente de extinción idéntico al que exhibe el ácido aspártico (Spackman *et al.*, 1958).

Los contenidos en serina y treonina se evalúan teniendo en cuenta las pérdidas que sufren a lo largo del proceso de hidrólisis. Para ello, las áreas de sus picos a diferentes tiempos de hidrólisis se ajustan a una recta de pendiente decreciente, cuya extrapolación a tiempo cero proporciona el valor definitivo. El contenido en tirosinas se evalúa en muestras no sometidas a oxidación con ácido per fórmico. El contenido en triptófanos se determina mediante los métodos espectrofotométricos de Beaven y Holiday (Beaven *et al.*, 1952) o de Benzce y Schmid (Benzce *et al.*, 1957).

3.4.3.1 Método de Beaven y Holiday

La proteína se dializa frente a agua destilada mediante cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia). Se le añade a continuación NaOH hasta una concentración final

de 0.1 N, y de forma que la absorción a 290 nm se sitúe alrededor de 0.2. En estas condiciones, se mide la absorción de la disolución a 294.4 y a 280.0 nm. A partir de esos valores, y haciendo uso de la expresión siguiente,

$$\frac{M_{\text{Tyr}}}{M_{\text{Trp}}} = \frac{0.592 \cdot A_{294.4} - 0.263 \cdot A_{280.0}}{0.263 \cdot A_{280.0} - 0.170 \cdot A_{294.4}} \quad [2]$$

se evalúa la relación molar $M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}}$. Ello permite, finalmente, el cálculo del contenido en Trp, a partir del contenido en Tyr determinado mediante análisis de aminoácidos.

3.4.3.2 Método de Bencze y Schmid

Este método se basa en la absorción de la proteína a $\text{pH} > 12$ en el intervalo de 270-300 nm. La pendiente de la recta tangente a los dos máximos de la curva de absorción está relacionada con la relación molar $M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}}$ de la proteína.

Como en el caso anterior, la proteína se prepara en un medio de NaOH 0.1 N, de forma que la absorción máxima en la región de los aminoácidos aromáticos esté comprendida entre 0.15 y 0.20. A continuación se registra el espectro de absorción de la preparación. Se traza la recta tangente a los dos máximos que presenta el espectro. El valor de la relación molar se calcula a partir del parámetro S deducido de la expresión:

$$S = \frac{10^3 \cdot (a/b)}{D_{\text{max}}} \quad [3]$$

donde a/b es la pendiente de la recta en unidades de densidad óptica por nm y D_{max} la absorbancia máxima del espectro en la zona 270-300 nm en unidades de densidad óptica. El valor de S así obtenido se interpola en los de la tabla II, obteniéndose el valor de $M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}}$.

3.5 VALORACIÓN DE GRUPOS SH

La determinación del contenido total en grupos tiol de las muestras a analizar se llevó a cabo en condiciones desnaturizantes (SDS), a fin de evitar cuantificaciones por defecto atribuibles a exposición parcial.

La mezcla de reacción contenía: 460 μl de un tampón tris 0.1 M pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS 1.5 %, 100 μl de la muestra conteniendo la proteína y 40 μl de una disolución de DTNB 12 mM, preparado en un tampón fosfato 50 mM pH 7.0. La adición del DTNB en último lugar desencadena al comienzo de la reacción, que fue seguida mediante el registro continuo de la A_{412} . Las medidas se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, en un espectrofotómetro de doble haz. La cubeta de referencia contenía una mezcla de idénticas características que la descrita, a excepción de los 100 μl de muestra, que eran sustituidos por un volumen igual del tampón fosfato anteriormente descrito.

Relación molar M_{Tyr}/M_{Trp}	S (nm ⁻¹)
0.1	-17.5
0.2	-14.7
0.3	-12.6
0.4	-10.7
0.5	-9.0
0.7	-6.1
0.9	-3.9
1.0	-2.8
1.1	-1.8
1.3	0.1
1.5	1.5
2.0	4.8
2.5	8.4
3.0	11.9
4.0	18.4

Tabla II. Relación M_{Tyr}/M_{Trp} en función de S.

3.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD RIBONUCLEOLÍTICA

Para la evaluación de las actividades ribonucleolítica o del IR se han empleado dos tipos de ensayos diferentes, según el número de muestras a evaluar, y del grado de pureza de las mismas.

3.6.1 Ensayo de precipitación con RNA de levadura como sustrato

Este ensayo enzimático se basa en la medida de la producción de mono y oligonucleótidos solubles en medio ácido en presencia de acetato de uranilo, (MacFayden, 1934) empleando RNA de levadura como sustrato. Por tratarse de un ensayo enzimático a tiempo fijo de incubación, resulta especialmente indicado para la valoración simultánea de un número elevado de muestras. Se trata, además, de un ensayo muy sensible (límite de detección aproximado de 0.5 UI), y puede ser empleado tanto para el ensayo de muestras puras, como para el de extractos crudos.

3.6.1.1. Procedimiento

En líneas generales, el protocolo seguido es el ya descrito por Blackburn (1977), con ligeras modificaciones. La mezcla de incubación estándar contiene, de forma constante, 200 μ l de un tampón tris-HCl 0.5 M pH 7.5, EDTA 6 mM, y 100 μ l de una disolución de albúmina de suero bovino 0.1

% (p/v) en H₂O. A esta mezcla se le añaden 200 μ l más, que varían en función de la muestra a ensayar. Así:

i) Ensayo de RNasa libre: a la mezcla anterior se añaden 100 μ l de la disolución de muestra y 100 μ l de H₂O destilada.

ii) Ensayo de RNasa latente (formando complejo con IR): se utilizan 100 μ l de la preparación de la muestra y 100 μ l de una disolución de *p*-hidroximercuribenzoato sódico (pHMB) 10mM disuelto en NaOH 10 mM. El pHMB bloquea los grupos sulfhidrilo de IR, liberando así la actividad ribonucleolítica. El valor de actividad medido bajo estas condiciones es el correspondiente a la totalidad de la RNasa presente en la disolución de muestra. Para evaluar la ribonucleasa en estado latente, es preciso restar a la actividad total así medida el valor obtenido en el ensayo de RNasa libre.

iii) Ensayo de actividad IR: los 200 μ l mencionados se componen de 100 μ l de una disolución de RNasa A comercial (Sigma tipo XII-A) de concentración conocida (en nuestras condiciones de ensayo, 0.08 μ g/ml), y 100 μ l de la muestra conteniendo el IR. Para este caso se requiere un control de la actividad ribonucleolítica que muestra la RNasa A añadida en ausencia del IR, para lo cual se realiza un control en el que se sustituyen los 100 μ l de la disolución de inhibidor por 100 μ l de H₂O destilada.

La mezcla resultante en todos los casos contiene así 500 μ l, que se incuban a 37°C durante 10 minutos. La reacción se inicia al añadir 500 μ l de una disolución de RNA de levadura 0.5 % (p/v) en H₂O destilada. La mezcla se agita rápidamente y se mantiene a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, la reacción se detiene transfiriendo los tubos del ensayo a un baño de hielo. Al cabo de 5 minutos se añade 1 ml de una preparación fría (2-4°C) de ácido perclórico al 10 % (v/v), conteniendo acetato de uranilo al 0.25 % (p/v). La suspensión resultante se agita vigorosamente y se mantiene en baño de hielo durante 20 minutos más. Tras este tiempo, se centrifuga a 3000 g durante 20 minutos, a 4°C. 0.5 ml del sobrenadante se diluyen tres veces con H₂O destilada, y a continuación se mide la A₂₆₀ de la disolución resultante en un espectrofotómetro Beckman DU-7.

Como blanco de estos ensayos se emplea una mezcla en la que se sustituyen los 100 μ l de muestra, y en el caso de los ensayos de IR, los 100 μ l de la disolución de RNasa A, por H₂O destilada. De forma paralela se realiza un nuevo ensayo en el que el agente precipitante es añadido inmediatamente después del RNA, continuándose con el protocolo de la forma habitual. Los valores de A₂₆₀ obtenidos para este último ensayo, así como el blanco se restan a los obtenidos en los demás ensayos.

Eventualmente fue necesario emplear condiciones de ensayo diferentes a las especificadas, como fue el caso de los estudios de inhibición hechos con el IR de testículo de cerdo y la RNasa A, con vistas al cálculo de la constante de inhibición de aquel. Para estas determinaciones cinéticas se hace necesario evaluar velocidades iniciales de reacción en concentraciones no saturantes de sustrato. Para determinar las condiciones adecuadas de concentración de sustrato y de tiempos de ensayo, se hicieron unos estudios preliminares en los que se evaluó la actividad ribonucleolítica de una concentración fija de enzima (4.2 ng/ml), con diferentes concentraciones de RNA y a distintos tiempos de incubación. Las concentraciones de sustrato empleadas fueron: 0.1, 0.2 y 0.3 mg/ml, valores 4, 2 y 1.3 veces inferiores a la K_m calculada para la enzima (584 μ M). Los tiempos de reacción estaban comprendidos entre 0 y 40 minutos. Debido a las bajas concentraciones de sustrato empleadas, fue necesario aumentar diez veces la concentración de albúmina, con el fin de facilitar la precipitación del RNA. Para el cálculo de las concentraciones molares de RNA se consideró un peso molecular promedio por nucleótido de 340 g/mol. De la representación de los resultados obtenidos (figura 1) se dedujo que un intervalo de tiempo adecuado para el cálculo de velocidades iniciales de

reacción era el comprendido entre 0 y 4 minutos. Así, las velocidades iniciales se calculan como la pendiente de la curva en ese tramo, y se expresan en unidades de $A_{260} \text{ min}^{-1}$.

El cálculo de las velocidades iniciales para las distintas concentraciones de sustrato, y en presencia de diferentes concentraciones de IR, permitió la determinación de la K_i de dicho inhibidor.

3.6.1.2 Unidades de actividad

Se define como unidad de actividad ribonucleolítica la cantidad de enzima necesaria para producir un incremento en la absorción a 260 nm de 1.0 en las condiciones de ensayo descritas. Para poder cuantificar la actividad de RNasa presente en una mezcla de ensayo, se precisa la construcción de una recta de calibrado que relacione cantidad de enzima ensayada y A_{260} obtenida, para lo cual se empleó RNasa A comercial. De este modo se comprueba la linealidad del ensayo en el intervalo de 0 a 12 ng de RNasa. La cantidad de ribonucleasa necesaria para conseguir una absorción de 1.0 (unidad de actividad) es de 8 ng.

Se define como unidad de IR (UI) la cantidad de inhibidor requerida para provocar una inhibición del 50 % en la actividad de 5 ng de RNasa A. Para evaluar la cantidad de IR presente en una mezcla de ensayo se precisa calcular la cantidad de ribonucleasa que ha sido inhibida. Para ello se evalúa la disminución en la A_{260} producida respecto a un ensayo control de actividad RNasa libre. Aplicando la definición de unidad de inhibidor se calcula el número de unidades de inhibidor presentes en la mezcla de ensayo.

Cuando se representa el porcentaje de inhibición de la actividad ribonucleolítica provocado por diferentes cantidades de IR de testículo de cerdo, frente a la cantidad de éste añadida, se comprueba que dicha inhibición se mantiene lineal en el intervalo de 25-75 %. Por lo tanto, sólo los valores de actividad inhibidora que provoquen una inhibición comprendida en este intervalo serán válidos para poder cuantificar correctamente la cantidad de IR presente en la mezcla de reacción.

3.6.1.3 Preparación del sustrato

Con el fin de optimizar las condiciones del ensayo de actividad, el sustrato comercial se somete a un proceso de purificación. De este modo se eliminan contaminantes (iones, glucanos, etc), así como fragmentos de RNA de pequeño tamaño, que proporcionarían fondos muy elevados en las medidas de A_{260} de los ensayos de actividad.

El esquema seguido para dicha purificación es el siguiente: 100 g de RNA de levadura (Sigma tipo VI) se disuelven lentamente en 500 ml de H_2O destilada, al tiempo que se añaden alícuotas de NaOH 1 M, de forma que el pH se mantenga próximo a la neutralidad, y sin que en ningún caso supere el valor de 9.0. Este proceso se realiza a 0-4 °C, en baño de hielo. La disolución neutralizada se enrasa a 1 litro con H_2O destilada y se somete a precipitación salina, añadiendo acetato sódico y ácido acético hasta una concentración final de 3 M y un pH de 5.5. El resultado es una disolución de color pardo, que se mantiene a -20 °C durante una noche. La preparación, tras este tiempo, adquiere una textura tipo gel, que se centrifuga a 13000 g durante 30 minutos, a -20 °C. El sedimento se recoge y se redisuelve en 1 litro de H_2O destilada. El proceso de precipitación en frío se repite dos veces más. El precipitado finalmente obtenido se redisuelve en 500 ml de H_2O destilada, y se le añade posteriormente 1 litro de etanol previamente enfriado a -20 °C. La suspensión resultante se mantiene a esta temperatura durante una noche. Tras este tiempo, se centrifuga en las condiciones ya descritas, y el sedimento obtenido se redisuelve en EDTA 25 mM, dializándose posteriormente frente a 20 volúmenes de la misma disolución (2 cambios x 6 horas). A continuación se dializa frente a 20

volúmenes de NaCl 0.15 M (de nuevo 2 cambios x 6 horas) y, por último, frente a 20 volúmenes de H₂O destilada (3 cambios x 6 horas). El RNA resultante de este proceso se recoge mediante liofilización y se conserva a -20 °C hasta el momento de su utilización.

3.6.2 Ensayo de actividad con 2',3'-CMPc.

En esencia, se utiliza el descrito por Blackburn (1979). Se basa en la capacidad de la RNasa para hidrolizar el 2',3'-CMPc como sustrato. como consecuencia de esta hidrólisis, el espectro de absorción se desplaza hacia el rojo, y ello se emplea para el seguimiento, de forma continua, del progreso de la reacción. Con este ensayo, por tanto, se evalúa la segunda de las etapas del mecanismo que siguen las RNasas ciclantes cuando hidrolizan RNA. Una primera etapa da lugar a la formación de un intermedio 2',3'cíclico, que posteriormente, en una segunda etapa, será hidrolizado a una forma 3'-P. La aplicación de este ensayo de actividad sólo puede realizarse sobre preparaciones purificadas.

3.6.2.1 Procedimiento

En una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico se añaden 200 µl de un tampón tris-acetato 0.5 M pH 6.5, EDTA 5 mM, y 75 µl de una disolución de 2',3'-CMPc 10 mM. El resto de los componentes del ensayo varía de nuevo en función del tipo de ensayo:

i) Ensayo de actividad RNasa libre: A los 275 µl anteriores se les añade el volumen necesario de la disolución de muestra, no superando en ningún caso los 200 µl.

ii) Ensayo de RNasa latente: la muestra a ensayar se preincuba aparte mezclando: 50 µl de ella con 10 µl de una disolución de N-etilmaleimida (NEM) 50 mM, cuya misión consiste en unirse al DTT presente en muestra. Tras 5 minutos de preincubación, se añaden 10 µl de una disolución 50 mM de *p*-HMB, y se mantiene la incubación durante cinco minutos más. Transcurrido este tiempo, se toman 35 µl de la mezcla y se añaden a la cubeta en la que se va a realizar el ensayo de actividad, y que contiene, como se ha descrito, 275 µl del sustrato en el tampón de ensayo. De no mediar la adición de la NEM, la reacción del DTT de la muestra con el *p*-HMB provocaría un incremento en la absorción de la mezcla, que interferiría en los resultados. Sin embargo, la reacción de la NEM con el DTT, consume a éste último sin interferencia alguna, y permitiendo que el *p*-HMB ejerza posteriormente su efecto inactivante del IR. Como en el ensayo de precipitación, a los resultados obtenidos en este ensayo habrá que restarles los correspondientes a RNasa libre, para obtener la cuantificación de RNasa latente.

iii) Ensayo de la actividad de IR: se añaden a la cubeta de cuarzo 10 µl de una disolución de RNasa A 0.1 mg/ml y un volumen de muestra variable, hasta un máximo de 200 µl. Cuando se trata de ensayar el IR eluido de la cromatografía de afinidad, la elevada fuerza iónica del tampón de elución obliga a ensayar un máximo de 40 µl. Volúmenes superiores aportarían a la mezcla de reacción una fuerza iónica tan elevada que llega a provocar la inactivación de la RNasa.

En todos los casos, las mezclas resultantes se enrasan con H₂O destilada hasta un volumen final de 1 ml. Este volumen de agua se añade antes que la muestra enzimática, de forma que la adición de ésta última se toma como punto de origen (tiempo cero) de la incubación.

La velocidad de hidrólisis del 2',3'-CMPc se determina a partir de la pendiente obtenida tras registrar durante 10 minutos la variación en la absorción a 286 nm de la mezcla de reacción.

3.6.2.2 Unidades de actividad

Para cuantificar la actividad RNasa se precisa disponer de una recta de calibrado que relacione las pendientes obtenidas con la cantidad de ribonucleasa ensayada. En las condiciones de ensayo mencionadas, se comprueba la existencia de una relación lineal para una cantidad de RNasa A de hasta 1.5 μg . Por su parte, la representación del porcentaje de inhibición en función de la cantidad de IR presente en la mezcla de reacción, ofrece un perfil lineal en el intervalo de 25 %-75 %. Por tanto, para la cuantificación de la actividad del IR se ha de guardar la precaución de diluir adecuadamente, a fin de que los porcentajes de inhibición se mantengan en ese intervalo. Concretamente, la inhibición de un 50 % de la actividad RNasa presente en la mezcla de reacción (1 μg) es conseguida por 200 UI.

3.7 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA EN PRESENCIA DE SDS

3.7.1 Polimerización del gel

Las electroforesis se realizan en placa, utilizando para ello el sistema Mini-Protean de Bio-Rad. Se llevan a cabo en modo discontinuo, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970). El espesor de los geles es de 0.75 mm, su anchura de 8 cm y sus alturas de 5.5 cm para el gel separador y 1.5 cm para el concentrante.

En el molde de polimerización se vierten aproximadamente 3.5 ml de una disolución filtrada y desgasificada, conteniendo acrilamida a una concentración del 8 %, 12.5 % ó 15 % (p/v), según el caso, N,N'-metilen-bisacrilamida 0.33 % (p/v), y dodecil sulfato sódico (SDS) 0.1 % (p/v) en tampón tris-HCl 0.375 M pH 8.8. Previamente a esos 3.5 ml se les había añadido 10 μl de N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 30 μl de una disolución recientemente preparada de persulfato amónico al 5 % (p/v), evitando la formación de espuma. Sobre la mezcla de polimerización se deposita una capa de aproximadamente 2 mm de espesor de n-butanol, a fin de evitar la formación de menisco en la superficie del gel. Transcurridos 30-45 minutos, se elimina la capa de n-butanol, lavando a continuación el frente del gel recién polimerizado (gel separador) con agua destilada. Sobre este gel se depositan, aproximadamente 0.8 ml de una disolución filtrada y desgasificada de acrilamida al 4.5 % (p/v), bisacrilamida 0.12 % (p/v), SDS 0.1 % (p/v) en tampón tris-HCl 0.125 M pH 6.8, a la que previamente se le añadieron 5 μl de TEMED y 7 μl de persulfato amónico 5 % (p/v). Antes de que esta mezcla polimerice, dando lugar al gel concentrante, se coloca el molde que forma los pocillos de aplicación.

3.7.2 Preparación de las muestras y desarrollo de la electroforesis

Las muestras a aplicar son desaladas mediante diálisis en bolsa, o mediante cromatografía de filtración en gel en columnas comerciales de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), frente a agua destilada. Posteriormente se llevan a sequedad en un desecador centrífugo a vacío Speed-Vac. Se disuelven a continuación en el tampón de aplicación tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, conteniendo SDS 2 % (p/v), glicerol 25 % (v/v), azul de bromofenol 0.01 % (p/v) como marcador del frente. En los casos en los que se desea reducir los puentes disulfuro de las proteínas presentes en las muestras, se añade β -mercaptoetanol 1 % (v/v). Antes de su aplicación, las muestras se calientan a 100 °C durante 5 minutos en baño de agua. El volumen de muestra aplicado nunca superó los 15 μl .

El desarrollo de la electroforesis se lleva a cabo en tampón glicocola 0.19 M, tris-HCl 25 mM pH 8.3, SDS 0.1 % (p/v). La diferencia de potencial entre electrodos se fija de forma que la intensidad de corriente se mantenga constante a 25 mA. La duración del proceso está en función del porcentaje de acrilamida con que se polimerizó el gel separador. La electroforesis se da por terminada controlando el tiempo desde que el azul de bromofenol eluye fuera del gel (normalmente 8 minutos después de ello).

3.7.3 Localización de las proteínas

Para este propósito se emplearon varios métodos de tinción, en función de la concentración de las muestras aplicadas, de la rapidez con la que se precisara evidenciar los resultados del proceso, o de la finalidad del mismo.

3.7.3.1 Tinción con plata

El método empleado se basa en el descrito por Oakley *et al.* (1980), con ligeras modificaciones. El gel se sumerge, de forma sucesiva, en las disoluciones que se detallan a continuación, durante los tiempos especificados, bajo agitación orbital continua, y a temperatura ambiente:

1. 100 ml de metanol 50 % (v/v), ácido acético 12 % (v/v), durante 30 minutos, aunque esta etapa puede prolongarse indefinidamente.
2. 100 ml de etanol 10 % (v/v), ácido acético 5 % (v/v), durante 15 minutos. Esta etapa se repite dos veces.
3. Triple lavado de 10 minutos con H₂O destilada.
4. 100 ml de la "disolución de plata", durante 20 minutos. Dicha disolución de plata, que ha de ser reciente, se prepara mezclando 21 ml de NaOH 0.36 % con 1.4 ml de NH₄OH concentrado; esta mezcla se agita al tiempo que se le añaden de forma lenta y continua 4 ml de AgNO₃ al 20 % (p/v), de forma que se disuelva el precipitado pardo que aparece inicialmente. La disolución transparente que resulta se lleva a 100 ml con H₂O destilada. Una vez utilizada, esta disolución se desecha (precipitación con Cl⁻).
5. Lavado con agua destilada abundante durante 3 minutos. Este lavado se repite tres veces.
6. 100 ml de la "disolución reductora" recientemente preparada. Durante la incubación con esta solución se produce el revelado del gel. Esta etapa se detiene cuando el fondo del gel comienza a tomar un color ámbar oscuro, para lo cual se acidifica el medio con ácido acético al 0.5 % (v/v). La solución reductora se prepara añadiendo 100 µl de ácido cítrico al 10 % (p/v) y 100 µl de formaldehído comercial (35 %) a 100 ml de agua destilada.
7. Lavado abundante con agua destilada y posterior almacenamiento del gel en una disolución de Na₂CO₃ al 1 % (p/v).

Para la detección de bandas minoritarias puede ser conveniente la prolongación del proceso de revelado, a expensas de un oscurecimiento del fondo y de la aparición de un ligero velo por la superficie del gel. Posteriormente, si se desea, se puede disminuir la intensidad del revelado, o incluso eliminarlo totalmente. Para tal fin se utiliza el reductor fotográfico descrito por Switzer *et al.* (1979).

Consta de las dos disoluciones siguientes:

Disolución A: 37 g de NaCl y 37 g de $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, disueltos en 850 ml de agua, a los que se añaden NH_4OH concentrado hasta que se disuelve el precipitado formado inicialmente, tras lo cual la disolución se enrasa a 1 litro.

Disolución B: 436 g de tiosulfato sódico disueltos en 1 litro de agua destilada.

Estas dos disoluciones se mezclan en partes iguales y la mezcla resultante se emplea directamente o diluída, según la intensidad del fondo a eliminar o la rapidez con que se desee que transcurra el proceso de desteñido. Este se finaliza transfiriendo el gel a un recipiente con abundante agua. Los geles se almacenan también en Na_2CO_3 al 1 % (p/v).

3.7.3.2 Tinción con azul de Coomassie

Tras la electroforesis, el gel se sumerge durante 10-15 minutos en una disolución de metanol 45 % (v/v), ácido acético 10 % (v/v) conteniendo azul de Coomassie R-250 al 5 % (p/v). Tras 15 minutos de incubación, el gel se trasfiere a una disolución de desteñido, conteniendo metanol 20 % (v/v), ácido acético 7.5 % (v/v). Esta etapa se prolonga hasta que aparecen nítidamente las bandas y suficientemente diferenciadas del fondo, cambiando si es preciso, la disolución de desteñido.

3.7.3.3 Tinción con zinc

En todos los pasos que se detallan a continuación se emplearon 100 ml de las disoluciones descritas. El gel sumergido en ellas, se mantuvo bajo agitación orbital continua. En la tabla II se resume el protocolo, el cual consta de dos etapas, una para la tinción negativa y otra para el viraje. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

3.7.3.3.1 Tinción negativa

1. Después de la electroforesis el gel es sumergido en una solución de Na_2CO_3 1 % (p/v) durante 5 minutos.
2. A continuación, dicho medio es sustituido por una solución de imidazol 0.2 M conteniendo SDS 0.1 % (p/v). Después de 15 minutos el gel se lava con agua durante unos segundos, procurando eliminar la espuma que pueda haber quedado en el medio.
3. El gel se trasfiere ahora a un medio conteniendo ZnSO_4 0.2 M. En unos segundos comienza a aparecer un fondo blanco, permaneciendo las bandas de proteína transparentes. Esta incubación se prolonga durante 40 segundos a lo sumo. Trascurrido este tiempo, la citada disolución se retira rápidamente, y el exceso de zinc es eliminado lavando el gel con abundante agua: 2 lavados de 10 segundos seguidos por otros dos de 10 minutos.

De este modo se ha conseguido teñir el gel de forma negativa con zinc. En este estado, el gel puede ser almacenado en agua por tiempo indefinido, pero, sin embargo, no puede ser secado, ya que durante este proceso se pierde el precipitado que cubre el fondo, y, por tanto, el patrón de tinción. Partiendo de este estado del gel, hemos desarrollado un modo de alterar dicho precipitado, de forma que se torna de color azul oscuro y toma un carácter permanente, lo que permite el secado del gel.

Dicho proceso, denominado "viraje", es el que se describe a continuación:

3.7.3.3.2 Viraje

4. Los geles teñidos inversamente en el modo descrito, se incuban durante 4 minutos en una disolución de ferricianuro potásico 0.1 % (p/v), *o*-tolidina 0.1 % (p/v) en metanol 20 % (v/v). Esta solución no es estable y tiende a desarrollar un precipitado oscuro sobre su superficie. Por lo tanto, ha de ser preparada inmediatamente antes de su utilización, mezclando volúmenes iguales de las siguientes disoluciones: (A) ferricianuro potásico 0.2 % (p/v); (B) *o*-tolidina 0.2 % (p/v) disuelta en metanol 40 % (v/v). Para facilitar la preparación de la disolución B es aconsejable disolver en primer lugar la *o*-tolidina en el metanol y, posteriormente enrasar con agua hasta el volumen final necesario para alcanzar las concentraciones de metanol y *o*-tolidina indicados.

Durante la incubación del gel en el medio descrito, el fondo blanco se vuelve de un color amarillo-marrón, mientras que las bandas toman un ligero color amarillo transparente. También durante esta incubación aparece el mencionado precipitado en la superficie de la disolución, lo que no afecta de forma perceptible a los resultados finales, especialmente si tras la incubación se lava el gel durante unos segundos con agua.

5. Posteriormente los geles se incuban con otra disolución de *o*-tolidina diferente: *o*-tolidina 0.1 % (p/v), H₂SO₄ 0.18 N, metanol 20 % (v/v). De nuevo esta disolución resulta ser inestable y ha de ser preparada inmediatamente antes de su utilización, mezclando volúmenes iguales de la disolución (A), descrita anteriormente, y de una nueva (C) H₂SO₄ 0.36 N. Durante los dos primeros minutos en este medio ácido, el fondo marrón del gel se vuelve de color azul, mientras que las bandas de proteína se tornan de nuevo transparentes, lográndose así el viraje del gel. Durante este tiempo, la disolución toma un color amarillo y desarrolla un precipitado blanco que no afecta a los resultados finales, siempre que dicha incubación se mantenga bajo constante agitación orbital.

No es preciso prolongar el proceso final de viraje, puesto que esta reacción tiene un punto final. Así, después de no más de 5 minutos, la disolución se retira y los geles se lavan varias veces con agua, con el fin de eliminar posibles trazas de precipitado blanco que podrían haberse quedado adheridas al gel.

El gel, en este momento está listo para ser secado en la forma convencional.

3.7.4 Densitometrado de geles

La evaluación densitométrica se realiza sobre los geles PAGE-SDS una vez secados entre dos láminas de papel celofán. Par el densitometrado se utiliza un espectrofotómetro Bevkman DU-8 equipado con el programa "gel scanning system". Se emplean los siguientes parámetros instrumentales: rendija del gel ("gel slit") 0.05 mm; promedio de lecturas, 1; velocidad de barrido del gel, 0.4 cm/min.; velocidad de carta, 1cm/min. la altura del haz de luz fue fijada en 2 mm, con el fin de asegurar que las bandas del gel, de aproximadamente 7 mm de ancho, fueran medidas a través de su zona central, evitándose así las irregularidades de los bordes.

En el caso del densitometrado de los geles teñidos inversamente con zinc y posteriormente virados, el registro se realizó en el modo transmitancia, empleando una longitud de onda de 580 nm.

3.7.5 Fotografiado de geles

Los geles teñidos con plata o con azul de Coomassie fueron fotografiados en el modo convencional.

Los geles teñidos de forma inversa con zinc se fotografian colocándolos sobre una superficie negra. Si se trataba de geles virados, dicho fondo negro se sustituyó por un transiluminador. Sin embargo, se han obtenido mejores resultados con estos geles virados acudiendo a fotografía por contacto. Para tal propósito, los geles, una vez secos, se sitúan directamente sobre una película fotográfica (película ortocromática Valcaline de 0.1 mm de espesor; Valca) y se iluminan utilizando una ampliadora estándar (Durst M370BW; Durst Phototechnik srl). Las condiciones de iluminación que resultaron más adecuadas fueron: f11, 10 segundos de exposición y 58 cm de distancia entre la lente y el gel. De este modo, y después del revelado de la película (revelador de papel Ilfospeed RC IS 4.1M; Ilford) se obtiene una copia negativa a tamaño real de cada gel, en una película fotográfica, que es a su vez empleada como negativo para una segunda impresión por contacto, esta vez sobre papel. Para esta segunda impresión, el objetivo de la ampliadora se ajusta a f16, y la exposición de luz se mantiene durante 5 segundos a una distancia de 34 cm del gel. Tras el revelado del papel, con el mencionado revelador, se obtiene una copia positiva del gel. Con este procedimiento hemos evitado los pasos de reducción y posterior ampliación de la forma clásica de fotografiado, mejorando, así, la definición y el contraste final.

Aunque el método de fotografiado por contacto directo que se ha descrito es válido para geles teñidos con zinc y virados, también resulta aplicable, con ligeras modificaciones, a geles teñidos con plata o con azul de Coomassie.

3.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS. HPLC

A parte de las cromatografías descritas en apartados anteriores, en el presente trabajo se han empleado diversos métodos de separación mediante HPLC, que se describen a continuación. En todos los casos se utilizó un equipo Beckman System Gold, dotado de un programador de gradientes modelo 126 compuesto por dos bombas, y un detector de longitud de onda variable, de un solo canal, modelo 166. Los disolventes orgánicos empleados eran de grado HPLC y el agua ultrapura, procedente de un sistema Milli-Q (Millipore) al que se le acopló un filtro con un diámetro de poro de 0.22 μm (MilliPack-40, Millipore). Todos los medios preparados fueron filtrados según la compatibilidad, a través de membranas Durapore (Millipore) o de nylon 66 (Altech), de 0.22 μm de diámetro. Los medios acuosos fueron desgasificados mediante trompa de vacío, mientras que con los orgánicos se hizo por ultrasonidos en un sonicador Ultrasons (Selecta).

A continuación se detallan los diferentes métodos empleados:

3.8.1 Cromatografía de intercambio catiónico

La columna empleada (MA7S, BioRad), consiste en un relleno no poroso (BioGel MA7), que tiene anclado como grupo intercambiador el radical sulfopropilo. Sus dimensiones son de 50 x 7.8 mm, y su diámetro de partícula no porosa, de 7 μm . El número de platos teóricos calculados para esta columna fue de 3400.

Como fase móvil se emplearon dos tampones: (A) fosfato sódico 20 mM pH 7, EDTA 1 mM;

(B) el mismo, pero conteniendo además NaCl 0.5 M.

El método de elución seguido consistía en un equilibrado inicial en el disolvente A, aplicándose, una vez inyectada la muestra, un gradiente lineal, de 16 minutos de duración, hasta un 80 % del sistema B. Durante los 4 minutos siguientes se mantiene la composición de forma isocrática, para recuperar finalmente las condiciones iniciales en 2 minutos más. El flujo de operación era de 1.5 ml/min., y el seguimiento espectrofotométrico se realizó midiendo A_{225} . El volumen de muestra aplicado era, generalmente, de 500 μ l.

3.8.2 Cromatografía de intercambio aniónico

En este caso, el relleno de la columna empleada fue de DEAE-TSK (spherogel-TSK DEAE 5PW, Beckman); sus dimensiones de 75 x 7.5 mm, y su diámetro de partícula de 10 μ m. El diámetro de poro de esta partícula fue de 10 μ m. El número de platos teóricos calculado para esta columna fue de 2752.

La fase móvil utilizada estaba compuesta por dos tampones: (A) tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 50 mM, glicerol 15 %; (B) idéntico al anterior, salvo en la concentración de NaCl, que era de 0.3 M.

El método empleado, consistía en una elución isocrática durante 5 minutos con 100 % del sistema A. Posteriormente, y con una duración de 1 minuto en todas ellas, se aplican las siguientes etapas: (A) gradiente lineal hasta el 50 % de B; (B) elución isocrática en estas condiciones; (C) gradiente lineal hasta el 100 % de B; (D) elución isocrática en ese porcentaje de B y (E) recuperación de las condiciones iniciales. El flujo se mantiene en 1 ml/min. La composición del eluido se registra por medio de A_{280} . El volumen de muestra aplicado era de 100 μ l en los casos en que se tratara de un estudio analítico, y de 500 μ l cuando se precisara recuperar la muestra para análisis posteriores. En la figura 10 se representan cromatogramas típicos obtenidos cuando se aplican muestras conteniendo IR, RNasa o complejo IR-RNasa.

3.8.3 Cromatografía de filtración en gel

Se utiliza una columna Superdex 75 HR 10/30 (Pharmacia). Se trata de un soporte cromatográfico diseñado para sistemas de FPLC; y, por tanto, resiste presiones muy inferiores a las de trabajo con columnas de HPLC. Por este motivo, el flujo empleado fue de tan solo 0.5 ml/min.

Las dimensiones de la columna son: 30 cm x 10 mm, con un diámetro de partícula de 13 μ m. El número de platos teóricos calculado fue de 10635. El intervalo de fraccionamiento de esta columna para proteínas globulares es de 3000-70000 D.

La elución se llevó a cabo con un tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, glicerol 10 % (v/v), de forma isocrática. El seguimiento espectroscópico se realizó mediante registro continuo A_{280} .

El volumen de muestra aplicado en todos los casos fue de 100 μ l. En la figura 11 se muestran los perfiles de los cromatogramas obtenidos cuando se aplican muestras de IR, RNasa o complejo.

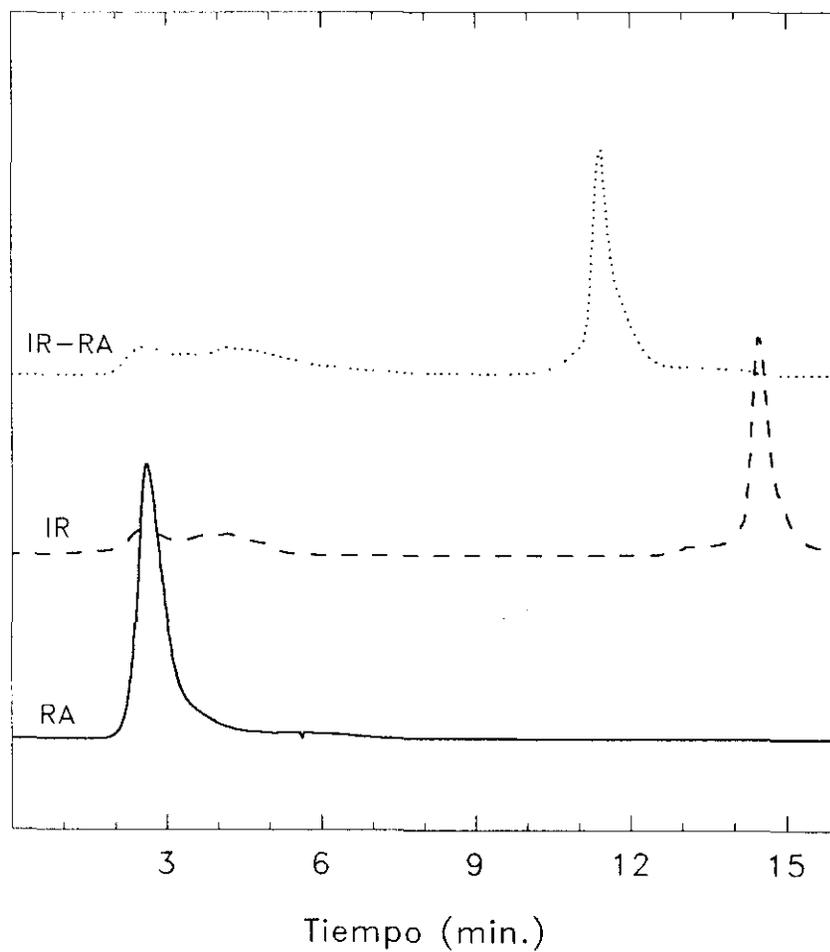


Figura 10. Perfiles cromatográficos obtenidos tras aplicar muestras de IR libre, RNasa A libre o complejo IR-RNasa A en una columna de intercambio aniónico DEAE-TSK 5PW (Beckman). En método de elución empleado de detalla en el apartado 3.8.2.

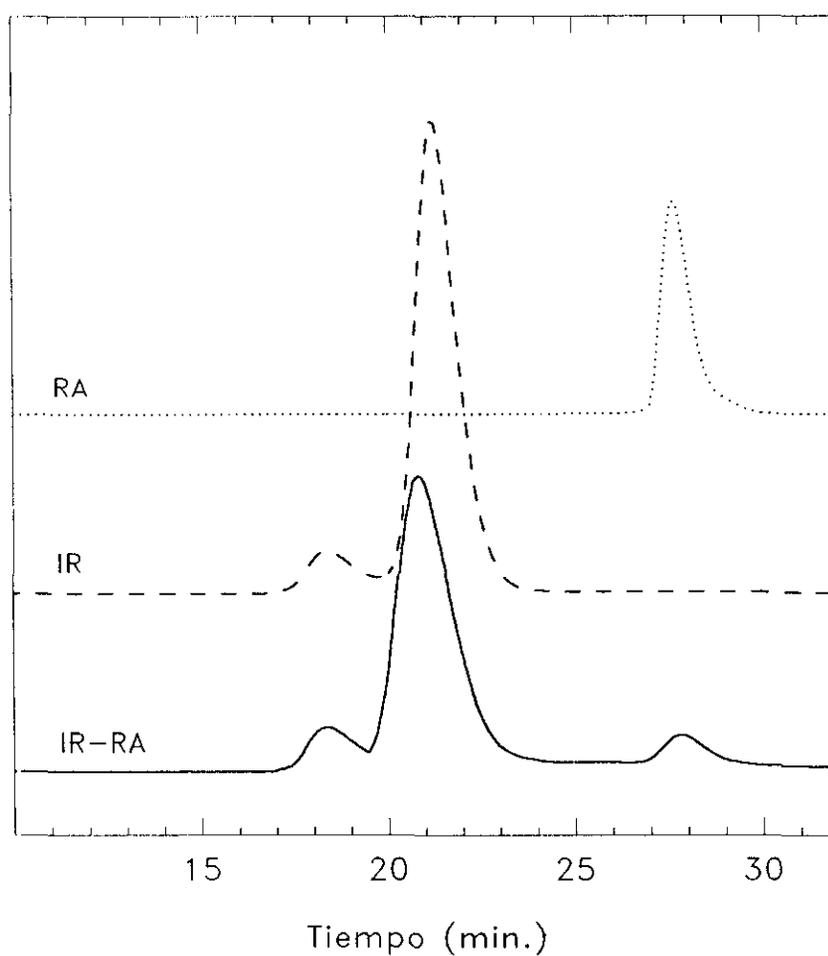


Figura 11. Perfiles cromatográficos obtenidos al aplicar muestras de IR libre, RNasa A libre, o complejo IR-RNasa A en una columna de exclusión molecular Superdex 75 HR (Pharmacia). El método de elución se describe en el apartado 3.8.3 de esta sección.

3.8.3.1 Evaluación de Pesos Moleculares. recta de calibrado

Con el fin de poder relacionar los tiempos de retención en esta columna, con los pesos moleculares de las proteínas aplicadas, se llevó a cabo un calibrado utilizando proteínas comerciales, de pesos moleculares conocidos. Las proteínas empleadas fueron: BSA (66200 D), ovoalbúmina (42700 D), inhibidor de tripsina (17600 D) y RNasa A (13700 D). El volumen de exclusión de la columna se evaluó aplicando una disolución de azul de dextrano. Los tiempos de retención relativos al tiempo de exclusión obtenidos para cada una de las proteínas aplicadas se representan en la figura 12, en función de sus respectivos pesos moleculares. Un ajuste por mínimos cuadrados de los resultados nos proporcionó la siguiente ecuación para la recta de calibrado:

$$\log M = -1.423 \cdot \left(\frac{t_r}{t_0} \right) + 6.402 \quad (r = 0.9974) \quad [4]$$

Donde M = peso molecular
 t_r = tiempo de retención
 t_0 = tiempo de exclusión

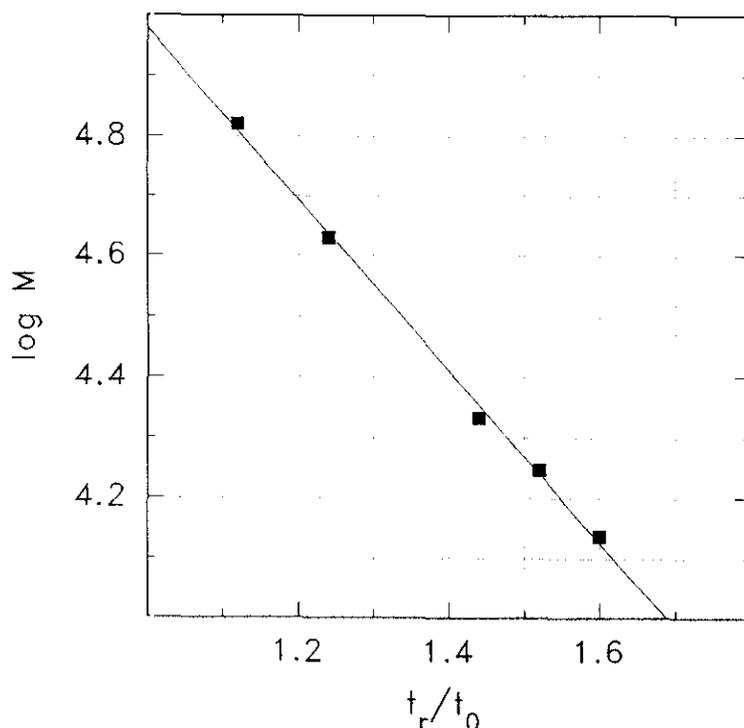


Figura 12. Recta de calibrado de la columna de filtración en gel Superdex 75 HR (Pharmacia), en la que se aplicaron las siguientes proteínas de peso molecular conocido: albúmina de suero (66.2 kD), ovoalbúmina (42.7 kD), inhibidor de tripsina (21.3 kD), mioglobina (17.6 kD) y RNasa A (13.7 kD). El eluyente empleado y las condiciones de elución se especifican en el apartado ???.

3.8.3.2 Cuantificación de RNasa A. Recta de calibrado

La evaluación del efecto que la modificación gradual del complejo IR-RNasa A tiene sobre el grado de asociación entre ambas proteínas se realizó empleando esta columna, en las condiciones cromatográficas descritas anteriormente. Esta columna no es capaz de resolver al IR libre de su forma asociada a la RNasa A, pero sí puede separar a éstos de la molécula de RNasa libre. Por lo tanto, la evaluación del grado de asociación entre el IR y la RNasa se llevó a cabo cuantificando la cantidad de RNasa A disociada. Para tal evaluación, se precisa conocer la relación existente entre el área del pico de RNasa y su masa. Este calibrado se realizó aplicando diferentes cantidades de RNasa A, comprendidas en el intervalo de 0.5-10 μg , en un volumen constante de 100 μl . La determinación de la masa exacta de RNasa A aplicada se realizó por medida de la A_{280} de las disoluciones aplicadas, y tomando como coeficiente de extinción $E_{280}^{0.1\%}$ de 0.72 $\text{mg}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ (). Las áreas integradas se representan en función de las cantidades de RNasa A aplicadas en la figura 13. Un ajuste por mínimos cuadrados de estos datos dió como resultado la siguiente recta de calibrado:

$$\text{Area} = 28.4048 \cdot (\mu\text{g RNasa A}) - 8.5587 \quad (r = 0.9994) \quad [5]$$

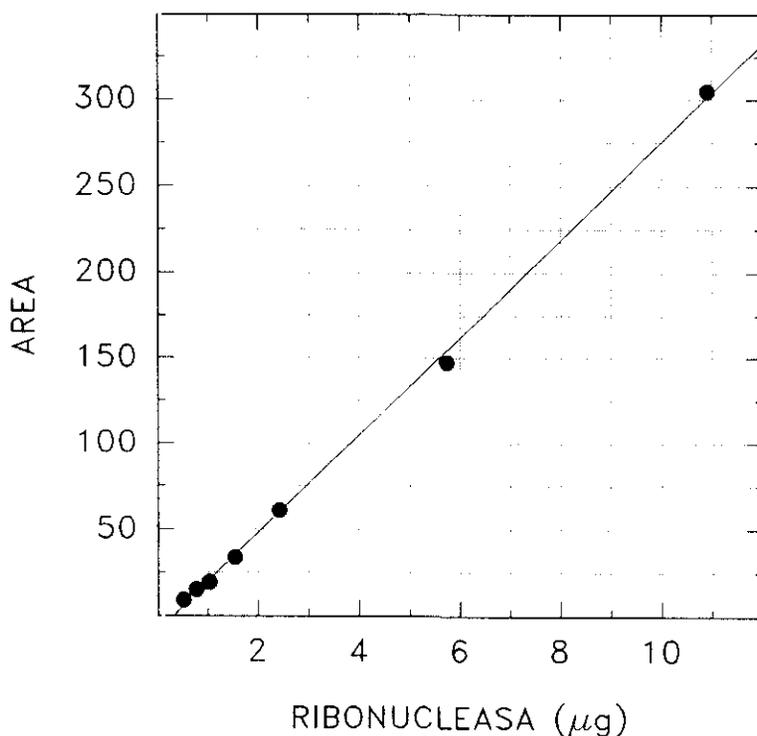


Figura 13. Recta de calibrado en la que se relaciona la cantidad de RNasa A aplicada en una columna de exclusión molecular Superdex 75 HR, en las condiciones descritas en el texto, con el área del pico resultante en el cromatograma.

3.8.4 Cromatografía en fase reversa

A lo largo del trabajo que aquí se expone, fueron puestos a punto dos métodos de cromatografía en fase reversa con distinta finalidad, y que emplean diferentes soportes cromatográficos; en concreto se utilizaron una columna C_4 y otra C_{18} . El método que emplea la primera de las columnas permitía obtener IR y/o RNasa puros, y en un disolvente volátil (orgánico). El segundo de ellos se utilizó para la cuantificación de GSSG y GSH de una mezcla de reacción. A continuación se describe cada una de ellos.

3.8.4.1 Cromatografía en soporte C_4

Se utiliza una columna C_4 (Supelcosil LC-304, Supelco), de dimensiones 5.0 cm x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm de diámetro, y un diámetro de poro de 300 Å. El número de platos teóricos calculado fue de 3284.

La elución se llevó a cabo empleando dos disolventes: (A) isopropanol 10 % (v/v), ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % (v/v); (B) isopropanol 90 % (v/v), TFA 0.1 % (v/v). El TFA se emplea para dar al medio un pH de 2, con el fin de minimizar las interacciones electrostáticas repulsivas con la fase estacionaria.

El método consiste en: dos minutos de disolvente A 100 % que, posteriormente pasará a 100 % de B en un gradiente de 20 minutos de duración. Tras mantenerse estas condiciones isocráticamente durante 5 minutos, se restablece un 100 % de A en 2 minutos más. El flujo de operación fue de 2 ml/min., y el registro espectrofotométrico se realizó a 225 nm.

Bajo estas condiciones, pudimos comprobar que la RNasa A eluía a un tiempo de 6.5 minutos, mientras que el IR lo hacía a 13.1 (figura 14). Cuando aplicamos una disolución de complejo, el resultado fue la aparición de dos picos a los tiempos mencionados, lo que ponía de manifiesto la desnaturalización del IR a lo largo de la cromatografía. Este hecho hizo que esta columna fuera empleada únicamente cuando no era preciso el estado nativo del IR. Por ejemplo, fue empleada para dializar IR reducido y carboximetilado destinado a secuenciación de aminoácidos. Puesto que la proteína eluía en una mezcla de agua, isopropanol y TFA, el secado de la muestra permitía su recuperación en ausencia de sales ni aditivos.

3.8.4.2 Cromatografía en soporte C_{18}

La columna empleada fue una Spherisorb ODS-2 de Symta, de dimensiones 25 cm x 4.6 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm , para la que se calcularon 42.121 platos teóricos.

El método de elución consiste en un gradiente entre un disolvente (A) agua con ácido trifluoroacético (TFA) 0.1 % (v/v), y un disolvente (B) acetonitrilo con TFA 0.1 % (v/v). Dicho gradiente pasa desde un 100 % de (A) hasta un 100 % de (B) en 7 minutos, para volver posteriormente a las condiciones iniciales en 1 minuto más.

El flujo de operación es de 1 ml/min. y el registro del cromatograma se realiza midiendo absorción a 214 nm. El seguimiento a tan baja longitud de onda está motivado por nuestro objetivo de lograr un método lo más sensible posible para la detección de GSH y de GSSG. Un cromatograma típico de una mezcla de GSH y GSSG se muestra en la figura 15.

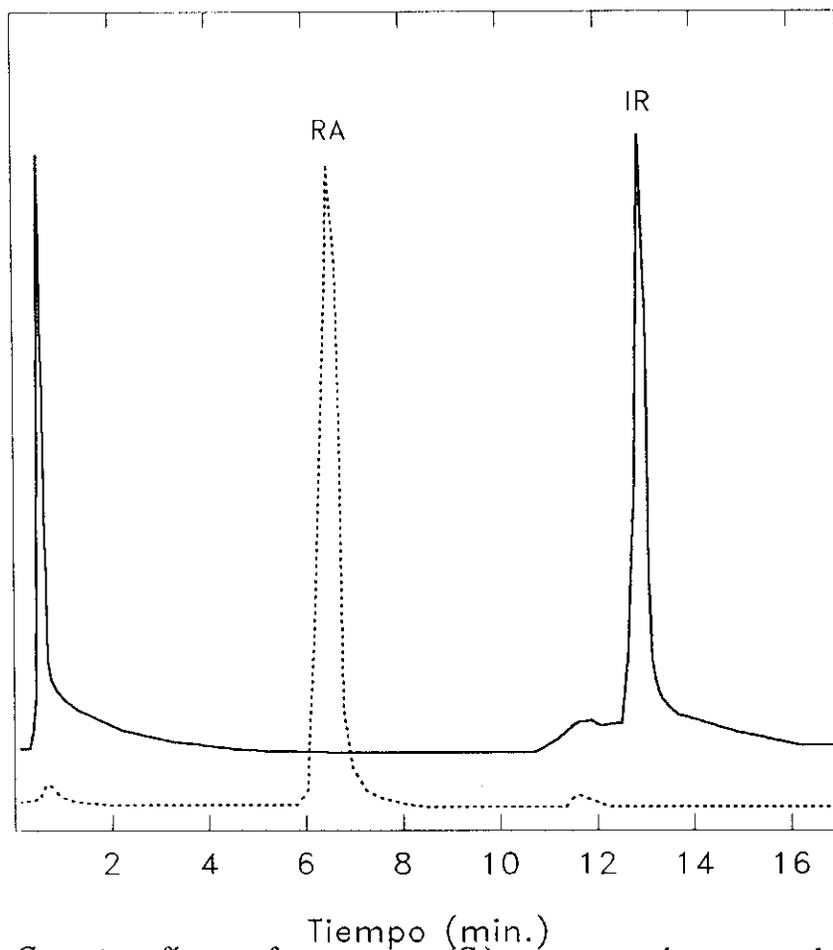


Figura 14. Cromatografía en fase reversa (C_4) en una columna supelcosil LC-304 (Technokroma) de dos muestras de IR y RNasa A, respectivamente. Las condiciones de elución empleadas se describen en el apartado 3.8.4.1 de esta sección.

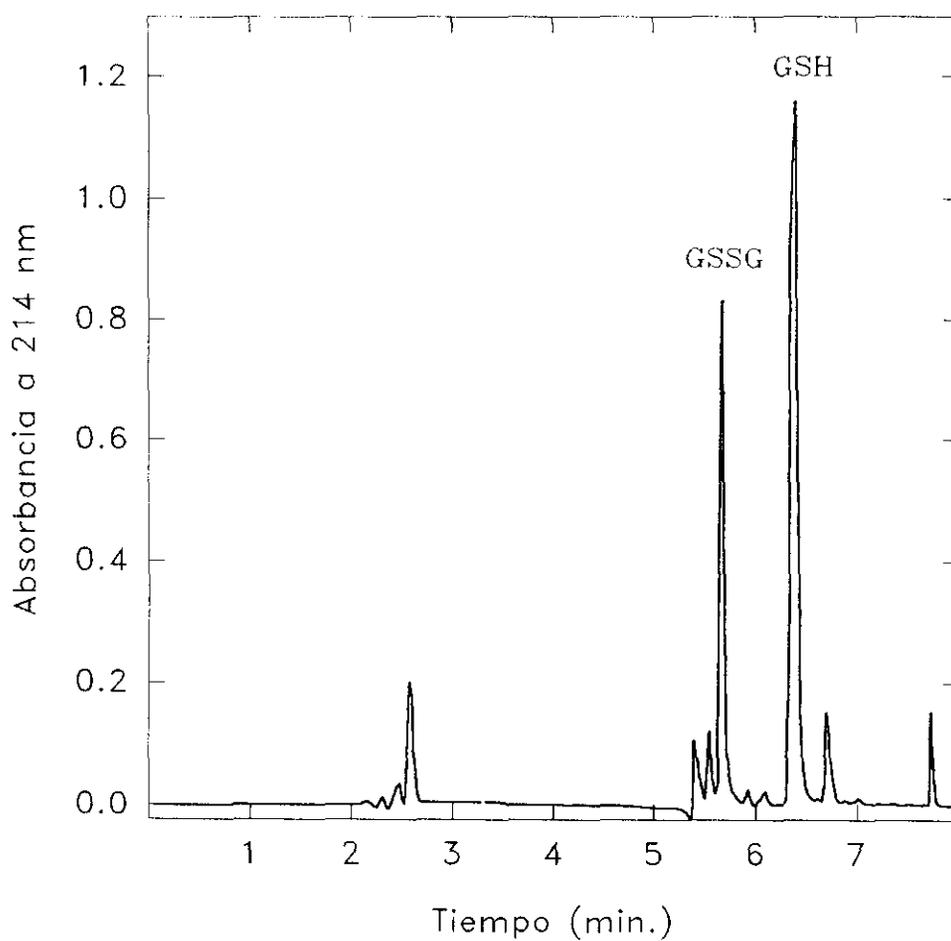


Figura 15. Cromatografía en fase reversa (C_{18}), en una columna Spherisorb ODS-2 (Symta) de una preparación conteniendo una mezcla de cantidades equimolares de GSH y GSSG, y tratada de forma previa con NEM. Las condiciones de elución se describen en el apartado 3.8.4.2 de esta sección. El pico que eluye a 5.7 minutos corresponde al GSSG, mientras que el derivado S-(N-etilsuccinimido)-GSH eluye a 6.4 minutos.

3.8.4.2.1 Cuantificación de GSH/GSSG

El método cromatográfico anteriormente descrito consigue la separación de las especies GSH y GSSG de una preparación, lo que posibilita su posterior cuantificación. Para ello, necesitamos disponer de sendas rectas de calibrado que nos permitan relacionar las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma con las cantidades de GSH o GSSG presentes en la muestra problema inyectada. Para la realización de dichas rectas de calibrado utilizamos como estándares ambos compuestos comerciales por separado. Tanto dichos estándares como las muestras problema se trataron con NEM, con el fin de impedir la oxidación del GSH y su consiguiente conversión en GSSG durante el proceso cromatográfico, lo que se traduciría en evaluaciones erróneas en las concentraciones de ambas especies. Una vez tratadas las preparaciones con NEM, se sometieron a una precipitación de las posibles proteínas que pudieran llevar las muestras problema, con el fin de evitar que pudieran complicar el cromatograma resultante y dificultar su valoración.

El protocolo empleado es el siguiente: 500 μ l de la muestra a evaluar, y cuyo pH se ajusta a 7.0, se mezclan con 250 μ l de NEM 20 mM disuelta en un tampón fosfato 50 mM pH 7.0. La mezcla resultante se incubaba a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se habrá producido la alquilación del grupo SH de la molécula de GSH. A continuación se añaden 250 μ l de ácido perclórico (PCA) al 40 % (v/v), con lo que se conseguirá precipitar las proteínas presentes en la muestra. Tras centrifugar las mezclas resultantes durante 10 minutos en una Microfuga-E de Beckman, los sobrenadantes están en condiciones de ser inyectados en la columna de HPLC C_{18} .

En cada valoración se prepara de forma paralela un blanco en el que se sustituye la muestra por tampón fosfato 50 mM pH 7.0, y que sufre idéntico proceso que aquella. El cromatograma obtenido para dicho blanco se resta de todos los correspondientes a las muestras, antes de proceder a la cuantificación de GSH y GSSG.

Las rectas de calibrado de GSH y de GSSG se hicieron inyectando 20 μ l de diferentes disoluciones con concentraciones que oscilaban entre 0.005 y 0.5 mM. Las áreas de los picos se calcularon por integración. Las rectas de calibrado obtenidas para ambos compuestos se representan en la figura 16. Las ecuaciones resultantes tras ajustar los valores experimentales a la ecuación de una recta fueron las siguientes:

Para el GSH:

$$\text{Área} = 206.57 \cdot (\text{mmoles GSH/litro}) + 1.92 \quad (r = 0.9994) \quad [6]$$

Para el GSSG

$$\text{Área} = 85.79 \cdot (\text{mmoles GSSG/litro}) + 0.25 \quad (r = 9,9998) \quad [7]$$

Para evaluar el efecto que el tratamiento precipitante de proteínas pudiera tener sobre los resultados obtenidos en la cuantificación de GSH y GSSG, se prepararon varias mezclas que contenían 100 ml de una disolución de albúmina de suero bovino (BSA) 0.05 mM, en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7.0, y 400 μ l de una disolución que contenía distintas relaciones GSH/GSSG, dentro del intervalo empleado para la elaboración de las rectas de calibrado, y en el mismo tampón fosfato. A todas las mezclas resultantes se les aplicó el tratamiento de modificación con NEM, y posteriormente se dividieron en dos alícuotas, una de las cuales fue sometida al posterior tratamiento de precipitación

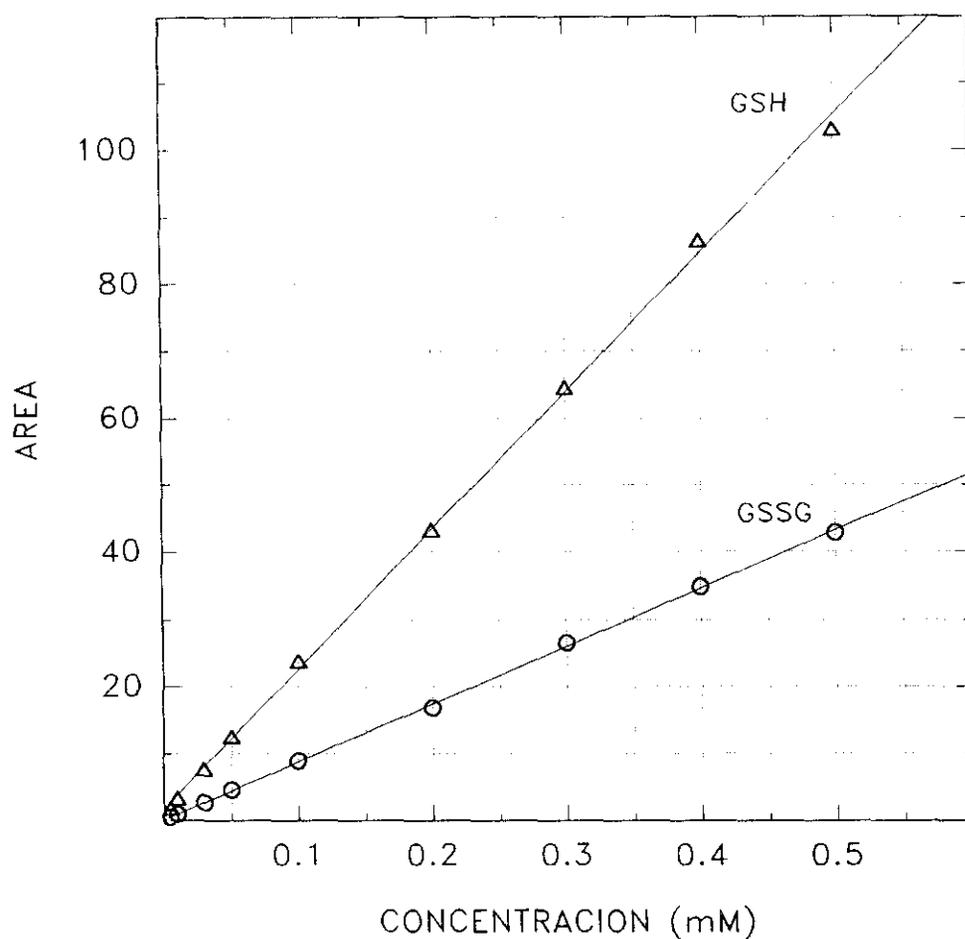


Figura 16. Rectas de calibrado que relacionan las cantidades de GSH y de GSSG aplicadas en la columna de fase reversa (C_{18}) Spherisorb ODS-2 (Symta), y las áreas de los picos correspondientes en los cromatogramas.

de proteínas. Todas las alícuotas se centrifugaron, tal y como se describió anteriormente, y de cada uno de los sobrenadantes obtenidos se aplicaron 20 μl en la columna C_{18} . Las áreas de los picos de GSH y GSSG resultantes se interpolaron en las rectas de calibrado. La comparación de las cantidades de ambas especies obtenidas para las alícuotas sometidas y no sometidas a precipitación de proteínas, permitió comprobar que este proceso no alteraba los resultados de cuantificación de GSH y de GSSG.

3.9 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

3.9.1 Espectros de absorción UV/VIS

Las medidas espectroscópicas, efectuadas de forma habitual a lo largo del presente trabajo, fueron realizadas en un espectrofotómetro Beckman DU-7, empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. De forma esporádica se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Uvicon-930 (Kontron).

3.9.2 Espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron en un dicrógrafo Jobin Yvon Mark III, equipado con una lámpara de xenón de 250 W, refrigerada por agua. El aire contenido en la cámara de muestra, en el sistema óptico y en la cámara del fotomultiplicador es desalojado mediante una corriente de N_2 mientras la lámpara permanezca encendida. Los registros fueron realizados en la región del UV lejano (200-250 nm) empleando cubetas de cuarzo, cilíndricas, de 0.05 cm de paso óptico. La velocidad de barrido era de 0.5 nm/s.

Los resultados se expresan como elipticidad molar por residuo (θ_{mwr}) en unidades de (grado $\text{cm}^2 \text{dmol}^{-1}$), y se calculan a partir de la expresión:

$$[\theta]_{MWR} = \frac{3300 \cdot S \cdot H \cdot MWR}{l \cdot c} \quad [8]$$

Donde H = diferencia en mm entre el registro de la muestra y el de su disolvente.

S = sensibilidad del registro, en unidades de absorbancia ($A_L - A_D$) por mm.

MWR = peso molecular promedio por residuo. Calculado para el complejo IR-RNasa a partir de su composición aminoácida (107.54).

l = paso óptico.

C = concentración de proteína, en mg/ml, calculada a partir de su medida espectrofotométrica.

Alícuotas de 300 μl de las muestras estudiadas fueron previamente dializadas por cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G 25 (PD-10, Pharmacia), a fin de eliminar su contenido en EDTA, que interfiere en la medida. Así mismo, esta diálisis sirve para eliminar el TNB presente en los estudios de oxidación por DTNB, el cual interfiere también negativamente.

A partir de los registros DC se realizaron análisis de estructura secundaria utilizando el programa "Convex Constrained Algorithm" de Fasman *et al.* (1993). Este algoritmo se basa en considerar que cada espectro DC de una colección de ellos, es la combinación lineal de una serie de espectros o curvas básicas correspondientes a las estructuras secundarias fundamentales. El algoritmo,

por tanto, busca cuáles de esas curvas puras está presente en cada espectro, y en qué proporción contribuye a él. Este cálculo lo lleva a cabo de forma inductiva, sin suposiciones, a priori, sobre la forma de los espectros DC correspondientes a las estructuras secundarias básicas.

En los estudios aquí recogidos, las curvas DC experimentales se descomponen en cuatro contribuciones básicas presentes en todas ellas, a la vez que se obtienen los pesos conformacionales de cada una de ellas. Las curvas puras obtenidas fueron asignadas a α -hélice, lámina β , giros β y ordenación aperiódica, por comparación con los espectros de dicroísmo de estas estructuras secundarias conocidas.

3.10 ESTUDIOS DE SECUENCIA AMINOÁCIDICA

Con el fin de establecer comparaciones, a nivel de secuencia aminoácida, entre el IR de testículo, purificado en este estudio, y el de hígado de cerdo, se procedió a secuenciación automática de los extremos N-terminales de los fragmentos resultantes en la hidrólisis por bromuro de cianógeno del IR de testículo. Los procedimientos experimentales empleados en estos estudios fueron los que se describen a continuación.

3.10.1 Reducción y carboximetilación

Se dializa una preparación de IR de testículo mediante cromatografía de filtración en gel en columnas comerciales de Sephadex G-25 (P-10, Sigma), frente a un tampón tris-HCl 0.576 M pH 8.6, EDTA 5.2 mM, urea 8 M, 2-mercaptoetanol 190 mM. Una vez reunidas las fracciones que contienen el IR, se gasea con N_2 la disolución y se mantiene a temperatura ambiente durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se añade a la preparación ácido iodoacético hasta una concentración final de 0.125 M, prolongando la incubación durante 20 minutos, a temperatura ambiente y en ausencia de luz. Tras este periodo se finaliza la modificación eliminando los reactivos mediante diálisis en la columna de Sephadex G-25. La elución se realiza con $(NH_4)HCO_3$ 50 mM. La muestra se liofiliza, recuperando así la proteína modificada, libre de sales y otros aditivos.

3.10.2 Hidrólisis con bromuro de cianógeno

Tras el tratamiento anterior, la proteína se redissuelve en ácido fórmico 70 %, hasta alcanzar una concentración de 1.5 mg/ml. El BrCN se añade, disuelto también en la misma solución ácida, en un exceso molar de 3000 veces sobre el IR. La mezcla de reacción se gasea con N_2 , y se mantiene la incubación por un periodo de 2 días, a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se procede a la liofilización de la preparación, para lo cual es preciso reducir la concentración de ácido fórmico por debajo del 3 % diluyendo con agua destilada (la dilución realizada fue 1:30). Sólo en las drásticas condiciones mencionadas fue posible obtener un rendimiento cuantitativo de la hidrólisis por el CNBr.

3.10.3 Separación de los péptidos mediante electroforesis PAGE-SDS

La mezcla de péptidos resultante tras la hidrólisis con CNBr se redissuelve en el tampón de aplicación de la electroforesis y se somete a PAGE-SDS en la forma convencional. Una vez finalizado el proceso, se visualiza el resultado mediante tinción negativa con zinc sin viraje. Una de las calles del gel se recorta en las posiciones ocupadas por los péptidos de interés, y los trozos de gel así obtenidos se someten a un proceso de electroelución.

3.10.4 Electrotransferencia

Las bandas recortadas se incuban en una disolución de ácido cítrico 2 % (p/v) durante 10 minutos. Este ácido tiene propiedades quelantes y es capaz, por tanto, de eliminar el zinc que está presente a lo largo del reticulado de poliacrilamida. Una vez realizada esta etapa, se incuban las bandas durante 15 minutos en el tampón en el que se va a desarrollar el proceso de electrotransferencia: tris-HCl 48 mM, glicocola 39 mM, SDS 0.375 % (p/v), en metanol 20 % (v/v).

La electroelución se realiza en un sistema NovaBlot (LKB 2117-250). Sobre el ánodo de grafito, saturado con agua destilada, se sitúan las unidades de transferencia. Dichas unidades se componen, cada una de ellas, de una banda del gel sobre una membrana de PVDF (Inmobilon-P, Millipore), rodeadas de cinco capas de papel de filtro por debajo y otras cinco por encima, todas con su mismo tamaño y forma, y humedecidas en el tampón de transferencia. La diferencia de potencial entre los electrodos se fija de forma que se mantenga una intensidad constante de 0.8 mA/cm² de gel. El proceso de electroelución se prolonga durante 75 minutos.

La membrana de PVDF se tiñe finalmente con azul de Coomassie, en unas condiciones ligeramente diferentes a las empleadas para la tinción de geles de poliacrilamida descritas. En concreto, la disolución de tinte contiene azul de Coomassie R-250 0.1 % (p/v) en metanol 40 % (v/v), ácido acético 1 % (v/v). La incubación en este medio se mantiene durante 1 minuto, tras el cual se procede al desteñido con metanol 50 % (v/v).

3.10.5 Secuenciación automática

Las bandas de péptido fijadas a la membrana de PVDF son sometidas a una degradación de Edman y a una posterior secuenciación automática de los extremos N-terminales de los péptidos CB1 y CB2. Para ello se empleó un secuenciador Applied Biosystems modelo 477 A. Los derivados feniltiohidantoin-aminoácido (Pth)-Xaa fueron identificados usando un analizador 120 A en línea, y el programa Applied Biosystems (Hewick *et al.*, 1981).

3.11 ESTUDIOS DE INTERCAMBIO TIOL-DISULFURO DEL COMPLEJO IR-RNasa A

Teniendo en cuenta que el objetivo de nuestros estudios es la molécula del complejo IR-RNasa y los posibles mecanismos redox que intervienen en su regulación, sometimos dicha molécula a una serie de tratamientos oxidantes, con el fin de evaluar los efectos en ella provocados. Los agentes oxidantes empleados fueron disulfuros, bien sintéticos, como el reactivo de Ellman (DTNB), bien naturales, como el glutatión oxidado (GSSG), la cistina o la cisteína. Con cualquiera de ellos la oxidación del complejo transcurre a través de intercambios tiol-disulfuro. El empleo del DTNB tiene su justificación en las favorables propiedades espectrofotométricas del mismo. Ello facilita el seguimiento del intercambio tiol-disulfuro que, a la larga, nos ha permitido modelizar la oxidación del complejo.

Asimismo, las muestras de complejo oxidadas se sometieron a tratamientos reductores posteriores, con el fin de estudiar la posible reversión de la oxidación provocada anteriormente. Los agentes reductores empleados fueron de dos tipos: reactivos químicos (DTT) o compuestos biológicos (GSH, cisteína y cisteína).

3.11.1 Oxidación por cantidades subestequiométricas de DTNB

Las disoluciones de complejo a tratar con el DTNB, eran dializadas previamente mediante cromatografía de penetrabilidad en columnas de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia), frente a un tampón tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, glicerol 15 % (v/v). En todo momento este tampón se mantiene saturado en argón por borboteo continuado de este gas inerte. El pH alcalino del tampón de diálisis asegura un eficaz intercambio tiol-disulfuro, al favorecer la formación del anión tiolato, que es el reactivo nucleofílico que desencadena el intercambio. La concentración de complejo tras la diálisis era de 10-12 μM . Las muestras así obtenidas se mantenían en viales cerrados herméticamente mediante válvulas minINERT, a través de las cuales se les introducía una presión positiva de argón (0.5 kg/cm²). Adicionalmente, siempre que fue posible, tales viales se conservaron en el interior de una cámara de ultrafiltración (diaflo, Amicon) bajo una presión positiva de 10 kg/cm² del mencionado gas inerte.

Las disoluciones de complejo con concentraciones 10-15 μM , se tratan a temperatura ambiente con sucesivas alícuotas DTNB, inyectadas en los mencionados viales a través de los septa de silicona de sus válvulas minINERT. En cada paso, la cantidad de DTNB añadida es subestequiométrica respecto al contenido en grupos tiol de la preparación de complejo. En concreto, se inyectaban 0.5 moles de DTNB por mol de complejo presente. El DTNB empleado se encuentra disuelto en un tampón fosfato 50 mM pH 7.0, y a concentraciones variables, en función de la que tuviera la muestra de complejo, de forma que resultara del orden de 100 veces más concentrada que ésta. Así, la adición de las sucesivas alícuotas no supone una dilución significativa en la preparación del complejo. Las reacciones de oxidación fueron seguidas espectrofotométricamente mediante el registro continuo de la A_{412} de una alícuota de la mezcla de reacción. Tras cada adición de DTNB, la reacción se da por finalizada una vez alcanzada la estabilización en las medidas de absorción.

Concluido cada paso de modificación, se estudia el efecto provocado en la molécula de complejo evaluando distintos parámetros:

- Número de grupos SH modificados por molécula de complejo. Este dato se calcula a partir del incremento en la A_{412} alcanzado, utilizando para ello un coeficiente de extinción molar para el TNB de 13600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Glazer *et al.*, 1985).
- Contenido en grupos tiólicos remanentes, en condiciones desnaturalizantes (SDS). El protocolo se describe en el apartado 3.5.
- Disociación del complejo en IR y RNasa libres. Este dato se calcula midiendo la cantidad de RNasa que aparece en forma libre, en el modo que se describe en el apartado 3.8.3.
- Inactivación del IR. Esta valoración se hizo de forma indirecta, midiendo la liberación de actividad ribonucleolítica. Para ello se utilizó el ensayo de actividad que emplea cCMP como sustrato (apartado 3.6.2).
- Alteraciones en la estructura secundaria del complejo, evaluadas mediante dicroísmo circular. Las condiciones empleadas se detallan en el apartado 3.9.2.

3.11.2 Oxidación por disulfuros biológicos en exceso

Las disoluciones de complejo a tratar siguen una preparación previa idéntica a la descrita en el apartado anterior para las muestras tratadas con DTNB. En primer lugar se dilalizan mediante

cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G 25 frente a un tampón tris-HCl 20 mM pH 8.0, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, glicerol 15 % (v/v). Las fracciones conteniendo el complejo se reúnen de forma que la concentración final alcanzada sea, en todos los casos, 12 μ M. De este modo, los resultados obtenidos en todos estos tratamientos serán directamente comparables.

Las oxidaciones se llevaron a cabo añadiendo el disulfuro en cuestión (GSSG, cistina o cistamina) en exceso sobre el contenido en SH de la preparación. Distintas alícuotas de complejo fueron incubadas con diferentes concentraciones de disulfuro, manteniendo las mezclas de reacción en viales herméticamente cerrados, en las mismas condiciones que las descritas en el apartado anterior. La evolución del tratamiento de oxidación se siguió midiendo la actividad ribonucleolítica liberada a lo largo del mismo, como consecuencia de la inactivación del IR. El ensayo utilizado fue el que se basa en el empleo de cCMP como sustrato.

Las concentraciones de los distintos disulfuros empleadas fueron seleccionadas en función de la velocidad con la que transcurría la reacción de oxidación en cada caso, de forma que el tratamiento lograra completarse en un espacio de tiempo no superior a 10 horas. Durante este tiempo podemos asegurar el mantenimiento de una atmósfera no oxidante en el medio de reacción. En concreto, las concentraciones utilizadas fueron las siguientes:

- GSSG: 5 mM, 10 mM, 15 mM y 20 mM.
- Cistina: 2.5 mM, 4 mM, 5 mM y 7 mM.
- Cistamina: 1 mM, 2.5 mM, 4 mM y 7 mM.

En el caso del GSSG, no se pudo alcanzar el punto final del tratamiento (activación de la totalidad de la RNasa presente en la preparación) puesto que para ello se precisan concentraciones de reactivo muy superiores a las utilizadas, dada la lentitud del proceso de oxidación que desencadena. Por limitaciones del ensayo de actividad ribonucleolítica utilizado, no fue posible el empleo de tales concentraciones (suponen una excesiva contribución a la A_{260} de la mezcla del ensayo, perdiéndose así la linealidad del mismo).

3.11.3 Reducción de preparaciones de complejo sometidas a tratamientos oxidantes

Preparaciones de complejo que fueron sometidas a tratamientos oxidantes, tanto con DTNB como con disulfuros biológicos (GSSG, cistina o cistamina), fueron posteriormente objeto de tratamientos reductores con DTT o con las correspondientes formas reducidas de aquellos disulfuros biológicos (GSH, cisteína o cisteamina), con objeto de intentar la reversión de las oxidaciones previas. Para ello, las disoluciones de complejo se dializaron mediante cromatografía de filtración en gel en columnas de Sephadex G 25 (PD10, Pharmacia). De este modo se conseguía eliminar los reactivos presentes en las muestras.

En el caso de las muestras tratadas previamente con DTNB, las incubaciones se hicieron empleando DTT 10 mM, y se llevaron a cabo con alícuotas con diferente grado de oxidación: 30 % y 100 % de modificación global de la mezcla de reacción.

Las muestras previamente oxidadas con los mencionados disulfuros biológicos, fueron sometidas a tratamientos reductores, tanto con DTT como con los compuestos biológicos GSH, cisteína y cisteamina, siempre en concentraciones de 10 mM. En estos casos, el intento de reversión fue hecho sobre muestras con un 30 % de oxidación global.

En todos los casos, las mezclas de reacción se mantuvieron en viales herméticamente

cerrados, con una presión positiva de argón de 0.5 kg/cm², y guardadas en un sistema de ultrafiltración bajo una presión de argón de 10 kg/cm². La evolución de la reacción fue seguida en el tiempo mediante ensayos de actividad ribonucleolítica, para lo que se empleó el ensayo que se basa en la utilización de cCMP como sustrato.

RESULTADOS

4.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL IR DE TESTÍCULO DE CERDO

El aislamiento y purificación del IR está fuertemente condicionado por la dependencia existente entre su actividad inhibidora y el estado reducido de sus grupos sulfhidrilo, así como por el carácter altamente hidrofóbico de la molécula. Estos condicionantes justifican la necesidad de incluir en todos los tampones agentes que preserven al IR de oxidación espontánea, como EDTA 2mM y 2-mercaptoetanol 10 mM o DTT 5 mM, así como agentes estabilizadores como el glicerol que, una vez la proteína en estado homogéneo, eviten su agregación y permitan su conservación a baja temperatura, sin congelarse.

El procedimiento seguido es, en líneas generales, el ya descrito con anterioridad para el IR de la misma procedencia (Cid, 1992), con dos salvedades:

- i) Repetición de la etapa de precipitación fraccionada con sulfato amónico, con el fin de conseguir un mayor grado de purificación en esta fase; esto permite disminuir los volúmenes de muestras manejados y, en consecuencia, reducir los tiempos de desarrollo de la siguiente etapa cromatográfica.
- ii) Supresión de la cromatografía en DEAE-celulosa. Tras la segunda precipitación fraccionada con sulfato amónico, el grado de purificación conseguido es 49 veces superior al descrito para dicha etapa cromatográfica; de este modo, podemos prescindir de ella, con el fin de no prolongar innecesariamente el proceso de aislamiento.

Tal y como ya ha sido descrito para el IR de testículo de cerdo (Cid, 1992), así como para inhibidores purificados de otras fuentes (Blackburn *et al.*, 1977; Burton y Fucci, 1982; Fominaya *et al.*, 1988a), se trata de una proteína presente en el citoplasma celular. Tras la homogeneización del tejido y la obtención de la fracción post-mitocondrial mediante centrifugación, el contenido en IR libre es del orden de 12-13 mg por kilogramo de tejido.

La fracción soluble celular es sometida a un doble proceso de precipitación fraccionada con sulfato amónico, entre el 30 y el 60% de saturación en ambos casos. La realización de una diálisis exhaustiva entre las dos precipitaciones, con el fin de garantizar el intervalo de saturación salina en la segunda de ellas, es de importancia crucial para obtener el máximo rendimiento.

La recuperación de IR tras esta doble precipitación fraccionada puede alcanzar el 79% del total presente en la fracción soluble. Junto a esta elevada recuperación, la principal ventaja de combinar dos precipitaciones fraccionadas en sustitución de la precipitación fraccionada seguida de cromatografía de intercambio iónico, se encuentra en la importante deslipidización que así se consigue. En efecto, uno de los inconvenientes del material biológico empleado, es su elevado contenido en grasa. De hecho, tras la primera precipitación con sulfato amónico, la redisolución del precipitado 30-60 % toma un aspecto turbio que dificulta las posteriores etapas cromatográficas y empobrece considerablemente su resultado. Ello es la consecuencia de la elevada concentración de material lipídico en suspensión. Sin embargo, cuando sobre esta suspensión se lleva a cabo la segunda etapa de precipitación fraccionada, la disolución que finalmente resulta al disolver el correspondiente precipitado 30-60 % tiene un aspecto transparente, indicando la ausencia de material lipídico en suspensión. En suma, se obtiene con esta doble precipitación una preparación mucho más adecuada para continuar el proceso de purificación, amén de proporcionar, como ya se ha mencionado, una purificación superior a la que se obtenía tras la cromatografía en DEAE-celulosa.

El material resultante de la doble etapa anterior, es ahora objeto de la etapa más crítica de

proceder con esta etapa, es preciso llevar a cabo una diálisis exhaustiva, con el objeto de poder asegurar las condiciones adecuadas para la unión del IR a la RNasa A anclada a Sepharose. Esta unión se lleva a cabo en un tampón fosfato sódico 45mM, pH 6.4. Valores de pH inferiores se traducen en uniones débiles del IR al soporte, mientras que valores superiores ocasionan uniones tan intensas entre el IR y la RNasa, que sólo pueden revertirse en condiciones desactivantes. Así, se precisa la destrucción del IR mediante reactivos bloqueantes de grupos sulfhidrilo, para la elución del inhibidor.

Un factor clave que determina la recuperación cuantitativa del IR y, por tanto, el éxito de esta etapa de purificación, es el grado de saturación alcanzado en el soporte cromatográfico antes de proceder a la elución. Para cada proceso de purificación de IR, se requiere montar una columna con un volumen de fase estacionaria que sea el mínimo para dar cuenta de la unión de todo el IR presente en el material que va a ser cargado. En ningún caso habrá de sobrepasarse este valor, ya que en cada una de estas etapas de cromatografía de afinidad la capacidad de unión de la fase estacionaria ha de quedar completamente saturada. Sólo así, con un lecho cromatográfico saturado, podremos garantizar rendimientos del orden del 88% en este proceso. Como es lógico, para poder trabajar en éstas condiciones, es necesario hacer una valoración de la capacidad de unión, cada vez que sea preparado un nuevo lote Sepharose-RNasa A. El valor promedio de capacidad de unión obtenido por nosotros para los diferentes lotes preparados fue de 90000 UI/ml de soporte.

La elución se lleva a cabo a temperatura ambiente, con un tampón acetato sódico 25 mM pH=5.5, NaCl 3 M, glicerol 30 %, DTT 5 mM. Sólo a partir de esta etapa cromatográfica, el 2-mercaptoetanol empleado en las primeras etapas del proceso de purificación es sustituido por el DTT, para aprovechar así el mayor poder reductor de este último. Razones de economía aconsejan no utilizar DTT en las primeras etapas, dados los mayores volúmenes que se manejan en éstas.

El procedimiento descrito conduce a la obtención del IR en un estado homogéneo, como lo pone de manifiesto la única banda que aparece en la posición correspondiente a un peso molecular de 50000 D en el gel de electroforesis PAGE-SDS que se muestra en la figura 1. EL rendimiento global de este proceso de aislamiento y purificación del IR de testículo de cerdo es de un 69%, tal como se recoge en la Tabla I que resume el protocolo seguido. Las preparaciones de IR puro presentan una actividad específica de aproximadamente 100.000 UI/mg de proteína, valor que concuerda con los descritos para los IR aislados de otras fuentes (Blackburn *et al.*, 1977; Burton y Fucci, 1982; Fominaya *et al.*, 1988a).

Si una elevada fuerza iónica y un pH próximo a su pI permitieron la elución del IR en la cromatografía de afinidad, un medio de tales características no resulta ser el más adecuado para el almacenamiento de una proteína que, como el IR, presenta un carácter marcadamente hidrofóbico. En efecto, cuando el IR se encuentra en concentraciones del orden de mg/ml, su elevada tendencia a la agregación se pone de manifiesto durante su manipulación y almacenamiento. La agregación llega incluso a hacerse evidente conforme progresa, y, una vez agregado, no es posible recuperar la forma monomérica del IR en su estado activo. Como resultado de lo anterior, en el transcurso de pocas horas después de eluir el IR de la cromatografía de afinidad podemos perderlo en su totalidad en aquellas fracciones donde alcanza sus valores más elevados de concentración.

Es por este motivo por lo que, una vez han terminado de eluir, cada una de las fracciones de la cromatografía de afinidad es inmediatamente dializada mediante cromatografía de filtración en gel. Para ello se utilizan sendas columnas de Sephadex G-25 (PD-10, Pharmacia) equilibradas en tampón Tris pH 6.5, NaCl 25mM, glicerol 15%. Las fracciones recogidas tras los procesos de diálisis son reunidas en función de la concentración de IR.

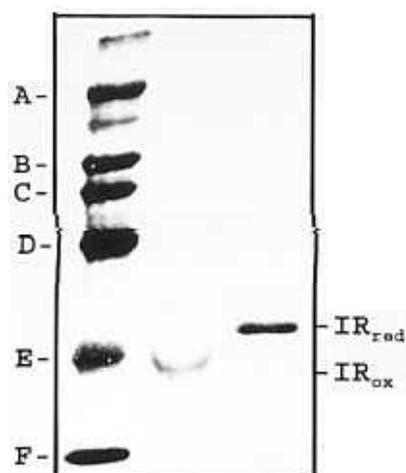


Figura 1. Electroforesis en gel de acrilamida en presencia de SDS de IR de testículo de cerdo purificado según el procedimiento descrito en el apartado 1. Las muestras aplicadas son: calle 2, IR sometido a calentamiento a 100°C durante 5 minutos en ausencia de agentes reductores; calle 3, IR calentado en presencia de 2-mercaptoetanol 5%; calle 1, proteínas de peso molecular conocido: miosina (205 kD), β-galactosidasa (116 kD), fosforilasa B (97.4 kD), albúmina de suero (66 kD), ovoalbúmina (45 kD) y anhidrasa carbónica (29 kD).

ETAPA	PROTEINA (mg)	INHIBIDOR (UI)	ACT. ESPEC. (UI/mg)	RENDIMIENTO (%)	PURIFICAC. (veces)
Fracción celular soluble	41605	1300000	31	100	1
1 ^a Precipitac. sulfato amónico	9346	1233800	132	95	4
2 ^a Precipitac. sulfato amónico	37	1028000	27783	79	889
Sepharosa-RNasa A	9.1	908000	99780	70	3210

Tabla III. Purificación del IR de testículo de cerdo. Los datos presentados corresponden a la purificación de 1 kg de material biológico siguiendo el protocolo descrito en "Parte Experimental". Las valoraciones de las etapas de precipitación con sulfato amónico se hicieron sobre los precipitados 30-60 % redissueltos en el tampón de la etapa siguiente del proceso de purificación.

Al igual que hiciéramos con el tampón de elución de la cromatografía de afinidad, el tampón empleado para las diálisis en Sephadex G-25 es previamente desgasificado en trompa de vacío y posteriormente gaseado con argón. El IR, almacenado a 4°C en viales herméticos, y gaseado periódicamente con argón, puede mantener su actividad bajo estas condiciones durante meses.

La recuperación del IR tras el proceso de diálisis es del orden del 95%.

4.2 FORMACIÓN DEL COMPLEJO

Como ya se ha mencionado, nuestros estudios parten de la hipótesis de que la RNasa presente en el citoplasma celular se encuentra en forma de complejo con el IR endógeno. Es sobre esta especie molecular sobre la que se ejercerían todos los mecanismos de regulación, que llevan a adecuar la actividad del sistema en estudio a los requerimientos fisiológicos de la célula en cada momento.

Por lo tanto, nuestro objetivo de analizar los mecanismos implicados en la regulación de la subunidad IR en el complejo mencionado, nos plantea la necesidad de disponer del mismo. Así, se ha trabajado con preparaciones de complejo reconstituido a partir del IR purificado de testículo de cerdo y RNasa A. Son varios los motivos que nos han llevado a la utilización de la RNasa A, o ribonucleasa pancreática, para la formación de estos complejos. i) el elevado grado de similitud existente entre esta ribonucleasa y las RNasas alcalinas citoplasmáticas sobre las que el IR ejercería su función *in vivo*; ii) el gran conocimiento acumulado sobre la RNasa A, y iii) la disponibilidad comercial de la misma en preparaciones de un elevado grado de pureza. De hecho, tales argumentaciones son igualmente válidas para los estudios que hasta la fecha se han realizado sobre la interacción de otros IR de mamíferos. Tales estudios se han centrado también en el empleo de RNasa A como enzima modelo.

Cuando el IR obtenido por el procedimiento descrito pretende utilizarse para la obtención de complejo reconstituido, es aconsejable hacerlo reaccionar con la RNasa A tan pronto como resulte posible después de su elución de la cromatografía de afinidad. De esta forma se puede obtener provecho de la mayor estabilidad frente a la agregación del complejo IR-RNasa en comparación con el IR libre. Con tal propósito, una vez que el IR ha eluido de la cromatografía de afinidad, y previamente a la diálisis en Sephadex G-25, se determinan los moles de IR presentes en cada fracción, a partir de su espectro de absorción UV/VIS, el coeficiente de extinción del IR ($E^{0.1\%}_{280} = 0.87$), y un valor de 50 kDa como su masa molecular. Teniendo en cuenta la estequiometría 1:1 de la unión, se añade a cada tubo un ligero exceso molar de RNasa A que dé cuenta de la unión de todo el IR presente. De este modo, podemos asegurar que no existe inhibidor libre en las preparaciones resultantes. Por supuesto, antes de proceder a la realización de los estudios de que va a ser objeto la molécula de complejo, se ha de eliminar el exceso de RNasa A.

4.2.1 Eliminación del exceso de RNasa A

El procedimiento seguido se basa en una cromatografía de intercambio catiónico en sulfopropil MA7S (BioRad) a pH neutro.

Debido a la diferencia existente entre la carga neta del complejo (de carácter ácido por el predominio del carácter ácido del IR, cuya masa es 3.5 veces superior a la de la RNasa) y la de la RNasa A (de carácter básico), ambas moléculas pueden ser separadas mediante una cromatografía de intercambio iónico, cubriéndose así el objetivo perseguido. Se prefirió emplear un intercambiador de cationes, porque en él la RNasa A queda retenida en las condiciones iniciales de carga de la muestra (0 M NaCl), mientras que el complejo IR-RNasa resulta excluido. Este hecho se traduce en una mínima dilución del complejo durante el proceso cromatográfico. Concretamente, se puede recuperar una disolución de complejo conteniendo el 85% del total cargado (se desprecian las fracciones extremas del pico), con una concentración 1.6 veces inferior a la inicial. En la figura 18 se representa un cromatograma tipo, en el que se aprecia la aparición del complejo a los 0.8 minutos de la inyección de la muestra (lo que supone un volumen de elución de 1.2 ml que coincide con el volumen de elución del material no retenido), y en forma de un pico muy agudo. Por su parte, la RNasa A eluye a un tiempo de 4.2 minutos, lo que corresponde a una fuerza iónica de 0.135 M NaCl.

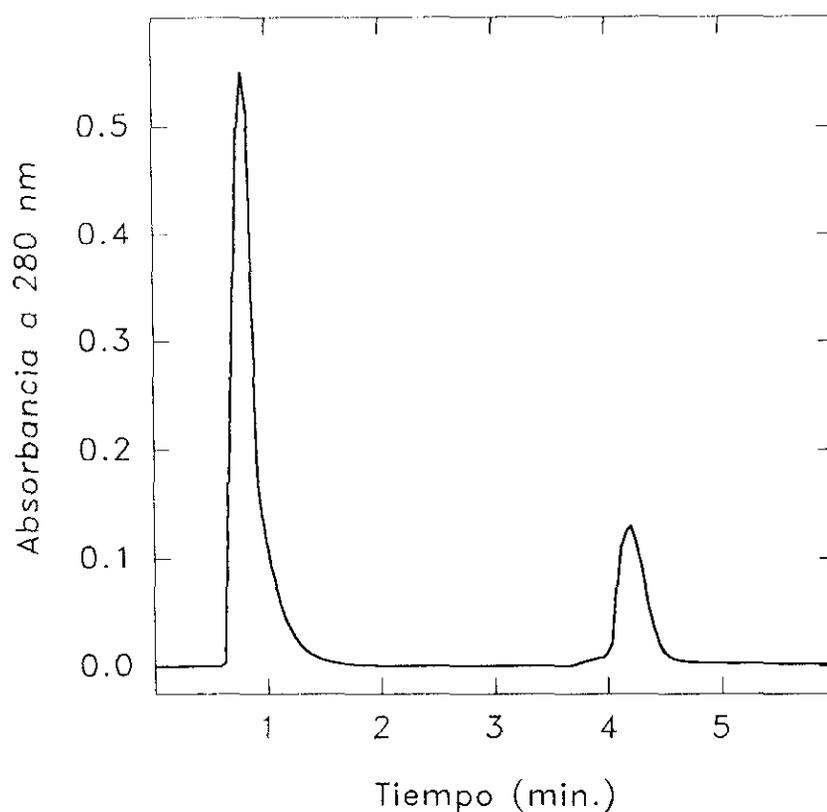


Figura 18. Cromatografía de intercambio catiónico en una columna MA7S (BioRad), en la que se aplicó una preparación conteniendo complejo IR-RNasa A junto con un exceso de RNasa A. Las condiciones de elución fueron las descritas en el apartado 3.8.1 de "Parte Experimental". El complejo resulta excluido, a 0.8 minutos de la inyección de la muestra. La RNasa A, por el contrario, queda retenida, eluyendo a 4.2 minutos.

4.3 COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS

La composición de aminoácidos del IR fue evaluada tras someter la proteína a hidrólisis ácida. Las determinaciones se llevaron a cabo sobre cinco muestras de diferentes concentraciones, e hidrolizadas a tres tiempos diferentes: 24, 48 y 72 horas. Ello permitió, en los casos que así lo requirieron, extrapolar a tiempo cero los valores de aquellos aminoácidos que sufren degradación parcial durante la hidrólisis ácida.

Los residuos de 1/2 cistina fueron evaluados en forma de ácido cisteico, para lo cual, y previamente a la hidrólisis, el IR se oxidó con ácido perbórmico. El análisis de aminoácidos en estas condiciones reveló la presencia de 30 residuos. Por otro lado, la determinación del número de estos residuos presentes en la molécula en forma reducida, como cisteínas, se efectuó utilizando el reactivo de Ellman (DTNB), y SDS como agente desnaturalizante. A partir de la medida de A_{412} del TNB liberado, y utilizando como valor del coeficiente de extinción molar del mismo $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, se pudo comprobar que el total de los 30 residuos se encuentran en forma reducida en el IR nativo; es decir, el IR nativo carece de puentes disulfuro.

La determinación del contenido en triptófanos se llevó a cabo por métodos espectrofotométricos (Tabla IV).

Método de Beaven y Holiday				
$A_{294.4}$	$A_{280.0}$	$M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}}$	Nº Trp	
0.211	0.297	1.11	3.6	
Método de Bencze y Schmid				
a/b	S	D_{max}	$M_{\text{Tyr}}/M_{\text{Trp}}$	Nº Trp
-4.245×10^{-4}	-5.44	0.078	0.75	5.3

Tabla II. Determinación del contenido en triptófano del IR de testículo de cerdo, mediante el empleo de métodos espectrofotométricos.

La Tabla V recoge la composición de aminoácidos obtenida para el IR de testículo de cerdo, junto a las de IRs purificados de otras fuentes. El número de cada uno de los aminoácidos presentes en la molécula de IR de testículo de cerdo fue calculado a partir del dato de peso molecular (50 kDa) obtenido mediante PAGE-SDS. La composición de aminoácidos así obtenida para el IR de testículo de cerdo, resulta ser prácticamente idéntica a la ya descrita para el IR de hígado de la misma procedencia (Hofsteenge *et al.*, 1988a). Aunque las similitudes con los otros IR descritos y purificados de otras fuentes no son tan marcadas, las diferencias siguen siendo pequeñas, manteniéndose las mismas características generales que definen a estas moléculas. Hay que destacar la gran hidrofobicidad (contiene un 21.49 % de leucinas y un 1.97 % de isoleucinas), así como el elevado contenido en cisteínas (30, lo que supone un 6.58 % del total de residuos). En el IR de testículo de cerdo, al igual que en el hígado de cerdo, no existen fenilalaninas, al contrario de lo que ocurre con el resto de los inhibidores purificados, donde el número varía entre 3 y 7 (Burton *et al.*, 1980; Burton *et al.*, 1982; Blackburn *et al.*, 1977).

Aminoácido	FUENTE									
	Testículo cerdo ^a	Testículo rata ^{a,1}	Hígado cerdo ^{b,c,2}	Hígado rata ^{a,3}	Hígado ratón ^{a,3}	Hígado ovino ^{a,3}	Hígado bovino ^{a,3}	Placenta humana ^{b,4}	Cerebro bovino ^{a,5}	HeLa humanas ^{b,6}
Asx	40	55	40	59	55	48	47	44	43	44
Glx	59	61	60	60	63	62	62	59	65	59
Ser	38	42	38	43	43	42	45	45	40	46
Gly	37	40	37	33	33	51	47	32	53	32
His	7	7	7	6	3	5	6	5	5	5
Arg	22	23	22	20	19	20	19	24	20	23
Thr	23	25	23	23	22	19	21	13	20	13
Ala	32	30	32	29	30	35	37	32	38	32
Pro	17	15	16	17	16	17	15	14	18	14
Tyr	4	8	4	5	5	4	5	3	5	3
Val	19	20	19	22	20	23	24	25	22	25
Met	2	2	2	2	3	1-2	2	2	2	2
Ile	9	13	9	10	13	10	9	12	9	12
Leu	98	66	98	89	94	92	91	92	88	92
Phe	0	7	0	5	3	4	4	4	3	4
Lys	14	18	14	20	21	15	14	16	15	16
Cys	30	31	30	31	26-27	27	30	32	30	32
Trp	4-5	ND	5	5	5	6	5	6	5	6
TOTAL	456-457	-	456	479	475	482	483	460	481	460

Tabla V. Composición de aminoácidos de IR de testículo de cerdo, calculada por análisis de aminoácidos, junto con la de IR de otras procedencias.

- a) Calculada por análisis de aminoácidos.
b) Calculada por secuencia de aminoácidos.
c) Idéntica a la de riñón de cerdo.
1) Fominaya *et al.*, 1988a.
2) Hofsteenge *et al.*, 1988.
3) Burton y Fucci, 1982.
4) Lee *et al.*, 1988.
5) Burton *et al.*, 1980.
6) Schneider *et al.*, 1988.

4.4 ESTRUCTURA PRIMARIA PARCIAL

Como se ha comentado, ya ha sido aislado y purificado otro IR de origen porcino, concretamente el procedente de hígado. Este inhibidor presenta una composición de aminoácidos extraordinariamente similar a la obtenida para el IR de testículo (Tabla V). Este hecho nos hizo pensar en una posible identidad molecular entre ambas, lo que no resultaría sorprendente dado el origen común de los órganos empleados. La confirmación de dicha identidad resultaba de especial interés, *dado que la secuenciación del IR de hígado fue publicada en el curso del presente trabajo de investigación.*

Para comprobar la posible identidad entre ambos inhibidores de cerdo, se pensó en comparar las secuencias N-terminales de las dos moléculas. Para ello, el IR de testículo fue sometido a una degradación automática de Edman, obteniéndose un resultado negativo. Ello, que indicaba que el residuo que ocupa la posición N-terminal en el IR de testículo se encuentra bloqueado, constituía ya un primer indicio a favor de la identidad de ambas moléculas, ya que en el IR de hígado tal residuo, *una metionina, se encuentra acetilado. El bajo número de residuos de metionina (2) que tiene el IR de testículo hizo aconsejable proceder a su hidrólisis química con CNBr, ya que sólo sería de esperar un máximo de tres fragmentos como resultado del mismo. La posterior separación de estos fragmentos habría de proporcionar dos extremos N-terminales que, una vez secuenciados automáticamente, podrían suministrar datos de secuencia suficientes como para establecer la comparación que se buscaba. En el caso de que, como en el IR de hígado, una de tales metioninas fuese el residuo N-terminal, el resultado de tal hidrólisis con CNBr sería, a efectos prácticos, como si se hubiese eliminado el bloqueo del extremo N-terminal del IR, ya que uno de los tres fragmentos resultantes del tratamiento sería simplemente N-acetil-homoserina.*

En definitiva, aún cuando el bloqueo del extremo N-terminal del IR de testículo fue, en primera instancia un resultado negativo, nos obligó a llevar a cabo el mencionado tratamiento con CNBr que, a la postre, nos había de permitir establecer la comparación de secuencias entre ambos IR, no sólo a nivel del extremo N-terminal de la molécula, sino también en porciones internas de la misma. De pasada, tal ruptura con CNBr brindaba la posibilidad de analizar electroforéticamente el patrón de péptidos resultantes, y comprobar así si resultaba coincidente cualitativa y cuantitativamente con el que se obtiene cuando el IR de hígado se somete al mismo tratamiento (Hofsteenge *et al.*, 1988).

En la figura 20 se muestra el resultado de tal análisis mediante PAGE-SDS. El patrón electroforético obtenido está compuesto por dos péptidos de 36000 y 14000 Da, que llamaremos CB1 y CB2 respectivamente. Se trata de un patrón esencialmente idéntico al obtenido para el IR de hígado sometido al mismo tratamiento.

Con vistas a la secuenciación de los extremos N-terminales de estos péptidos, se llevaron a cabo electroforesis en gel de las anteriores mezclas, y se procedió a su electroelución a membranas de inmobilón de Millipore (PVDF). A tal electroelución sólo se sometieron aquellas porciones del gel en que se localizaban los péptidos de interés, lo cual fue posible porque los geles habían sido previamente teñidos por un procedimiento compatible con la electroelución; en concreto, un método optimizado de tinción negativa con zinc. La optimización de este método de tinción negativa, así como su transformación en un método de tinción permanente, han sido objeto de estudio en el curso de la investigación que recoge la presente Memoria, y como tal, será tratado en un apéndice al final de la misma.

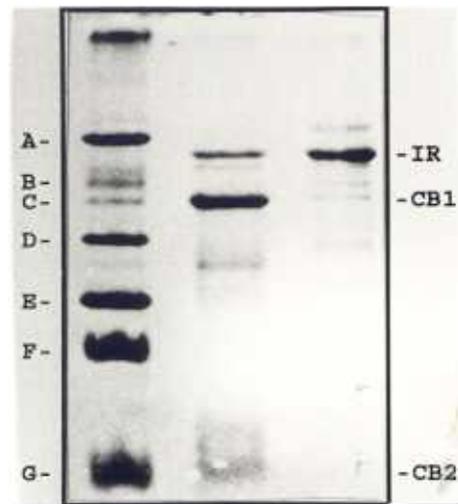


Figura 20. Electroforesis en gel de poliacrilamida, en presencia de SDS. Las muestras aplicadas fueron las siguientes: **calle 1** proteínas de peso molecular conocido, en concreto, albúmina de suero (66 kD), ovoalbúmina (45 kD), gliceraldehído-3-P DHasa (36 kD), anhidrasa carbónica (29 kD), tripsinógeno (24 kD), inhibidor de tripsina (20.1 kD) y α -lactalbúmina (14.2 kD). **Calle 2** IR de testículo de cerdo sometido a degradación con CNBr. **Calle 2** Muestra de IR de nativo. El gel fue teñido con azul de Coomassie.

Los péptidos CB1 y CB2, una vez electroeluidos e inmovilizados en las membranas de PVDF se sometieron a secuenciación automática, obteniéndose para cada uno de ellos las secuencias que a continuación se especifican:

CB1: Asn-Leu-Asp-Ile-Cys-Glu-Gln-Leu

CB2: Leu-Thr-Gln-Asn-Lys-His-Leu-Leu-Glu-Leu-Gln-Leu

En la figura 21, estas secuencias se han alineado dentro de la secuencia completa del IR de hígado. Se puede comprobar la identidad de las mismas con la de los respectivos fragmentos N-terminales de los péptidos CB2 y CB3 obtenidos por hidrólisis del IR de hígado de cerdo (Hofsteenge *et al.*, 1988)). Todos estos datos proporcionan una fuerte evidencia sobre la identidad de ambas moléculas de IR, máxime si tenemos en cuenta que la región N-terminal de la proteína resulta ser la de mayor variabilidad entre los IR aislados de distintas fuentes.

4.5 INHIBICIÓN DE LA RNasa POR EL IR DE TESTÍCULO: ESTUDIOS CINÉTICOS

Como ya fue descrito por nuestro grupo (Fominaya *et al.*, 1988b), el estudio cinético de la inhibición ejercida por el IR no se puede llevar a cabo de forma clásica (representaciones de Lineweaver-Burk para la clasificación del tipo de inhibición y de Dixon para el cálculo de la K_i). En efecto, estos tratamientos clásicos de la inhibición enzimática parten del supuesto de que la concentración de inhibidor en el medio de reacción es, como la concentración de sustrato, muy superior a la concentración de enzima. Hecha esta suposición, se puede asumir en los tratamientos matemáticos subyacentes que la concentración de inhibidor libre es aproximadamente igual a la concentración total de inhibidor empleado. No es este el caso del IR, cuya alta eficacia inhibitoria se pone de manifiesto en que la sola presencia de cantidades de IR equimolares a las de RNasa conducen a una inhibición casi completa de la actividad ribonucleolítica, siendo además la concentración de IR asociado, no la libre, la que es aproximadamente igual a la concentración de IR total empleado.

```

1
MNLDIHCEQLSDARWTELLPLLQQYEVYR
MNLDIHCEQL
30 LDDCGLTEEHCKDIGSALRANPSLTELCLRTNELGDAGVHLVLQGLQSPPTCKIQKLS
87 LQNCSLTEAGCGVLPSTLRSLPTLRELHLSDNPLGDAGLRLLCEGLLDPOCHLEKLO
144 LEYCRLTAASCEPLASVLRATRALKELTVSNNDIGEAGARVLGQGLADSACQLETLR
201 LENCGLTPANCKDLGGIVASOASLRELDLGSNGLGDAGIAELCEGLLSPASRLKTLW
258 LWECDITASGCRDLCRVLQAKETLKELSLAGNKLGDGARLLCESLLQPGQLESWM
315 YKSCSLTAACCOHVSLMLTQNKHLELEQLSSNKLGDSGIOELCQALSQPGTTLRVLC
      LTONKHLELEQL
372 LGDCEVTNSGCSSLASLLLANRSLRELDLSNNOVGDPGVLQLLGSLEQPGCALEQLV
429 LYDTYWTEEEVEDRLQALEGSKPGLRVIS
      456

```

Figura 21. Estructura primaria del IR de hígado de cerdo completa, en la que se han alineado las secuencias N-terminales de los péptidos CB1 y CB2 del IR de testículo de cerdo.

Los inhibidores enzimáticos que muestran esta elevada eficacia inhibitoria, reciben el nombre de inhibidores de alta afinidad o de "unión estrecha" (tight binding inhibitors), para así hacer referencia a que su elevada eficacia inhibitoria es la consecuencia de su particularmente alta constante de asociación con la enzima.

En términos de las constantes de inhibición (K_i) que se calculan por los procedimientos cinéticos convencionales (equivalentes a constantes de disociación, cuyo valor se expresa en unidades molares), los inhibidores de alta afinidad se caracterizan por presentar K_i especialmente bajas. Para la valoración de las K_i de este tipo de inhibidores se han desarrollado una serie de procedimientos gráficos (Dixon, 1972) o algebraicos (Henderson, 1972; Morrison, 1982) que toman en consideración sus peculiaridades.

Los IR constituyen una clase aún más especial dentro de los inhibidores de alta afinidad. En ellos la K_i es mucho menor que las concentraciones de enzima empleadas en su ensayo. Ello limita o incluso imposibilita el cálculo de su K_i por los procedimientos puestos a punto para los inhibidores de alta afinidad. Nuestro grupo desarrolló un método para el cálculo de la K_i en este caso tan especial, en el cual se considera que la interacción del IR con la RNasa es tan potente que no llega a establecerse ningún tipo de competición de aquel con el sustrato por su unión a la enzima. En definitiva, que primero se establece el equilibrio del IR con la RNasa, tras lo cual, la cantidad de RNasa que queda libre se comporta del modo michaeliano normal en su catálisis. Se llega así a demostrar que para diferentes concentraciones de IR en el medio de ensayo, la velocidad de reacción en presencia del inhibidor relativa a la velocidad en su ausencia obedece a la siguiente ecuación:

$$V' = \frac{V}{V_0} = 1 - \frac{1}{p \cdot [E]_t} \cdot i + \frac{K_i}{[E]_t} \cdot \frac{i}{1-i} \quad [9]$$

donde i es el porcentaje de inhibición que se alcanza con las diferentes concentraciones de inhibidor ensayadas, p es la pendiente de la recta de calibrado que relaciona el porcentaje de inhibición, i , con la concentración de IR, y $[E]_t$ es la concentración total de enzima ensayada.

Por tanto, para poder calcular K_i utilizando esta ecuación, se han de realizar una serie de estudios cinéticos en los que, para una concentración de enzima conocida, se determine la velocidad inicial de reacción y el porcentaje de inhibición, para diferentes concentraciones de inhibidor en el medio.

El ensayo enzimático utilizado para estas determinaciones es el que emplea RNA como sustrato. Puesto que para el cálculo de la K_i es preciso trabajar con valores de velocidad inicial, se hace necesario definir en qué intervalo de tiempo la producción de oligonucleótidos + mononucleótidos a partir del RNA sustrato se mantiene lineal (tramo lineal de la curva A_{260} vs tiempo). La pendiente de este tramo lineal puede, entonces, ser considerada como una buena medida de velocidad inicial. Para ello, se evaluó la actividad enzimática a diferentes concentraciones de sustrato y a diferentes tiempos de incubación (figura 22). Se optó por considerar como velocidad inicial la pendiente de la curva de actividad entre 0 y 4 minutos de reacción, zona en la que se conserva la linealidad del ensayo.

Utilizando un valor de p de 30.61 (figura 23) y ajustando los pares de datos experimentales (V/V_0 , i) a la ecuación [9] mediante regresión no lineal, se pudo determinar un valor de $9.09 \cdot 10^{-13} \text{ M} \pm 1.46 \cdot 10^{-13} \text{ M}$ para la K_i del IR de testículo de cerdo (figura 24).

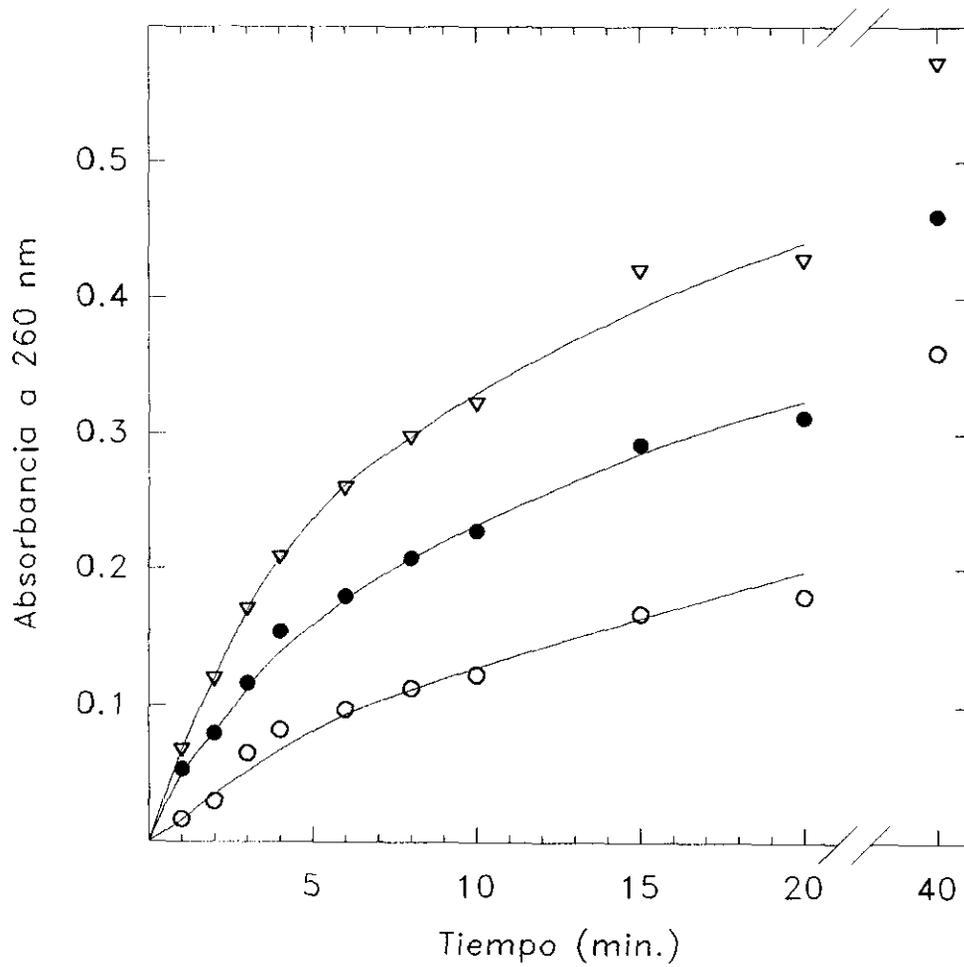


Figura 22. Ensayos de actividad ribonucleolítica, a diferentes tiempos de incubación. Los estudios se llevaron a cabo para distintas concentraciones de sustrato, RNA. Las condiciones del ensayo se especifican en el apartado 3.6.1 de "Parte Experimental".

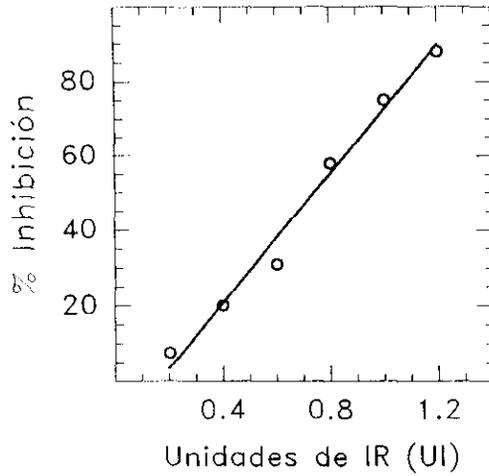


Figura 23. Curva que relaciona la cantidad de IR ensayado (expresada en unidades de actividad) y el porcentaje de inhibición que ocasiona en los 8 ng de RNasa A añadidos a la mezcla de reacción (i). El ensayo de actividad utilizado es el que emplea RNA como sustrato. La pendiente del tramo lineal nos da el valor de p (30.61).

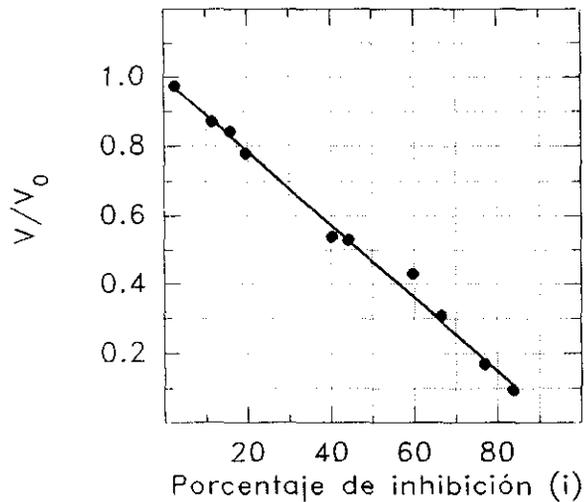


Figura 24. Representación de los pares de valores V/V_0 vs i experimentales (en símbolos). La recta dibujada corresponde a la representación teórica de la expresión [9]. Los ensayos de actividad fueron hechos empleando RNA como sustrato.

4.6 OXIDACIÓN DEL IR E INACTIVACIÓN: Estudios electroforéticos

Ya ha sido comentada la dependencia existente entre la actividad del IR y el estado reducido de sus grupos sulfhidrilo. El elevado número de grupos SH de la molécula IR, junto a su relativa facilidad de oxidación ambiental, imponen severos condicionantes para el mantenimiento del IR funcionalmente activo. Con más frecuencia de lo deseable, las preparaciones de IR almacenadas cuya atmósfera reductora o no oxidante se haya visto accidentalmente degradada, pierden completa o parcialmente su actividad.

Los estudios realizados en el sentido de recuperar la actividad inhibidora sometiendo estas preparaciones de IR inactivo a condiciones reductoras (diálisis frente a 300 volúmenes con tres cambios de 2-mercaptoetanol, DTT o borohidruro sódico 50 mM, durante dos días) no proporcionaron resultados positivos en ningún caso.

El análisis electroforético de tales preparaciones de IR inactivo demuestra que en ellas el IR se encuentra en estado monomérico (figura 25, calle 2), con una movilidad electroforética anómala, correspondiente a un peso molecular aparente de 41 kDa. Al mismo resultado se llega cuando preparaciones de IR nativo se someten previamente a tratamiento oxidante con DTNB o a desnaturalización térmica (figura 25, calles 3 y 5). Este comportamiento anómalo del IR monomérico debe ser interpretado como la consecuencia de la formación de puentes disulfuro intracatenarios, los cuales impiden el completo desplegamiento del IR cuando se le une el SDS del tampón de aplicación. Por tanto, el volumen hidrodinámico que ocupa el complejo IR_{oxidado}-SDS es menor que el del IR_{reducido}-SDS y, consiguientemente, la movilidad relativa de aquél mayor que la de este.

En el caso de la oxidación del IR por el DTNB, o de su desnaturalización térmica, dependiendo de las condiciones experimentales, la oxidación puede llegar a ser tan drástica que la especie resultante sea el IR agregado incapaz de penetrar en el reticulado de poliacrilamida (figura 25, calles 4 y 6).

Sea con IR oxidado de elevada movilidad electroforética, sea con IR agregado de baja movilidad, el tratamiento reductor con DTT o 2-ME previo a la electroforesis, regenera la especie de IR reducido, cuyo peso molecular es de 50 kDa (figura 25 calles 7, 8 y 9). Sin embargo, en ningún caso se restituye igualmente la actividad inhibidora. El sulfito, otro agente capaz de romper los puentes disulfuro, tampoco consigue revertir la inactivación del IR; en este caso, no se recupera ni siquiera la movilidad electroforética del IR reducido (figura 25, calle 10). Ello indica que este agente es incapaz de acceder a los puentes disulfuro del IR oxidado, lo que debe atribuirse a su carga negativa, que introducirá importantes repulsiones electrostáticas, dado el carácter ácido del IR.

De lo anterior parece claro que la inactivación del IR por oxidación no es una consecuencia directa de la modificación de sus grupos sulfhidrilo. De ser así, habría que esperar que tal inactivación fuese reversible, en la misma medida en que es posible reducir los puentes disulfuro hasta las correspondientes formas tiólicas. Es evidente que el estado conformacional del IR es el que ejerce un papel clave, y que tal estado conformacional sí que parece mostrarse dependiente del estado de óxido-reducción del IR. La reversibilidad en la inactivación del IR estaría indicando que, una vez que el IR pierde su estado conformacional nativo, ya no puede recuperarlo por la simple restitución del estado rédox de sus grupos SH.

Las anteriores afirmaciones plantean algunas interrogantes en cuanto a la importancia de estos procesos de inactivación/oxidación en la regulación fisiológica del IR y, por tanto, de la actividad ribonucleolítica. Es, cuando menos, arriesgado concluir de los anteriores datos que la actividad del

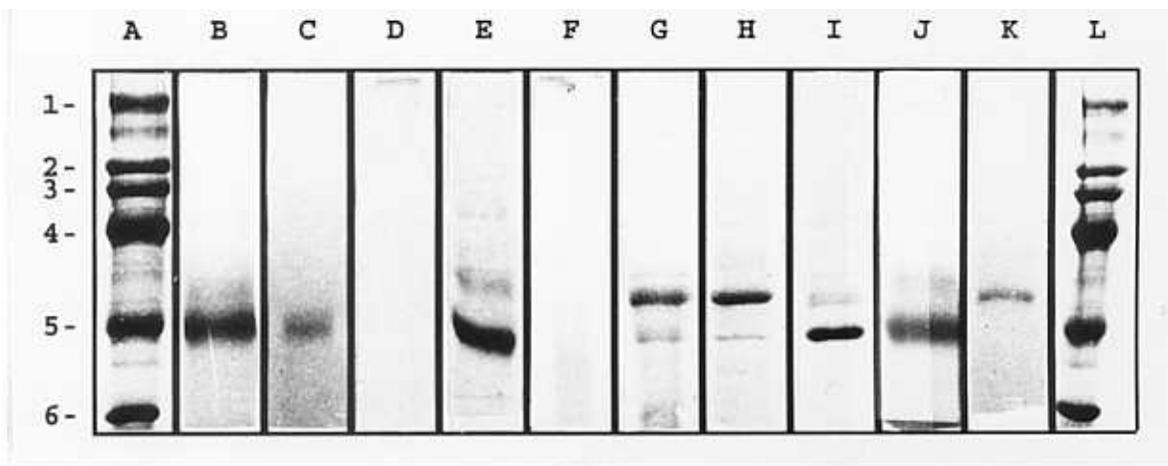


Figura 25. Composición de distintas calles correspondientes a diferentes geles de poliacrilamida en presencia de SDS. Las muestras aplicadas en cada una de ellas fue: **(1)** mezcla de proteínas patrón compuesta por miosina (205 kD), β -galactosidasa (116 kD), fosforilasa B (97.4 kD), albúmina de suero (66 kD), ovoalbúmina (45 kD), y anhidrasa carbónica (29 kD). **(2)** IR inactivado por oxidación ambiental. **(3)** IR (0.1 mg/ml) oxidado con DTNB. **(4)** IR (1 mg/ml) oxidado con DTNB. **(5)** IR desnaturalizado por calentamiento a 100°C durante 5 minutos. **(6)** IR desnaturalizado por calentamiento a 100°C durante 30 minutos. **(7)** IR oxidado tratado con DTT 50 mM. **(8)** IR oxidado con DTNB y posteriormente reducido con DTT 50 mM. **(9)** IR desnaturalizado térmicamente (100°C, 15 minutos) reducido con DTT 50 mM. **(10)** IR oxidado con DTNB y tratado posteriormente con sulfito sódico 50 mM **(11)** IR oxidado con DTNB, tratado posteriormente con sulfito sódico 50 mM, y finalmente reducido con DTT 50 mM.

IR en la célula sólo puede ser regulada de forma negativa, y que una vez inactivado el IR (como resulta de cambios conformacionales irreversibles propiciados por el estado rédox celular), su reutilización por la célula sólo es posible previa degradación del mismo, con el fin de incorporar sus aminoácidos constituyentes al "pool" que se emplea en la síntesis proteica. Aún cuando ello no es una hipótesis deshechable, no parece prudente aceptarla de primeras, aunque sólo sea por razones de economía celular. O, en otros términos, los resultados expuestos en este apartado, no son lo suficientemente exhaustivos como para permitir su extrapolación a la situación *in vivo*. En ella, el IR se encuentra unido a la RNasa, la cual puede influir en su susceptibilidad a la oxidación y, por tanto, en su inactivación. Por otra parte, las condiciones oxidantes que puedan manifestarse en la célula, en ningún caso llegarán a ser las fuertes condiciones oxidantes que aquí se han empleado. Hay que considerar que el medio intracelular es esencialmente reductor, y sólo caben esperar en el mismo ligeras fluctuaciones hacia estados menos reductores, pero nunca un cambio radical hacia un estado netamente oxidante.

Finalmente, no conviene pasar por alto que los equilibrios químicos en la célula se establecen generalmente mediante reacciones catalizadas. El que *in vitro* no se haya conseguido revertir la inactivación del IR mediante el empleo de agentes reductores, no significa necesariamente que *in vivo* ocurra lo mismo. Siempre puede considerarse la presencia de algún biocatalizador que propicie una reacción que, aunque termodinámicamente permitida, sea en la práctica irrealizable por razones de tipo cinético, y sólo la presencia del catalizador pueda asegurarla.

Todos estos razonamientos nos han llevado a plantear un estudio más detallado sobre la inactivación del IR por el estado rédox, y, en concreto, por reacciones de intercambio tiol-disulfuro, como las que en la célula pueden dar cuenta del mensaje regulador contenido en el estado de óxido-reducción celular. A los resultados obtenidos en la investigación de estos aspectos se dedican los apartados 4.7 y 4.8.

4.7 EFECTOS DEL DTNB EN LA MOLÉCULA DE COMPLEJO IR-RNasa A

Como se ha comentado en el apartado 4.6, la estrecha dependencia existente entre los grupos SH del IR y su actividad inhibidora lleva a proponer un mecanismo de regulación del mismo, en el que el estado de óxido-reducción de la molécula ejerza un papel clave. De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, el estudio de estos aspectos reguladores ha de centrarse sobre el complejo IR-RNasa. Es decir, pretendemos estudiar la regulación de su actividad ribonucleolítica por el estado rédox del medio; en concreto, reacciones de intercambio tiol-disulfuro.

En primer lugar, ha de centrarse la atención en los procesos oxidantes que dan cuenta de liberación de actividad ribonucleolítica por inactivación de la capacidad inhibidora de IR. En este planteamiento no ha de olvidarse que, *in vivo*, tal inactivación del IR puede ocurrir de forma reversible, por lo que habrán de estudiarse condiciones oxidantes poco drásticas que no impliquen la desnaturalización irrecuperable del IR. Posteriormente, si lo anterior es factible, se habrán de investigar procesos reductores que den cuenta de inhibición de la actividad ribonucleolítica previamente liberada.

Como primera aproximación a las mencionadas reacciones de oxidación (activación de RNasa), nos hemos centrado en el intercambio entre los grupos tiólicos del complejo IR-RNasa y el disulfuro aportado por el reactivo de Ellman (DTNB). Las favorables propiedades espectrofotométricas de esta reacción nos han llevado a esoger el DTNB como el agente oxidante a estudiar en primer lugar. En efecto, el progreso de la reacción de intercambio puede seguirse fácilmente midiendo la A_{412} de la mezcla de reacción, la cual da cuenta de la aparición del ácido 5-tio-



En el primero de los pasos, una molécula de DTNB reacciona con uno de los grupos SH del IR (la RNasa A no tiene ninguno de sus ocho sulfhidrilos en estado reducido), formándose así un disulfuro mixto complejo-S-S-TNB, y liberándose una molécula de TNB. Posteriormente, un nuevo grupo SH del IR reacciona con el disulfuro mixto dando lugar a la formación de un puente disulfuro en la proteína, con la consiguiente liberación de una segunda molécula de TNB. En suma, por cada molécula de DTNB añadida al medio de reacción se originan dos moléculas de TNB. En el esquema [10], deliberadamente se ha considerado que el puente disulfuro que se origina en la segunda etapa es interno. Ciertamente, cabe considerar que se formen puentes disulfuro intercatenarios que den lugar a la agregación del IR. El que la segunda etapa transcurra intra- o inter-molecularmente vendrá determinado por la concentración de complejo en el medio. A las concentraciones normalmente empleadas ($< 10 \mu\text{M}$) sólo parecen tener validez estadística los encuentros entre SH próximos en la misma molécula. Así, no se ha detectado mediante PAGE-SDS la formación apreciable de agregados por puentes disulfuro intermoleculares (figura 25).

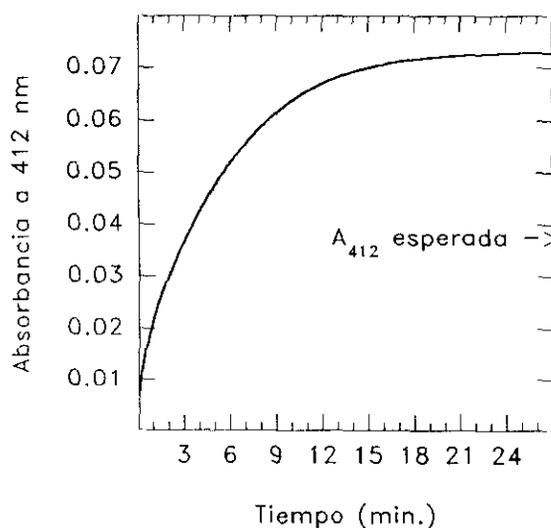


Figura 26. Curva que representa el incremento de A_{412} con el tiempo, a medida que progresa la oxidación con DTNB, en uno de los pasos de modificación con cantidades subestequiométricas de DTNB con relación al contenido en SH de la preparación de complejo IR-RNasa A. Con una flecha se indica el valor de A_{412} esperado suponiendo la liberación de un mol de TNB por mol de DTNB añadido.

4.7.1 Evaluación del grado de oxidación

El grado de oxidación alcanzado tras cada paso de reacción se evaluó mediante dos determinaciones diferentes. Por una parte, la A_{412} al final de cada paso daba cuenta del número total de SH modificados, para lo cual se tomó en consideración un coeficiente de extinción molar de $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para el TNB. De acuerdo con el esquema [10], el número de moles de TNB liberados es coincidente con el de grupos SH modificados. Por otra parte, alícuotas de la mezcla de reacción con al DTNB se sometieron, al final de cada paso, a condiciones desnaturalizantes y posterior determinación de su contenido en grupos tiol reducidos (ver Parte Experimental). Los resultados de estas dos determinaciones independientes se recogen en la figura 27 para los sucesivos pasos de oxidación con el DTNB. Se comprueba cómo a lo largo de la modificación la suma de los resultados proporcionados por ambas determinaciones (SH modificados + SH sin modificar) da cuenta del total de 30 cisteínas de la subunidad IR. Consiguientemente, cabe descartar una oxidación ambiental del IR adicional a la provocada por el DTNB.

4.7.2 Evaluación del grado de activación

Entendemos como tal la liberación de actividad ribonucleolítica cuando el complejo IR-RNasa se somete a modificaciones crecientes por el DTNB. Dada la dependencia entre actividad inhibidora y estado reducido del IR, era de esperar que la progresiva oxidación por el DTNB, conllevara la aparición de actividad ribonucleolítica en el medio. La medida de esta actividad tras cada paso de oxidación con DTNB ha de servir, pues, como evaluación del efecto que el DTNB (o grado de oxidación) ejerce sobre la actividad inhibidora. Los resultados de estas determinaciones se recogen en la figura 28. Es de destacar la naturaleza bifásica del perfil obtenido. En la primera fase, la liberación de actividad ribonucleolítica se ralentiza en torno al 15 %, para continuar después aumentando hasta la completa liberación de la actividad potencial del complejo, una vez que se alcanzan relaciones globales DTNB/complejo superiores a 5.0. Tal comportamiento será objeto de una discusión posterior.

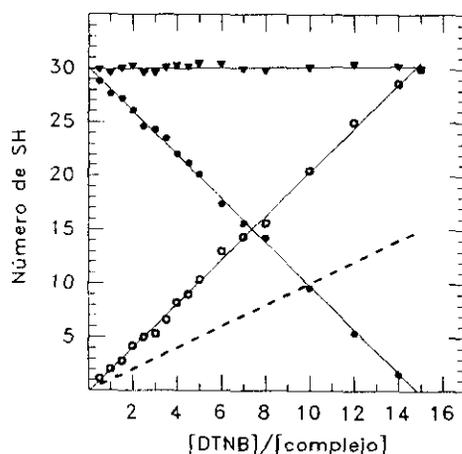


Figura 27. Representación de la evaluación del número de grupos SH modificados a lo largo del proceso de oxidación del complejo IR-RNasa A con DTNB (círculos blancos), así como del número de SH remanentes (círculos negros). En triángulos, la suma de los dos valores anteriores. La línea discontinua indica el número de SH que se esperaba fueran modificados por el DTNB, considerando la liberación de un mol de TNB por mol de DTNB añadido.

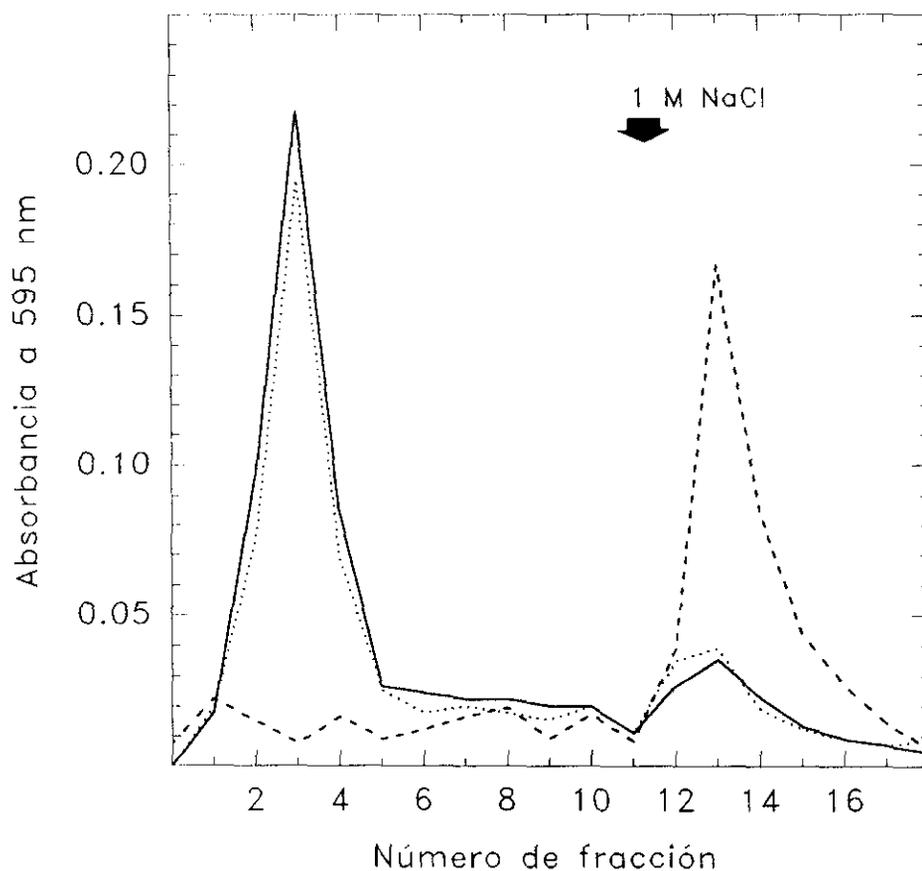


Figura 28. Cromatografía de exclusión molecular en carboximetil sephadex G 25 (Whatman). El método de elución comienza de forma isocrática con un tampón fosfato 25 mM pH 6.5, EDTA 2 mM, glicerol 10 % (tampón de equilibrado de la columna), para pasar de forma instantánea al mismo tampón conteniendo NaCl 1M. El cambio se tampón se indica en la figura mediante una flecha. El contenido proteico de las fracciones eluidas fue valorado por el método de Bradford, midiendo la A_{595} . En línea continua se representa el perfil cromatográfico obtenido tras aplicar una disolución de complejo IR-RNasa A. En línea discontinua, el correspondiente a la aplicación de una disolución de RNasa A. Por último, en línea de puntos el perfil del cromatograma de una preparación de dicho complejo sometido a tratamiento con *p*-HMB 1 mM.

4.7.3 Evaluación del grado de disociación

Generalmente, la liberación de actividad ribonucleolítica a partir del complejo se ha atribuido a la disociación de éste. Ello puede ser cierto en las condiciones de modificación masiva de los grupos SH del IR que suelen emplearse en su inactivación. En nuestro caso, sin embargo, cabe plantearse si lo anterior es cierto incluso en pequeños porcentajes de modificación del complejo. O en otras palabras, la tendencia en el terreno de la investigación sobre el IR, a considerar que su inactivación vaya pareja a su disociación, no está refrendada por un estudio detallado sobre este particular. La mayor parte de los estudios a nivel funcional del IR se han llevado a cabo sobre la molécula aislada. En tales circunstancias, el IR es especialmente vulnerable (ver apartado 4.6), hasta el extremo que inactivación y desnaturalización irreversible son eventos prácticamente indiferenciables. Sin embargo, la posible regulación reversible de la actividad ribonucleolítica del complejo IR-RNasa obliga a considerar la disociación como un evento independiente de la liberación de actividad ribonucleolítica. Es decir, los resultados del apartado anterior no pueden, de primeras, considerarse como indicativos de la paulatina disociación del complejo. Éste es un aspecto que requiere ser estudiado empleando una metodología diferente a la del simple ensayo de actividad enzimática liberada.

A este nivel, el empleo de métodos cromatográficos capaces de separar el complejo asociado de sus constituyentes disociados, puede considerarse como una buena aproximación experimental para la evaluación del grado de disociación. De hecho, en la bibliografía se pueden encontrar antecedentes sobre el empleo, o de cromatografía de penetrabilidad (Goto y Mizuno, 1971), o de intercambio catiónico (Hofsteenge *et al.*, 1991) con tal finalidad. Los primeros hacen uso de las diferencias de tamaño entre el complejo IR-RNasa (64 kD) y sus constituyentes IR, 50 kD; RNasa A, 14 kD). Los segundos se basan en la diferencia en pI entre IR y RNasa; así, en el complejo, el carácter ácido del IR (pI \approx 5.0), predomina sobre el carácter básico de la RNasa (pI \approx 9.6), resultando el complejo una especie menos ácida que el IR, pero más que la RNasa. En consecuencia, en intercambio catiónico sólo la RNasa liberada del complejo quedará retenida. La evaluación del correspondiente pico de elución se ha empleado (Hofsteenge *et al.*, 1991a) para determinar el grado de disociación.

Los resultados obtenidos en estas evaluaciones son contradictorios. Utilizando el primero de los procedimientos (Goto y Mizuno, 1971), se ha llegado a afirmar que el pHMB (un conocido agente disociante del complejo IR-RNasa (Blackburn *et al.*, 1977)), no es capaz de disociar el complejo. Por otra parte, el segundo de los métodos cromatográficos se ha empleado para asegurar que la modificación química de los SH del complejo por el S-DABIA¹ no produce disociación (Hofsteenge *et al.*, 1991a). Los autores de este último trabajo no realizaron, sin embargo, ningún control con el que comprobaran si la disociación provocada por conocidos agentes disociantes (v.g. pHMB) se ponía de manifiesto en su método cromatográfico. De hecho, cuando intentamos adecuar este método de intercambio catiónico para evaluar el grado de disociación de nuestras preparaciones tratadas con DTNB, llevamos a cabo tal control, comprobando que el método aludido no resultaba válido para la finalidad perseguida (figura 29). Ello, por una parte, ponía en cuestión las conclusiones derivadas en el estudio de la modificación química por el S-DABIA. Por otra parte, se hacía necesario explicar este comportamiento aparentemente anómalo, según el cual la RNasa disociada del complejo, no se retiene en un intercambiador catiónico.

A un resultado análogo se llega cuando se trabaja con un intercambiador aniónico (datos no mostrados), si bien en este caso los resultados anómalos se traducen en una elución conjunta de la RNasa disociada (que no resulta excluida) y el IR inactivado, ambos en posiciones correspondientes al complejo IR-RNasa.

¹3 ácido 4-N,N-dimetilaminoazobenceno-4'-iodoacetamido-2'-sulfónico; reactivo de grupos sulfhidrilo que se ha empleado para el marcaje diferencial de los SH del IR unido a la RNasa (Hofsteenge *et al.*, 1991)

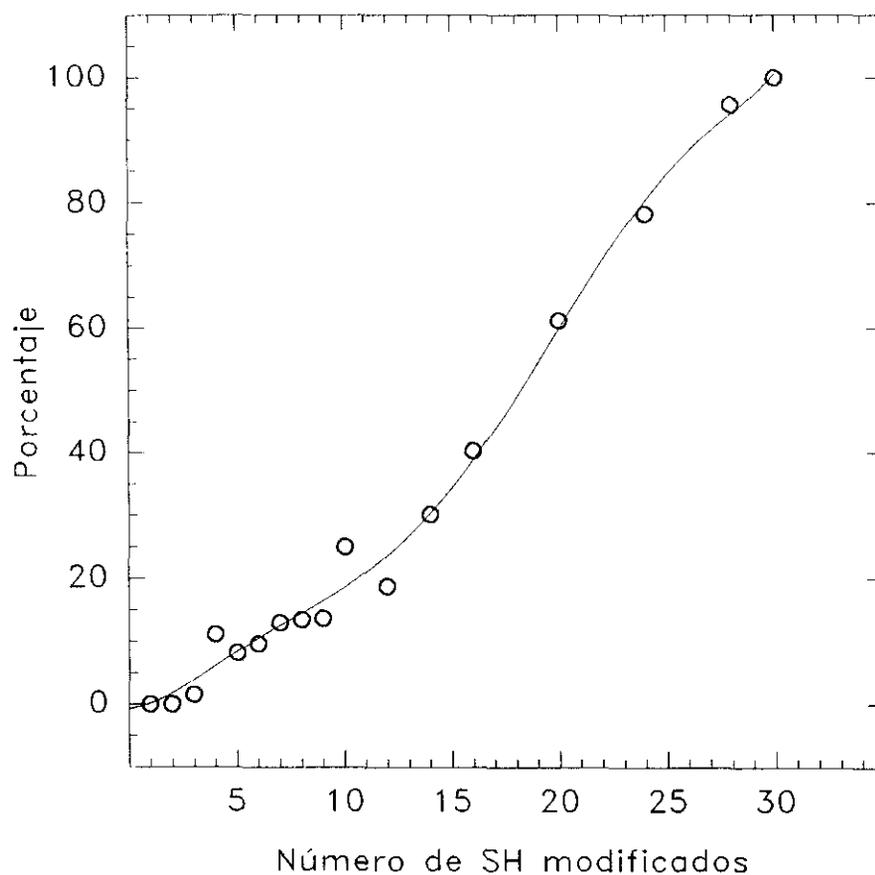


Figura 28. Evaluación de la inactivación del IR del complejo IR-RNasa A, como respuesta a la oxidación progresiva con DTNB. Las determinaciones fueron hechas midiendo la actividad ribonucleolítica liberada a lo largo del tratamiento. El tipo de ensayo empleado es el que utiliza cCMP como sustrato.

En suma, se diría que el tratamiento con *pHMB* no produce disociación, llegando así a la misma conclusión que Goto y Mizuno sostenían tras su estudio por cromatografía de penetrabilidad (Goto y Mizuno, 1971). Sin embargo, no es momento de cuestionarse la capacidad disociante del *pHMB*. Ésta ya quedó sobradamente demostrada por Blackburn *et al.* (Blackburn *et al.*, 1977). Así, cuando sometieron preparaciones de complejo tratadas con *pHMB* en exceso a cromatografía de penetrabilidad, empleando un tampón de elución que contenía *pHMB* 1 mM, lograron separar al IR inactivo de la RNasa libre. Este resultado, opuesto al de Goto y Mizuno, no puede explicarse argumentando que se requiere la presencia de *pHMB* en el medio de elución para evitar que su efecto disociante se vea revertido por la diálisis que conlleva la cromatografía de penetrabilidad. Es bien conocido, y así se ha comentado (apartado 1) que la inactivación del IR por el *pHMB* es irreversible.

La única explicación plausible al anómalo comportamiento cromatográfico de la RNasa disociada del IR es que, en las condiciones de elución empleadas cuando se observa tal comportamiento, se mantenga una interacción inespecífica entre ambas moléculas. Ello es posible dado el carácter ácido del IR ($pI \approx 5.0$) y el básico de la RNasa ($pI \approx 9.6$). Si el medio de elución incluye un agente ácido (como el *pHMB* empleado por Blackburn *et al.* en su concluyente experimento), éste puede competir con el IR en la interacción con la RNasa, con lo cual ésta queda definitivamente disociada.

Cabe cuestionarse si tal interacción electrostática inespecífica es o no importante en condiciones fisiológicas. En otros términos, dada la relativa fortaleza de esta unión, que se mantiene en las condiciones cromatográficas mencionadas, podría pensarse que la verdadera disociación del complejo IR-RNasa no tiene lugar *in vivo*. Para esclarecer este aspecto habría que tomar en consideración las condiciones iónicas que prevalecen en la célula. Así, con vistas a la evaluación de la disociación promovida por el tratamiento con DTNB, hemos replanteado el concepto de disociación. Sólo se considera como tal la que se produce en condiciones fisiológicas de fuerza iónica ($f_i = 0.15$ M), y así resulta evidenciable mediante cromatografía. En consecuencia, el grado de disociación producido por el progresivo tratamiento con DTNB del complejo, se ha evaluado, tras cada paso de reacción, mediante cromatografía de penetrabilidad en columna Superdex 75 HR (Pharmacia), equilibrada y eluída con un tampón que cumplía la anterior especificación de fuerza iónica. En tales condiciones se pone de manifiesto el efecto disociante del *pHMB* (figura 30). Esta columna no tiene poder resolutivo suficiente como para separar el complejo no disociado del IR disociado, pero sí a ambos de la RNasa. Así, la cantidad de RNasa libre que vaya apareciendo al progresar la modificación se puede tomar como indicativa de la cantidad de complejo disociado en sus dos componentes. La cantidad de RNasa disociada se cuantifica por integración de su pico e interpolación del área en una recta de calibrado construída utilizando RNasa A como estándar (ver Parte Experimental).

Un perfil cromatográfico típico obtenido en la mencionada columna de filtración en gel se muestra en la figura 31. Corresponde a una alícuota de complejo modificado con una relación molar DTNB/complejo de 10, donde ya se ha producido la disociación de aproximadamente un 40 % del complejo inicial.

Los resultados obtenidos al evaluar el grado de disociación del complejo a lo largo de su modificación con el DTNB se recogen en la figura 32. Se puede comprobar cómo la curva de disociación sigue una evolución diferente a la de activación, confirmando así que se trata de dos procesos independientes. En concreto, se pueden alcanzar grados de modificación por el DTNB (relaciones globales DTNB/complejo entre 2.0 y 4.5) en las que se manifiesta actividad ribonucleolítica sin que ello vaya parejo a disociación del complejo. En consecuencia, en el medio debe de haber, entonces, lo que hemos llamado "complejo activo"; es decir, moléculas de complejo cuyo IR permite la expresión, al menos parcial, de la RNasa a él asociada.

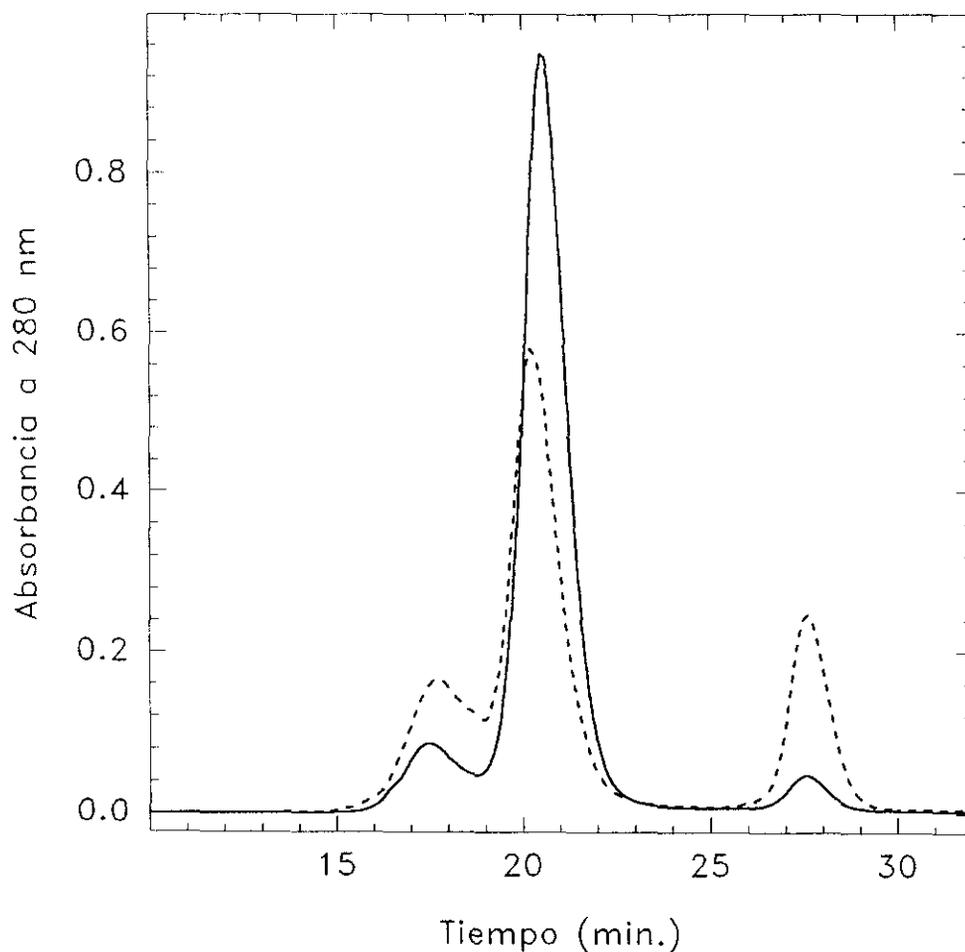


Figura 30. Cromatografía de exclusión molecular en una columna Superdex 75 HR (Pharmacia), en las condiciones descritas en "Parte Experimental". Los perfiles cromatográficos que se muestran corresponden a dos muestras de complejo IR-RNasa A. En línea continua se representa el obtenido tras aplicar una sidolución del complejo en estado nativo. En línea discontinua, el perfil del cromatograma de otra alícuota de complejo, tratada con *p*-HMB 1 mM.

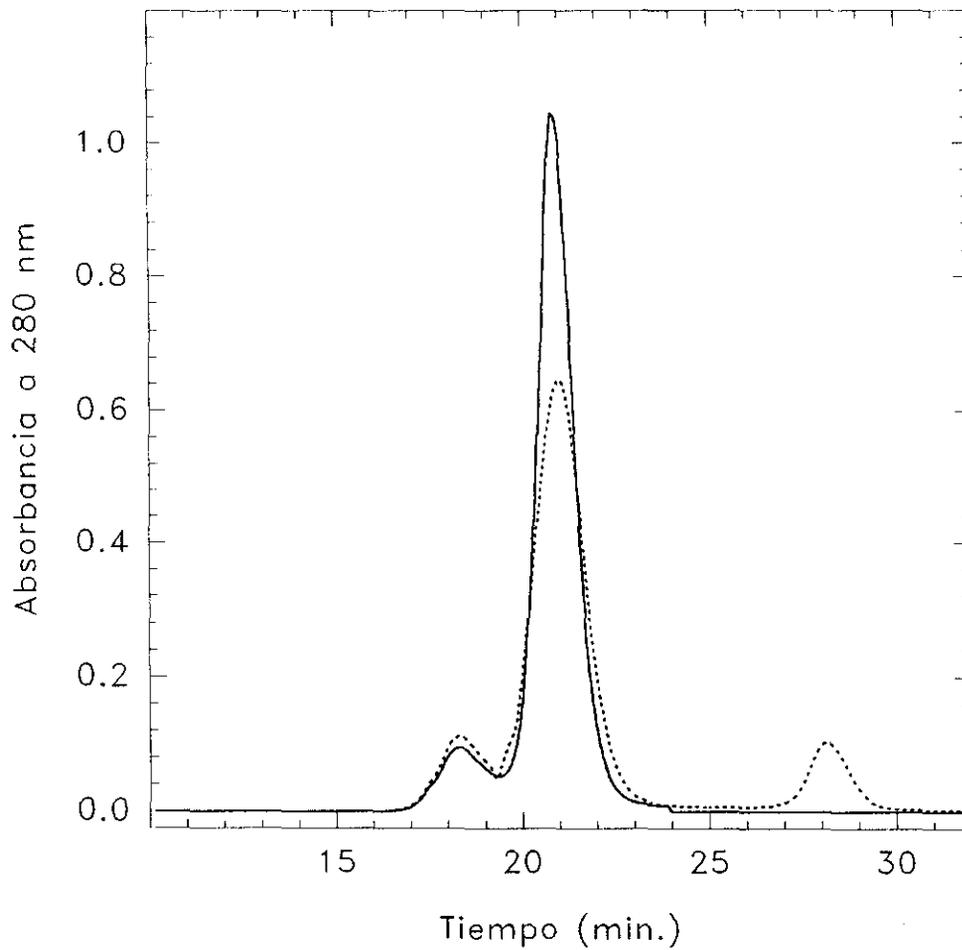


Figura 31. Cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superdex 75 HR (Pharmacia), en las condiciones descritas en "Parte Experimental", de una disolución de complejo IR-RNasa A tratada con DTNB hasta alcanzar una relación $[DTNB]/[complejo]$ global de 10 (línea de puntos). A efectos comparativos, se representa también el perfil cromatográfico obtenido al aplicar una disolución de complejo nativo (línea continua).

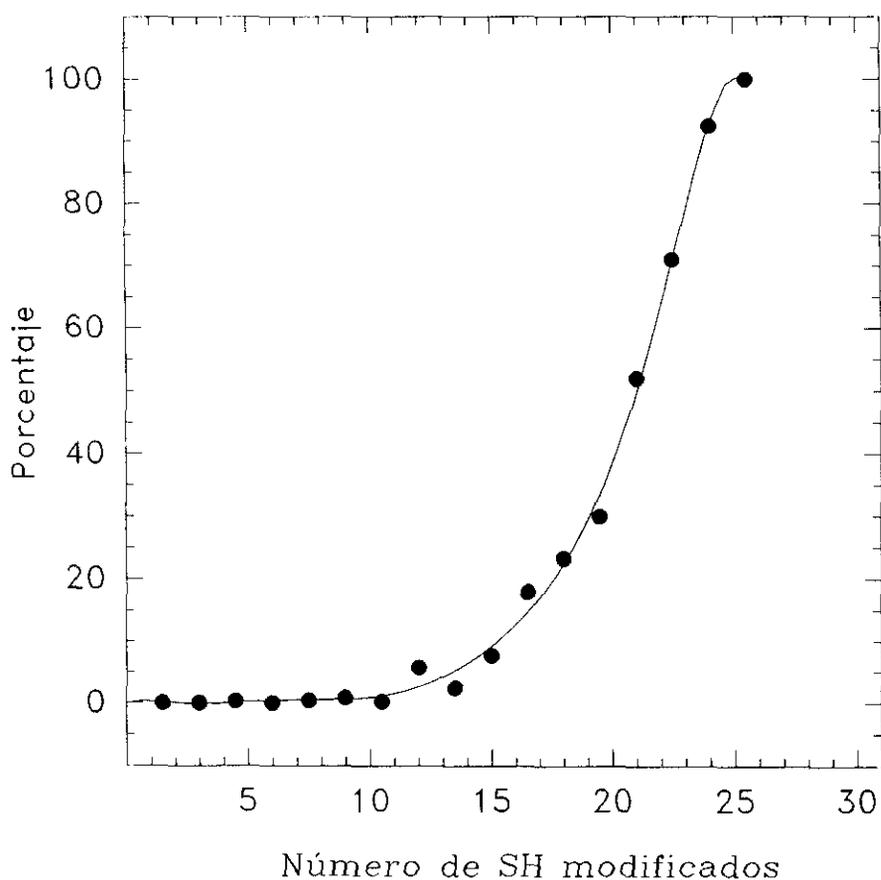


Figura 32. Curva que representa el grado de disociación (expresado en %) provocado en el complejo IR-RNasa A por el tratamiento oxidante con DTNB. La evaluación del grado de disociación se realizó aplicando alícuotas de la mezcla de reacción a lo largo del proceso de modificación en una columna de exclusión molecular Superdex 75 HR, y evaluando la RNasa libre, por integración de su pico de elución y posterior interpolación en la recta de calibrado definida en el apartado 3.8.3.2 de "Parte Experimental"

Estos resultados constituyen la primera evidencia experimental sobre la existencia de RNasa asociada al IR, pero no completamente inhibida. Tales resultados apoyan, a su vez, nuestra hipótesis sobre la presencia en la célula de IR unido a la RNasa formando un complejo enzimático, cuya subunidad reguladora, el IR, vería modulada su actividad en función del estado redox del medio, sin que ello implicara disociación del complejo. Este modelo permitiría la reversibilidad de la inactivación del IR, cosa poco probable una vez que la disociación se hubiera consumado.

En consecuencia, la meseta en la curva de activación, en torno a un 15 % de actividad liberada (figura 28), podría corresponder al máximo grado de modificación del IR compatible con su asociación a la RNasa, y, por tanto, al grado de oxidación correspondiente al estado activo del complejo enzimático IR-RNasa. Condiciones oxidantes más drásticas conllevarían la oxidación y disociación irreversibles del IR.

Los resultados expuestos ponen de manifiesto que la modificación de los grupos SH del complejo IR-RNasa (los aportados por la subunidad IR) sigue un proceso bifásico. Inicialmente, las diferentes especies de complejo van modificando unos pocos de sus grupos SH, como consecuencia de lo cual todo el complejo de una preparación dada queda en un estado intermedio de modificación. Ello da cuenta del primer escalón en la curva de activación. Si se prosigue la modificación por el DTNB, el conjunto de moléculas continúa oxidándose en el resto de sus grupos SH, hasta que, finalmente, no queda ninguna cisteína por modificar. En esta segunda etapa es cuando se alcanza la disociación total de la preparación. Asimismo, en esta segunda etapa se cuando se produce la liberación total de la actividad ribonucleolítica potencial del complejo.

Cabe preguntarse cuántos grupos SH han de verse modificados para que se produzca la activación sin disociación, y cuántos para que el complejo se disocie. Para dar respuesta a esta pregunta, hemos analizado los efectos de la oxidación por el DTNB desde un punto de vista cuantitativo, considerando tanto los datos de activación como los de disociación.

Como punto de partida hemos considerado que la modificación de los 30 grupos SH del complejo se produce completamente al azar. No es ésta una idea muy alejada de la realidad. Resultados obtenidos con el IR libre (Fominaya, comunicación personal) ponen de manifiesto que su reacción con el DTNB no conduce a patrones de modificación repetitivos en los péptidos resultantes de hidrólisis limitada. Se diría que no hay en el IR cisteínas con reactividades muy diferenciadas, que sean las responsables de su modificación preferencial y de su regulación.

Dentro de este esquema de modificación al azar la probabilidad de encontrar una molécula de complejo (o de IR libre) con m de sus 30 grupos SH modificados dependerá de la cantidad de agente modificador añadido. Así, si la cantidad de DTNB añadida, de una sola vez o en pasos sucesivos, a una preparación de complejo da cuenta de la modificación del 30 % de los grupos SH en ella contenidos, se puede calcular que la probabilidad de encontrar una molécula de complejo con, por ejemplo, 10 grupos SH modificados y los 20 restantes sin modificar será:

$$0.3^{10} \cdot 0.7^{20} \cdot \binom{30}{10}$$

El primer factor da cuenta de la probabilidad de que se modifiquen 10 SH a la vez, cuando cada uno tiene una probabilidad de 0.3 de ser modificado; el segundo factor da cuenta de la probabilidad de que no se modifiquen 20 SH, cuando la probabilidad individual de que eso ocurra es de 0.7 (1-0.3); y el tercer factor toma en consideración las diferentes posibilidades de encontrar una

molécula con 30 SH, modificada en diez de ellos (combinaciones de 30 elementos tomados de 10 en 10).

Con carácter general, la probabilidad $P(m)$ de encontrar una molécula de complejo (o de IR libre) con m de sus 30 grupos SH modificados vendrá dada por la siguiente expresión:

$$P(m) = r^m \cdot (1 - r)^{(30-m)} \cdot \binom{30}{m} \quad [13]$$

donde r es el grado de modificación global, calculado multiplicando por dos (2 SH modificados por molécula de DTNB) la relación DTNB/complejo que se va acumulando tras cada adición de DTNB.

Mediante tal expresión es posible calcular, para cada relación acumulada DTNB/complejo la distribución de moléculas con diferentes estados de oxidación. Esto es lo que se representa en la figura 33, donde se observa que, a medida que aumenta el grado de oxidación total de la muestra, la población de complejo total se distribuye según diferentes campanas de Gaus que van desplazando su máximo, o grado de modificación promedio, hacia valores superiores. El punto final se alcanza cuando el 100 % de las moléculas tienen todos sus grupos oxidados.

Llegado a este punto, es posible buscar respuesta a la pregunta planteada sobre el número de SH que requieren ser oxidados para activar el complejo, y el que se precisa para su disociación. Llamamos a a los primeros y d a los segundos. Obviamente, $a < d$, ya que la disociación es posterior a la activación.

Aquellas moléculas que tengan hasta $a-1$ grupos SH modificados se comportarán como complejo inactivo, sin expresar actividad ribonucleolítica alguna. Todas las que tengan un número de grupos SH modificados entre a y $d-1$ se comportarán como complejo activo, expresando una fracción f de la actividad ribonucleolítica en él contenida. Finalmente, las moléculas modificadas en d o más de sus grupos SH se habrán disociado, y, en consecuencia, expresarán completamente toda su actividad ribonucleolítica.

En términos porcentuales, la actividad ribonucleolítica liberada o grado de activación se obtendrá sumando la contribución de la fracción de moléculas de complejo activo más la contribución de las de complejo disociado. Es decir,

$$\% \text{Activación} = \sum_{m=a}^{d-1} P(m) \cdot f + \sum_{m=d}^{30} P(m) \quad [14]$$

donde $P(m)$ viene dado por la expresión [13].

Por su parte, el grado de disociación vendrá dado simplemente por la fracción de moléculas con d o más de sus grupos SH modificados. Es decir,

$$\% \text{Disociación} = \sum_{m=d}^{30} P(m) \quad [15]$$

Las dos expresiones anteriores permiten generar curvas teóricas de activación y disociación como función de los parámetros a , d y f . Se trata de buscar qué valores de estos parámetros proporcionan curvas teóricas ajustadas a las experimentales. En la figura 34 se representan junto a los valores experimentales, las curvas teóricas que mejor se ajustan, y que son las que se obtienen

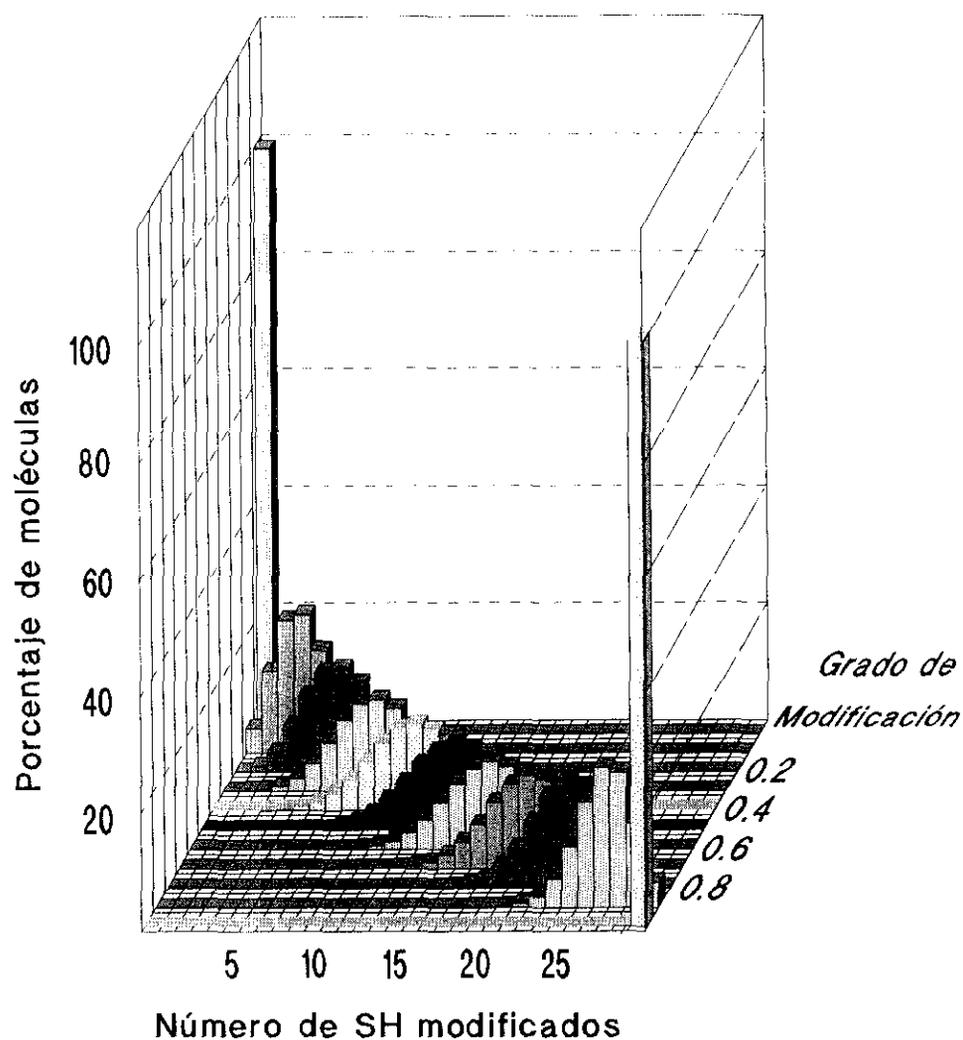


Figura 33. Representación de la distribución de la población moléculas, en términos de número de grupos SH modificados, de una preparación de complejo IR-RNasa A tras tratamiento oxidante con DTNB, y su evolución conforme aumenta el grado de modificación global de la disolución. El cálculo se hizo considerando una distribución estadística de las moléculas de DTNB añadido entre la población total de grupos SH presentes en la disolución. Es decir, considerando una misma reactividad para todos los sulfhidrilos. Cada una de las curvas corresponde a la distribución de la población de moléculas de complejo correspondiente a un determinado grado de modificación global (r).

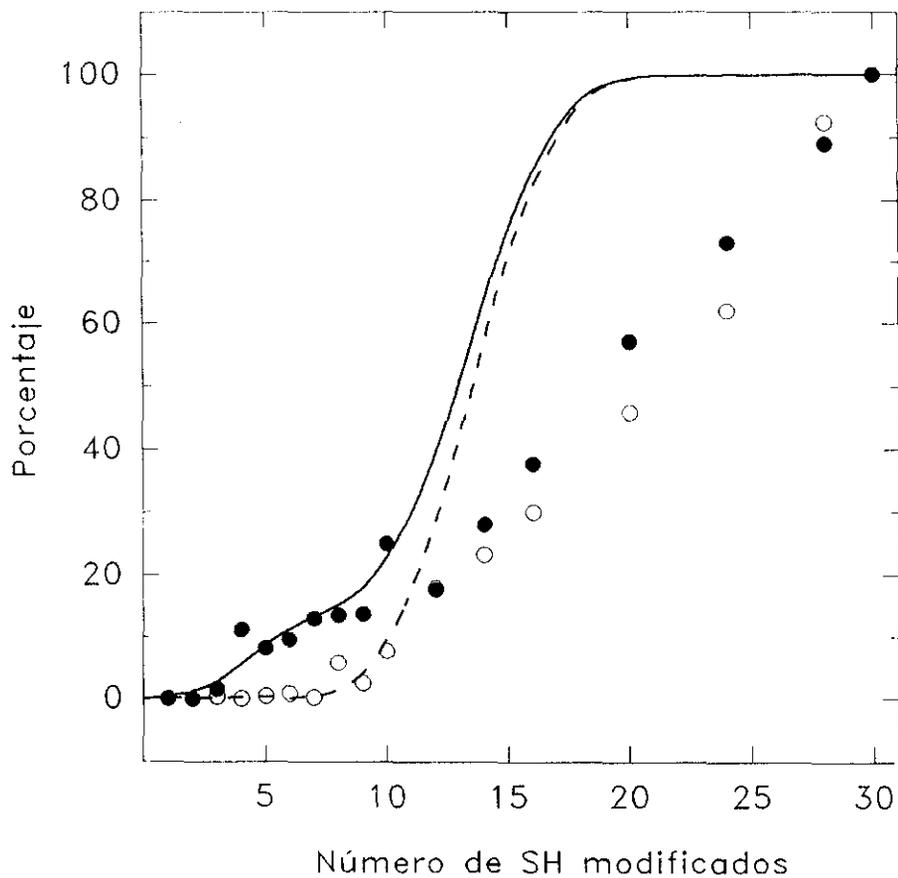


Figura 34. En esta figura se representan los valores de porcentaje de activación de RNasa y de disociación del complejo como consecuencia del tratamiento progresivo con DTNB (mostrados previamente en las figuras 28 y 32, respectivamente), junto con los ajustes teóricos basados en una distribución estadística del DTNB entre toda la población de SH de la disolución de complejo (igual reactividad para todos los sulfhidrilos). Para ello, se aplicó la expresión [13], tomando $a=5$, $d=15$ y $f=0.15$.

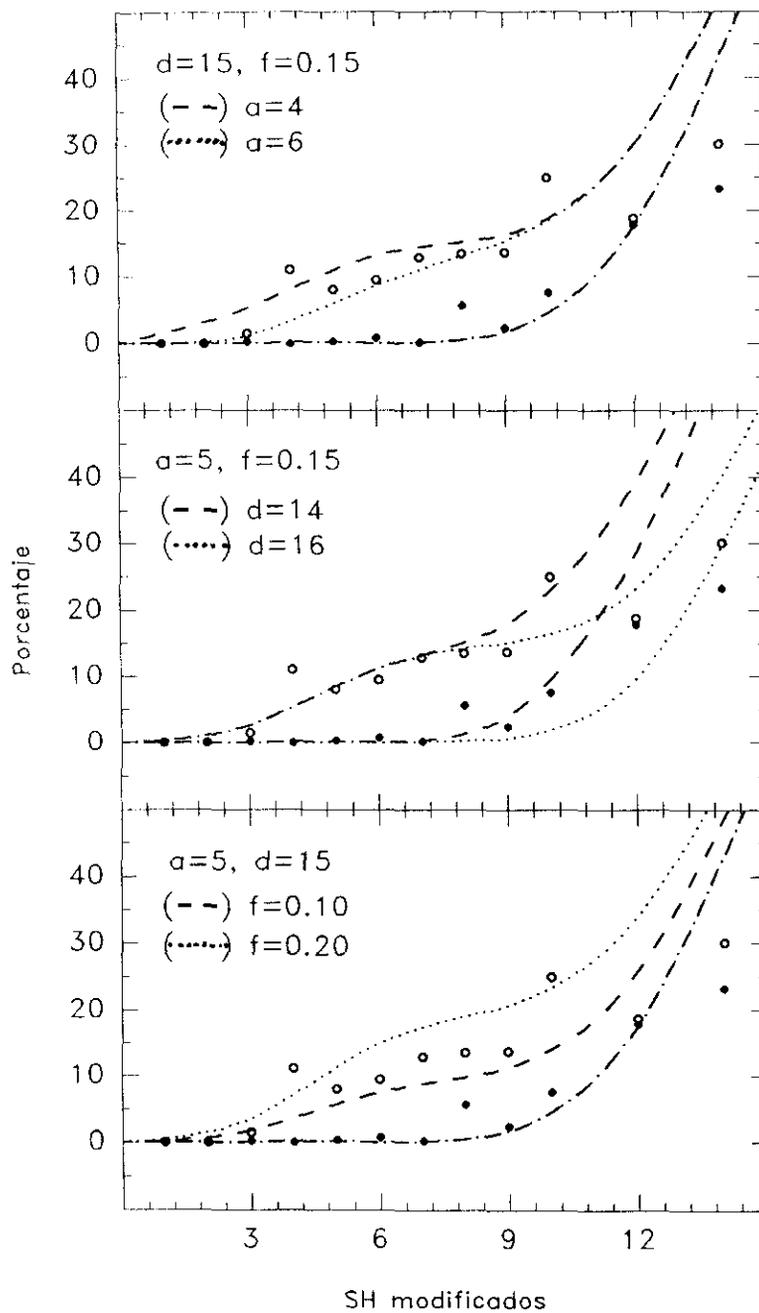


Figura 35. Ajustes de los valores experimentales de porcentaje de activación de RNasa y de disociación de complejo IR-RNasa A (en puntos blancos y negros, respectivamente) provocados por el tratamiento oxidante con DTNB a la expresión [13] (distribución totalmente estadística de las moléculas de DTNB entre la población de grupos SH de la disolución del complejo), considerando diferentes valores para a , d y f .

para $a=5$, $d=15$ y $f=0.15$. Como se puede comprobar, el ajuste es bueno en el primer tramo, donde sólo se da el complejo activo, pero no así para porcentajes superiores de modificación, donde, obviamente, el modelo propuesto no da cuenta de los resultados experimentales. La disparidad entre las curvas teóricas y las experimentales no es una consecuencia de los valores asignados a a , d y f . Ninguna otra combinación de valores se ajusta mejor que la presentada. Más aún, variaciones pequeñas en tales valores se traducen en discrepancias inaceptables a lo largo de toda la modificación. En la figura 35 se recogen también algunas curvas teóricas generadas con pequeñas modificaciones en a , d o f .

Hay que concluir que el modelo de modificación al azar puede ser válido para dar cuenta del comportamiento observado con porcentajes pequeños de modificación. Cuando éstos se incrementan, el incremento concomitante en el grado de activación y/o disociación es menor de lo previsto teóricamente. Se podría pensar que para altas relaciones globales DTNB/complejo el grado de modificación experimentado por los SH de la preparación es menor del calculado teóricamente.

Sin embargo, tal línea de argumentación no resulta válida, ya que, tras cada adición de DTNB se constata experimentalmente que éste ha producido su efecto modificante esperado (evaluación de grupos SH remanentes). Una explicación alternativa es que el consumo de DTNB se produzca de forma preferente por parte de aquellas moléculas de IR que, por haber acumulado un grado alto de modificación, ya se han disociado del complejo. La susceptibilidad de tales moléculas a resultar adicionalmente modificadas no se traduciría ni en mayor liberación de actividad ribonucleolítica, ni en mayor disociación. En consecuencia, tales moléculas disociadas se convierten en sumidero de DTNB. De esta forma, una parte del DTNB añadido se sustrae del DTNB disponible para incrementar el grado de oxidación del resto de moléculas de complejo.

Esta posibilidad no resulta en absoluto sorprendente, si tenemos en cuenta los resultados aportados recientemente sobre los estudios de modificación con DTNB llevados a cabo con la molécula de IR libre (Fominaya y Hofsteenge, 1993). Según dichos estudios, la modificación de la molécula de IR sigue un mecanismo "todo o nada" que implica que, una vez modificados un número muy pequeño de grupos SH de una molécula concreta, el resto de los pertenecientes a la misma molécula van a reaccionar de forma preferente sobre los demás sulfhidrilos de las moléculas que aún no han sido modificadas en ninguno. Por tanto, la adición de cantidades limitadas (no en exceso) de DTNB a una preparación de IR libre, no se traduce en la obtención de moléculas parcialmente modificadas, sino en una población con todos sus SH oxidados, y en otra con todos ellos sin modificar.

En consecuencia con todo lo anterior, es asumible que cuando modificamos complejo IR-RNasa A con DTNB, en el momento en que aparece una molécula de IR libre, la distribución del DTNB del medio ya no es aleatoria, sino que va a ser captado de forma preferente por esa molécula de IR libre; dicha molécula continuará con la modificación de sus restantes grupos SH según el mecanismo "todo o nada". Una vez que todo el IR libre haya sido completamente modificado, el DTNB restante que quede en el medio sí va a distribuirse de un modo aleatorio entre las moléculas de complejo. Ese comportamiento podría explicar porqué el modelo de regulación planteado en un principio no se ajusta a la realidad a partir del punto en el que comienza a aparecer disociación: ya no podemos considerar igual reactividad para todos los grupos SH del medio.

Al tomar en consideración este peculiar efecto sumidero de DTNB que presenta el IR libre, la distribución de moléculas con diferente grado de modificación ya no seguirá el comportamiento completamente aleatorio que se ilustra en la figura 33. No obstante, se puede llevar a cabo un cálculo numérico de las nuevas distribuciones de grupos oxidados que se van alcanzando conforme progresa la modificación en pasos discretos por el DTNB. Para ello, igualmente a como se hizo para el modelo

aleatorio, se emplea la expresión [13], si bien, en este caso, el cálculo se realiza como se expone a continuación.

En primer lugar, se calcula cuál es el porcentaje mínimo de modificación por el DTNB que da cuenta de la aparición incipiente de IR libre. Por supuesto, para este cálculo se debe conocer cuál es el valor del parámetro \underline{d} definido en párrafos anteriores. En primera aproximación, se ha tomado como válido el valor de 15, deducido con el modelo de modificación completamente aleatoria.

Establecido lo anterior, se supone una preparación de complejo que se vaya modificando mediante pasos sucesivos de adición de DTNB. Se considera, además, que el DTNB añadido en cada paso da cuenta de una modificación del 5 % del total de SH presentes en la muestra. En estas condiciones se puede calcular mediante la expresión [13] que, sólo cuando se alcanza un grado de modificación acumulado del 25 % (5 adiciones de DTNB) aparece en forma incipiente, aunque significativa, complejo disociado. Así, para $r=0.25$, la expresión [13] informa que el 0.25 % de las moléculas tendrán 15 SH modificados y el 0.1 % tendrán 16 SH modificados. La probabilidad de encontrar moléculas con más SH modificados es despreciable (<0.02 %).

Por tanto, la siguiente adición de DTNB (6ª adición), para alcanzar una modificación acumulada del 30 %, se encontrará con una mezcla de moléculas en la que el 0.3 % de ellas estarán disociadas. El efecto sumidero de DTNB que presenta el IR libre se traduce en que ese 0.3 % llegará a modificarse completamente, dejando DTNB disponible para que el 99.7 % de moléculas restante ya no alcance el 30 % de modificación global, sino sólo el 29.79 % ($0.2979 \times 0.997 + 1.0 \times 0.003 = 0.30$).

Con este nuevo porcentaje de modificación ($r=0.2979$) se calcula mediante la expresión [13] la proporción de moléculas que resulta modificada en 15 o más de sus grupos SH (1.0 % - 15 SH; 0.4 % - 16 SH; 0.1 % - 17 SH). Éstas serán las que en la siguiente adición (séptima adición para alcanzar una modificación global del 35 %) ejercerán el efecto sumidero, por el cual la modificación que realmente alcanzan las moléculas no disociadas ya no será del 35 % sino del 33.81 %.

Este último porcentaje de modificación se emplea para el siguiente cálculo, y así sucesivamente. Se comprueba entonces que paulatinamente se van alcanzando porcentajes de modificación en la población de moléculas no disociadas que son, en todo caso, inferiores a los porcentajes de modificación global de la preparación del complejo. En la Tabla VI se recogen ambos porcentajes conforme progresa la modificación, hasta que todos los SH resultan oxidados.

Son los porcentajes de modificación del complejo no disociado los que realmente dan cuenta de liberación de actividad ribonucleolítica, o de incremento en el grado de disociación del complejo. La modificación de las moléculas de IR libre, aún cuando contribuye a incrementar el grado de modificación global, no redundará en activación o disociación, que es lo que se mide experimentalmente.

Por consiguiente, la Tabla VI pone claramente de manifiesto cómo a partir del 25 % de oxidación, la modificación desencadenante de activación o disociación progresa más lentamente que la global.

La figura 36 es la contrapartida a la figura 33. Mientras en ésta última se consideraba una distribución completamente aleatoria de la modificación, en la que ahora se representa se ha tomado en consideración el efecto sumidero de DTNB ejercido por el IR libre. Queda claramente ilustrado que, conforme progresa la modificación, va disminuyendo el porcentaje de moléculas con hasta 14 grupos SH oxidados, a la vez que aumenta la proporción de ellas con todos sus grupos tiol oxidados.

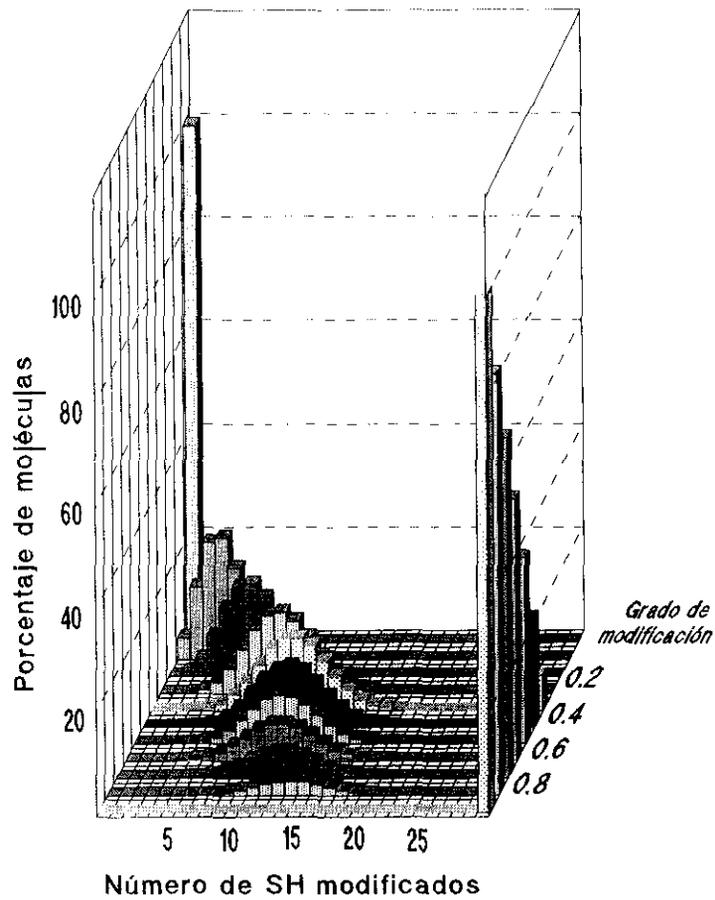


Figura 36. Distribución de la población de moléculas de complejo IR-RNasa, en función del número de grupos SH modificados, conforme progresa la oxidación por DTNB, y considerando un mecanismo de modificación siguiendo el modelo "todo o nada" para las moléculas de IR que se disocian de la RNasa. Cada una de las curvas dibujada corresponde a la distribución prevista para un grado de modificación global (r) concreto (desde 0 hasta 1).

[DTNB]/[Complej.] Global	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	6.0	7.0	10	12
k_1	39.4	28.6	6.3	15.8	30.2	30.2	23.5	20.2	28.9	44.1	45.3	73.2	657.7	320.0
k_2	1.96	0.49	0.31	0.39	0.45	0.41	0.32	0.29	0.41	0.50	0.10	0.17	0.04	0.0

Tabla VI. En esta tabla se recogen los valores de las constantes cinéticas k_1 y k_2 de las dos etapas por las que transcurre la oxidación de los grupos SH del complejo IR-RNasa A por DTNB (reacciones [11] y [12], respectivamente), en función de la relación global [DTNB]/[complejo] alcanzada en la mezcla de reacción.

En suma, el efecto sumidero se traducirá, según el modelo propuesto, en que en el medio no se detectarán moléculas de IR libre con estados intermedios de oxidación que supusieran de 15 a 29 grupos SH modificados.

La validación de este modelo de oxidación del complejo requiere comprobar, en primer lugar, si da cuenta de las curvas experimentales de activación y disociación; en segundo lugar, se hace necesario constatar experimentalmente los grados de modificación que presentan las moléculas de complejo e IR libre en preparaciones sometidas a oxidación parcial por el DTNB ($0.25 < r < 1.0$).

En la figura 37 se representan los datos experimentales de activación y disociación observados a lo largo de la modificación con el DTNB, junto con las correspondientes curvas teóricas generadas con $a=5$, $d=15$, $f=0.15$ y considerando el efecto sumidero mencionado. Como se puede comprobar, el modelo propuesto da muy buena cuenta de los resultados experimentales.

En cuanto a la segunda de las pruebas de validación mencionadas, se ha hecho uso de la capacidad que ofrece la cromatografía de intercambio aniónico para separar al complejo IR-RNasa del IR libre. Así, preparaciones de complejo parcialmente modificadas por el DTNB (relación global DTNB/complejo de 7.5, $r=0.5$) se sometieron a cromatografía en DEAE-TSK 5PW; el eluido se fraccionó y se determinó en cada fracción el contenido proteico así como en grupos tiol reducidos. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 38. A efectos comparativos, en la misma figura se muestran los perfiles de elución de complejo e IR libre sin modificar, sometidos a las mismas condiciones cromatográficas.

Lo primero que se aprecia es que la anchura de los picos de elución de complejo e IR libre cuando éstos se encuentran parcialmente modificados, es mayor que cuando éstos se aplican en estado nativo, sin modificar. Incluso, en el pico del complejo parcialmente modificado se puede observar la presencia de un hombro. Estos hechos son indicativos de la existencia de poblaciones dispersas, con una concomitante dispersión en su interacción con el DEAE. Tal dispersión ha de ser el resultado de diferencias en el estado conformacional o exposición de residuos cargados. En el caso del complejo, esto es atribuible a la presencia de especies moleculares con diferente grado de modificación. En el caso del IR, su pico, aún siendo más estrecho, sigue siendo ancho, probablemente como consecuencia de que en él está representada una distribución más o menos estadística de moléculas con diferentes apareamientos disulfuro.

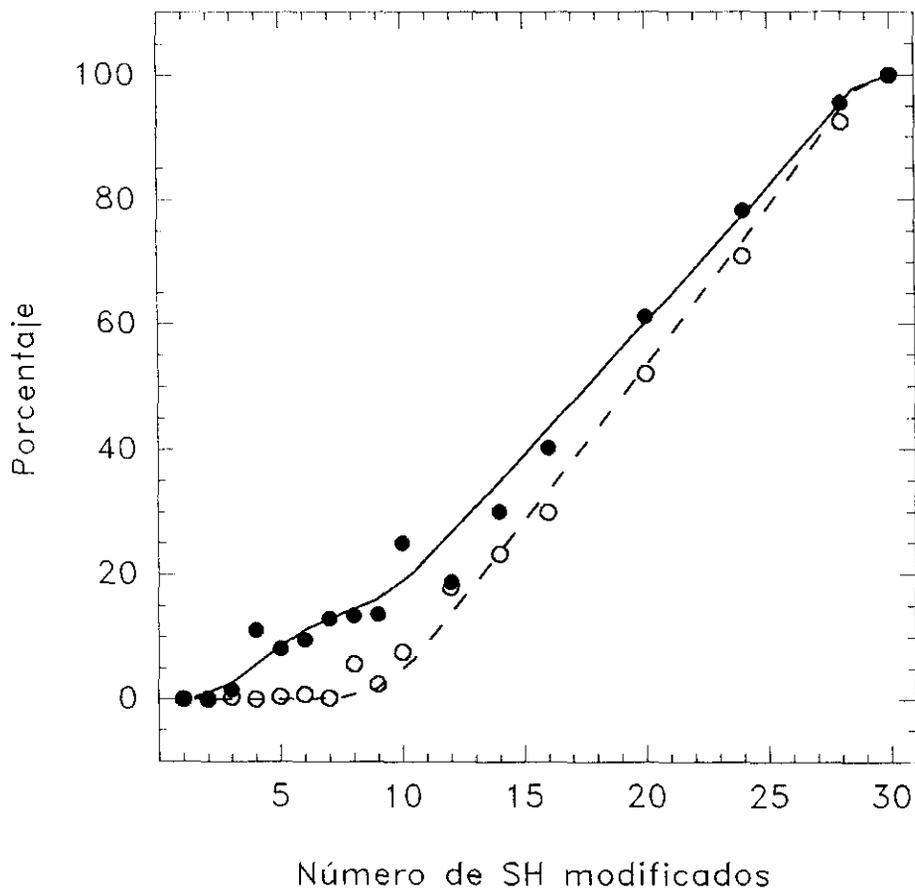


Figura 37. Representación de los valores experimentales de porcentaje de activación de RNasa (puntos negros) y de disociación del complejo IR-RNasa A (puntos blancos) como consecuencia del tratamiento progresivo con DTNB, en función de la relación $[DTNB]/[complejo]$ globalmente alcanzada en la disolución. Las curvas dibujadas corresponden a la representación de los valores teóricos que tomarían los parámetros anteriores (% activación RNasa, en línea continua, y % disociación del complejo, en línea discontinua) considerando para el IR disociado un mecanismo de modificación por DTNB según el modelo "todo o nada", y haciendo $a=5$, $d=15$ y $f=0.15$.

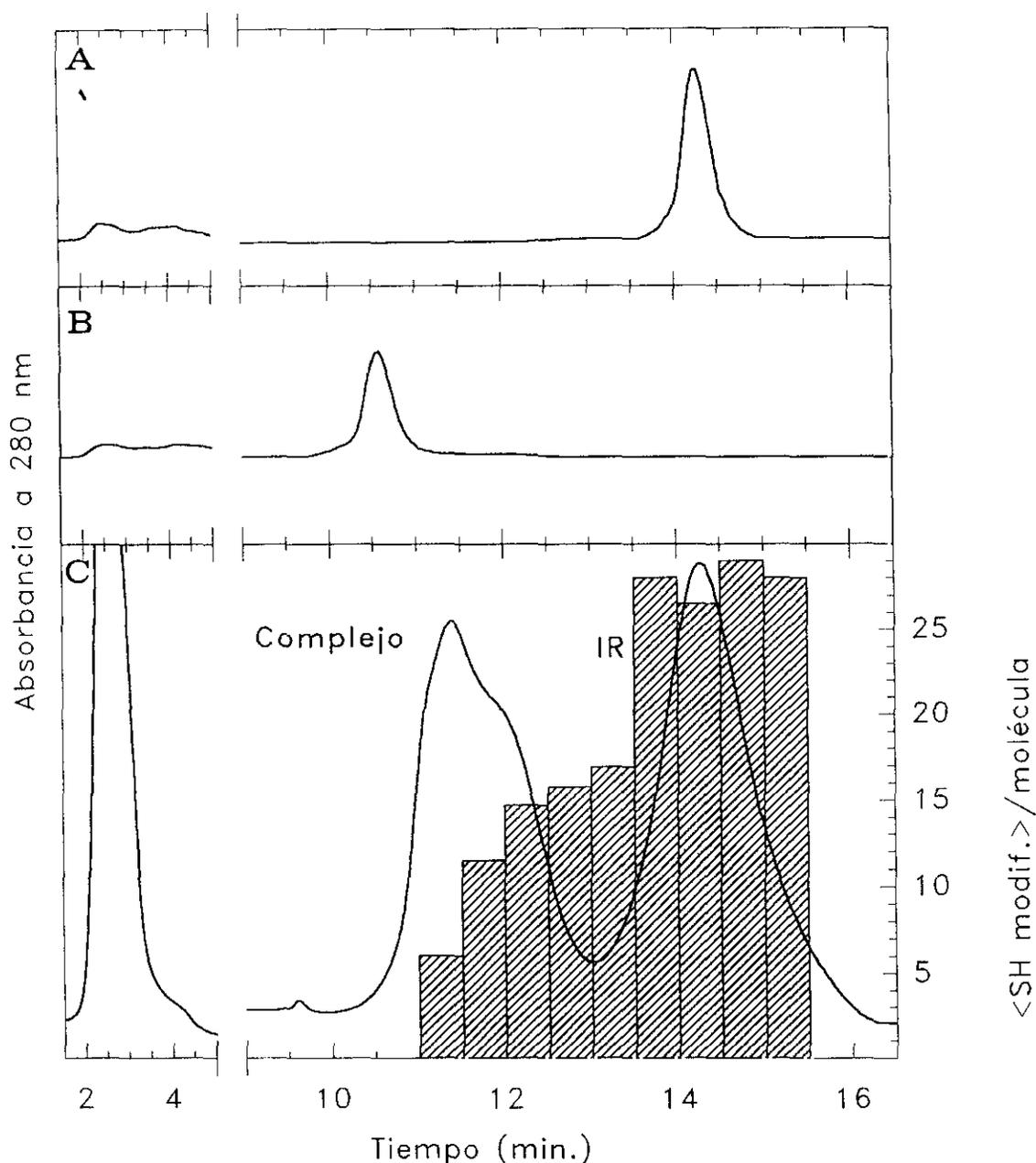


Figura 38. Cromatografías de intercambio aniónico en una columna DEAE-TSK 5PW (Beckman), empleando las condiciones que se describen en "Parte Experimental". (A) Perfil cromatográfico típico cuando se aplica una alícuota de IR libre. (B) Perfil cromatográfico obtenido para una alícuota de complejo IR-RNasa A nativo. (C) En línea continua se representa el perfil cromatográfico de una preparación de complejo IR-RNasa A sometido a un proceso de oxidación progresiva con DTNB, hasta alcanzar una relación [DTNB]/[complejo] total acumulada de 7.5 (oxidación del 50 % de los grupos SH de la disolución de complejo). En barras ralladas se representa el número promedio de grupos SH oxidados por molécula de complejo o IR en cada una de las fracciones de 0.5 ml recogidas.

En cualquier caso, aún tratándose de picos anchos, se alcanza una buena resolución entre ellos. Por consiguiente, la evaluación del contenido en grupos tiol reducidos en las diferentes fracciones obtenidas, nos ha permitido calcular el valor promedio por molécula (o de complejo o de IR) a lo largo del eluido. Esto es lo que se representa en el diagrama de barras en la misma figura. Dos hechos son notorios como resultados de estas evaluaciones. En el complejo se detectan estados de oxidación variables, que van aumentando a lo ancho del pico. En su valor más alto, la oxidación sólo afecta a 15 grupos tiol de los 30 de la molécula. Por el contrario, a lo ancho del pico de elución del IR disociado, el estado de oxidación se mantiene constante en torno a 29 grupos SH oxidados. Teniendo en cuenta el error experimental en estas determinaciones, se puede asumir que estos resultados apuntan a que toda la población de IR disociado se encuentra cuantitativamente oxidada al completo. En consecuencia, se confirma la validez del mecanismo "todo o nada" para la modificación por el DTNB del IR libre, y con ello, el papel sumidero de DTNB asignado al IR libre.

Por su parte, la presencia de moléculas de complejo con hasta 15 grupos SH oxidados concuerda relativamente bien con los resultados mostrados. Según éstos, la disociación del complejo se produce cuando 15 de sus grupos tiol resultan oxidados. En consecuencia, cabría esperar que el máximo grado de oxidación compatible con el mantenimiento del complejo asociado, fuese el de 14 grupos tiol oxidados, y no 15. Sin embargo, las curvas teóricas de asociación y disociación que se obtienen cuando se hace $d=16$, se alejan considerablemente del comportamiento experimentalmente medible (figura 39). Por tanto, es inmediato considerar que la discrepancia mencionada sea fruto del error experimental, bien en la determinación de los SH remanentes, bien como consecuencia del solapamiento entre los anchos picos de complejo e IR.

Como resumen, se puede considerar probado que la oxidación de 5 o más grupos SH en el complejo IR-RNasa conduce a su activación, sin que ello suponga disociación, mientras no se afecten más de 15 residuos. Si esto ocurre, el complejo se disocia, y el IR liberado se vuelve extremadamente sensible a sufrir oxidación adicional hasta quedar completamente modificado es sus SH.

4.7.4 Estudios cinéticos sobre la reactividad del complejo IR-RNasa A hacia el DTNB

El mecanismo de oxidación propuesto para el complejo IR-RNasa A supone una reactividad frente al DTNB similar para todas los grupos SH del IR, en tanto en cuanto éste permanezca asociado a la RNasa A. La similar reactividad ha de traducirse en que las cinéticas de modificación por el DTNB (curvas de A_{412} vs tiempo) deben mantenerse constantes hasta tanto no se produzca la disociación del complejo. Un examen cuidadoso de tales curvas de A_{412} frente al tiempo para cada uno de los pasos de oxidación con cantidades subestequiométricas de DTNB (figura 40), revela que, efectivamente, no se producen grandes diferencias entre ellas, si bien no son coincidentes. Esta falta de coincidencia nos llevó a cuantificar las constantes cinéticas promedio que gobernaban la reacción con el DTNB en cada etapa de modificación.

Como ya se ha comentado, la reacción del DTNB con el complejo IR-RNasa A, transcurre en dos etapas:

La aparición de cada una de las dos moléculas de TNB (TNB_1 y TNB_2) vendrá gobernada por su correspondiente ecuación cinética, en función de las respectivas constantes de velocidad, k_1 y k_2 . Dada la ausencia de agregados por puentes disulfuro en nuestras condiciones de reacción, las ecuaciones cinéticas, en términos diferenciales, son las siguientes:

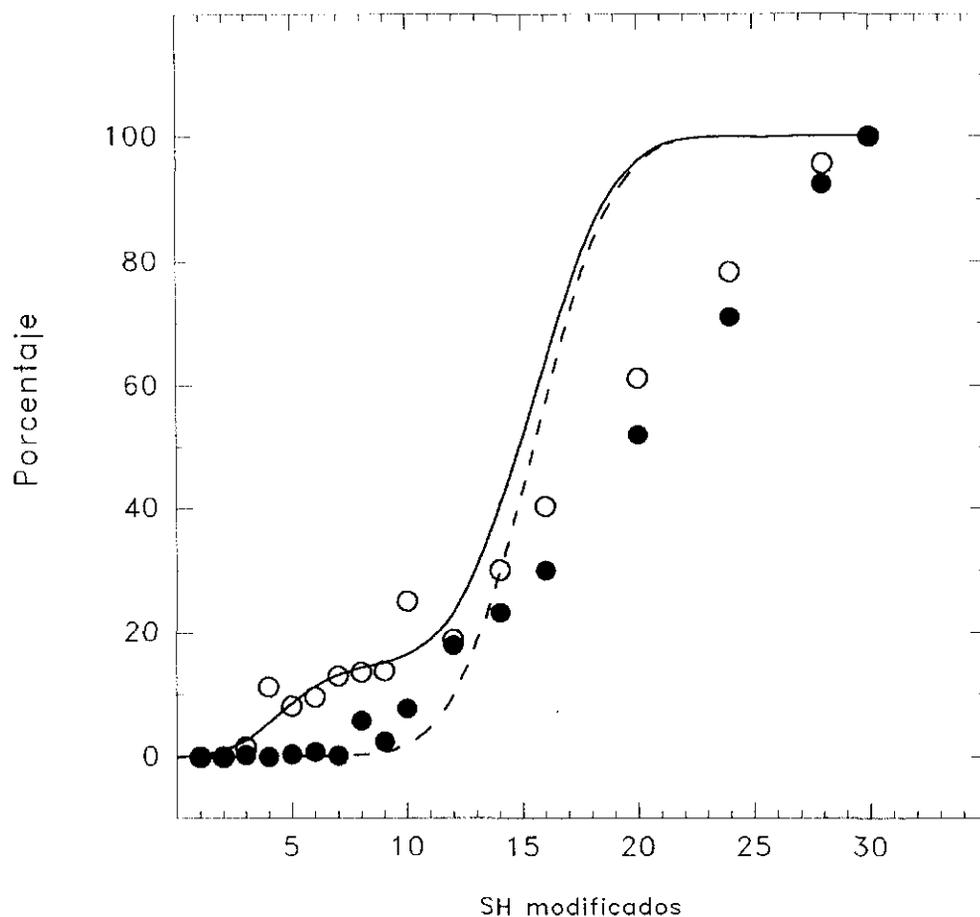


Figura 39. Ajuste de los valores experimentales de porcentaje de activación de RNasa (puntos negros) y de porcentaje de disociación del complejo (puntos blancos) provocados por la oxidación progresiva con DTNB, en función de la relación global $[DTNB]/[complejo]$ alcanzada, al modelo teórico que considera un mecanismo "todo o nada" para la oxidación del IR disociado, haciendo $a=5$, $d=16$ y $f=0.15$.

A₄₁₂ vs T

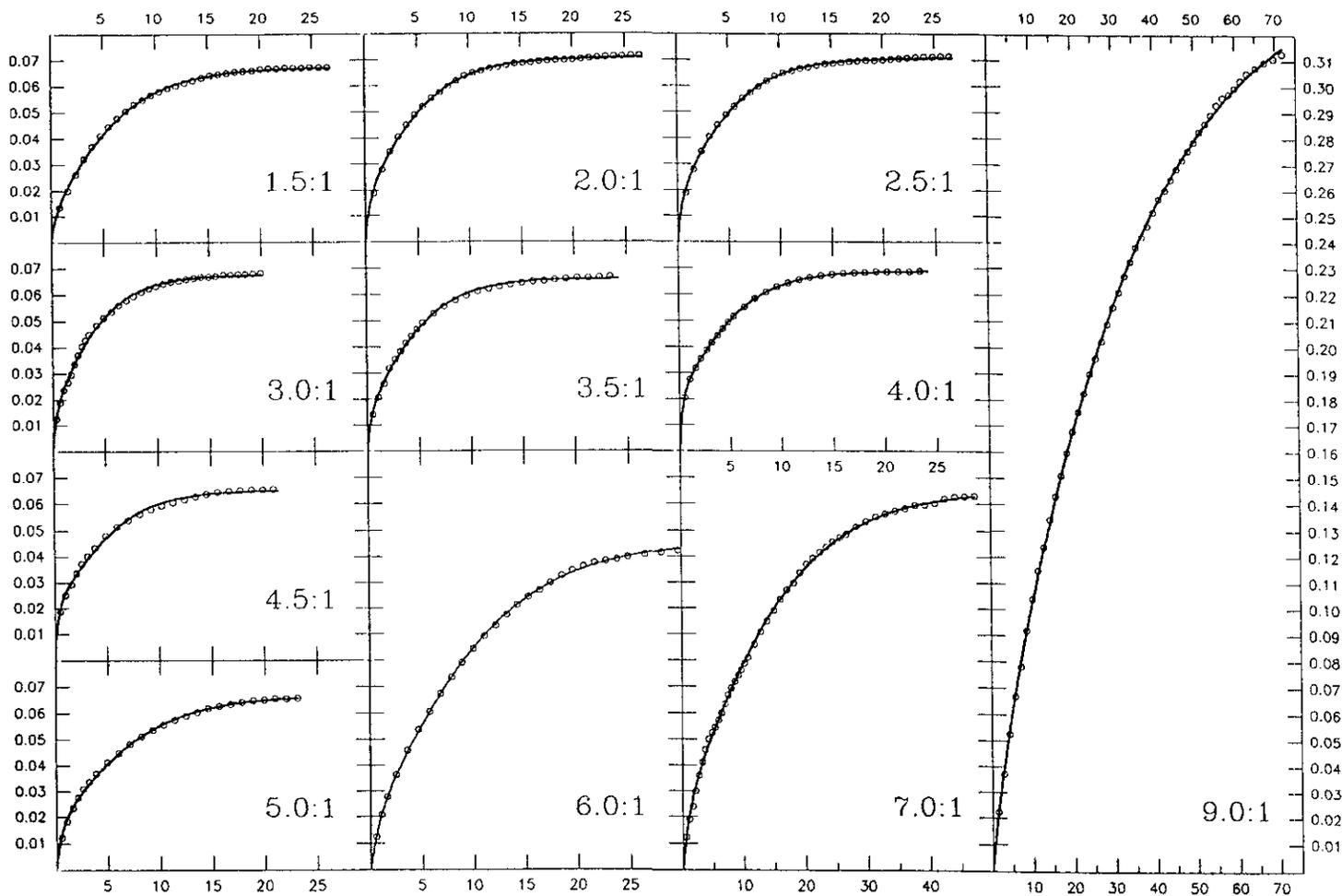


Figura 40. Curvas que registran la evolución de la A_{412} en función del tiempo para cada una de las etapas de incubación del complejo IR-RNasa A con cantidades subestequiométricas de DTNB, y que recogen la liberación de TNB. En cada una de las gráficas se indica el valor acumulado de la relación $[DTNB]/[complejo]$ en cada paso de modificación.

$$\frac{d [\text{TNB}_1]}{dt} = k_1 \cdot [\text{COMPLEJO}] \cdot [\text{DTNB}] \quad [16]$$

$$\frac{d [\text{TNB}_2]}{dt} = k_2 \cdot [\text{COMPLEJO-S-S-TNB}] \quad [17]$$

$$\frac{d [\text{COMPLEJO-S-S-TNB}]}{dt} = k_1 \cdot [\text{COMPLEJO}] \cdot [\text{DTNB}] - k_2 \cdot [\text{COMPLEJO-S-S-TNB}] \quad [18]$$

La integración de las dos primeras ecuaciones nos permite conocer, de forma teórica, la aparición con el tiempo de TNB_1 y TNB_2 , respectivamente. La integración de la primera es inmediata. Por el contrario, la integración de la segunda requiere la previa integración de la tercera. Tras el empleo de algunas aproximaciones que no afectan de forma significativa a los resultados finales, llegamos a las siguientes expresiones:

$$[\text{TNB}_1] (t) = \frac{A \cdot B \cdot [e^{(mk_1 t)} - 1]}{A \cdot e^{(mk_1 t)} - B} \quad [19]$$

$$[\text{TNB}_2] (t) = B \cdot [1 - e^{(-k_2 t)}] - (B/A) \frac{k_2}{mk_1} \cdot \frac{k_2}{k_1} \cdot \ln \frac{A \cdot e^{(mk_1 t)} - B}{[A - B]} \cdot e^{(-k_2 t)} \quad [20]$$

Donde $A = [\text{COMPLEJO}] \cdot \text{número de SH} = [\text{SH}]_{\text{total}}$
 $B = [\text{DTNB}]_0$, o concentración de DTNB a tiempo 0.
 $m = A - B$

Experimentalmente no conocemos los valores de $[\text{TNB}_1]$ y de $[\text{TNB}_2]$. Las medidas de A_{412} vs tiempo dan cuenta de la cinética total de liberación de TNB al medio. Integrando las dos primeras ecuaciones se dispondrá de sendas ecuaciones algebraicas que han de proporcionar cómo van apareciendo en el medio de reacción. Por tanto, la ecuación general que describe el aumento de A_{412} con el tiempo será:

$$A_{412} = 13600 \cdot ([\text{TNB}_1] (t) + [\text{TNB}_2] (t)) \quad [21]$$

donde $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ es el coeficiente de extinción molar del TNB. En todos los casos se empleó un paso óptico de 1 cm. Un ajuste por mínimos cuadrados de los datos experimentales (A_{412} vs tiempo), a la expresión general que surge de sustituir las ecuaciones [19] y [20] en la expresión anterior, permite evaluar los valores que toman los parámetros k_1 y k_2 en cada etapa de oxidación del complejo IR-RNasa A por el DTNB.

En la tabla VI se recogen los valores obtenidos para ambas constantes de velocidad a lo largo de la oxidación por el DTNB. Como se puede observar, en la zona en la que aún no se produce disociación del complejo (hasta una relación molar DTNB/complejo alrededor de 4.5), los valores de k_1 y de k_2 no experimentan variaciones importantes; se mantienen en el mismo orden de magnitud a medida que progresa la oxidación. A partir de ese punto, y coincidiendo con el momento en el que de forma significativa comienza a aparecer complejo disociado, los valores de k_1 sufren un importante incremento, a la vez que k_2 disminuye en dos órdenes de magnitud. De nuevo, queda perfectamente definido un comportamiento muy diferente entre ambas zonas de la curva de modificación (figura 41).

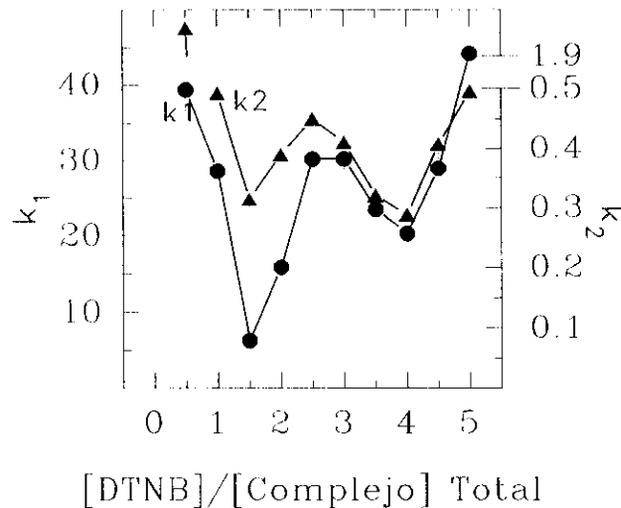


Figura 41. Representación de la evolución que experimentan los valores de las constantes cinéticas k_1 y k_2 que gobiernan, respectivamente, la primera y la segunda de las etapas de que consta la reacción del complejo IR-RNasa A con el DTNB, conforma aumenta la relación global acumulada $[DTNB]/[complejo]$. En círculos, los valores de k_1 , y en triángulos, la evolución de k_2 .

En el primero de los tramos, las variaciones observadas son muy pequeñas. Sin embargo, si se analizan estos valores ajustados en función de la relación molar global DTNB/complejo, se pueden apreciar dos tránsitos que significativamente se correlacionan con grados de modificación claves desde el punto de vista del modelo propuesto:

- a) El primero de ellos se localiza a una relación DTNB/complejo de 1.5-2.0; es decir, en el punto en el que se han modificado 3-4 residuos de cisteína por molécula de complejo como promedio. Este es el valor límite que, como ya vimos, determinaba la aparición de complejo activo. En este intervalo se observa un descenso en los valores de k_1 y de k_2 . Tras ésta disminución comienzan a recuperarse los valores iniciales.
- b) El segundo de los cambios se halla situado a una relación DTNB/complejo de 3.5-4.5, intervalo umbral para el comienzo de la disociación del complejo. En esta zona, tanto los valores de k_1 como los de k_2 experimentan un nuevo descenso, para, a continuación, evolucionar cambiando drásticamente (segundo tramo).

La cuantificación de k_1 y k_2 llevada a cabo, en modo alguno es el reflejo de valores particulares de estas constantes atribuibles a residuos concretos que se van modificando secuencialmente. Por el contrario, la evolución de estas constantes es el reflejo de cambios significativos en la reactividad global del complejo. En efecto, si la paulatina modificación del complejo no afectara a la reactividad de sus SH, no habría que esperar tránsito alguno. Por su parte, si los grupos tiol del complejo se fuesen oxidando según su diferente reactividad hacia el DTNB, sería de esperar que se modificasen primero los más reactivos y, posteriormente, los de menor reactividad. En consecuencia, los valores ajustados deberían ser cada vez menores conforme progresa la

modificación. El hecho de que no se observe ninguno de estos comportamientos, sólo puede ser explicado admitiendo la existencia de cambios conformacionales que alteran el entorno a accesibilidad de los SH. Con ello se explican los incrementos de reactividad detectados. Dado que son los tioles de la subunidad IR los únicos que sufren la acción del DTNB sobre el complejo, se puede deducir la existencia de cambios conformacionales en tal subunidad.

La existencia de estos cambios de reactividad no invalida, sin embargo, el modelo de modificación aleatoria propuesto para el complejo no disociado. Son, ciertamente, cambios pequeños que no afectan de forma significativa a la distribución estadística del marcaje. De hecho, se ha comprobado (datos no mostrados) que serían necesarios cambios de, al menos, un orden de magnitud en los valores de k_1 para que ello tuviera un reflejo apreciable en las curvas teóricas de activación.

En cuanto al segundo tramo de la curva de oxidación con DTNB (figura 16), se aprecia un diferente comportamiento para las constantes cinéticas k_1 y k_2 . El fuerte incremento que experimenta k_1 parece estar relacionado a la mayor susceptibilidad a la modificación que presenta el IR libre en comparación con el complejo. Por su parte, k_2 sufre una caída en sus valores. Esta disminución puede ser la consecuencia de la desnaturalización o desplegamiento del IR una vez disociado. En efecto, k_2 da cuenta de la etapa de formación de disulfuros intracatenarios. La mayor flexibilidad conformacional del IR disociado puede hacer que se encuentre cinéticamente desfavorecida la aproximación de un nuevo grupo SH al disulfuro mixto -S-S-TNB.

Con el fin de aportar evidencia experimental sobre los cambios conformacionales comentados, se procedió a su cuantificación mediante el estudio por dicroísmo circular de las mezclas de reacción, tras los diferentes pasos de oxidación.

4.7.5 Estudios mediante CD de la oxidación del complejo IR-RNasa por el DTNB

Una vez concluida la reacción del complejo con el DTNB añadido en cada paso, una alícuota de la mezcla era dializada mediante cromatografía de filtración en gel, en una columna de sephadex G-25, con objeto de eliminar el TNB liberado, que podría afectar a los resultados espectrocópicos.

Los espectros de DC fueron registrados en el intervalo de 200-250 nm (figura 30). El posterior análisis de los espectros obtenidos se realizó mediante el programa "Convex Constraint Algorithm" (Fasman *et al.*, 1993). De este modo calculamos las proporciones de α -hélice, lámina β , giros β y estructura aperiódica que conforman el complejo IR-RNasa A, conforme avanza su modificación con DTNB. Los resultados obtenidos para grados de modificación del complejo compatibles con su estado asociado (relación molar global DTNB/complejo entre 0 y 5), se representan en la figura 42. En la misma figura se representan los valores de k_1 y k_2 de la tabla VII, con el fin de poder establecer comparaciones entre la evolución de los tres parámetros.

Los datos obtenidos mediante estos estudios corroboran las conclusiones derivadas en el apartado anterior. En efecto, los tránsitos detectados en la evolución de las constantes de velocidad k_1 y k_2 , se correlacionan con cambios significativos en la estructura secundaria del complejo. En el comienzo de la modificación del complejo con DTNB, se observa una ligera desorganización de la proteína, que se traduce en la disminución de la proporción de α -hélice y de giros β , mientras aumenta la estructura aperiódica. En torno a una relación molar DTNB/complejo de 2, aparece la primera transición en los valores de k_1 y de k_2 , relacionada con un cambio conformacional por el cual la proteína se reorganiza, aumentando su contenido en α -hélice, al tiempo que disminuye ligeramente la estructura en lámina β , y fuertemente la aperiódica.

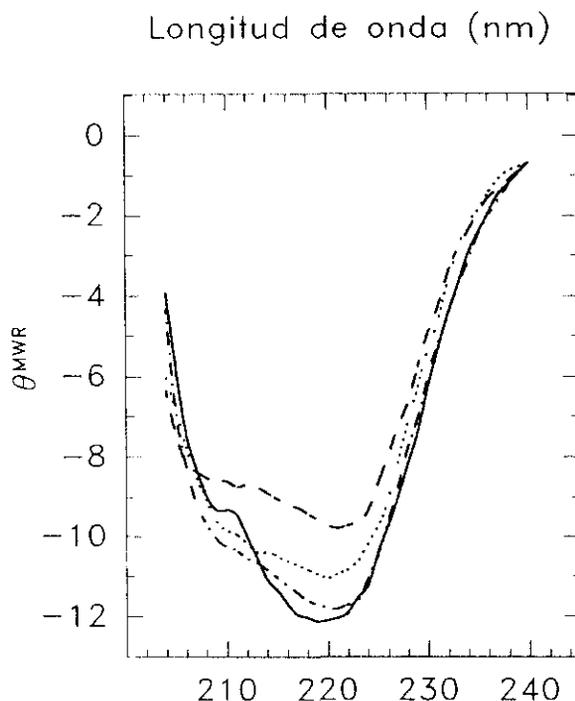


Figura 42. Espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano, de distintas alícuotas de complejo IR-RNasa A sometidas a diferentes grados de oxidación por DTNB. En concreto, en línea continua se dibuja el espectro correspondiente al complejo en estado nativo ($[DTNB]/[complejo]=0$); en línea discontinua, el espectro de complejo sometido a un grado de oxidación (r) de 0.133 ($[DTNB]/[complejo]=2$); en línea de puntos y rayas, el espectro de una alícuota de complejo con un grado de modificación de 0.233 ($[DTNB]/[complejo]=3.5$), y, por último, en línea de puntos, el espectro de complejo con un grado de modificación de 0.333 ($[DTNB]/[complejo]=5$). Estos grados de oxidación corresponden a puntos estratégicos en la curva de oxidación del complejo por DTNB. Cuando la relación molar $[DTNB]/[complejo]$ es de 2, nos encontramos con el primero de los cambios conformacionales; el que determina el comienzo de la formación de complejo activo. Cuando la relación toma el valor de 3.5, la proteína se encuentra cuantitativamente en forma de complejo activo. Con una relación de 5, se desencadena el segundo de los cambios conformacionales que determina la disociación del complejo en IR inactivo y RNasa A libres.

Alrededor de una relación molar DTNB/complejo de 4.5-5, se producía la segunda de las transiciones en los valores de k_1 y k_2 . En ese punto hemos comprobado la existencia de un nuevo cambio conformacional, que se traduce en una disminución en el componente de α -hélice, al tiempo que aumentan las estructuras en giros β y aperiódica. En ese momento, como ya vimos, se produce la disociación del complejo en IR y RNasa A libres. El IR continúa su oxidación según el mecanismo "todo o nada", lo que implica que, en la mezcla de reacción, sólo vamos a encontrar complejo activo en cantidad decreciente a medida que aumenta la proporción de IR totalmente oxidado. La presencia en el medio de tres especies moleculares distintas (complejo, IR y RNasa) hace que el análisis de los correspondientes espectros CD se complique, una vez que se produce la disociación, por lo que no se ha proseguido, a partir de ese punto, con un estudio similar. En cualquier caso, los espectros CD obtenidos van desplazándose paulatinamente hacia menores longitudes de onda, indicando un progresivo incremento en estructuras secundarias no ordenadas (desnaturalización del IR disociado). En todo momento, sin embargo, se mantienen contribuciones dicroicas a longitudes de onda correspondientes a giros β . Ello tiene su justificación en el elevado número de puentes disulfuro internos que se han formado. La molécula del IR, aunque desorganizada, se encontrará fuertemente compactada.

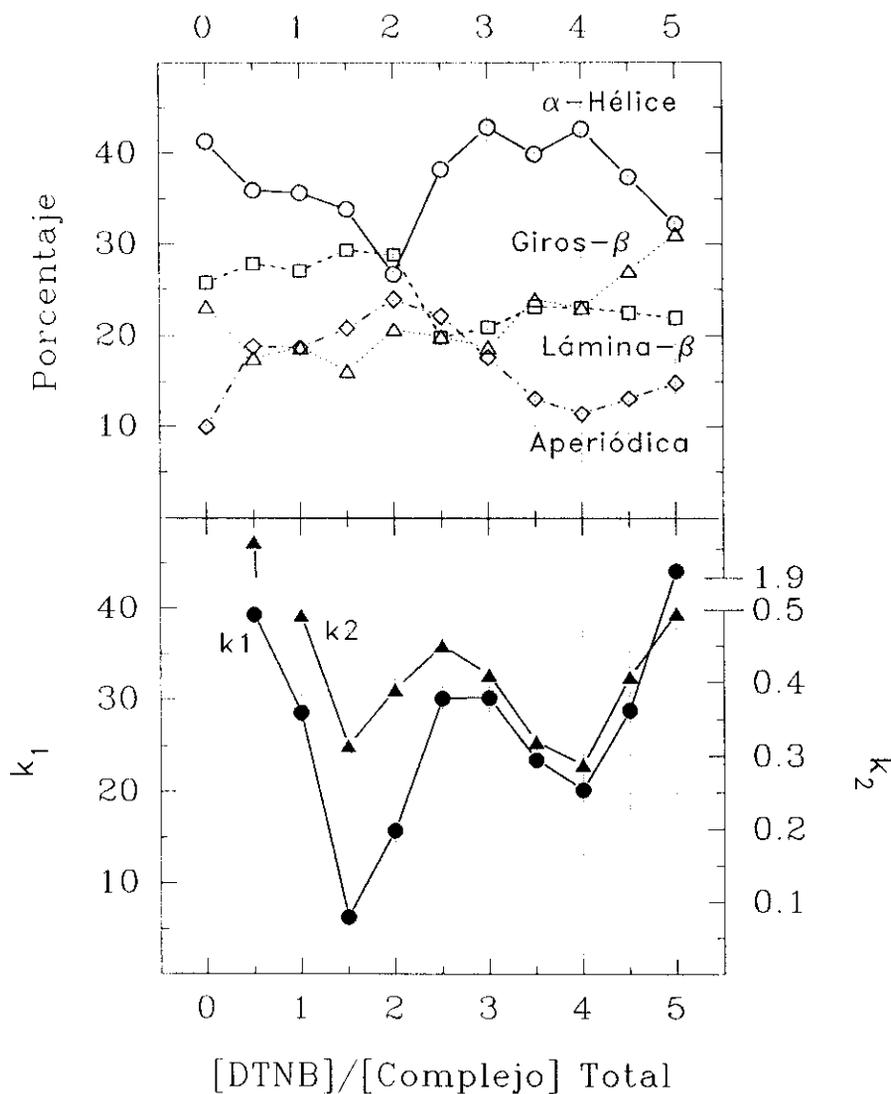


Figura 43. Variaciones de parámetros estructurales y cinéticos en la molécula de complejo IR-RNasa A sometida a oxidación progresiva con DTNB, conforme aumenta la relación [DTNB]/[complejo], hasta alcanzar un valor de 10 (antes del comienzo de la disociación del complejo). **(A)** Contenido en α -hélice, lámina β , giros β y ordenación aperiódica de preparaciones de complejo sometidas a oxidación progresiva con DTNB. Evolución de dichos parámetros conforme incrementa la relación [DTNB]/[complejo], hasta alcanzar ésta un valor de 10. **(B)** Evolución de las constantes cinéticas k_1 y k_2 , que determinan las dos etapas por las que transcurre la reacción del complejo IR-RNasa A con el DTNB.

4.7.6 Reversibilidad de la oxidación por DTNB

Los estudios reflejados hasta ahora han permitido evidenciar cómo el complejo IR-RNasa puede experimentar, por reacciones de intercambio tiol-disulfuro con el DTNB, un proceso de activación ribonucleolítica sin disociación; y ello, mediado a través de cambios conformacionales, probablemente de la subunidad IR.

Por el momento, tales resultados casan bien con la hipótesis sobre el control reversible de la actividad ribonucleolítica presente en el complejo enzimático IR-RNasa. Así, por modificación covalente de la subunidad IR, ésta puede regular positivamente (activación) a la subunidad catalítica, la RNasa.

Para comprobar la reversibilidad de este control, es preciso estudiar si en condiciones reductoras (p. ej.: DTT en el medio), opuestas a las condiciones oxidantes hasta ahora empleadas, el complejo activado recupera su estado inactivo; es decir, si la subunidad IR es capaz de regular negativamente (inhibición) la actividad enzimática del complejo activo.

Con tal finalidad, preparaciones de complejo tratadas con diferentes relaciones molares de DTNBse sometieron, inmediatamente después de terminar la oxidación por el disulfuro (A_{412} constante en el tiempo) a la acción del DTT. En la Tabla VIII se resumen los datos obtenidos al aplicar tratamientos reductores con DTT sobre dos preparaciones de complejo con diferente grado de oxidación parcial, y, por tanto, con diferente porcentaje de activación y de disociación.

La inhibición de toda la actividad ribonucleolítica liberada por el DTNB sólo se consigue cuando la oxidación previa es lo suficientemente suave como para no provocar disociación del complejo. Es decir, en términos de actividad, la reversión que ejerce el DTT sólo afecta a la fracción de moléculas que se encuentra en forma de complejo activo; las moléculas de IR disociadas no recuperan su actividad inhibidora tras el tratamiento reductor. Parece obvio que su modificación todo o nada las desnaturaliza irreversiblemente.

[DTNB]/[complejo]	% Oxidación	% Disociación	% Actividad	
			Antes DTT	Después DTT
2.5	17	-	14.5	-
14	82	76	80	74

Tabla VIII. En esta tabla se recogen los resultados obtenidos en los estudios de reducción con DTT realizados sobre preparaciones de complejo IR-RNasa A tratados previamente con diferentes concentraciones de DTNB, de forma que al complejo alcance diferentes grados de oxidación.

4.8 OXIDACIÓN DEL COMPLEJO IR-RNasa POR DISULFUROS BIOLÓGICOS

De lo expuesto hasta este momento, queda claro que en el complejo entre el IR y la RNasa se dan los requisitos necesarios para su regulación reversible por reacciones de intercambio tiol-disulfuro. La extrapolación de estos resultados a la situación *in vivo*, con lo que ello supone de regulación reversible de la actividad ribonucleolítica por el estado redox celular, sólo es posible si los resultados obtenidos con el DTNB se pueden hacer extensivos a otros disulfuros de origen natural. A este nivel se han considerado tres disulfuros de conocida presencia celular y cuyas propiedades ácido-base abarcan desde el carácter ácido del glutatión oxidado (carga neta negativa a pH fisiológico), hasta el básico de la cistamina (carga positiva a pH neutro), pasando por el carácter neutro de la cistina (carga aproximadamente nula a pH neutro). La consideración de estos aspectos ácido-base reviste gran importancia.

En efecto, los estudios preliminares llevados a cabo con glutatión oxidado (datos no mostrados) pusieron de manifiesto que su reacción con el complejo era considerablemente más lenta que la del DTNB. A este respecto, las peores propiedades como grupo saliente del GSH en comparación con el DTNB, son, sin duda, un factor clave; o, en otros términos, el DTNB es mucho más oxidante que el GSSG. El complejo IR-RNasa presenta un carácter ácido neto que desfavorece su reacción con el también ácido DTNB. Sin embargo, la reacción entre ambos progresa de forma suficientemente rápida, impulsada por el potencial de óxido-reducción considerablemente negativo del par TNB/DTNB. Con el GSSG no ocurre lo mismo. Su menor poder oxidante ($E_{\text{redox}}(\text{GSH}/\text{GSSG}) = -0.205 \text{ v}$) (Keire *et al.*, 1992) hace que las repulsiones electrostáticas no se vean suficientemente contrarrestadas, con lo que la energía libre de activación no resulta lo suficientemente baja. En suma, la reacción progresa de forma muy lenta.

Dada la importancia que pueden alcanzar las repulsiones electrostáticas, se entiende la conveniencia de analizar el efecto regulador de disulfuros biológicos con diferencias en su carga neta. Esta comparación viene favorecida por el hecho de que los tres disulfuros mencionados muestran aproximadamente el mismo potencial redox (Keire *et al.*, 1992).

La reacción del complejo IR-RNasa con cualquiera de los disulfuros biológicos comentados, era, en todo caso, lenta, lo que hizo inviable llevar a cabo con ellos un estudio análogo al realizado con el DTNB. Las repercusiones fisiológicas que se pueden dar a este hecho deben estar relacionadas con la probable existencia *in vivo* de enzimas encargadas de acelerar el intercambio tiol-disulfuro. Pero, al margen de esta cuestión, que será objeto de una discusión posterior, la extrapolación de los resultados obtenidos con el DTNB sólo fue posible trabajando con los disulfuros biológicos en exceso respecto al contenido en tioles de la preparación de complejo en estudio. En estas condiciones, se evaluó el grado de activación ribonucleolítica de tales preparaciones para tiempos fijos de incubación con los respectivos disulfuros en exceso. Un estudio análogo con el DTNB no resultó posible, ya que las concentraciones en exceso de este disulfuro sintético interfieren en el ensayo de actividad ribonucleolítica.

4.8.1 Tratamiento cinético de la activación por disulfuros biológicos

En primera aproximación, cabe considerar que la activación ribonucleolítica es la consecuencia de una reacción como la esquematizada a continuación:



donde C representa a la especie de complejo inactivo (carente de actividad ribonucleolítica) y C_a , la especie resultante de la oxidación por un disulfuro genérico SS. El subíndice "a" hace referencia al carácter activo (expresa actividad ribonucleolítica) de la especie oxidada.

En condiciones de reacción en que el disulfuro se encuentre en exceso, se puede admitir que su concentración se mantiene en el curso de la reacción. De tal forma, la anterior puede considerarse como una reacción de pseudo-primer orden, cuya ecuación de velocidad será, en términos diferenciales:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{obs} \cdot [C] \quad [22]$$

donde $k_{obs} = k \cdot [SS] = cte$

En consecuencia, la ecuación de velocidad integrada será:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t} \quad [23]$$

donde C_0 es la concentración inicial de complejo.

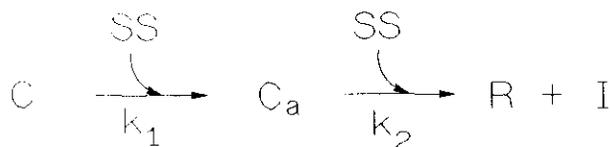
Puesto que lo que se mide experimentalmente es la aparición de actividad ribonucleolítica con el tiempo. Se hace necesario trabajar con la ecuación integrada de velocidad de activación. Es fácil llegar a tal expresión, dada la relación de proporcionalidad que ha de existir entre concentración de especie activa y su actividad enzimática. Así, se llega a:

$$\% \text{Activación} = 100 \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad [24]$$

La medida experimental de porcentajes de activación para diferentes tiempos de incubación con el disulfuro, proporcionará pares de valores, cuyo ajuste por mínimos cuadrados a la anterior expresión permitirá la evaluación de k_{obs} . Obviamente, el valor ajustado de k_{obs} será dependiente de la concentración particular de disulfuro empleada para la activación. Si se llevan a cabo una serie de incubaciones con cantidades diferentes del disulfuro, siempre en exceso, se dispondrá de sendos valores de k_{obs} . La pendiente de la representación k_{obs} vs $[SS]$ proporcionará el valor de la constante cinética del proceso de activación.

A modo de ilustración, en la figura 44 se representa la evolución de la actividad ribonucleolítica de una preparación de complejo a lo largo de su incubación con cistina 2.5 mM. En dicha figura se incluye también la correspondiente curva ajustada a la expresión [???]. La clara discrepancia entre valores experimentales y curva teórica lleva a concluir que el sencillo esquema de activación propuesto no resulta válido.

Para dar cuenta del comportamiento experimental cuasi-sigmoidal, se ha considerado un esquema de reacción en dos etapas; a saber:



Tal esquema de reacción se ha propuesto a la luz de los resultados obtenidos con el DTNB; así, C, C_a, R e I hacen referencia a complejo inactivo, complejo activo, ribonucleasa disociada e inhibidor disociado, respectivamente.

Análogamente al esquema en una sola etapa, el empleo de concentraciones de disulfuro en exceso, permite considerar las dos etapas del nuevo esquema como reacciones de pseudo-primer orden; por tanto, guiadas por las siguientes ecuaciones diferenciales de velocidad:

$$\frac{d[C]}{dt} = -k_{1,obs} \cdot [C] \quad [25]$$

$$\frac{d[C_a]}{dt} = k_{1,obs} \cdot [C] - k_{2,obs} \cdot [C_a] \quad [26]$$

$$\frac{d[R]}{dt} = k_{2,obs} \cdot [C_a] \quad [27]$$

donde $k_{1,obs} = k_1 \cdot [SS] = cte.$, y $k_{2,obs} = k_2 \cdot [SS] = cte.$

Las correspondientes ecuaciones integrales son:

$$[C] (t) = [C_T] \cdot e^{(-k_{1,obs} \cdot t)} \quad [28]$$

$$[C_a] (t) = k_{1,obs} \cdot \frac{[C]_T}{k_{2,obs} - k_{1,obs}} \cdot [e^{(-k_{1,obs} \cdot t)} - e^{(-k_{2,obs} \cdot t)}] \quad [29]$$

$$[R] (t) = [C_T] \cdot [1 + \frac{k_{1,obs}}{k_{2,obs} - k_{1,obs}} \cdot e^{(-k_{2,obs} \cdot t)} - \frac{k_{2,obs}}{k_{2,obs} - k_{1,obs}} \cdot e^{(-k_{1,obs} \cdot t)}] \quad [30]$$

Puesto que lo que se mide experimentalmente es el porcentaje de activación de la mezcla de reacción, las anteriores expresiones han de transformarse para dar cuenta de la evolución de la actividad ribonucleolítica con el tiempo de incubación. Tal actividad es la que proporcionan las especies C_a y R. A cada tiempo de incubación, la contribución de cada una de ellas será proporcional a su concentración respectiva. Llamando p y q a las correspondientes constantes de proporcionalidad (de C_a y R, respectivamente), la evolución de la actividad ribonucleolítica será:

$$\text{Actividad total (t)} = p [C_a] (t) + q [R] (t) \quad [31]$$

La relación entre ambas constantes de proporcionalidad (p/q), nos informa sobre la fracción de actividad del complejo activo, referida a la de la RNasa. Si llamamos f a tal fracción, se llega a:

$$\% \text{Activación} = 100 \cdot \left[1 + \frac{k_{1, \text{obs}}}{k_{2, \text{obs}} - k_{1, \text{obs}}} \cdot (1 - f) \cdot e^{(-k_{2, \text{obs}} t)} - \frac{k_{2, \text{obs}} - f k_{1, \text{obs}}}{k_{2, \text{obs}} - k_{1, \text{obs}}} \cdot e^{(-k_{1, \text{obs}} t)} \right] \quad [32]$$

El ajuste por mínimos cuadrados a esta expresión de los datos experimentales de porcentajes de activación para diferentes tiempos de incubación con el disulfuro, permite evaluar las constantes $k_{1, \text{obs}}$ y $k_{2, \text{obs}}$, así como la fracción f , para las diferentes concentraciones de disulfuro empleadas. De la pendiente de las representaciones $k_{1, \text{obs}}$ vs [SS] y $k_{2, \text{obs}}$ vs [SS] se evalúan, posteriormente, las constantes de velocidad correspondientes a la activación del complejo y a su disociación.

4.8.2 Oxidación por disulfuros biológicos vs DTNB

El tratamiento cinético que se acaba de exponer, basado en un proceso de oxidación en dos etapas, da buena cuenta del comportamiento observado experimentalmente. A modo de ilustración, en la figura 44, en línea de puntos, se recoge la correspondiente curva ajustada para el caso de la oxidación por cistina 2.5 mM. La bondad del ajuste es evidente cuando se compara con el que se obtiene para el tratamiento cinético correspondiente a activación en una sola etapa. En el apartado siguiente se recogen los parámetros cinéticos que se obtienen cuando se aplica este tratamiento a las activaciones ejercidas por cistina, cistamina y glutatión oxidado.

En este momento, sin embargo, se requiere resaltar la validez de los estudios llevados a cabo con el DTNB como modelizador del intercambio tiol-disulfuro del complejo IR-RNasa.

En efecto, tales estudios han permitido evidenciar la existencia de una forma asociada IR-RNasa, con un estado de oxidación intermedio, que muestra actividad ribonucleolítica. Más concretamente, la actividad específica de este intermedio de la oxidación por el DTNB es un 15 % de la que presenta la RNasa disociada.

La interpretación y el tratamiento cinético de la activación ribonucleolítica ajercida por los disulfuros biológicos, sólo ha sido posible cuando ambos hechos se han tomado en consideración. Así, los datos experimentales sólo se ajustan bien a un proceso en dos etapas a través de un intermediario que expresa sólo una fracción de la actividad ribonucleolítica total. El ajuste por mínimos cuadrados, permite cuantificar esta fracción de actividad, que resulta ser, en todos los casos, de un 15 %.

Por consiguiente, no es osado afirmar que las anteriores coincidencias no son fruto de la casualidad. Las reacciones de intercambio tiol-disulfuro del complejo IR-RNasa parecen seguir cierta lógica molecular independiente de la naturaleza concreta del disulfuro. Si ello es así, los estudios realizados con el DTNB cobrarían repercusión funcional.

En cualquier caso, la utilización del mecanismo de oxidación comentado, ha permitido cuantificar la eficacia de los diferentes disulfuros biológicos en la activación del complejo IR-RNasa. Estos aspectos cuantitativos son los que se recogen a continuación.

4.8.3 Cinéticas de la oxidación del complejo IR-RNasa por cistina, cistamina y GSSG

El efecto oxidante sobre el complejo IR-RNasa de los tres disulfuros biológicos mencionados, se cuantificó por medida de la actividad ribonucleolítica de alícuotas tomadas a tiempos controlados de las mezclas de reacción. Para ello se acudió al ensayo enzimático basado en el cCMP como sustrato. En todos los casos, las mezclas de incubación disulfuro-complejo contenían un exceso de tres órdenes de magnitud en el disulfuro biológico. La concentración de éste último en cada caso particular, se ajustó de forma que los tiempos de incubación se mantuvieran en intervalos razonables (no más de 10 horas), y que permitieran, además, considerar despreciable la oxidación ambiental.

El GSSG constituyó un caso especial. La extremada lentitud con que se expresa su reacción con el complejo, obligaría al empleo de concentraciones del disulfuro bastante superiores a 20 mM. Sólo así se podría completar su curva de activación bifásica en los mencionados tiempos razonables de incubación. Sin embargo, ello no es posible, ya que tan elevadas concentraciones de disulfuro son incompatibles con el posterior ensayo de actividad enzimática. Manteniendo la incubación con el GSSG durante tiempos similares a los empleados con la cistina, y trabajando a concentraciones máximas de disulfuro de 20 mM, sólo la primera fase de la oxidación queda suficientemente definida experimentalmente, como para permitir su ajuste por mínimos cuadrados. Ello es la consecuencia del bajo valor de k_2 respecto a k_1 en el esquema [1]. Desde un punto de vista práctico, cabe considerar que cuando $k_2 \ll k_1$, la expresión [1] queda reducida a una monoexponencial:

$$\% \text{ Activación} = f \cdot [1 - e^{(-k_1 \cdot \text{obs} \cdot t)}] \quad [33]$$

Este es el planteamiento que ha guiado el tratamiento cuantitativo de los datos experimentales obtenidos con el GSSG: su ajuste a la expresión monoexponencial anterior, a fin de obtener la constante de velocidad correspondiente a la oxidación del complejo hasta su forma activa.

En las figuras 44 a 46, se representan los porcentajes de activación del complejo para diferentes tiempos de incubación con cistina, cistamina y GSSG, respectivamente. Tales figuras recogen, igualmente, las correspondientes curvas que resultan de ajustar por mínimos cuadrados, esos valores experimentales a la expresión [32], para cistina o cistamina, o a la expresión [33] para el GSSG.

Asímismo, en el interior de cada una de las figuras anteriores se representan, frente a cada una de las concentraciones de disulfuro estudiadas, los respectivos valores de las constantes aparentes ajustadas por mínimos cuadrados. Las pendientes de estas representaciones proporcionan los valores de las constantes de velocidad buscadas.

En la Tabla IX se resumen estos resultados para cada uno de los tres disulfuros estudiados.

En un primer comentario acerca de los resultados obtenidos, cabe destacar cómo la mayor eficacia oxidante corresponde a la cistamina. Sus dos constantes de velocidad son más elevadas que las del resto. Por el contrario, el GSSG se comporta como el peor intercambiador tiol-disulfuro. Obviamente, estos resultados han de ser la expresión cuantitativa de cómo las diferencias en carga neta de los disulfuros estudiados afectan a la energía de activación del correspondiente intercambio tiol-disulfuro.

En segundo lugar, es destacable la inversión en la magnitud de las constantes cinéticas, al pasar de la cistina ($k_1 > k_2$) a la cistamina ($k_1 < k_2$). Al margen de las posibles implicaciones funcionales de este hecho (que serán objeto de discusión posterior), una explicación plausible del mismo podría encontrarse en que los grupos SH cuya oxidación desencadena la disociación del

complejo, se encuentren en posiciones de accesibilidad más restringida que las que ocupan los SH responsables de la activación sin disociación.

Disulfuro	$k_1 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$	$k_2 \times 10^6 \text{ (M}^{-1}\text{)}$
Cistamina	3.0	43.5
Cistina	2.2	1.1
GSSG	0.5	N.D.

Tabla IX. Valores calculados para las constantes cinéticas de asociación k_1 y k_2 que gobierna las dos etapas por las que transcurre la reacción del complejo IR-RNasa A con los disulfuros biológicos mencionados. En el caso del GSSG, el bajo valor de k_2 nos ha inducido a considerar tan sólo la primera de las etapas de la reacción.

Para una adecuada intuición del proceso de oxidación por disulfuros en exceso, conviene tomar en consideración los estudios llevados a cabo con el DTNB. Los análisis cinéticos realizados con este disulfuro sintético pusieron de manifiesto que la formación del disulfuro mixto, complejo-S-S-TNB, transcurre con una constante de velocidad de hasta dos órdenes de magnitud superior a la que gobierna el paso de la formación del disulfuro intramolecular. De acuerdo con las similitudes encontradas entre el intercambio tiol-disulfuro promovido por el DTNB y el promovido por los disulfuros biológicos estudiados, es admisible suponer que también con éstos últimos la formación de disulfuros mixtos se encuentra cinéticamente favorecida. Ello se traducirá en que, en las condiciones de reacción ahora empleadas (disulfuro en exceso), la formación de disulfuros mixtos sea el proceso por el que, de forma cuantitativa, se vayan modificando los grupos tiol del complejo. Tal afirmación se puede realizar, si cabe, con más fuerza que para el caso del DTNB, ya que las correspondientes mitades tiólicas de los disulfuros biológicos en estudio, son peores grupos salientes que el TNB.

Como resulta de todo ello, uno se puede imaginar cómo el complejo va resultando progresivamente modificado, primero en sus sulfhidrilos más externos, y luego, tras determinados cambios conformacionales que relajan su plegamiento, en sulfhidrilos menos accesibles. Tales modificaciones consistirían, como se acaba de exponer, en la incorporación de una mitad tiólica, o con carga neta positiva ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S}$ para la cistamina), o con carga neta nula o ligeramente negativa al pH de reacción ($\text{H}_3\text{N}^+\text{-CH(COO}^-\text{)-CH}_2\text{-S}$, para la cistina). Mientras la incorporación de estos grupos cargados se produzca en zonas superficiales, de gran libertad conformacional, no cabe esperar grandes diferencias en las respectivas constantes de velocidad; si acaso, sólo un discreto favorecimiento de la reacción con cistamina, por su carga opuesta a la del complejo, que se traduciría en un efecto atractivo. La situación cambiaría drásticamente cuando fuesen grupos SH en entornos con poca flexibilidad conformacional los que se vieran implicados en la modificación. Tal puede ser la disposición de los SH entre 5 y 15 de acuerdo con los resultados proporcionados por el DTNB) que se han de modificar en el complejo activo para que se disocie. Es fácil imaginar que, en esta situación, la introducción de una carga positiva (cisteamina) en un entorno relativamente rígido y negativo estará mucho más favorecida (baja energía libre de activación) que la introducción de dos cargas (cistina), una positiva y otra negativa, predominando ésta última. Ni qué decir tiene que en el caso del glutatión, su carga negativa neta y su mayor tamaño se traducirían, no sólo en impedimentos electrostáticos, sino también estéricos. Se justifica así la lentitud de su reacción que nos ha impedido cuantificar la constante de velocidad de la segunda etapa (disociación) en la oxidación del complejo.

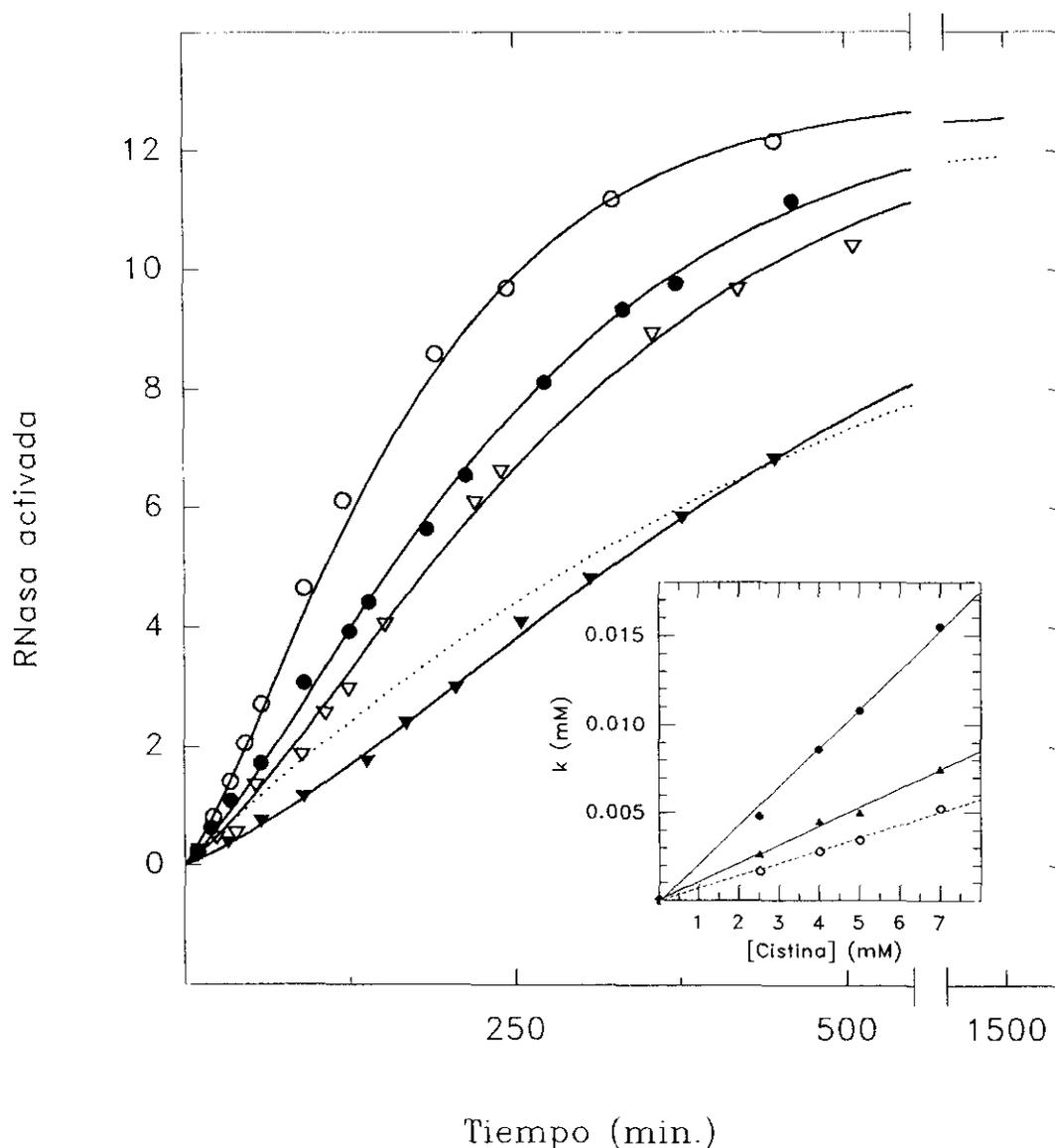


Figura 44. Curvas de activación de RNasa del complejo IR-RNasa A por tratamiento oxidante con cistina en exceso, en función del tiempo de incubación. Cada una de las curvas corresponde a los valores experimentales obtenidos tras el tratamiento con diferente concentración de cistina: (-▲-), 2.5 mM; (-△-), 4 mM; (-●-), 5 mM y (-○-), 7 mM. Las curvas dibujadas son el resultado de ajustar los valores experimentales a una curva biexponencial (ecuación [32] del texto). En línea discontinua, el ajuste de los valores experimentales a una ecuación monoexponencial ([24]) En la gráfica insertada se representan los valores de las constantes $k_{1,obs}$ y $k_{2,obs}$ calculados para cada uno de los tratamientos con cistina. En línea discontinua, los resultados obtenidos si ajustamos los valores experimentales a la ecuación [24].

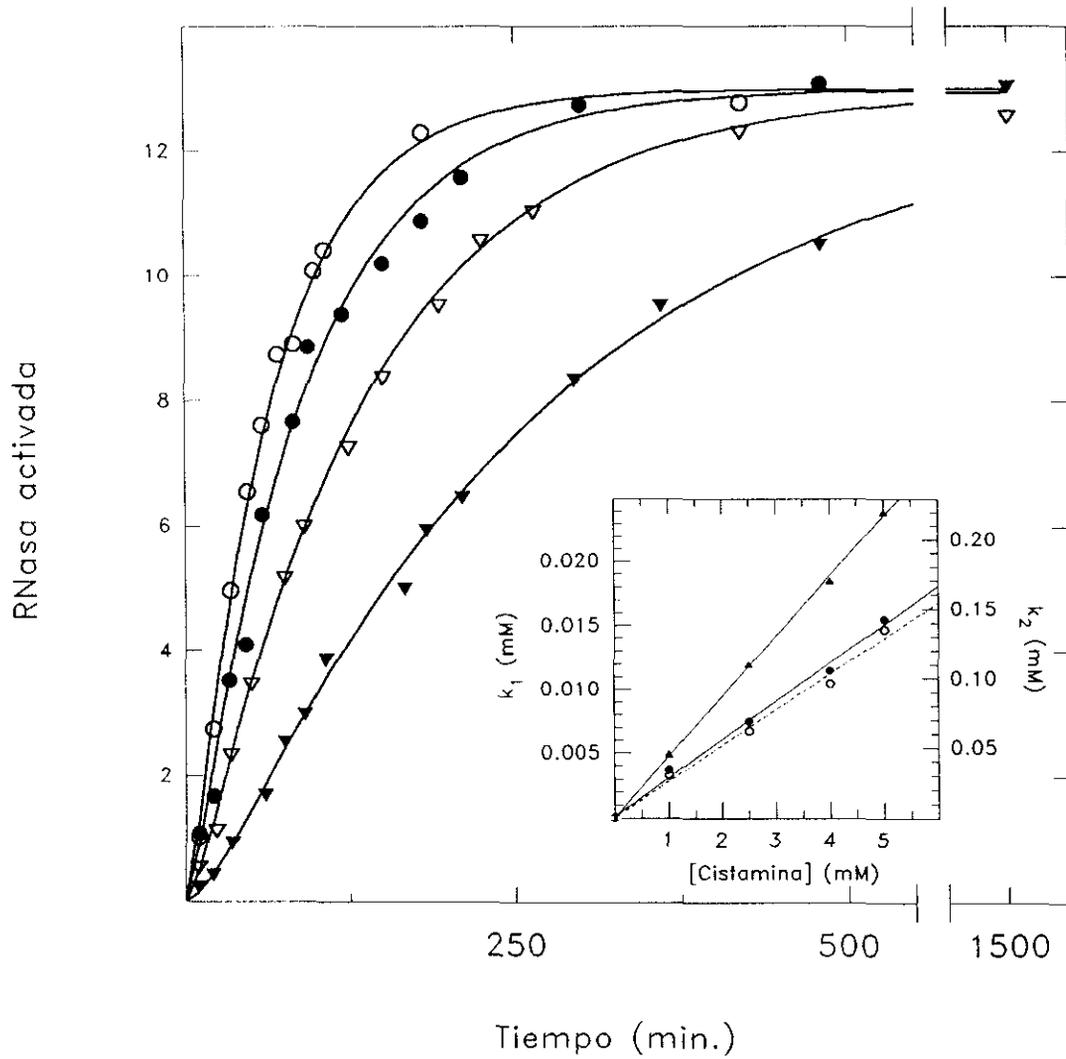


Figura 45. Representación de la activación de RNasa provocada a lo largo del tiempo por el tratamiento del complejo IR-RNasa A con diferentes concentraciones de cistamina: (-▲-), 1 mM; (-△-), 3 mM; (-●-), 4 mM y (-○-), 5 mM, así como sus ajustes a una curva biexponencial (ecuación [34] del texto). En la figura interior, se representan los valores de las constantes $k_{1,obs}$ y $k_{2,obs}$ obtenidos con los ajustes anteriores. En línea discontinua, los resultados cuando los datos experimentales se ajustan a una curva monoexponencial (ecuación [24]).

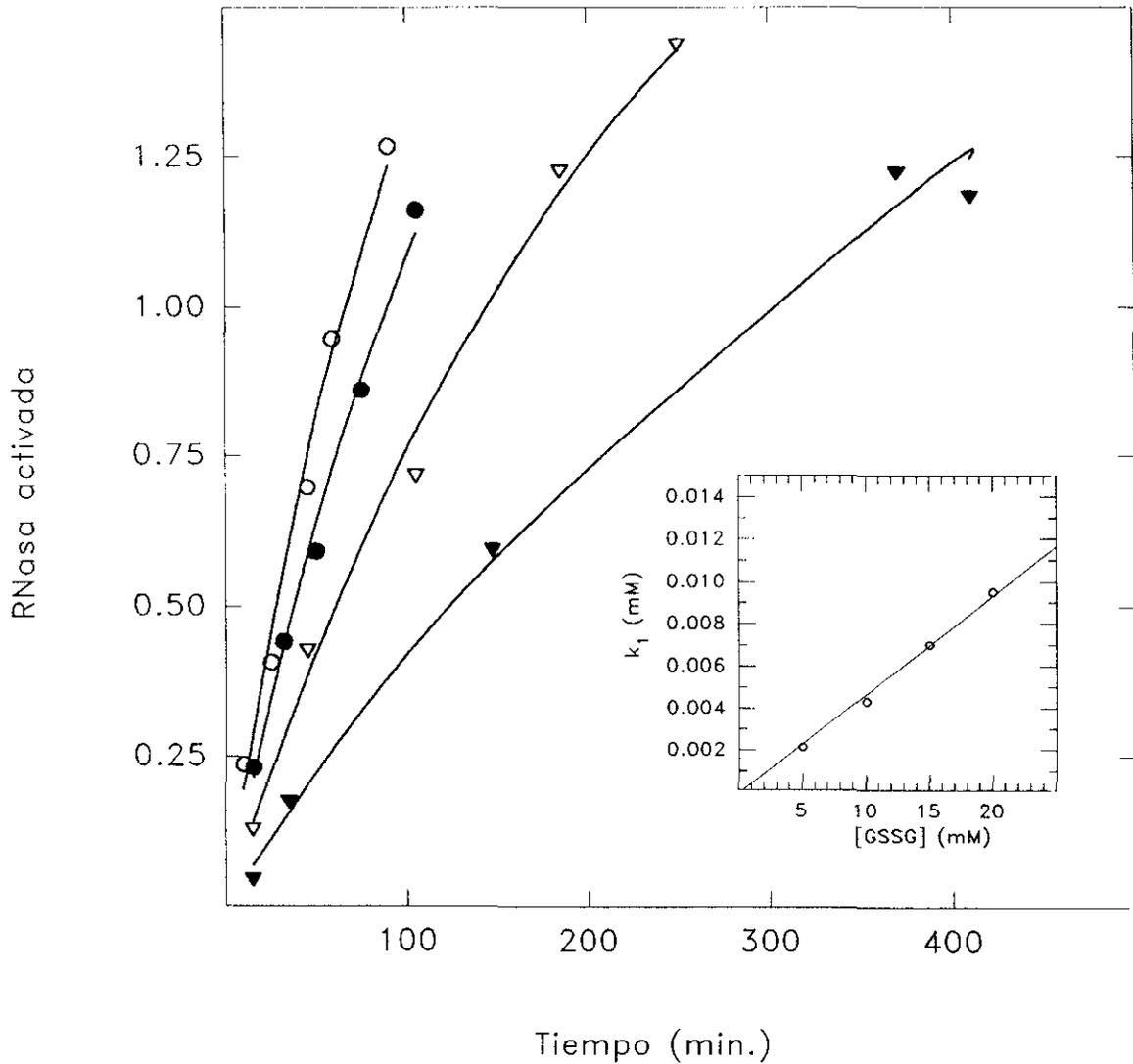


Figura 46. Representación de la activación de RNasa con el tiempo provocada por el tratamiento del complejo IR-RNasa A con GSSG a distintas concentraciones: (-▲-), 5 mM; (-△-), 10 mM; (-●-), 15 mM y (-○-), 20 mM, así como sus ajustes a una curva monoexponencial (ecuación [34]). En la gráfica interna se representan los valores de $k_{1,obs}$ obtenidos tras los ajustes anteriores.

4.8.4 Reversibilidad de la oxidación por GSSG

En el apartado 4.7.6 describimos cómo la reversión de la oxidación que el DTNB provoca en la molécula de complejo IR-RNasa mediante el empleo de un agente reductor, como el DTT, sólo era posible cuando dicha oxidación era leve, y el complejo no llegaba a disociarse. Una vez disociado, la recuperación de la actividad inhibidora no resultó posible. En los apartados anteriores hemos comprobado, asimismo, la respuesta del complejo IR-RNasa a la oxidación por disulfuros biológicos, en términos de actividad inhibidora de ribonucleasa, encontrando que, como en el caso del DTNB, el mecanismo de oxidación transcurre mediante la formación de un intermediario en forma de complejo activo. Por tanto, y hasta este punto, la modelización hecha con el DTNB del mecanismo de regulación de la actividad IR, en el sentido de inactivación, podría tener un reflejo fisiológico, protagonizado por dichos disulfuros biológicos. En este momento se hace necesario, de forma obvia, el estudio de la reversibilidad de la oxidación provocada por los disulfuros biológicos empleados, con el fin de determinar si el modelo de regulación de la actividad inhibidora propuesto sería posible.

Para ello, sometimos distintas preparaciones de complejo IR-RNasa a sendos tratamientos oxidantes con cistina, cistamina y GSSG en exceso, hasta alcanzar una activación ribonucleolítica de un 15 % respecto de la total presente (primera fase de la curva de modificación). En este punto, y por analogía con los resultados obtenidos con el DTNB, es de esperar que las mezclas de reacción estén constituidas por moléculas de complejo activo, sin que éste haya comenzado el proceso de disociación. Es previsible que la incubación de las muestras en este punto con un agente reductor revierta la oxidación provocada por el anterior tratamiento con disulfuros. Para comprobar esta idea, dializamos las mezclas de reacción mediante cromatografía de penetrabilidad en Sephadex G-25, con el fin de eliminar el exceso de disulfuros, y posteriormente incubamos las muestras resultantes con las formas reducidas de los disulfuros empleados en el paso de oxidación: cisteína, cisteamina y GSH, respectivamente. La concentración empleada de estos compuestos reducidos fue, de 20 mM.

El resultado obtenido para todos los casos fue, sorprendentemente, la no reversión de la inactivación del IR. Antes al contrario, en las mezclas de incubación continuó la aparición de nueva actividad RNasa. Este resultado podría ser explicado teniendo en cuenta un mecanismo de oxidación del complejo IR-RNasa a través de la formación de disulfuros mixtos entre los SH del IR y los disulfuros biológicos empleados. Conviene recordar que estos tratamientos se hicieron en presencia de cantidades de los disulfuros en exceso sobre los SH totales de la preparación de complejo. Mientras transcurre dichas incubaciones, la formación de dichos disulfuros mixtos, se encuentra cinéticamente favorecida sobre la formación de disulfuros intramoleculares. Una vez que las mezclas de reacción son dializadas, se elimina el agente oxidante, y en estas condiciones, el complejo activo podría evolucionar hacia la formación de disulfuros intracatenarios, entre los grupos SH que forman parte de los disulfuros mixtos y nuevos grupos SH adyacentes en la estructura terciaria del complejo IR-RNasa. Como resultado, llegaríamos a un punto en el que el número de grupos tiólicos modificados por molécula de complejo sería el doble que el buscado inicialmente, con el consiguiente aumento en la actividad RNasa y disociación del complejo, puesto que la preparación supera el 15 % de activación ribonucleolítica total, y entra en la segunda fase caracterizada por la disociación entre el IR totalmente inactivo y la RNasa. La presencia en el medio del agente reductor (cisteína, cisteamina o GSH) no consigue anular esa tendencia a la formación de disulfuros internos; es decir, la constante de velocidad que lleva a la formación de estos disulfuros es mayor que la que gobierna el proceso de reducción de los disulfuros mixtos.

La forma en la que podríamos conseguir potenciar la reducción de los disulfuros mixtos sobre la formación de disulfuros internos, sería la incubación con concentraciones de agente reductor muy

elevadas. Pero esta solución resulta impracticable en nuestras condiciones, puesto que concentraciones de agente reductor tan altas como las que se precisan inactivan a la propia RNasa (contiene cuatro puentes disulfuro en su molécula). Por ejemplo, hemos comprobado (datos no mostrados) que concentraciones de GSH superiores a 20 mM se traducen ya en inactivación de la RNasa.

Llegados a este punto, procedimos a intentar la reversión de la inactivación del IR empleando un agente reductor más potente, como es el DTT. Si bien los resultados obtenidos no tendrían repercusión funcional, por tratarse de un reactivo no biológico, nos permitió comprobar si la recuperación de la actividad inhibidora resulta posible, o si, por el contrario, el camino de oxidación seguido por el complejo cuando se emplean los disulfuros biológicos mencionados (cistina, cistamina o GSSG) conduce a la formación de una estructura con una conformación tal, que no resulta posible reducir de nuevo los puentes disulfuro formados.

Para tal propósito, incubamos una preparación de complejo oxidado con GSSG hasta alcanzar un 15 % de activación de RNasa, añadiendo tan sólo la cantidad de disulfuro necesaria para oxidar 4 grupos SH por molécula de complejo. Una posterior transformación de los cuatro disulfuros mixtos en disulfuros internos, llevaría a la aparición de moléculas con 8 grupos SH modificados, lo que no implicaría aún la disociación del complejo activo de forma apreciable. Posteriormente se incubó la preparación con DTT 10 mM (concentraciones superiores conllevan inactivación de RNasa). Durante las dos primeras horas de incubación se obtuvieron valores de actividad ribonucleolítica similares a los que presentaba la preparación antes del comienzo de la incubación con DTT. Tras una noche, lo que implica un tiempo total de incubación de 15 horas, se consiguió la recuperación del 100 % de la actividad inhibidora.

Este resultado tan solo indica la posibilidad de reactivación del IR que forma parte de un complejo activo, si bien para conocer la forma en que este proceso tiene lugar en condiciones fisiológicas se precisa llevar a cabo estudios detallados empleando cisteína, cisteamina y GSH como agentes reductores.

DISCUSIÓN

MODELIZACIÓN DEL MECANISMO DE INACTIVACIÓN DEL IR

Los conocimientos que actualmente se tienen sobre la molécula del inhibidor de RNasa se refieren fundamentalmente a aspectos puramente estructurales. Poco se conoce, sin embargo, acerca de los mecanismos de acción de esta proteína, así como de los procesos implicados en su regulación. Hasta fechas recientes, estos conocimientos se limitaban a relacionar el estado reducido de los grupos sulfhidrilo del IR, con su actividad inhibitoria de RNasa.

Los estudios que se habían llevado a cabo en este sentido consistían en la modificación drástica de la molécula de IR, o bien en forma libre, o bien unido a la RNasa en forma de complejo, con reactivos de grupos sulfhidrilo tales como *p*HMB, NEM, etc. Dichos tratamientos tenían como resultado invariable la inactivación irreversible del IR, que, en el caso de estar unido a la RNasa, provocaba su disociación de ella (Blackburn, 1977). Ante estos resultados, quedaba sin determinar si la incapacidad del IR para inhibir a la RNasa implicaba además, la imposibilidad de interacción con ella.

Estudios recientes de mutagénesis modular de la molécula del IR revelaron una respuesta negativa a esta cuestión. Diseñaron un mutante de IR que, si bien había perdido su capacidad de inhibir a la RNasa, seguía manteniendo la capacidad de unión a ella (Lee y Vallee, 1990a,b). Este hecho resultaba ser un dato positivo para nuestra hipótesis de trabajo, puesto que suponía la, cuando menos posibilidad, de que el sistema IR-RNasa se comporte *in vivo* como un sistema multienzimático en el que el IR fuera la subunidad reguladora, mientras que la RNasa sería la subunidad catalítica. La regulación que nosotros suponemos para dicho sistema implica la activación-inactivación de la subunidad reguladora, sin que ello se traduzca en procesos de asociación-disociación de los dos componentes.

Resulta evidente que, para conocer los procesos que median la regulación de la molécula del IR, hay que estudiar en primer lugar los efectos que desencadena la inactivación controlada de la misma, pero partiendo de la situación en que se encuentra en condiciones fisiológicas normales, es decir, formando el complejo con la RNasa. Hay que delimitar qué grado mínimo de oxidación de la población de grupos SH se precisa para provocar tal inactivación, y si es posible que ésta curse sin disociación del complejo ("complejo activo"). En este caso, resultaría lógico predecir que la regulación fisiológica de la proteína IR se llevaría a cabo en ese intervalo de modificación, mientras que la disociación entre el IR y la RNasa supondría modificaciones drásticas, y probablemente irreversibles, en la molécula del primero, que tendrían como consecuencia su destrucción final y la descomposición en sus aminoácidos constituyentes.

En cualquier caso, exista o no una regulación que implique la existencia de la especie de complejo activo, pretendemos estudiar los procesos que conducen a la inactivación de la molécula de IR unida a la RNasa, como respuesta a tratamientos oxidantes.

Recientemente ha sido publicado un trabajo en el que se hacen estudios de oxidación controlada de la molécula de IR de hígado de cerdo, en estado libre, con DTNB (Fominaya y Hofsteenge, 1993). Aunque los resultados de este trabajo pueden servirnos para el establecimiento de comparaciones, no hay que pensar que sus resultados sean necesariamente extrapolables a lo que ocurra con la molécula del complejo IR-RNasa. Antes al contrario, es de suponer que la interacción con la RNasa confiera a la molécula del inhibidor propiedades diferentes frente a la oxidación. De hecho, ya se ha comprobado que la asociación entre ambas moléculas provoca cambios conformacionales en alguno de sus componentes (Cid, 1992), puesto que el espectro de dicroísmo circular obtenido experimentalmente para el complejo IR-RNasa difiere del teóricamente calculado

por suma de los correspondientes a IR y RNasa libres. Además, la unión del IR a la RNasa protege a 15 residuos de cisteína de la modificación con reactivos de grupos sulfhidrilo (Cid, 1992; Hofsteenge *et al.*, 1991b), lo que apoya la idea de que el mecanismo de inactivación esperado para el IR unido sea diferente al seguido por la proteína libre.

Esta suposición, efectivamente, se vió confirmada por nuestros estudios de modificación de la molécula del complejo IR-RNasa con DTNB. El empleo de este reactivo químico se justifica por el hecho de que las reacciones en las que él participa son fácilmente seguibles espectrofotométricamente. De este modo, servirá como modelo para una primera aproximación a los mecanismos de inactivación que puedan tener lugar *in vivo* a cargo de compuestos disulfuro biológicos. En cualquier caso, se habrán de valorar los efectos que algunos de estos compuestos biológicos ejercen sobre la molécula de complejo IR-RNasa, para comprobar si se confirman los resultados obtenidos con el DTNB.

Tratamiento oxidante secuencial del complejo IR-RNasa con DTNB

El tratamiento de oxidación realizado de forma paulatina, mediante la adición de sucesivas alícuotas de cantidades subestequiométricas del reactivo, nos permitió poder hacer el seguimiento de los cambios que sufría la molécula a lo largo del proceso de modificación. Tras cada adición de DTNB y una vez que la reacción había concluído, se realizaron diferentes estudios sobre varias alícuotas de la mezcla de reacción.

Para poder llevar a cabo este tipo de estudios, hay que asegurar unas condiciones de trabajo en las que el complejo sea estable a factores ajenos a los tratamientos a los que va a ser sometido, puesto que los estudios de oxidación requerían, como es lógico, la eliminación del agente reductor que se emplea para mantener la actividad del inhibidor (DTT). En este sentido, el mantenimiento de una alícuota no sometida a tratamiento alguno, de forma paralela y en las mismas condiciones que la alícuota que era tratada con DTNB, en viales herméticos, permitió demostrar que la saturación de todos los medios en argón, así como su manipulación bajo una atmósfera de este gas, aseguraba la conservación de la estructura de la molécula del complejo durante el periodo de tiempo que duraban los estudios realizados.

La reacción del complejo con DTNB sigue un proceso en dos etapas, al igual que ocurre con la molécula de IR libre (Fominaya y Hofsteenge, 1993). El resultado al término de ambas es la formación de un puente disulfuro intracatenario en la proteína, y la liberación al medio de dos moléculas de TNB por cada molécula de DTNB consumida.

La evaluación de la pérdida de actividad inhibidora conforme progresaba la reacción, medida como actividad RNasa liberada, nos permitió comprobar que el camino general de oxidación que sigue el IR unido a la RNasa es diferente al seguido por el IR libre, como ya predecíamos.

Al comienzo del tratamiento, la oxidación de un pequeño número de grupos SH del complejo (3-4) no lleva asociada pérdida de actividad inhibidora, al igual que ocurre con el IR libre. Pero cuando la modificación progresa, mientras que el IR libre parece seguir un mecanismo de modificación descontrolado, según el modelo denominado "todo o nada" que conduce a su rápida oxidación total, la molécula de RNasa unida al IR parece modular la oxidación de éste. El comportamiento del IR libre ha sido justificado por la existencia de un presunto cambio conformacional (aunque éste no ha sido demostrado experimentalmente) que constituye el disparo que provoca un aumento en las reactividades del resto de los grupos SH de la molécula. Como

consecuencia, los grupos SH se modificarán rápidamente, sin que se generen estados intermedios estables. Por el contrario, en el caso del complejo IR-RNasa la pérdida de actividad inhibitora sigue un proceso con dos etapas bien diferenciadas:

1.- En una primera fase, la oxidación de hasta 15 residuos de cisteína ocasiona la aparición de una nueva especie molecular que, si bien sigue siendo un complejo IR-RNasa, (no aparece RNasa libre en la cromatografía de penetrabilidad a la que fue sometida la alícuota correspondiente a este punto del tratamiento de oxidación) presenta actividad ribonucleolítica. La magnitud de dicha actividad es de un 15 % con relación a la que presentaría la molécula de enzima en estado libre.

2.- A partir de esta situación, la modificación de nuevos residuos en la molécula del complejo activo introduce una perturbación tal en la estructura de la proteína, que ocasiona la disociación de sus dos componentes. El incremento observado en la actividad RNasa libre en esta segunda fase no es sino el reflejo de la RNasa que ha sido liberada y que pasa a presentar su actividad máxima, frente al 15 % que exhibía cuando formaba parte del complejo activo.

El IR, ya en estado libre, continúa su modificación de una forma rápida hasta alcanzar su oxidación máxima, comportándose ahora como lo hace cualquier IR libre que ha comenzado su oxidación. Este hecho puede deberse a que tal grado de oxidación provoca un cambio conformacional que, no sólo induce la disociación, sino que además incrementa la reactividad de los grupos SH restantes, o a que tras la disociación se exponen nuevos grupos SH mucho más reactivos, y que se encontraban ocultos, en la zona de unión con la RNasa.

Un experimento que avala este comportamiento supuesto para la molécula de IR una vez que se disocia de la RNasa, es la cromatografía en DEAE-HPLC de una alícuota de la mezcla de reacción correspondiente a una oxidación global de un 50 %. En este punto, y según nuestro modelo, tan sólo deberían existir moléculas de complejo activo, modificadas en un número variable de residuos de cisteína, desde 3-4 hasta 15, y moléculas de IR libre, ya totalmente oxidado. En el cromatograma obtenido aparece un pico correspondiente al complejo, anormalmente ancho, indicando que está compuesto por una población de moléculas que presentan diferentes cargas, y un pico de IR mucho más estrecho. Cuando fraccionamos dichos picos y medimos el número de SH que han sido modificados como promedio en cada una de las fracciones, comprobamos que, dentro del pico del complejo, a medida que aumenta el tiempo de elución de dichas fracciones, aumenta el grado de oxidación de la población de grupos SH de la disolución. En cuanto al pico de IR libre, los resultados obtenidos indican una modificación máxima en las distintas fracciones. Por tanto, se confirma la interpretación que hemos hecho del mecanismo de inactivación del complejo IR-RNasa por oxidación: en el complejo existe una diversidad de situaciones de modificación, mientras que el IR que se disocia sólo puede aislarse en un estado de oxidación máxima.

Según este mecanismo de oxidación, cada molécula de IR libre actuará así como un "sumidero" de DTNB, de forma que el reactivo presente en el medio tendrá como destino prioritario la oxidación máxima del IR recién disociado. Como consecuencia, la concentración de reactivo libre disponible para oxidar las moléculas de IR que continúan formando complejo activo con la RNasa, se ve disminuída.

Este comportamiento puede tener una importante significación funcional, por cuanto supone un mecanismo de protección del sistema IR-RNasa frente a variaciones drásticas en el estado redox del medio. El IR que se disocia tampona las fluctuaciones del potencial redox del medio, en el caso en que aumente el poder oxidante. Este hecho queda patente cuando comparamos la curva que describe la pérdida de actividad inhibitora a lo largo del proceso de oxidación, con la curva teórica que habríamos obtenido en el caso de que la molécula de IR que se disocia continuara una

modificación estadística de sus grupos SH; o, dicho de otro modo, en el caso de que tras la disociación del IR no se vieran incrementadas las reactividades de los SH restantes. Como se puede comprobar, la curva experimental se ajusta perfectamente a la teórica mientras no se produce el comienzo de la disociación del complejo; por el contrario, la pendiente de la curva en el segundo tramo obtenida experimentalmente es inferior a la teórica. Es decir, que si el IR libre se comportara frente a la oxidación en la misma forma en que lo hacía antes de disociarse (igual reactividad para todos los grupos SH), la inactivación general que sufriría el IR de la preparación de complejo sería mayor. Por lo tanto, el hecho de que la disociación del IR provoque un espectacular incremento en la reactividad de los grupos SH aún reducidos supone un mecanismo de autoprotección del sistema IR-RNasa.

A la luz de los resultados obtenidos, surge ahora una pregunta: la curva de inactivación del IR del complejo obtenida tras la oxidación progresiva ¿viene determinada por la modificación de los SH en términos cuantitativos, o de cada etapa es responsable la oxidación de grupos SH concretos dentro de la secuencia de aminoácidos del IR?. El primer caso supondría la posibilidad de que las distintas moléculas de complejo siguieran distintos caminos de oxidación, según en qué orden fueran reaccionando sus grupos SH. Por el contrario, la segunda de las opciones implicaría la existencia de un único camino de oxidación secuencial.

El análisis de la estructura primaria del IR revela que la mayor parte de los residuos de cisteína se hallan situados en posiciones fijas dentro de la secuencia, y en medio de una alternancia de residuos polares y apolares.

Como ya se ha comentado, la secuencia de aminoácidos, así como la estructura secundaria, siguen un patrón tan repetitivo y uniforme a lo largo de ella, que posiblemente la reactividad de los diferentes residuos de cisteína sea muy similar, al encontrarse en microentornos parecidos. Si todos los grupos SH tuvieran reactividades similares, podrían participar en interacciones del mismo tipo.

Hay que recordar en este punto una idea que fue comentada en el apartado de Introducción, donde se justificaba la presencia de varios módulos repetitivos en la estructura de muchas proteínas, y en concreto en el IR, como mecanismo de conseguir interacciones proteína-proteína con afinidades especialmente elevadas. En este sentido, posiblemente el elevado número de cisteínas de la molécula de IR, en posiciones fijas tenga como misión el aumento del número de interacciones IR-RNasa, sin que ninguna de ellas tenga un papel de importancia predominante sobre el resto. En este caso, sería de esperar que las transiciones entre los distintos estados por los que pasa la molécula de complejo cuando es oxidado secuencialmente por DTNB vinieran determinadas, más que por la modificación de grupos SH concretos, por la modificación de determinados porcentajes de ellos, es decir, por el estado rédox global de la molécula de complejo IR-RNasa.

Para intentar aclarar esta cuestión, calculamos los valores de las constantes cinéticas de las dos etapas que implican la reacción tras cada paso de adición de DTNB: k_1 y k_2 promedio de la mezcla de reacción. El cálculo de dichas constantes fue posible, tal y como se describió en la sección de Resultados y Discusión, por el ajuste de las curvas experimentales de A_{412} registradas en función del tiempo, a las ecuaciones teóricamente calculadas para describir la liberación de TNB durante el tratamiento de oxidación con DTNB. La progresión de dichas constantes a lo largo de las distintas etapas de oxidación podía seguir, en principio, cualquiera de los tres comportamientos siguientes:

- i) Mantenerse siempre más o menos constante, indicando una similitud en las reactividades de toda la población de grupos SH del complejo.

ii) Presentar una tónica decreciente a lo largo de las sucesivas etapas de modificación con DTNB, lo que indicaría diferencias en las reactividades de los distintos SH. En este caso, los sulfhidrilos reaccionarían de forma ordenada, siguiendo un orden de reactividades decreciente.

iii) Mostrar un comportamiento no uniforme, presentando transiciones. Esta situación sólo puede ser explicada considerando la ocurrencia de cambios conformacionales en la molécula del complejo como consecuencia del tratamiento oxidante.

La evolución de los valores de k_1 y de k_2 observadas experimentalmente sigue el comportamiento descrito por el tercero de los supuestos. Efectivamente, aparecen transiciones en los valores de dichas constantes coincidiendo con los puntos en los que fueron observadas transiciones en la evolución de la inactivación del IR y de la disociación del complejo. En concreto, el punto en que comienza a inactivarse el IR del complejo, (complejo activo), y el punto en el que el grado de oxidación determina la disociación de IR y RNasa, suponen sendos cambios conformacionales, a juzgar por las medidas de k_1 y k_2 .

No obstante, los valores de ambos parámetros se mantienen dentro de un mismo orden de magnitud en las etapas de oxidación previas a la disociación del complejo, presentando poca desviación respecto al valor medio de todos ellos. Esto justifica que el modelo que propusimos para explicar el mecanismo de oxidación del complejo con DTNB, basado en la no diferencia de reactividades de los grupos SH en tanto en cuanto el IR permanezca asociado a la RNasa, se ajuste bien a los datos experimentales.

El hecho de que no se hayan observado grandes modificaciones en los valores de k_1 y k_2 medidos hasta la ocurrencia del segundo de los cambios conformacionales, apoya la suposición anteriormente comentada de que el factor que gobierna el mecanismo de oxidación del complejo por DTNB, no es tanto la modificación de grupos SH concretos dentro de la secuencia de aminoácidos del IR, como el estado de oxidación global de la población de dichos grupos sulfhidrilo. A lo sumo, pueden diferenciarse poblaciones de grupos SH respecto a su reacción con DTNB, puesto que, como hemos mencionado, no todos ellos presentan igual accesibilidad al reactivo, especialmente cuando el IR se halla unido a la RNasa. Dentro de esas grandes poblaciones, no se encontrarían diferencias significativas entre los distintos grupos SH constituyentes.

En este sentido apuntan los resultados obtenidos cuando Fominaya *et al.* (comunicación personal) modifican la molécula de IR de hígado de cerdo con DTNB de forma secuencial, y analizan qué residuos de cisteína concretos son los modificados, intentando localizarlos en la secuencia de aminoácidos del IR. Tras cada etapa del tratamiento, no se encuentran con una nueva especie molecular de IR en la que han sido modificados dos nuevos residuos de cisteína concretos, sino con toda una población de especies moleculares que presentan gran diversidad en cuanto a los grupos SH modificados. El número de nuevas especies moleculares resultó ser tan elevado que su separación y posterior identificación supuso una complicada tarea, aún hoy no resuelta en su totalidad. No obstante, han podido comprobar que, si bien la oxidación de los diferentes grupos SH no sigue un único camino establecido, tampoco se han observado todas las posibles combinaciones estadísticamente posibles entre los treinta grupos totales, indicando situaciones preferentes. En cualquier caso, estos resultados corroboran nuestra hipótesis.

La segunda de las transiciones, o segundo cambio conformacional, supone una perturbación drástica en la estructura del IR, de modo que no sólo es incapaz de inactivar a la RNasa, sino también de permanecer unido a ella. Estas alteraciones provocan un brusco aumento en los valores de las constantes medidas, en especial de k_1 . Los valores de k_2 , no sólo no experimentan incrementos tan significativos, sino que incluso comienzan rápidamente a disminuir, seguramente como consecuencia

de la menor probabilidad de que un nuevo grupo SH se halle lo suficientemente próximo al disulfuro mixto proteína-S-S-TNB formado tras el primer paso de la reacción, como para atacarlo y formar otro puente disulfuro interno. Hay que tener en cuenta que en estas etapas del proceso de oxidación secuencial con DTNB, quedan libres menos del 50 % del número de grupos SH iniciales.

Los resultados experimentales de esta parte del tratamiento de oxidación con DTNB se ajustan bien al modelo teórico propuesto (ver Resultados y Discusión), que se basaba en la oxidación preferente de los grupos SH del IR que se disocia de la RNasa frente a los que forman parte de un complejo IR-RNasa.

Los cambios conformacionales predichos a partir de la evolución observada en los valores de k_1 y de k_2 , se vieron corroborados por los análisis de estructura secundaria, realizados mediante dicroísmo circular. Dichos estudios fueron hechos sobre alícuotas de la mezcla de reacción correspondientes a la primera etapa de la modificación secuencial del complejo, es decir, mientras el IR aún se mantiene unido a la RNasa. El motivo que determinó que no continuáramos los estudios durante el resto de las etapas del tratamiento, fue el hecho de que, una vez que hemos pasado la segunda de las transiciones, las oxidaciones posteriores conducen a la desaparición de un determinado porcentaje de moléculas de complejo activo que pasan a constituirse en IR oxidado en su totalidad y RNasa libres. Es decir, no ocurren cambios estructurales nuevos, sino que en la mezcla de reacción tan solo habrá, en términos generales, dos únicas especies moleculares, y las variaciones observadas tan sólo supone la interconversión progresiva de una en la otra.

Por otro lado, a partir del momento en el que el complejo comienza a disociarse, no solamente hay que tener en cuenta los posibles cambios que sufra la molécula del IR al oxidarse, sino que, además, hay que tener en consideración los cambios conformacionales que se ha comprobado que tienen lugar por el simple hecho de que una molécula de IR y otra de RNasa se unan o se disocien (Cid, 1992), lo que complica el análisis de los espectros de dicroísmo correspondientes.

Hasta el momento en que la molécula de complejo IR-RNasa se oxida con DTNB en 3-4 grupos SH, la estructura secundaria sufre algunas modificaciones, aunque, como ya se ha comentado, no afectan a la actividad inhibidora de RNasa. Durante esas primeras etapas de oxidación, en el complejo disminuyen las proporciones de estructura en α -hélice y de giros β , incrementando en consecuencia la contribución de estructura aperiódica. Es decir, el complejo sufre una pérdida de estructura secundaria ordenada; se desestructura.

Una vez que han sido modificados 3-4 grupos SH, la desorganización relativa alcanzada ocasiona que el IR pierda capacidad inhibidora de RNasa, si bien siguen reducidos el número de residuos de cisteína suficiente como para que se mantenga la interacción entre él y la RNasa. La oxidación de nuevos residuos de cisteína, curiosamente no conduce a un incremento en la pérdida de estructura secundaria del complejo IR-RNasa, sino que, al contrario, ocasiona una reestructuración del mismo. En efecto, hemos comprobado que de nuevo aumenta la proporción de estructura secundaria ordenada; en concreto, se restituyen los porcentajes originales tanto de α -hélice como de giros β , a costa de la disminución de la estructura aperiódica, mayoritariamente, y, en menor proporción, de lámina β . Es decir, la aparición del complejo activo no parece deberse a una pérdida de actividad inhibidora consecuencia de la desnaturalización del IR, en el sentido del término más comúnmente empleado, es decir, de pérdida de estructuración ordenada. Más bien parece ser la consecuencia la adopción de una nueva estructura funcional por parte del IR que constituye el complejo.

El IR unido a la RNasa podría fluctuar así entre dos estados con significación funcional. El equilibrio entre ambos estados estaría controlado por el estado redox del medio.

Si el mecanismo de oxidación del complejo fuera extrapolable a lo que ocurre *in vivo*, en condiciones fisiológicas normales, el elevado poder reductor del medio celular determinaría el desplazamiento de dicho equilibrio hacia la forma de IR activo. La disminución de dicho poder reductor en determinadas condiciones metabólicas, ocasionaría el desplazamiento del equilibrio hacia la segunda de las formas, con la consiguiente aparición de actividad ribonucleasa. En estados oxidativos más acusados, la oxidación de la molécula de complejo IR-RNasa es tan importante que provoca la pérdida del número de puntos de contacto IR-RNasa mínimos necesarios para mantener dicha unión. La molécula se ha vuelto a desestructurar (segundo de los cambios conformacionales), a juzgar por la pérdida de estructura secundaria ordenada. Pero esta vez sí que implica una desnaturalización, en el sentido amplio del término, y, presumiblemente definitiva, puesto que la molécula de IR libre, como ya se ha comentado, continúa rápidamente hasta su total oxidación.

Si el incremento en el potencial oxidativo del medio no es extremo, el mecanismo de oxidación que sigue el IR libre (actuando a modo de "sumidero" del poder oxidante del medio) podría ayudar a proteger parcialmente la población de moléculas de complejo de la célula. Así, tan sólo se perdería un pequeño porcentaje de ellas. Pero si el aumento en el poder oxidante del medio llega a ser muy elevado, el porcentaje de moléculas de complejo que se pierden puede ser especialmente alto, llegando incluso a desaparecer todo el IR activo.

Hasta aquí los resultados obtenidos *in vitro* oxidando la molécula de complejo IR-RNasa con un reactivo químico, como es el DTNB. Dichos resultados no son necesariamente extrapolables a la situación real, *in vivo*, si bien los datos observados bien podrían servir para explicar el mecanismo de regulación fisiológica del IR. Sin embargo, podría pensarse que las condiciones rédox empleadas para oxidar por completo la población de moléculas de complejo presentes en las preparaciones utilizadas, podrían ser tan drásticas que no llegaran a darse bajo ninguna situación fisiológica. Como ya se ha comentado, se conocen casos extremos caracterizados por un estado de degeneración tisular (corteza cerebral de individuos afectados por Alzheimer, cataratas, tejidos envejecidos, tejidos sometidos a estrés oxidativo, por ejemplo tras someterse a una radiación ionizante, etc) en los que la relación GSH/GSSG es especialmente baja, y donde se ha comprobado que desaparece la ribonucleasa latente, para mostrarse en estado libre. Estas situaciones parecen corresponder al un estado equivalente al estado final alcanzado en las muestras oxidadas con DTNB, lo que contribuiría a dar validez al mecanismo de inactivación del IR obtenido por tratamiento con dicho reactivo químico.

Por tanto, parece ser que la regulación del sistema IR-RNasa podría mantenerse de forma normal en un estado equivalente al de la primera parte del tratamiento con DTNB, permaneciendo el IR unido siempre a la RNasa. La necesidad por parte de la célula de actividad ribonucleolítica en determinadas situaciones metabólicas normales, conduciría a la aparición transitoria de complejo activo, que presumiblemente podría revertir a un estado de inactividad de la RNasa cuando la célula dejara de necesitar tal actividad enzimática. Sólo estados fisiológicos extremadamente oxidantes conducirían a la activación del 100 % de la actividad RNasa potencial de la célula. La propia molécula de RNasa unida al IR conduciría tanto el proceso de oxidación funcional del IR, como posiblemente su reactivación, sirviendo como "molde" que ayude al IR a recuperar una estructura funcional durante el proceso de reducción de los puentes disulfuro.

Por el momento no ha sido demostrada inequívocamente la reversión real de la inactivación del IR dentro del complejo. En este sentido, sólo cabe mencionar la reversión conseguida mediante el empleo de un agente químico fuertemente reductor, como es el DTT. Por el contrario, hasta el momento no hemos conseguido la reactivación del IR que ha alcanzado un grado máximo de oxidación.

Aún considerando que, como hemos visto, el mecanismo de inactivación que sigue el complejo IR-RNasa cuando se oxida con DTNB podría servir como mecanismo de regulación de dicho sistema *in vivo*, hay que comprobar cuál es la respuesta de dicho complejo a la oxidación por compuestos disulfuro biológicos, tales como GSSG, cistamina o cistina, que, en definitiva, son quienes realmente se van a encargar de llevar a cabo esa regulación.

Para comprobarlo, sometimos a diferentes preparaciones de complejo IR-RNasa a sendos tratamientos incubando la proteína con distintas concentraciones en exceso de los compuestos arriba mencionados, y dejando a la mezcla de reacción evolucionar en el tiempo. La reacción fue seguida midiendo la pérdida de actividad inhibitora. Las concentraciones de los reactivos fueron seleccionadas en función de la velocidad de reacción que cada uno de ellos presentaba, puesto que se trató de completar la curva de inactivación en un solo día, por un doble motivo: a lo largo de un día podíamos asegurar el perfecto mantenimiento del complejo en las condiciones de trabajo, garantía que se iba perdiendo a tiempos superiores, y, por otro lado, de este modo podíamos seguir experimentalmente la pérdida total de actividad inhibitora ensayando alícuotas a lo largo de todo el tratamiento.

El primer dato que ya resultaba positivo, fue el hecho de encontrar en el complejo IR-RNasa una respuesta bifásica a la inactivación por estos compuestos disulfuro, ya que apoya el modelo propuesto anteriormente como mecanismo de inactivación fisiológica del IR. En todos los casos, la primera de las fases conducía a la activación de aproximadamente un 15 % de la actividad ribonucleolítica total presente en las mezclas de reacción. En la segunda fase se completaba la activación total de la RNasa.

Este comportamiento general era también observado para el caso de los tratamientos con GSSG, aunque la segunda de las etapas resultó ser tan lenta, que limitaciones experimentales no permitieron abordar su seguimiento (ver el apartado correspondiente en Resultados y Discusión). Tan solo con las concentraciones superiores de reactivo empleadas pudimos diferenciar las dos fases, si bien la segunda de ellas solamente la pudimos seguir en sus comienzos. Por este motivo, en el caso del GSSG nada más hemos calculado el valor de la constante k_1 . El valor de k_2 resulta ser tan pequeño que suponemos no tenga reflejo fisiológico alguno.

La realización de tratamientos a diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos disulfuro biológicos, nos permitió calcular las constantes cinéticas que gobiernan cada una de las dos fases, para cada uno de dichos reactivos. La Tabla IX recoge los valores obtenidos en los tres casos.

Si comparamos los valores de las constantes obtenidos para los distintos compuestos, observamos que existe una relación entre dichos valores y la carga neta del reactivo empleado. Los valores más elevados los presenta la cistamina, que al pH al que transcurre el tratamiento (pH=8.0) presenta una carga neta positiva, a continuación la cistina, con carga neta cero, y, por último, los valores más bajos los presenta el GSSG, con carga neta negativa. La justificación de estos resultados reside en el hecho de que la mayor parte de los residuos de cisteína de la molécula de IR se encuentran localizados en microentornos cargados negativamente (ver secuencia de aminoácidos), por lo que la reacción con compuestos con carga positiva se ve favorecida frente a la reacción con aquellos que presentan carga negativa. Esta influencia, como es lógico, se deja sentir tanto en los valores obtenidos para k_1 como en los de k_2 .

Ante la comparación de los valores de las constantes cinéticas obtenidos, cabe hacerse la pregunta de cuál de todos estos compuestos es el que, *in vivo*, podría soportar de forma prioritaria la regulación del sistema IR-RNasa. En principio parecería lógico pensar que dicha regulación fuera llevada a cabo fundamentalmente por la cistamina, ya que es el compuesto más eficaz a la hora de interactuar con el complejo. Por el contrario, el GSSG parece ser un dudoso candidato para llevar

a cabo dicha actividad.

Sin embargo, hay que tener en cuenta cuales son las condiciones rédox que se dan en una célula, en condiciones normales. Como ya hemos dicho (ver Introducción), el par rédox más abundante, con mucho, es el formado por el glutatión reducido y su correspondiente forma oxidada, hasta el punto de que se suele identificar al estado rédox del medio con la relación GSH/GSSG. La hipótesis de Gilbert relaciona el nivel de actividad de múltiples enzimas, así como el estado metabólico celular, con los valores que toma dicha relación. Por tanto, muy posiblemente los pares rédox formados por cisteína/cistina y por cisteamina/cistamina, a pesar de ser potencialmente más eficaces en la reacción con los grupos SH del complejo IR-RNasa, no lleguen a soportar el peso de la regulación fisiológica de dicho sistema. Para poder definir con precisión la influencia de esos equilibrios rédox en la regulación del complejo, sería necesario conocer las concentraciones de dichos compuestos en la célula.

Las concentraciones de cistamina y de cistina fisiológicas no están bien determinadas, pero, en cualquier caso, las empleadas en los tratamientos aquí realizados eran considerablemente superiores. En el caso del GSSG, las concentraciones utilizadas son del orden de las concentraciones de glutatión totales que existen en la célula. No obstante, en condiciones fisiológicas normales, no más del 3 % de él se encuentra en forma oxidada.

Parece, por tanto, que el par GSH/GSSG, a pesar de ser el más abundante, es un mal candidato a ejercer la inactivación del IR por sí mismo. Su reacción espontánea con los grupos SH de esta proteína es tan lenta, que incluso, no sólo parece poco probable que la oxidación real del IR pase de la primera de las etapas descrita, sino que la regulación en esta primera fase resultaría tan lenta, que difícilmente serviría como mecanismo de adaptación rápida del sistema a los requerimientos fisiológicos.

No obstante, a la hora de considerar las reacciones rédox en las que participa el glutatión, hay que tener en cuenta que dichas reacciones *in vivo* no suelen tener lugar de forma espontánea, sino catalizadas por enzimas tioltransferasas. Esta catálisis podría imprimir a la reacción la velocidad necesaria como para que tuviera realmente significación fisiológica.

Otra posibilidad a la hora de llevar a cabo la inactivación del sistema IR-RNasa *in vivo*, podría ser que las reacciones de intercambio tiol/disulfuro en las que participa dicho sistema fueran establecidas con los pares cisteamina/cistamina y/o cisteína/cistina, ya que dichas reacciones se encuentran favorecidas con relación a las del glutatión. Sería éste compuesto quien, en último término, determinaría el estado del equilibrio en los dos pares rédox primeros. Según este mecanismo, el estado de oxidación del sistema IR-RNasa vendría determinado realmente por el glutatión celular, utilizando a los pares rédox cisteamina/cistamina y/o cisteína/cistina a modo de catalizadores de las reacciones de intercambio tiol/disulfuro.

Como conclusión final, parece ser que el mecanismo propuesto para la inactivación fisiológica del IR del sistema IR-RNasa es válido, si bien no queda claramente determinado cuales son los compuestos que realmente participan en las reacciones de intercambio tiol/disulfuro que implica.

APÉNDICE

MÉTODO PERMANENTE DE TINCIÓN NEGATIVA CON ZINC PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los resultados que a continuación se exponen no son una consecuencia directa de la investigación en marcha sobre el IR. Son, sin embargo, una consecuencia indirecta de la misma. En efecto, en el curso de esta investigación fue necesario llevar a cabo electroforesis y posterior electrotransferencia de los péptidos a membranas. Mientras se hacía esto, apareció publicado un método de tinción negativa basado en el zinc, que permitía la visualización de las proteínas en el gel de poliacrilamida de forma previa a la transferencia (Ortiz *et al.*, 1992). Ello era posible por el carácter negativo de la tinción, que se traduce en que las proteínas no resultan teñidas, lo que permite su posterior procesamiento sin ninguna interferencia. La visualización se consigue porque, a diferencia de las posiciones ocupadas por las proteínas, el resto del gel sí que resulta teñido.

Si a la ventaja de visualizar las proteínas antes de su transferencia (sólo se someten a transferencia aquellas porciones del gel en que se localizan las proteínas de interés), se une la buena sensibilidad de estos métodos de tinción negativa, y la rapidez de su desarrollo, se entenderá el interés de los mismos en un laboratorio como el nuestro, donde la realización de PAGE es una práctica cotidiana.

Al incorporar el método descrito en nuestras metodologías de tinción, encontramos una serie de inconvenientes y artefactos, cuya solución requirió un estudio detallado del mismo. Adicionalmente, nos propusimos modificar el método a fin de conseguir que la tinción fuese permanente y no, como ocurría en el método descrito, que se desvanecía cuando los geles se secaban. La idea que guiaba este último propósito era obtener provecho del carácter universal que se ha de esperar de estos métodos de tinción, en términos de cuantificación de proteínas por densitometrado de los geles. En efecto, a diferencia de los métodos clásicos (v.g.: azul de Coomassie, tinción con plata), en los que la intensidad con la que se tiñe cada proteína no depende sólo de la cantidad de la misma, sino también de su particular composición, en las tinciones negativas las proteínas no resultan teñidas; no cabe esperar, por tanto, una "no tinción" diferente en función de la composición aminoácida. Esta ventaja no era, sin embargo, aprovechable, dado que el densitometrado con fines cuantitativos suele realizarse sobre geles secos, y en el secado se pierde la tinción negativa.

Como resultado de todo lo anterior, nos pareció interesante abrir un paréntesis en nuestra investigación sobre el IR, con el fin de centrar nuestra atención en estos aspectos metodológicos. Así, hemos conseguido poner a punto un procedimiento permanente de tinción negativa, cuyo protocolo aparece en la Parte Experimental. A continuación se discuten los aspectos más relevantes de esta investigación, y se muestran los resultados que tal método proporciona.

Consideraciones experimentales sobre el protocolo

El método publicado de tinción negativa a que se ha aludido (protocolo en Tabla X) (Ortiz *et al.*, 1992), se basa en la precipitación de un complejo de imidazol-zinc en las capas superficiales del gel de poliacrilamida. De esta precipitación se salvan aquellas posiciones en que se localizan las proteínas. El gel, una vez teñido, toma un aspecto opaco y blanquecino, quedando transparentes las bandas de proteína. Este precipitado blanco se vuelve transparente al secar el gel, perdiéndose así el contraste entre fondo y bandas. Para eliminar este inconveniente, procedimos a estudiar cómo modificar la naturaleza del precipitado, de forma que no se transparentara al secarse. Nos interesaba utilizar alguna reacción coloreada del zinc que "virase" el color blanco del fondo hacia alguna

TINCIÓN NEGATIVA PREVIAMENTE DESCRITA			
Paso	Solución	Tipo de gel	Tiempo
1	Imidazol 0.2 M -SDS 0.1 % -SDS 0.5 %	Gel de acrilamida 18 % -SDS	5 min.
		Gel de agarosa 1 % sin SDS	10 min.
		Gel de acrilamida 5 % sin SDS	15 min.
2	Zn ₂ SO ₄ 0.2-0.3 M		5-15 seg.
3	H ₂ O		Indeterminado
TINCIÓN REVERSA OPTIMIZADA Y VIRAJE POSTERIOR			
Paso	Solución	Tipo de gel	Tiempo
Tinción Reversa			
1	Na ₂ CO ₃ 1 %	Gel de acrilamida 12.5-15 %	5 min.
2	Imidazol 0.2 M -SDS 0.1 %		15 min.
3	H ₂ O		10 seg.
4	Zn ₂ SO ₄ 0.2 M		40 seg.
5	H ₂ O		10 seg. x 2 5 min. x 2
Viraje			
6	Solución (A)+ Solución (B) (1:1)		4 min.
7	H ₂ O		10 seg.
8	Solución (B)+ Solución (C) (1:1)		2-5 min.

Tabla X. Protocolos del método de tinción negativa con zinc publicado (Ortiz *et al.*, 1992), y del método modificado descrito en esta Memoria junto con el posterior paso de viraje.

Artefacto	Posible causa	Remedio
1. El fondo blanco tras la incubación con Zn^{2+} es demasiado tenue	Incubación con Zn^{2+} demasiado corta Incubación con Zn^{2+} demasiado larga o disolución de Zn^{2+} demasiado concentrada	Controlar estrictamente tanto el tiempo de incubación como la concentración de la disolución de Zn^{2+} .
2. El fondo se cubre con un velo blanco	Incubación con Zn^{2+} demasiado larga o disolución de Zn^{2+} demasiado concentrada	Controlar estrictamente tanto el tiempo de incubación como la concentración de la disolución de Zn^{2+} .
Las bandas de proteína se tiñen positivamente	Ya descrito como una consecuencia de bajos niveles de SDS	Alargar el tiempo de incubación con imidazol-SDS: 15 min. en vez de 5 min., como fue descrito. Esta incubación además aumenta los niveles de imidazol en el gel, rindiendo fondos más densos.
Frentes irregulares en el fondo	Alteraciones tanto de pH como de niveles de glicina en los geles, debido a la sustitución del tampón del gel por el de electroforesis.	Preincubación con Na_2CO_3 . La pérdida de SDS que ocurre durante esta incubación se compensa por la siguiente incubación con imidazol- Zn^{2+} .

Tabla XI. Método de tinción negativa con zinc. Artefactos más frecuentes, junto a las posibles causas y soluciones propuestas

tonalidad oscura; de esta forma aumentaría el contraste con las bandas transparentes y, por tanto, la sensibilidad.

Con tal finalidad era deseable que la aplicación del método de tinción negativa proporcionase geles con bandas completamente transparentes y bien contrastadas respecto a un fondo lo más denso posible. Sin embargo, la aplicación del método de tinción negativa que se recoge en la Tabla X proporcionaba cierta variabilidad en los resultados, que afectaba al posterior viraje del precipitado. En la Tabla XI se describen los artefactos más frecuentemente encontrados, así como sus posibles causas.

Para la optimización posterior del viraje, fue preciso, a su vez, optimizar el propio método de tinción negativa. En la misma Tabla X se especifican las modificaciones introducidas con esta finalidad en el método original de tinción con zinc.

Cuando el tiempo de incubación del gel con la disolución de zinc es demasiado corto, el resultado es el esperado: precipitados demasiado tenues. Sin embargo, cuando se alarga el tiempo de incubación, toda la superficie del gel, incluyendo las bandas de proteína, se cubre con un velo blanquecino; si continúa prolongándose la incubación, el precipitado se atenúa e incluso puede llegar a desaparecer. Aparentemente se trata de resultados contradictorios, ya que por acciones contrapuestas se llega a lo mismo: geles con poco contraste entre bandas y fondo. Un estudio más detallado de la reacción de precipitación en tubos de ensayo, puso de manifiesto que un exceso de zinc puede redissolver el precipitado que inicialmente se forma entre el imidazol y el zinc. La razón se encuentra en que el precipitado imidazol-zinc es soluble en medio ácido, y en que el catión zinc es, precisamente, un ácido de Lewis.

Por tanto, parecería más conveniente la utilización de disoluciones de zinc más diluidas de lo que se había descrito (ZnSO_4 0.3 M. Ortiz *et al.*, 1992). Así, con ZnSO_4 50 mM ciertamente se obtenían fondos más densos, pero ello era a costa de alargar el tiempo de incubación en esta disolución, dando oportunidad al imidazol embebido en el gel a difundir fuera del mismo. En suma, se provocaba la formación de un velo superficial como consecuencia de cierta precipitación indiscriminada en toda la superficie del gel.

Todo lo expuesto sugería que debía alcanzarse una buena tinción negativa cuando el frente de precipitación del complejo imidazol-zinc se formara con la suficiente rapidez y en una profundidad adecuada dentro del gel. Este frente de precipitación es el resultado del encuentro de dos frentes de difusión: hacia afuera, el del imidazol embebido en el gel, y hacia adentro, el del zinc de la disolución que provoca la tinción. Es preciso que esta última disolución tenga una concentración adecuada para que su difusión hacia el interior del gel sea más rápida que la difusión del imidazol hacia afuera. De esta forma se conseguirá "retener" todo ese imidazol embebido, y, por tanto, se asegurará una precipitación suficientemente intensa. La mayor concentración de zinc en la superficie del gel redissolverá cualquier precipitado que ahí se forme como consecuencia del imidazol que, incontroladamente, haya podido salir del gel. Adicionalmente, es preciso controlar cuidadosamente el tiempo de incubación con esta disolución de zinc, en el sentido de detener inmediatamente la incubación, una vez que se haya conseguido un buen contraste entre las bandas de proteína transparentes y un fondo blanco suficientemente denso. Alcanzado tal punto, el único efecto de mantener el gel teñido en contacto con la disolución de zinc, es la redisolución por este catión del precipitado, con lo que ello supone de pérdida de contraste y sensibilidad.

En suma, la obtención de buenos resultados en la tinción negativa con zinc, con vistas a un buen proceso de viraje, requiere encontrar una solución de compromiso en lo que a concentración de la disolución de zinc y tiempos de incubación en ella se refiere. Tal y como se describe en "Parte

Experimental", hemos encontrado que los resultados óptimos se consiguen cuando se emplea una disolución 0.2 M $ZnSO_4$ y un tiempo de incubación entre 30 y 40 segundos para geles de poliacrilamida el 12.5-15 %. Geles con diferente concentración de acrilamida requerirán distintos tiempos de incubación, en la medida en que el porcentaje de acrilamida influye en la difusión de los reactivos, la cual es el factor clave en el revelado del gel.

Por otra parte, la fácil redisolución del precipitado de imidazol-zinc en medio ácido nos llevó a considerar la conveniencia de asegurar un pH ligeramente alcalino en el gel de poliacrilamida. La uniformidad del pH en todo el gel debía, además, asegurar la formación de un fondo homogéneo. De hecho, si no se toman precauciones al respecto, el fácil obtener geles irregularmente teñidos, como consecuencia de la inevitable formación de frentes de electroforesis. Estos son atribuibles a una desigual sustitución del tampón tampón de polimerización (pH=6.8 para el gel concentrante y pH=8.8 para el gel separador) por el tampón de electroforesis (pH=8.3), durante el desarrollo de ésta. A ello hay que unir que el tampón de electroforesis contiene glicocola, la cual tiene propiedades quelantes para el zinc.

Ambos factores, desigual pH y presencia de frentes de glicocola, interfieren en la precipitación del zinc. La incubación previa con Na_2CO_3 contribuye a alcalinizar de manera uniforme el gel, a la vez que, durante ella, se elimina la glicocola que pudiera quedar retenida en el reticulado de poliacrilamida. El resultado es la consecución de una tinción negativa final mucho más adecuada para el posterior viraje.

Ya se ha comprobado para otros métodos de tinción negativa que el SDS (presente tanto en el tampón de polimerización como en el de electroforesis), contribuye al carácter negativo de la tinción (Ortiz *et al.*, 1992)). De hecho, la ausencia de SDS puede traducirse en la aparición de bandas positivas. La incubación previa con Na_2CO_3 hace que los niveles de SDS disminuyan en el gel de poliacrilamida, con la consiguiente aparición de bandas teñidas positivamente y con menor sensibilidad. Esta pérdida de SDS es inevitable durante la incubación con Na_2CO_3 , dado que no es posible incluir el detergente junto con la sal por la insolubilidad de aquél en ésta. No obstante, es posible restituir los niveles adecuados de SDS en el siguiente paso de incubación (imidazol-SDS). Para ello se ha comprobado que conviene alargar esta incubación respecto a la originalmente descrita.

El conjunto de modificaciones comentadas permite mejorar la sensibilidad de la tinción con zinc en comparación a la que se alcanza con los métodos descritos hasta el momento (Ortiz *et al.*, 1992; Fernández Patrón *et al.*, 1992). Así, es posible detectar bandas correspondientes a 5 ng de proteína cargada (figura 47). En condiciones normales se alcanzan sensibilidades 10 veces superiores a las que se obtienen con el azul de Coomassie. Además, los geles así teñidos se pueden fotografiar de forma convencional mediante iluminación directa, sin necesidad de condiciones especiales de iluminación oblicua, como se ha descrito para la tinción negativa (Lee *et al.*, 1987; Ortiz *et al.*, 1992). Quizá esta iluminación oblicua sea un requisito impuesto por la formación de velo en la superficie del gel, atribuible, como se ha comentado, a una inadecuada incubación con el zinc.

Optimizada la tinción negativa, se pudo abordar en mejores condiciones el estudio sobre el "viraje" del precipitado imidazol-zinc. Se estudiaron diversas reacciones coloreadas del zinc, encontrándose que el par rédox ferricianuro/ *o*-tolidina proporcionaba los mejores resultados. El anión ferricianuro es capaz de oxidar a la *o*-tolidina, originando un producto de color azul, a la vez que él se reduce a ferrocianuro (Burriel *et al.*, 1985). Por sí sola, esta reacción es muy lenta e incompleta, pero, en presencia de Zn^{2+} , el ferrocianuro formado precipita como $Zn_2[Fe(CN)_6]$, incrementando el potencial de oxidación del ferricianuro y acelerando así la reacción rédox. Además, el precipitado adsorbe el par ferricianuro/ *o*-tolidina, lo que aumenta la sensibilidad de la reacción al intensificar el color. Este puede fluctuar entre diferentes tonalidades, dependiendo de la intensidad con la que se

produzca la adsorción comentada. Por su parte, tal adsorción será tanto más importante cuanto más rápido se produzca el correspondiente precipitado. La conclusión de todo lo anterior es que conviene fijar condiciones experimentales que aseguren una velocidad elevada de la reacción rédox, y así conseguir una mayor adsorción y un color más intenso.

La aplicación de esta reacción coloreada a los geles teñidos negativamente con zinc permite conseguir el viraje deseado, y, además, el fondo así virado se mantiene al secar los geles. Por su parte, las bandas de proteína permanecen transparentes, a lo sumo amarillean ligeramente. Sin embargo, una aplicación directa de la reacción mencionada no proporciona virajes repetitivos. Se hizo necesario, igualmente, optimizar tal reacción coloreada, adecuándola al particular sustrato sobre el que ha de producirse: el reticulado de poliacrilamida. Éste impone restricciones a la difusión de los reactivos, con lo que ello implica de limitación de la velocidad de reacción, y, por ende, reducción en la intensidad del viraje.

Afortunadamente, las propiedades tamponadoras del imidazol presente en el precipitado ayudan a compensar estas limitaciones a la difusión de los reactivos. En efecto, la incubación con el par ferricianuro/ *o*-tolidina de los geles teñidos negativamente no es suficiente para desencadenar la reacción coloreada. Tal reacción sólo se produce en medio ácido, y el imidazol, por tanto, la evita al mantener el gel a pH neutro. De esta forma, el mencionado par rédox puede ir difundiendo al interior del gel hasta que alcance en él concentraciones adecuadas. Sólo en ese momento resulta procedente que se desencadene la reacción rédox, puesto que se darán los condicionantes para que ésta progrese con la rapidez necesaria. El desencadenamiento de la reacción se consigue anulando rápidamente la capacidad tamponadora del imidazol, para lo cual comprobamos que el H₂SO₄ era el ácido más conveniente. Este ácido, además, disolverá transitoriamente el complejo imidazol-zinc, liberando el catión metálico para su participación en la reacción rédox.

Conviene recalcar que todas estas consideraciones experimentales son de crucial importancia para alcanzar un buen viraje final. La intensidad del color virado está íntimamente ligada con la rapidez de la reacción rédox. Si ésta progresa lentamente, la adsorción del par ferricianuro/ *o*-tolidina, y, por tanto el viraje, serán muy pobres (marrón o, a lo sumo, azul-verdoso), y proporcionarán poco contraste con las bandas que permanecen transparentes. Tal resultado ya no será posteriormente modificable, puesto que la adsorción sólo se produce durante la reacción rédox.

Como un factor más que contribuye a aumentar la intensidad del tono final, hemos comprobado que conviene incluir *o*-tolidina en el medio ácido final. La razón radica probablemente en un incremento adicional en la velocidad de la reacción. Por el contrario, la inclusión de ferricianuro en ese medio no dio buenos resultados, debido a que se producía una precipitación masiva en la propia disolución, lo que conducía a virajes muy pobres en el gel.

Sensibilidad

Como ilustración de los resultados que pueden obtenerse con el método discutido, en la figura 47 se muestran fotografías de geles a los que se ha aplicado, o el método de tinción negativa modificado por nosotros (C), o el método de tinción negativa seguido de viraje (A), o los dos procedimientos anteriores y posterior secado del gel (D). Asimismo, a efectos comparativos, se muestra un gel cargado igualmente con un kit de proteínas patrón, y que fue teñido en la forma convencional con azul de Coomassie (B).

La comparación de nuestro método de tinción con el de azul de Coomassie pone de manifiesto la diferente especificidad de ambos. En efecto, estos kits de proteínas patrón son formulados por el

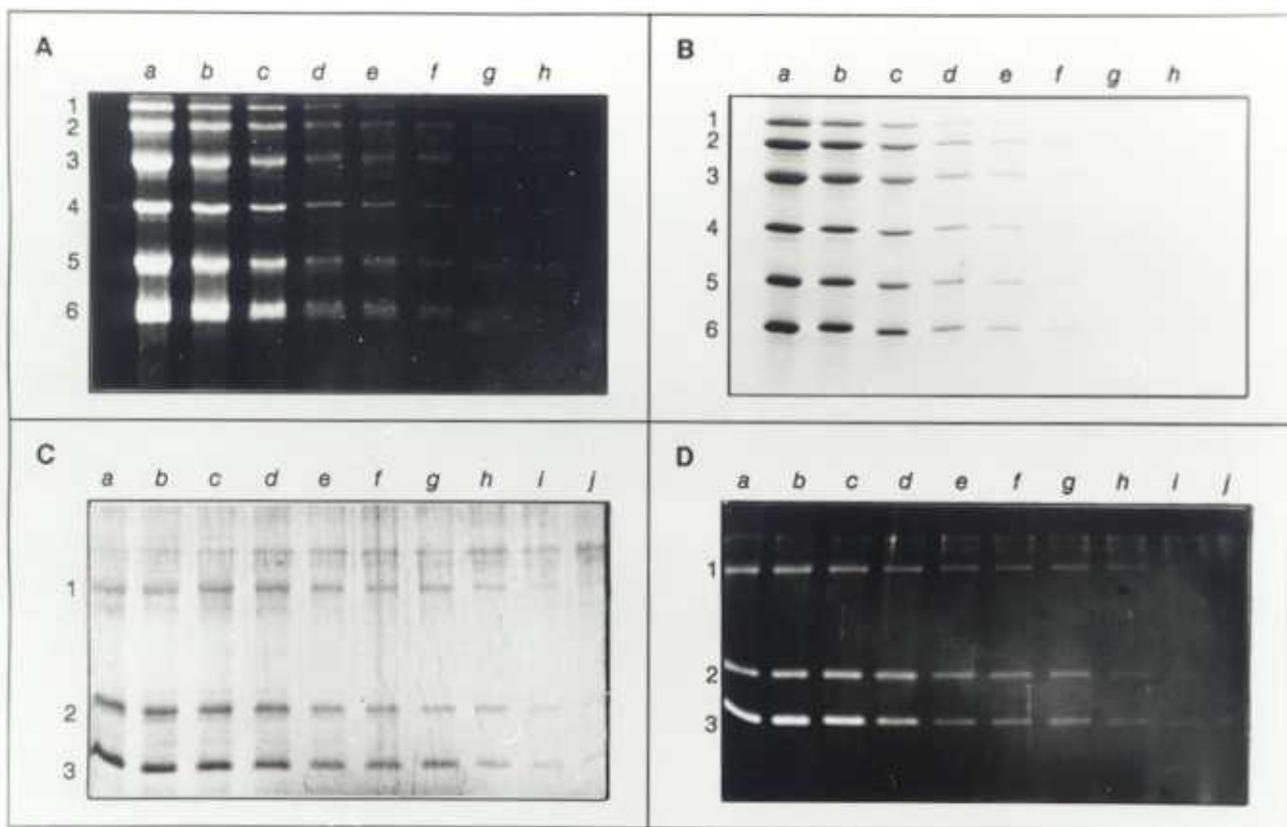


Figura 47. (A y B) PAGE-SDS(15 % de acrilamida) de un kit comercial de proteínas de peso molecular conocido: 1, fosforilasa b de músculo de ratón; 2, albúmina de suero bovino; 3, ovoalbúmina de huevo de gallina; 4, anhidrasa carbónica bovina; 5, inhibidor de tripsina de soja y 6, lisozima de huevo de gallina. Las cantidades de cada proteína cargadas en las distintas calles es: a, 2.5 μ g; b, 1.7 μ g; c, 800 ng; d, 300 ng; e, 150 ng; f, 80 ng; g, 30 ng; h, 15 ng. El gel (A) fue teñido con zinc y posteriormente virado, según el protocolo descrito en la tabla X. El gel (B) se teñó con azul de Coomassie (C y D) PAGE-SDS (15 % de acrilamida) de una mezcla de proteínas compuesta por: 1, ovoalbúmina de huevo de gallina; 2, inhibidor de tripsina de soja, y 3, lisozima de huevo de gallina. Las cantidades de cada proteína aplicadas fueron: a, 1 μ g; b, 750 ng; c, 500 ng; d, 250 ng; e, 100 ng; f, 75 ng; g, 50 ng; h, 25 ng; i, 10 ng y j, 5 ng. El gel (C) fue teñido con zinc, siguiendo el protocolo mejorado que se describe en la Tabla X. El gel (D) fue teñido en la misma forma, y posteriormente virado, tal y como se describe en la misma tabla. Finalmente fue secado entre láminas de papel celofán antes de hacer la foto.

fabricante de forma que las diferentes proteínas se tiñan con similar intensidad por el azul de Coomassie. Dado que este colorante no interacciona por igual con las diferentes proteínas (muestra más afinidad por las proteínas básicas), la formulación es desigual para cada una de las proteínas presentes. Este hecho queda puesto de manifiesto en la diferente intensidad con que las proteínas aparecen en la tinción negativa (figura 47 A), lo cual constituye, cuando menos, una prueba de la diferente especificidad del método de tinción negativa en comparación con el de azul de Coomassie. Aparte de estas diferencias en especificidad, en la figura 47 también queda patente la mayor sensibilidad del método de tinción negativa + viraje, en comparación con la tinción por el azul de Coomassie.

A fin de verificar estos aspectos relativos a la especificidad y a la sensibilidad del método descrito, se han llevado a cabo electroforesis de mezclas igualmente formuladas en tres proteínas diferentes: ovalbúmina, inhibidor de tripsina y lisozima (figuras C y D).

Cuantificación de proteínas

Tras los procesos de virado y secado, se evaluó la relación existente entre la cantidad de proteína cargada y su respuesta a la tinción mediante densitometrado del gel en el modo transmitancia. Teniendo en cuenta que el cromóforo a evaluar está asociado al fondo del gel y no a las bandas de proteína, es lógico pensar que la cantidad de proteína en cada banda esté relacionada con su grado de transparencia o transmitancia.

A fin de llevar a cabo tal densitometrado en condiciones de máxima sensibilidad, se procedió a caracterizar el cromóforo resultante tras el virado, y que da cuenta del color que toman los geles. Para ello se registró el espectro de absorción en la región del visible de una zona del gel carente de proteínas. En la figura 48 se muestra un espectro típico, en el que se puede observar un máximo de absorción a 580 nm. Por tanto, los densitometrados se realizaron registrando transmitancia a esta longitud de onda. La aplicación del procedimiento de tinción negativa y posterior virado, tal como se describe en la Parte Experimental, permite obtener de forma repetitiva geles teñidos cuyos fondos no muestran diferencias significativas en sus espectros de absorción cuando se comparan con el de la figura 48.

En la figura 49 se muestran perfiles típicos de transmitancia obtenidos tras densitometrar dos calles de un gel en las que se aplicaron diferentes cantidades de la mezcla de tres proteínas descrita anteriormente, en concreto, 750 y 75 ng de cada una de las proteínas, respectivamente. Aunque la citada mezcla contiene la misma cantidad de las tres proteínas, en la línea de 750 ng se puede observar una relación inversa entre las áreas de los picos y su movilidad electroforética. En cambio, este fenómeno no se observa en la línea de 75 ng, donde todos los picos tienen áreas similares.

La integración de los picos de transmitancia permitió establecer la relación entre área de las bandas, en unidades de transmitancia, y la respectiva cantidad de proteína cargada. Tal relación aparece representada en la figura 50. En el intervalo de 10-100 ng, las tres proteínas estudiadas muestran una misma dependencia lineal entre área y cantidad aplicada, lo que indica que la tinción negativa es independiente de sus particulares composiciones de aminoácidos. Cuando se aplican en el gel cantidades de proteína superiores a 100 ng, se puede observar una pérdida de linealidad, exhibiendo cada una de las proteínas un diferente comportamiento.

Estos hechos se pueden explicar como una consecuencia de la diferente capacidad de difusión de las proteínas estudiadas: tanto mayor es el peso molecular, menor será la difusión a través de la matriz de poliacrilamida. De este modo, una proteína con una movilidad electroforética reducida, dará, tras la tinción, una banda estrecha (poca dispersión). Por el contrario, una proteína con mayor

movilidad electroforética aparecerá como una banda más ancha. Esto se traducirá en que las bandas de las proteínas de menor movilidad mostrarán una especie de saturación en su transparencia, mientras que las de mayor movilidad, debido a su mayor difusión, proporcionarán picos de transmitancia de mayor anchura, cuyas áreas aún conservan la relación lineal con la cantidad de proteína cargada.

En conclusión, este método de tinción negativa de geles de poliacrilamida permite la cuantificación, de forma universal, de cantidades de proteína inferiores a 100 ng. Para ello, basta disponer de una recta de calibrado obtenida con cualquier proteína disponible. Para cantidades superiores a este valor, la cuantificación de cada proteína requiere una curva de calibrado propia, en la que se refleje su peculiar difusibilidad a través del gel de poliacrilamida.

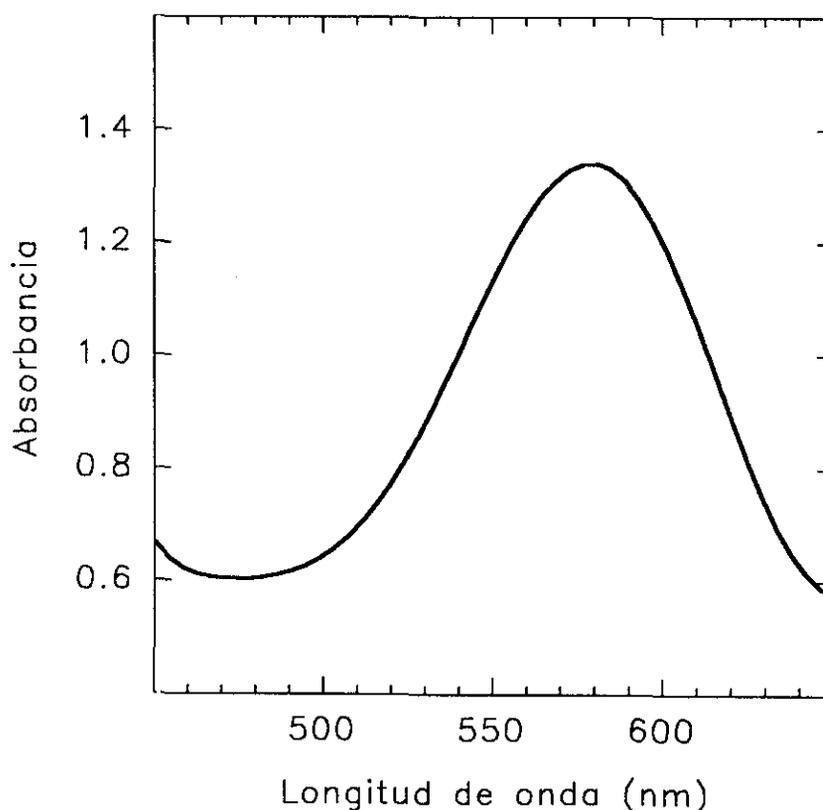


Figura 48. Espectro de una porción carente de proteínas de un gel PAGE-SDS teñido con zinc y posteriormente virado, siguiendo el protocolo descrito en la Tabla X.

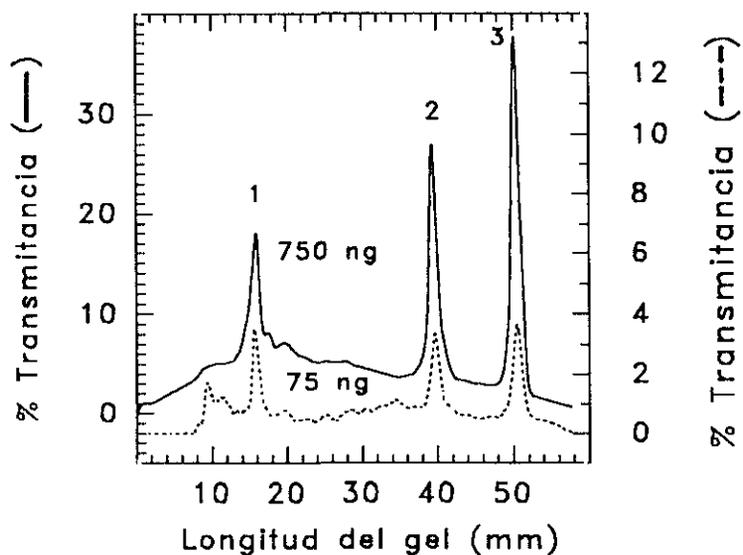


Figura 49. Perfiles de transmittancia correspondientes a dos calles de un gel PAGE-SDS teído con zinc y virado posteriormente, en las que aplicaron una mezcla de proteínas conteniendo 1, ovoalbúmina de huevo de gallina, 2, inhibidor de tripsina y 3, lisozima de huevo de gallina. En cada calle se aplicó 750 ng y 75 ng, respectivamente, de cada una de las proteínas.

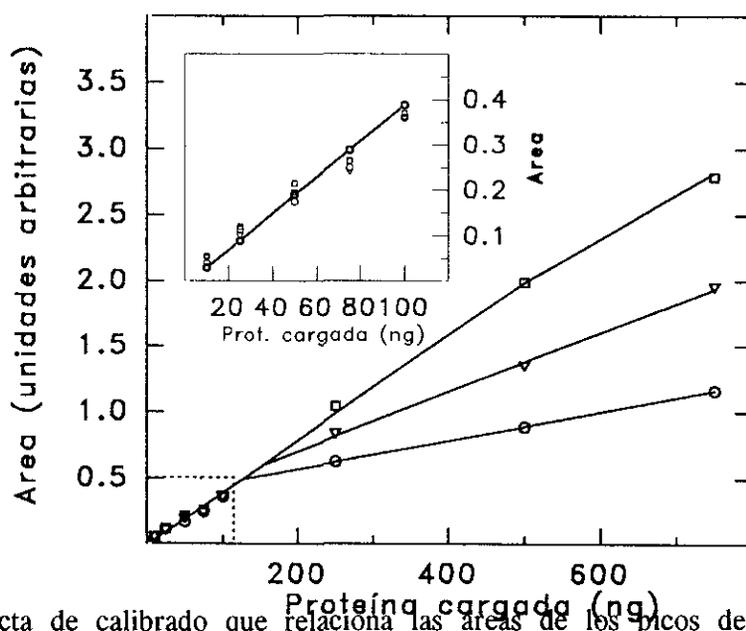


Figura 50. Recta de calibrado que relaciona las áreas de los picos de las medidas de transmittancia y las cantidades de proteína cargadas. En la figura interior se muestra la zona lineal de las representaciones anteriores. (○), ovoalbúmina, (▽) inhibidor de tripsina, (□) lisozima de huevo de gallina.

BIBLIOGRAFÍA

- Akerboom, T.P.M. ; Bilzer, M. y Sies, H. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 4248-4252.
- Alpert, A.J. y Gilbert, H.F. (1985) *Anal. Biochem.*, **144**, 553-562.
- Anderson, M.E.; Bridges, R.J. y Meister, A. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96**, 848-853.
- Anderson, M.E. y Meister, A. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 707-711.
- Aoki, Y. y Natori, S. (1981) *Biochem. J.*, **196**, 699-703
- Arrick, B.A.; Nathan, C.G.; Griffith, O.W. y Cohn, Z.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **57**, 1231-1247.
- Baba, A.; Lee, E.; Kihara, T. e Iwata, H. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1204-1210.
- Bajardi, F.; Benedetto, C.; Nohammer, G.; Schauenstein, E. y Slater, T.F. (1983) *Histochem.*, **78**, 95-100.
- Barnard, E.A. (1969) *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 677-732.
- Bates, D.J.; Good, R.T. y Austin, L. (1985) *Neurochem. Res.*, **10**, 953-967.
- Beaven, G. y Holiday, E.R. (1952) *Adv. Protein Chem.*, **7**, 319-325.
- Beintema, J.J. (1987) *Life Chem. Rep.*, **4**, 333-389.
- Beintema, J.J.; Schuller, C.; Irie, M. y Carsana, A. (1988) *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, **51**, 165-192.
- Bencze, W.L. y Schmid, K. (1957) *Anal. Chem.* **29**, 1193-1199.
- Bicknell, R. y Vallee, B.L. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 5961-5965.
- Bicknel, R. y Vallee, B.L. (1989) *Proc. Natl. Sci. U.S.A.*, **86**, 1573-1577.
- Bishay, E.S. y Nichols, D.M. (1973) *Arch. Biochem. Biophys.*, **158**, 185-194.
- Blackburn, P.; Wilson, G. y Moore, S. (1977) *J. Biol. Chem.*, **252**, 5904-5910.
- Blackburn, P. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 12484-12487.
- Blackburn, P. y Gavilanes, J.G. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 10959-10965.
- Blackburn, P. y Moore, S. (1982a) *Enzymes* **15**, 317-433.
- Blackburn, P. y Gavilanes, J.G. (1982b) *J. Biol. Chem.*, **257**, 316-321.
- Blobel, G. y Potter, V.R. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **55**, 1283-1288.
- Bloemendal, H.; Zweers, A.; Koopmans, M. y Van der Broek, W. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 416-425.

- Bloemendal, H. y Jansen, K. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, **966**, 117-121.
- Bond, M.D. y Vallee, B.L. (1990) *Biochemistry*, **29**, 3341-3349.
- Brewer, E.N.; Foster, L.B. y Sells, B.H. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 1389-1392.
- Brokdorf, N.A. y Knowler, J.T. (1986) *Mol. Cel. Endocrin.*, **44**, 117-124.
- Buchanan, B.B.; Crawford, N.A. y Volosiuk, R.A. (1979) *Plant. Sci. Lett.*, **14**, 245-252.
- Burchell, A. y Burchell, B. (1980) *FEBS Lett.*, **118**, 180-184.
- Burton, L.E.; Blackburn, P. y Moore, S. (1980) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **16**, 359-364.
- Burton, L.E. y Fucci, N.P. (1982) *Int. J. Pept. Protein Res.*, **19**, 372-379.
- Button, E.E.; Guggenheimer, R. y Kull, F.J. (1982) *Arch. Biochem. Biophys.*, **219**, 249-260.
- Cappel, R.E. y Gilbert, H.F. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 15378-15384.
- Carow, H.M.; Kharrazi, H.; Koschorur, G.; Schauenstein, E.; Schaur, R.J.; Tillian, H.M. y Morris, H.B. (1982) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **103**, 281-286.
- Cavalli, L.; Galaverni, D.; Pesando, P.; Bracchi, P.G.; Campani, G. y Maraini, G. (1979) *Ophthalmia Res.*, **11**, 416-422.
- Cid, M.C. (1992) "Estudios sobre la interacción de la RNasa A con el Inhibidor de Ribonucleasa de testículo de cerdo" Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas, U.C.M.
- Cohen, B.B. (1976) *Cancer Biochem. Biophys.*, **1**, 251-256.
- Connellan, J.M. y Folk, J.E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3173-3181.
- Connor, M.J. y Wheeler, L.A. (1987) *Photochem. Photobiol.*, **46**, 239-245.
- Crawford, D.; Hagerty, K. y Beutter, B. (1989) *Gene*, **85**, 527-533.
- Crevel-Thieffry, I.; Cotterill, S. y Schuller, E. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1122**, 107-112.
- Czajkowska, B.; Naskalski, J.W. y Sznajd, J. (1986) *Clinica Chim. Acta*, **154**, 19-28.
- Cho, S. y Joshi, J.G. (1989) *Anal. Biochem.*, **176**, 175-179.
- Cho, S.W. y Kim, G.Y. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **202**, 107-111.
- Chow, P.Y. y Fasman, G.D. (1978) *Ann. Rev. Biochem.*, **47**, 251-276.
- Chung, H.; Fried, J.; Williams-Ashman, E. y Jarabak, J. (1987a) *Prostaglandins*, **33**, 383-390.
- Chung, H.; Fried, J. y Jarabak, J. (1987b) *Prostaglandins*, **33**, 391-402.

- D'Alessio, G.; Didonato, A.; Parente, A. y Piccoli, R. (1991) *Trends Bioch. Sci.*, **16**, 104-106.
- DeLucia, A.J.; Mustafa, M.G.; Hussain, M.Z. y Cross, C.E. (1975) *J. Clin. Invest.*, **55**, 794-802.
- Deneke, S.M.; Gershoff, S.N. y Fanburg, B.L. (1983) *J. Appl. Fisiol.*, **4**, 147-151.
- Deneke, S.M.; Lynch, B.A. y Fanburg, B.L. (1985a) *J. Appl. Physiol.*, **58**, 571-574.
- Deneke, S.M.; Lynch, B.A. y Fanburg, B.L. (1985b) *J. Nutr.*, **115**, 726-732.
- Dijkstra, J.; Touw, J.; Haselma, I.; Gruber, M. y AB, G. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **521**, 363-373.
- Dixon, M. (1972) *Biochem. J.*, **129**, 197-202.
- Eisemberg, D. (1984) *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 595-623.
- Eldjarn, L. y Bremer, L. (1962) *Biochem. J.*, **84**, 286-291.
- Ernest, M.J. y Kim, K.H. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1550-1555.
- Feldman, N.; Kohtz, D.S. y Kleinberg, D.L. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **157**, 286-294.
- Fernández Patrón, C.; Castellanos Serra, L. y Rodríguez P. (1992) *Biotechniques*, **14**, 564-573.
- Fett, J.W.; Strydom, D.J.; Lobb, R.R.; Alderman, E.M.; Bethune, J.L.; Riordan, J.F. y Vallee, B.L. (1985) *Biochemistry*, **24**, 5480-5486.
- Fominaya, J.M.; García-Segura, J.M. y Gavilanes, J.G. (1988a) *Biochim. Biophys. Acta*, **954**, 216-223.
- Fominaya, J.M.; García-Segura, J.M.; Ferreras, M y Gavilanes, J.G. (1988b) *Biochem. J.*, **253**, 517-522.
- Fominaya, J.M. (1989) "Estudios sobre la funcionalidad fisiológica del sistema Ribonucleasa/Inhibidor de RNasa" Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Biológicas, U.C.M.
- Fominaya, J.M. y Hofsteenge, J. (1993) *J. Biol. Chem.* **267**, 24655-24660.
- Frost, A.A. y Pearson, R.G. (1961) *Kinetics and Mechanism*, Jonh Wiley and Sons, New York, 166-169.
- García-Segura, J.M. (1985a) "Actividades degradantes de RNA del insecto *Ceratitits capitata*" Tesis Doctoral. Facultad de C.C. Químicas, U.C.M.
- García-Segura, J.M.; Fominaya, J.M.; Orozco, M.M. y Gavilanes, J.G. (1985b) *Biochim. Biophys. Acta*, **826**, 129-136.
- Gascoyne, P. (1986) *International Journal of Quantum Chemistry: Quantum Biology Symposium*, **12**, 245-255.

- Gilbert, H.F. y Stewart, M.D. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 1782-1785.
- Gilbert, H.F. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 12086-12091.
- Girija, N.S. y Sreenivasan, A. (1966) *Biochem. J.*, **98**, 562-566.
- Gleich, G.J.; Loegering, D.A.; Bell, M.P.; Checkel, J.L.; Ackerman, S.J. y McKean D.J. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 3146-3150.
- Goto, S. y Mizuno, D. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.*, **145**, 71-77.
- Greif, R.L. y Eich, E.F. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **286**, 350-359.
- Greif, R.L. y Eich, E.F. (1977) *Metab. Clin. Exp.*, **26**, 851-856.
- Gribnau, A.A.M.; Schoenmakers, J.G.G. y Bloemendal, H. (1969) *Arch. Biochim. Biophys.*, **130**, 48-52.
- Griffith, O.W.; Larsson, A. y Meister, A. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **79**, 919-925.
- Hagen, T.M.; Aw, T.Y. y Jones, D.P. (1988) *Kidney Int.* **34**, 74-81.
- Hagen, T.M.; Brown, L.A. y Jones, D.P. (1986) *BNiochem. Pharmacol.*, **35**, 4537-4542.
- Hamann, K.J.; Barker, R.L.; Loegering, D.A.; Pease, L.R. y Gleich, G.J. (1989) *Gene*, **83**, 161-167.
- Hartley, R.W. (1988) *J. Mol. Biol.*, **202**, 913-915.
- Hashimoto, C.; Hudson, K.L. y Anderson, C.A. (1988) *Cell*, **52**, 269-279.
- Henderson, P.J.F. (1972) *Biochem. J.* **158**, 367-372.
- Hiranyavasi, W. y Kusamran, T. (1983) *FEBS Lett.*, **152**, 35-38.
- Hofsteenge, J.; Kieffer, B.; Mathies, R.; Hemmings, B.A. y Stone, S.R. (1988) *Biochemistry*, **27**, 8537-8544.
- Hofsteenge, J.; Mathies, R. y Stone, S.R. (1989) *Biochemistry*, **28**, 9806-9813.
- Hofsteenge, J.; Vicentini, A. y Stone, S.R. (1991a) *Biochem. J.* **275**, 541-543.
- Hofsteenge, J.; Servis, C. y Stone, S.R. (1991b) *J. Biol. Chem.*, **266**, 24198-24204.
- Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 3672-3678.
- Imrie, R.C. y Hutchison, W.C. (1965) *Biochem. Biophys. Acta*, **108**, 106-113.
- Isaacs, J. y Binkley, F. (1977a) *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 192-204.
- Isaacs, J. y Binkley, F. (1977b) *Biochim. Biophys. Acta* **498**, 29-38.

- Issels, R.D.; Nagele, A.; Eckert, K.G. y Wilmanns, W. (1988) *Biochem. Pharmacol.* **37**, 881-888.
- Jocelyn, P.C. (1971) *Biochemistry of the SH group*, Academic, New York.
- Jones, L.M. y Knowler, J.T. (1989) *J. Neurochem.* **53**, 1341-1344.
- Junien, C. y McBride, O.W. (1989) *Cytogenet. Cell. Genet.*, **51**, 226-258.
- Kaplowitz, N. (1980) *Am. J. Physiol.*, **239**, (Gastrointest. Liver Physiol. 2) G439-G444.
- Kataoka, T.; Brock, D. y Wigler, M. (1985) *Cell*, **43**, 493-505.
- Kawanamoto, M.; Motojima, K.; Sasaki, M.; Hattori, H. y Goto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1129**, 335-338.
- Keire, D.A.; Strauss, E.; Guo, W.; Noszal, B. y Rabenstein, D.L. (1992) *J. Org. Chem.*, **57**, 123-127.
- Kiss, Z.S. y Guba, F. (1979) *FEBS Lett.* **108**, 185-188.
- Kiyohara, H. y Menjo, M. (1983) *Gastroenterol. Jpn.*, **18**, 252-254.
- Kobe, B. y Deisenhofer, J. (1993) *J. Mol. Biol.* **231**, 137-140.
- Konichev, A.S.; Ivanov, V.G.; Proskurina, I.K. y Filipovich, YU.B. (1986) *Biochemistry (USSR)*, **51**, 1297-1302.
- Konishi, K. y Fujioka, M. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 90-96.
- Kosower, N.S. y Kosower, E.M. (1976a) *Free Radicals in Biology*, Vol. II, Pryor, W.A. Ed. (Academic, New York) 55-84.
- Kosower, N.S. y Kosower, E.M. (1976b) *Glutathione: Metabolism and Function*, Arias, I.M. y Jakobi, W.B. Eds. (Raven, New York) 159-174.
- Kraft, N. y Shortman, K. (1970a) *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**, 175-184.
- Kraft, N. y Shortman, K. (1970b) *Biochim. Biophys. Acta*, **217**, 164-175.
- Kraus, A.A. y Scholtissek, C. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **48**, 345-350.
- Kraus, P. y Kloft, H.D. (1980) *Enzyme*, **25**, 158-160.
- Kyner, D.; Christman, J.K. y Acs, G. (1979) *Eur. J. Biochem.*, **99**, 395-399.
- Laemli, U.K. (1970) *Nature (London)*, **227**, 680-685.
- Lash, L.H.; Hagen, T.M. y Jones, D.P. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 4641-4645.
- Lawford, G.R.; Langford, P. y Schachter, H. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 1835-1839.

- Lee, F.S.; Fox, E.A.; Zhou, H.M.; Strydom, D.J. y Vallee, B.L. (1988) *Biochemistry*, **27**, 8545-8553.
- Lee, F.S.; Auld, D.S. y Vallee, B.L. (1989a) *Biochemistry*, **28**, 219-224.
- Lee, F.S. y Vallee, B.L. (1989b) *Biochemistry*, **28**, 3556-3561.
- Lee, F.S.; Shapiro, R. y Vallee, B.L. (1989c) *Biochemistry*, **28**, 225-230.
- Lee, F.S. y Vallee, B.L. (1989d) *Biochem Biophys. Res. Commun.*, **160**, 115-120.
- Lee, F.S. y Vallee, B.L. (1990b) *Biochemistry*, **29**, 6633-6638.
- Lee, F.S. y Vallee, B.L. (1990a) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 1879-1883.
- Lee, F.S. y Vallee, B.L. (1993) *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, **44**, 1-30.
- Leone, E.; Greco, L.; Rastogi, R.K. y Iela, L. (1973) *J. Reprod. Fert.*, **34**, 197-200.
- Little, B.W. y Meyer, W.L. (1981) *Can. J. Biochem.*, **59**, 220-231.
- Liu, D.K.; Williams, G. H. y Fritz, P.J. (1975a) *Biochem. J.* **148**, 67-76.
- Liu, D.K.; McKee, E.E. y Fritz, P.J. (1975b) *Growth*, **39**, 167-175.
- Liu, D.K. y Matrisian, P.E. (1977) *Biochem. J.*, **164**, 371-377.
- López, J.A.; Chung, D.W.; Fujikawa, K. Hagen, F.S.; Papayamopoulou, T. y Roth, G.J. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5615-5619.
- Luthy, J.A.; Praissman, M.; Finkenstadt, w.r. y Laskowski Jr., M. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1760-1771.
- Macfayden, D.A. (1934) *J. Biol. Chem.* **107**, 297-304.
- Malika-Blaskiewicz, C. (1978) *Proceedings of 12th FEBS Meeting*. Dresden, Abstr. 0122.
- Mannervik, B. y Axelsson, K. (1980) *Biochem. J.*, **190**, 125-130.
- Marlat, P.; Bracchi, P.G. y Maraini, G. (1981) *Ophthalmic. Res.*, **13**, 293-301.
- Marotta, C.A. y Majocha, R.W. (1986) *Prog. Brain Res.*, **70**, 303-320.
- Maschoff, K.; White, C.L.; Jennings, L.W. y Morrison-Bogorad, M.R. (1989) *J. Neurochem.*, **52**, 1071-1078.
- Matousek, J. (1973) *Experientia*, **29**, 858-859.
- McCormack, P.L. y Palmer, D.G. (1980) *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 3333-3336.
- McGregor, C.W.; Adams, A. y Knowler, J.T. (1981) *J. Steroid Biochem.*, **14**, 415-419.

- McLachlan, A.D. (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **52**, 411-420.
- Meister, A. (1981) *Trends Biochem. Sci.*, **69**, 231-234.
- Meister, A. (1984) *Nutr. Rev.*, **42**, 397-410.
- Meister, A. y Anderson, M. (1986) *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760.
- Meister, A.; Anderson, M. y Hwang, O. (1986) *J. Am. Coll. Nutr.*, **5**, 137-151.
- Miller, A.C. y Henderson, B.W. (1986) *Radiat. Res.*, **107**, 83-94.
- Moron, M.S.; Depierre, J.W. y Mannervik, B. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, **582**, 67-78.
- Morrison, M.R.; Pardue, S.; Maschoff, K.; Griffin, W.S.T.; White, C.L.; Gilbert, J. y Roses, A. (1987) *Biochem. Soc. Trans.*, **15**, 133-134.
- Morrison, J.F.C. (1982) *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 102-105.
- Morrison, J.F. y Walsh, C.T. (1988) *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **61**, 201-301.
- Murthy, P.V.N. y Sideshmukh, R. (1992) *Biochem. J.*, **281**, 343-348.
- Nakashima, K.; Pontremoli, S. y Horecker, B.L. (1969) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **64**, 947-951.
- Neumann, U.; Hofsteenge, J.; Ackerman, A.H. y Dijkstra, B.L. (1993) *J. Mol. Biol.*, **231**, 505-508.
- Noelle, R.J. y Lawrence, D.A. (1981) *Biochem. J.*, **198**, 571-579.
- Oakley, B.R.; Kirch, D.R. y Morris, N.R. (1980) *Anal. Biochem.*, **105**, 361-363.
- Ondarza, R.N. (1966) *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **27**, 81-88.
- Ortiz, M.L.; Calero, M.; Fernández Patrón, C.; Castellanos, L. y Méndez, E. (1992) *FEBS Lett.*, **296**, 300-304.
- Ortwerth, B.J. y Birnes, R.J. (1971) *Exp. Eye Res.*, **12**, 120-127.
- Ortwerth, B.J. y Byrnes, R.J. (1972) *Exp. Eye Res.*, **14**, 114-122.
- Pajares, M.A.; Durán, C.; Corrales, F.; Pliego, M.M. y Mato, J.M. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17598-17605.
- Parker, C.W.; Fischman, C.M. y Wedner, H.J. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 6870-6873.
- Pirotte, M. y Desreux, V. (1952) *Bull. Soc. Chim. Belges*, **61**, 167-180.
- Pontis, H.G.; Bavio, J.R. y Salerno, G. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 6667-6669.

- Quast, U.; Engel, J.; Heumann, H.; Krause, G. y Steffen, E. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2512-2520.
- Reinke, R.; Krantz, D.E.; Yen, D. y Zipursky, S.L. (1988) *Cell*, **52**, 291-301.
- Revesz, L. y Edgren, M. (1984) *Br. J. Cancer*, **49**, Suppl. VI, 55-60.
- Richman, P.G. y Meister, A. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422-1426.
- Rosemberg, H.S.; Tenen, D.G. y Ackerman, S.J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **86**, 4460.
- Roth, J.S. (1956) *Biochim. Biophys. Acta*, **21**, 34-43.
- Roth, J.S.; Bachmurski, D. e Inglis, L. (1958) *J. Biol. Chem.*, **231**, 1085-1095.
- Sajdel-Sulkowska, E.M. y Marotta, C.A. (1984) *Science*, **225**, 947-949.
- Scheele, G. y Blackburn, P. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76**, 4898-4902.
- Schneider, R.; Schneider-Scherzer, E.; Thurner, M.; Auer, B. y Schneiger, M. (1988) *EMBO J.*, **7**, 4151-4156.
- Schneider, R.; Higgins, M.J.; Kieninger, D.; Schneider-Scherzer, E.; Hirsch-Kauffman, M.; Shows, T.B. y Zabel, B.U. (1992a) *Cytogenet. Cell Genet.*, **59**, 264-267.
- Schneider, R. y Schweiger, M. (1992b) *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 315-318.
- Shapiro, R.; Riordan, J.F. y Vallee, B.L. (1986a) *Biochemistry*, **25**, 3527-3532.
- Shapiro, R.; Fett, J.W.; Strydom, P.J. y Vallee, B.L. (1986b) *Biochemistry*, **25**, 7255-7264.
- Shapiro, R.; Srydom, D.J.; Olson, K.A. y Vallee, B.L. (1987a) *Biochemistry*, **26**, 5141-5146.
- Shapiro, R. y Vallee, B.L. (1987b) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2238-2241.
- Shapiro, R.; Fox, E.A. y Riordan, J.F. (1989a) *Biochemistry*, **28**, 1726-1732
- Shapiro, R. y Vallee, B.L. (1989b) *Biochemistry*, **28**, 7401-7408.
- Shapiro, R. y Vallee, B.L. (1991) *Biochemistry*, **30**, 2246-2255.
- Shimazu, T.; Tokutake, S. y Usami, M. (1978) *J. Biol. Chem.* **253**, 7376-7382.
- Shortman, K. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* **51**, 37-49.
- Shortman, K. (1962a) *Biochim. Biophys. Acta*, **55**, 88-96.
- Shortman, K. (1962b) *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 50-55.
- Spackman, D.H.; Stein, W.H. y Moore, S. (1958) *Anal. Chem.*, **30**, 1185-1192.
- Strydom, D.J.; Fett, J.W.; Lobb, R.R.; Alderman, E.M.; Bethline, J.L.; Riordan, J.F. y Vallee,

- B.L. (1985) *Biochemistry*, **24**, 5486-5494.
- Suzuki, Y. y Takahashi Y. (1970) *J. Neurochem.*, **17**, 1521-1524.
- Switzer, R.C.; Merril, C.R. y Shifrin, S. (1979) *Anal. Biochem.*, **98**, 231-237.
- Takahashi, N.; Takahashi, Y. y Putnam, F.W. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 1906-1910.
- Terada, T.; Maeda, H.; Okamoto, K.; Nishinaka, T.; Mizoguchi, T. y Nishihara, T. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.*, **300**, 495-500.
- Tian, W.X.; Hsu, R.Y. y Wang, Y.S. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 11375-11387.
- Titani, K.; Takio, K.; Handa, M. y Ruggeriz, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**, 5610-5614.
- Tuboi, S. y Hayasaka, S. (1972) *Arch. Biochem. Biophys.*, **150**, 690-697.
- Turner, P.M.; Lerea, K.M. y Kull, F.J. (1983) *Biochem Biophys, Res. Commun.*, **114**, 1154-1160.
- van Berkel, T.J.C.; Koster, J.F. y Hulsmann, W.C. (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, **293**, 118-124.
- Vicentini, A.M.; Kieffer, B.; Mathies, R.; Meyhack, B.; Hemminga, B.A.; Stone, S.R. y Hofsteenge, J. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8827-8834.
- Walters, D.W. y Gilbert, H.F. (1986a) *J. Biol. Chem.*, **261**, 13135-13143.
- Walters, D.W. y Gilbert, H.F. (1986b) *J. Biol. Chem.* **261**, 15372-15377.
- Weremowicz S.; Fox, E.A.; Morton, C.C. y Vallee, B.L. (1990) *Genomics*, **8**, 717-721.
- Zneimer, S.M.; Crawford, D.; Schneider, N.R. y Beutler, B. (1990) *Genomics*, **8**, 175-178.