

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio.....82..... número.....62..... del libro
correspondiente.

Sevilla, 10 MAR 1989

El Jefe del Negociado de Tesis,

Manuel Gordillo Rueda

ESTUDIO DE LAS MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES DE
PROTEINAS DURANTE EL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO.

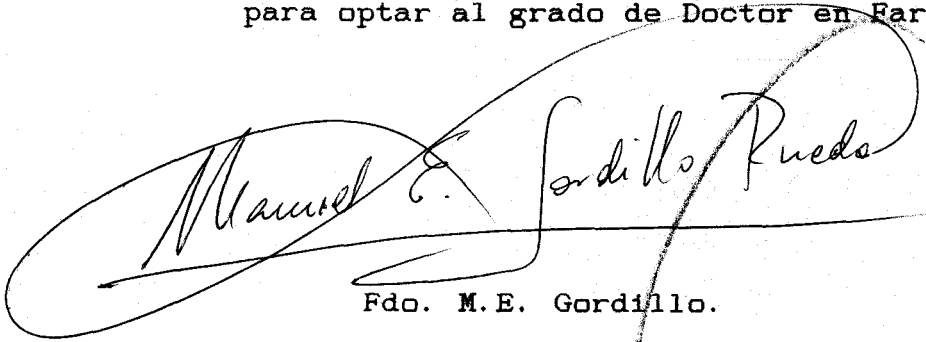


Tesis que presenta el Ldo.
Manuel Enrique Gordillo Rueda
para optar al grado de Doctor
en Farmacia.

Sevilla, Marzo de 1989.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA

Tesis que presenta el Ldo. Manuel Enrique Gordillo Rueda
para optar al grado de Doctor en Farmacia.



Fdo. M.E. Gordillo.

Vº Bº del director de Tesis:



Fdo. Dr. Alberto Machado de La Quintana.
Catedrático de Bioquímica.

Realizada con una Beca
de Formación de Perso-
nal Investigador de la
Junta de Andalucía.

Me gustaría expresar mi profundo y sincero agradecimiento al Dr. Alberto Machado el haberme brindado la oportunidad de realizar el presente trabajo, así como, su constante orientación , estímulo y decisiva contribución a mi formación científica.

A todos los miembros de este departamento por su ayuda y amable colaboración. Por los buenos y malos ratos vividos con ellos.



A mis padres

A Olga

ABREVIATURAS

CM-celulosa.....	Carboximetil celulosa
cpm.....	Cuentas por minuto
DEAE-celulosa.....	Dietilaminoetil celulosa
DEPC.....	Dietil-pirocarbonato
DTNB.....	Acido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
DTT.....	DL-ditiotreitol
EDTA.....	Acido etildiamina tetraácetico
EM.....	Enzima málico.
EVMP.....	Expectativa de vida máxima potencial
6-PGDH.....	6-Fosfogluónico deshidrogenasa
G-6-PDH.....	Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa
MetSo.....	Sulfóxido de metionina
NADP(H).....	Nicotin adenín dinucleótido fosfato (reducido)
p-NPG.....	p-Nitrofenilglioxal
p/v.....	Peso:volumen
rpm.....	Revoluciones por minuto
SDS.....	Dodecil sulfato sódico
-SH.....	sulfidrilos
TEA.....	Trietanol amina
TEMED.....	Tetrametiletilen diamina
TNBS.....	Trinitro benzol-sulfónico
Tris.....	Trihidroximetilaminometano

INDICE.

	<u>Página.</u>
1. INTRODUCCION	1
2. PLAN DE TRABAJO	12
3. MATERIAL Y METODOS	15
3.1. Animales de experimentación	16
3.2. Aparatos	16
3.3. Productos	16
3.4. Determinaciones de las actividades enzimáticas	17
3.5. Titulaciones de los anticuerpos	19
3.6. Inmunoprecipitaciones de las actividades enzimáticas	20
3.7. Purificación de las enzimas	20
3.8. Electroforesis	21
3.9. Determinación del punto isoelectrico	22
3.10. Determinación de grupos -SH	22
3.11. Determinación de grupos arginina	25
3.12. Determinación de grupos histidina	27
3.13. Determinación del número de restos de metionina	28
3.14. Determinación del número de restos de lisina	28
3.15. Modificación oxidativa de la EM y 6-PGDH de joven con ascorbato	29
3.16. Iodación, hidrólisis parcial con tripsina y Endoproteinasa Arg-C y separación de los péptidos obtenidos en la hidrólisis de la 6-PGDH de joven y de viejo	30

	<u>Página.</u>
4. RESULTADOS	33
4.1. Isocitrato deshidrogenasa	34
4.1.1. Relación actividad/cantidad de enzima	34
4.2. Enzima málico deshidrogenasa	36
4.2.1. Relación actividad/cantidad de enzima	36
4.2.2. Purificación	37
4.2.3. Caracterización	41
4.2.4. Modificaciones aminoacídicas	43
4.2.5. Oxidación de la EM de joven con ascorbato	54
4.3. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	56
4.3.1. Relación actividad/cantidad de enzima	56
4.3.2. Purificación	57
4.3.3. Caracterización	60
4.3.4. Modificaciones aminoacídicas	61
4.4. 6-Fosfogluconico deshidrogenas	72
4.4.1. Relación actividad/cantidad de enzima	72
4.4.2. Purificación	73
4.4.3. Caracterización	76
4.4.4. Modificaciones aminoacídicas	77
4.4.5. Modificación con ascorbato de la 6-PGDH de joven	88

Página.

4.4.6. Iodación, hidrólisis parcial con tripsina y endoproteinasa Arg-C y separación de los péptidos obtenidos en la hidrólisis por HPLC de la 6-PGDH	91
5. DISCUSION	96
5.1. Isocitrato deshidrogenasa	97
5.1.1. Relación actividad/cantidad de enzima	97
5.2. Enzima málico	98
5.2.1. Relación actividad/cantidad de enzima	98
5.2.2. Purificación y caracterización	98
5.2.3. Modificaciones aminoacídicas	100
5.2.4. Oxidación de la EM de joven con ascorbato	102
5.3. Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	102
5.3.1. Relación actividad/cantidad de enzima	102
5.3.2. Purificación y caracterización	103
5.3.4. Modificaciones aminoacídicas	103
5.4. 6-Fosfogluconico deshidrogenasa	104
5.4.1. Relación actividad/cantidad de enzima	104
5.4.2. Purificación y caracterización	104
5.4.3. Modificaciones aminoacídicas	104
5.4.4. Oxidación de la 6-PGDH de joven con ascorbato	105

	<u>Página.</u>
5.4.5. Iodación, hidrólisis parcial y separación de los péptidos	105
6. CONCLUSIONES	108
7. BIBLIOGRAFIA	111



1. INTRODUCCION

Distintas estadísticas indican que para el año 2000, según la tendencia actual la población mundial se triplicará, mientras que la población mayor de 65 años se quintuplicará. De estos datos se desprende que actualmente nos encontramos en lo que podría llamarse "era del envejecimiento", lo que conlleva, enormes implicaciones económicas, sociales, sanitarias, etc. Esta es la razón por la Gerontología está teniendo un gran auge y que se haya producido el desarrollo de la Biogerontología. La Biogerontología estudia el cómo y el por qué del envejecimiento en los seres vivos.

El proceso del envejecimiento se manifiesta como pérdida progresiva y uniforme del estado óptimo de la salud y del vigor (1). Esto, lógicamente, implica que la Biogerontología aborda un problema enormemente complejo, ya que la mayoría, si no todas, las funciones biológicas están implicadas en este proceso. Existe, a su vez, una gran dificultad de abordaje, ya que es realmente difícil separar lo que es causa y efecto en el envejecimiento. Todo esto hace que, por desgracia, se desconozca, por el momento, el mecanismo intrínseco que conduce a un progresivo envejecimiento del ser humano y de los seres vivos en general.

Uno de los primeros rasgos propios del envejecimiento, y que de alguna manera ha sustentado fuertemente que éste fuese un proceso "programado", aunque eso no implique necesariamente la existencia de unos genes especiales para este proceso, ha sido la "longevidad" o "expectativa de vida máxima potencial" (EVMP) de una especie, que se define como el tiempo máximo de vida de una población homogénea hasta que ha muerto el último individuo de la población. Al estudiar este parámetro se demostró que era una

característica de la especie, e independiente de otros parámetros, como la "expectativa de vida de un individuo" o el "tiempo de supervivencia del 50% de los individuos de una población". Esta EVMP puede ser, además, calculada a partir de los pesos del cuerpo y cerebro de los individuos adultos de cada especie por la ecuación de Sacher (2-3).

$$EVMP = (\text{peso del cerebro gr})^{0.6336} \times (\text{peso del cuerpo gr})^{0.225}$$

También hay que destacar en el envejecimiento una pérdida uniforme y continua de todas y cada una de las funciones fisiológicas, lo que significa para nosotros, que:

1) Para el envejecimiento, todas estas funciones son igual de importantes, aunque desde el punto de vista de la fase final, que es la muerte, serán más importantes aquellas que mejor nos defiendan de las agresiones del medio ambiente, como puede ser:

- La capacidad inmunológica.
- La formación del interferón.
- Los procesos de destoxificación, etc.

2) La causa del envejecimiento tiene que ser "algo" que produzca un efecto generalizado, que se dé en la mayoría, por no decir en todos, los tejidos de los organismos.

Estos dos hechos han dado lugar a una serie de teorías que intentan justificar este proceso. Cada una de las cuales es probable que tengan algo de ciertas.

Una de ellas, es la denominada, "teoría del error catastrófico" desarrollada por Orgel en 1963 (4), recoge por primera vez un mecanismo molecular del envejecimiento. Según esta teoría, el envejecimiento es debido a la acumulación de errores en las proteínas. Orgel supone que la fidelidad del

proceso de síntesis de proteínas se pierde con el tiempo, produciéndose una serie de "proteínas erróneas", que van aumentando en cantidad a medida que la célula va envejeciendo. La presencia de estas enzimas modificadas tendrá una consecuencia importante, y es que no actuarán de manera idónea en todos aquellos procesos en los que tomen parte. Además, Orgel, supone que algunos de estos procesos son la replicación y la transcripción del ADN. Los errores en estas dos series de reacciones, conllevan a un círculo de regulación feed-back positivo de errores en todo el mecanismo que conduce a la síntesis final de las proteínas.

Los primeros datos concernientes a esta teoría son los estudios matemáticos de las distintas curvas que podrían llevar a la formación del envejecimiento y la muerte, en respuesta a la acumulación de errores de las proteínas. En estos estudios, si se comienza con un nivel de error inicial suficientemente pequeño, y el sistema de regulación feed-back acoplado es también pequeño pero suficiente para que no exista un equilibrio, los errores se acumularán de forma exponencial. Inicialmente, la acumulación de estos no es perceptible pero, conforme va pasando el tiempo, se van desarrollando y acumulando estos errores, hasta producir efectos visibles por acumulación exponencial.

En términos matemáticos, la acumulación de estos errores seguirá la ecuación:

$$E_t = E_0 e^{\alpha t}$$

donde E_0 es la frecuencia de error inicial. E_t es la frecuencia de error en el tiempo t y α es una constante de proporcionalidad.

Lo más interesante es que esta ecuación es idéntica a la ecuación de Gosdperg (5) que justifica el aumento de la mortalidad específica con la edad.

$$M_t = M_0 e^{\alpha t}$$

donde M_0 es la mortalidad inicial, M_t es la mortalidad en el tiempo t y α es una constante de proporcionalidad.

Los resultados de Gerson y Gerson (6) que estudiaron el comportamiento de la actividad isocitrato liasa del nematodo de vida libre Turbatrix aceti, parecían justificar la existencia de una proteína inactiva que bien podría ser una proteína distinta obtenida mediante error en su síntesis.

Esto aumentó considerablemente el interés de este tema, lo que incrementó, lógicamente, el número de trabajos dedicados a corroborar o rechazar dicha teoría. Con este fin se abren principalmente dos líneas de investigación: a) dedicada al estudio de la fidelidad de la síntesis de proteínas, y sus cambios producidos por la edad; b) estudios de las proteínas en animales viejos.

Entre los del primer grupo hay que destacar a los estudios realizados por Buchaman y col. (7), quienes usando estratos libres de células MRC-5, estudiaron el nivel de error en el mecanismo de traducción por incorporación de leucina en la síntesis de proteínas dirigidas por poli-U (Fenilalanina) encontrando que era 1-2% mayor que las producidas "in vivo". Sin embargo, no había diferencias entre células de un número pequeño de pases de cultivo y las que se podían considerar que estaban en su último estadio de división celular. Tampoco encontraron un aumento de error por la adición de puromicina en estos dos tipos de extractos celulares.

Estos experimentos fueron repetidos por Wojtyk y Goldstein (8) con los mismos resultados. Además estos autores ampliaron el estudio usando células de individuos con progeria y con el síndrome de Werner, entre los que tampoco encontraron diferencias en la capacidad de producir errores en la síntesis de proteínas.

También son interesantes los trabajos de Harley y col (9) quienes, mediante la técnica del "ayuno en aminoácidos", inducen errores en las proteínas celulares, lo que conlleva a la formación de proteínas alteradas. Las proteínas sintetizadas bajo estas condiciones son separadas por electroforesis en dos dimensiones, y se revelan por autoradiografía. Las proteínas extrañas tendrán que tener un mayor recorrido, principalmente por el cambio de histidina (aminoácido neutro), que sería sustituido por la glutamina (aminoácido básico), resultando una proteína nueva con el mismo peso molecular pero con mayor punto isoelectrico. Estos autores encuentran que la frecuencia de errores no cambia con el número de "pases" de las células, que en todo caso disminuye, así como, en las células de donadores viejos. Por otra parte, la frecuencia de error no está relacionada con la expectativa de tiempo máximo de vida de las diferentes células estudiadas. Esta frecuencia aumenta cuando se utilizan células transformadas SV-40 (células inmortales), lo que es contrario a la teoría de errores.

La segunda línea de investigación de estudios de las proteínas llegan a distinguir entre las propiedades de las proteínas que cambian con la edad y las que no cambian.

1) Propiedades que no sufren generalmente cambios o sus cambios son poco significativos.

- El peso molecular. (10-13)

- Los aminoácidos, inicial y final de las proteínas (14).

- La carga eléctrica de las proteínas (15-16).

- El comportamiento electroforético de dichas proteínas en geles (17-18).

- El patrón de inmunodifusión (19).

2) Propiedades que se alteran con mayor frecuencia.

- La sensibilidad al calor (20-21)

- La actividad específica (11, 22-26).

- Las propiedades espectrales (27).

- La inactivación por proteasas (28-30).

- La inmunotitulación (31-32).

Todos estos resultados (10-32), no pueden interpretarse más que como pruebas negativas de la teoría de errores en las proteínas. Sin embargo, sí se demuestra la existencia de proteínas "alteradas" con la edad. Por lo que esta alteración tiene que ser producida con posterioridad a la traducción, o sea, por modificaciones post-traduccionales.

Actualmente se han descrito numerosas modificaciones químicas que se producen en las proteínas con posterioridad a su síntesis. La mayoría de éstas se encuentran en la tabla 1.

Como podemos observar en dicha tabla las modificaciones post-traduccionales, pueden ser:

a) Enzimáticas.

b) No enzimáticas.

De estos dos posibles tipos de modificaciones post-traduccionales que se pueden dar en los seres vivos, el que parece tener una mayor influencia sobre el envejecimiento, son las modificaciones no enzimáticas.



TABLA 1. Clasificación de las modificaciones post-traduccionales

I) MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES COVALENTES ENZIMATICAS.

I.A. MODIFICACIONES A NIVEL DE ENLACE PEPTIDICO

I.A.1. *Degradación proteolítica parcial*

I.B. MODIFICACIONES A NIVEL DE RESTOS AMINOACIDICOS

I.B.1. *Adición de grupos no aminoacídicos*

- Adición de carbohidratos.
- Adición de lípidos.

I.B.2. *Modificación de restos aminoacídicos*

- * Fosforilación.
- * Metilación.
- * Acilación.
- * Hidroxilación.
- * Oxidación.

II) MODIFICACIONES POST-TRADUCCIONALES COVALENTES NO ENZIMATICAS.

II.A. MODIFICACIONES QUE TRANSCURREN A TRAVES DE LA FORMACION DE UNA BASE DE SCHIFF.

1. Glucosilación.
2. Reacciones con aldehidos y cetonas.
3. Reacciones con quinonas.

II.B. OTRAS MODIFICACIONES NO ENZIMATICAS.

1. Cianilación.
2. Racemización.
3. Oxidación.
4. Isomerización.

De entre ellas las que actualmente se les considera más importante son la glucosilación y la oxidación.

GLUCOSILACION

La glucosilación puede ser un proceso enzimático y entonces se produce la unión de la glucosa en lugares específicos de la proteína. sin embargo, desde el punto de vista del envejecimiento nos interesa la glucosilación no enzimática.

Este proceso añade glucosa al azar sobre cualquiera de los sitios que se ofrecen a todo lo largo de la cadena polipeptídica. Las reacciones no enzimáticas entre la glucosa y las proteínas, reacciones de Maillard o de oscurecimiento (33), comienzan con la atracción mutua entre el aldehído (CHO) de la glucosa y un grupo amino (NH₂) de una proteína. Las moléculas se combinan y forman lo que se conoce como base de Schiff, producto inestable que rápidamente y de forma espontánea evoluciona hacia una situación más estable, si bien todavía reversible, los productos de Amadori. Estos compuestos pueden deshidratarse y unirse entre si dando enlaces cruzados con la misma proteína o proteínas adyacentes derivados de la glucosa llegando a formas irreversibles que es lo que se denomina productos finales de glucosilación avanzada (AGE), que en su mayoría presentan un color pardo amarillento característico y son fluorescente, exhibiendo además propiedades espectrales específicas .

Estas proteínas glucosiladas fueron descubiertas, primeramente, en individuos diabéticos (34-39). Posteriormente se han encontrado más de 20 proteínas Amadori en el hombre, y como cabría esperar su concentración en diabéticos duplica o triplica las presentadas por los no diabéticos .

La presencia de estos compuestos han sido estudiados en el envejecimiento, habiéndose encontrado estos productos AGE en aquellas proteínas de vida muy larga en el organismo. La mejor estudiada ha sido el colágeno (33).

OXIDACION

Stadtman y colaboradores en experimentos "in vitro" han estudiado el efecto inactivador que sobre muchas enzimas produce la acción oxidativa de una gran variedad de sistemas oxidativos (40-44). En estos estudios, también se ha observado que la inactivación por oxidación hace a las enzimas más susceptibles a la degradación proteolítica lo que permitió suponer que esta oxidación podría ser una marca para que dichas proteínas sean hidrolizadas. Por otra parte, ellos llegan, por métodos indirectos, a la conclusión de que la inactivación es producida por la oxidación de restos de histidina y/o lisina fundamentalmente (45), aunque también pueden ser oxidados otros restos aminoacídicos. En esta misma línea los estudios de Levine (46-47) en la glutamina síntesis de E. Coli, muestran que la oxidación de dicha enzima con ascorbato a una concentración de 15 mM una inactivación del 50% y la modificación de un único resto de histidina en la molécula proteica.

Estas oxidaciones en las proteínas pueden tener una significación fisiológica en el envejecimiento, ya que las proteínas con menor actividad catalítica acumuladas durante el mismo, podrían ser enzimas inactivas o con menor actividad debido a estas oxidaciones. En relación a su interés en el proceso de envejecimiento, el grupo de Stadtman (48) estudia la concentración de grupos carbonilos en extractos de fibroblastos procedentes de individuos de diferentes edades. Consideran que un aumento del grupo carbonil podría ser producido por la oxidación de restos histidina y lisina fundamentalmente. En los resultados

obtenidos, encuentran un aumento de la concentración de grupos carbonilos paralelo a la edad de los donadores de fibroblastos, así como también en extractos de fibroblastos de individuos con el síndrome de Werner y progeria (síndromes que producen un envejecimiento rápido y prematuro).

Los sistemas oxidativos propuestos por Stadtman y colaboradores (ascorbato, oxigenasas mixtas, etc.) transcurren mediante la formación de radicales libres de oxígeno (49-50). Esto estaría de acuerdo con la teoría del envejecimiento producido por radicales libres, de la que Harman (51) es de los principales responsables. Esta teoría supone que el envejecimiento es debido a los daños producidos por los radicales en diferentes reacciones. Harman defiende que esta teoría de los radicales libres es de aplicación general para el envejecimiento de mamíferos, en los que el oxígeno es la fuente principal de estos radicales que producen reacciones perjudiciales.

En nuestro trabajo hemos intentado abordar el estudio de las modificaciones de proteínas producidas durante el envejecimiento, a partir del supuesto de:

- 1) Buscar proteínas que pierdan actividad durante el envejecimiento.
- 2) Estudiar si la pérdida de actividad va acompañada o no de una pérdida de proteína enzimática.
- 3) En aquellas proteínas que se encuentre una acumulación de enzima no activa, o al menos, menos activa, estudiar con reactivos específicos de aminoácidos el comportamiento y cuantificación de los mismos, con el objetivo de ver si hay o no modificación en algún resto aminoacídico en las moléculas de dichas proteínas.

2. PLAN DE TRABAJO

En el presente trabajo intentamos aportar nuevos datos sobre las modificaciones post-traduccionales en las proteínas durante el envejecimiento, estudiando distintas deshidrogenasas (enzima málico (EM); Glucosa 6-Fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH); 6-Fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGDH), todas ellas de hígado, y la Isocitrato deshidrogenasa (IDH) de corazón) en ratas jóvenes y viejas, ya que hemos observado que pierden actividad durante el envejecimiento.

Para ello hemos seguido el siguiente plan de trabajo:

2.1 Determinación de la relación actividad/cantidad de las enzimas estudiadas, en jóvenes y viejos, mediante inmunoprecipitación.

2.2 Purificación de estas enzimas, en jóvenes y viejos, mediante cromatografía de Inmunocafinidad.

2.3 Caracterización de dichas enzimas purificadas.

2.3.1 Determinación de los pesos moleculares.

2.3.2 Estudios cinéticos.

2.3.3 Determinación de pI.

2.4 Estudio en dichas moléculas enzimáticas, mediante el empleo de distintos reactivos específicos de aminoácidos, de

posibles modificaciones aminoacídicas ocurridas durante el envejecimiento.

2.4.1 Estudio de los grupos -SH en las moléculas mediante el reactivo DTNB.

2.4.2 Estudio de los restos de histidina en las moléculas enzimáticas con el DEPC.

2.4.3 Estudio de los restos de arginina con p-NPG.

2.4.4 Estudio de los restos metionina con Cloramina-T.

2.4.5 Estudio de los restos lisina con TNBS.

2.5 Oxidación "in vitro" de la EM y 6-PGDH de joven con ascorbato.

3. MATERIAL Y METODOS.

3.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales de experimentación han sido ratas machos de la raza Wistar de edades comprendidas entre 2-3 meses (250-300 gr.) y de 2 años (650-750 gr.). También se han utilizado, para la obtención de anticuerpos, conejos Neozelandeses blancos.

3.2. APARATOS.

Las determinaciones espectrofotométricas se efectuaron en un espectrofotómetro Pye Unicam SP 1700 de Philips (Holanda). Las centrifugaciones se realizaron en una ultracentrífuga Beckman mod. Spinco L/L2 (U.S.A.), en una centrífuga Kontron CentriKon H401 (Suiza) y en una microfuga Hettich Mikroliter (Alemania). Las homogenizaciones de los tejidos se realizaron en un homogenizador Bellco Glass, Inc. (U.S.A.). Para las liofilizaciones se empleó un liofilizador experimental Telstar (Tarrasa, España). La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en un series 4 de PerKins Elmer (U.S.A.).

3.3. PRODUCTOS.

Los sustratos, coenzimas y enzimas utilizados proceden de las firmas Sigma Chemical Co. (U.S.A.) y Boehringer (Manheim, Alemania). El Na^{125}I ha sido suministrado por Amersham (Inglaterra).

La acrilamida y bisacrilamida, así como el TEMED y el persulfato de Bio-Rad (U.S.A.).

La columna DEAE-celulosa de Sigma Chemical Co., la CM-celulosa de Watman (Inglaterra). Por último, la columna para la Inmunofinidad utilizada fue la Sepharosa 4B CNBr-activada de Pharmacia (Suecia).

La tripsina y Endoproteinasa Arg-C utilizadas en la hidrólisis enzimática de la 6-PGDH de Boehringer (Alemania).

Para la preparación de tampones y demás disoluciones se emplearon reactivos de las casas Sigma Chemical Co. (U.S.A.) y Merck (Alemania).

3.4. DETERMINACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

3.4.1. PREPARACION DE LOS HOMOGENEIZADOS.

Para la preparación de los homogeneizados de tejido hepático y corazón, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo rápidamente el hígado y corazón. Se homogeniza el tejido hepático con tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4 (conteniendo además: sacarosa 0,25 mM; KCl 60 mM; EDTA 1 mM; y DTT 1 mM) en un homogeneizador Bellico Glass, Inc. en la proporción de 1 gramo de tejido por 2 ml de tampón. El corazón se homogeniza con tampón TEA-HCl 18 mM pH 7,0 conteniendo sacarosa, EDTA, KCl y DTT en las mismas proporciones que anteriormente. Posteriormente, se centrifuga a 800xg durante 10 minutos a 4°C y en el sobrenadante obtenido se ensayaron las actividades enzimáticas.

3.4.2. DETERMINACION DE ENZIMA MALICA.

La actividad de la malato deshidrogenasa-NADP ha sido medida espectrofotométricamente a 340 nm observando la aparición de NADPH, según el método de Ochoa y col. (52). La reacción se realizó en un volumen final de 1 ml siendo la concentración de los componentes de la mezcla de ensayo la siguiente: 100 mM de tampón Tris-HCl a pH 7,4; 1 mM MgCl₂; 0,25 mM NADP⁺; 1,5 mM ácido málico y extracto. La reacción se realizó frente a un blanco que no contenía málico, añadiendo éste a la cubeta.

3.4.3 DETERMINACION DE GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

Las determinaciones de la actividad de la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G-6-PDH) de hígado se ha realizado según el método descrito por Sapag-Hagar y col. (53), ligeramente modificado, midiendo la aparición de NADPH a 340 nm. El medio de reacción contenía en un volumen de 1 ml: tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,0; 1,5 mM MgCl₂; 0,25 mM NADP⁺; 0,5 mM glucosa 6-fosfato y extracto. La reacción se inició con la adición de glucosa-6-fosfato a la cubeta y se leyó frente a una cubeta de referencia en la que se omitió el sustrato.

3.4.4. DETERMINACION DE 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA.

La enzima 6-fosfogluconico deshidrogenasa (6-PGDH) se ha medido por el mismo procedimiento que la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, sustituyendo únicamente en la mezcla de reacción el sustrato.



3.4.5. DETERMINACION DE ISOCITRATO DESHIDROGENASA-NADP⁺.

La actividad de esta enzima se midió según el procedimiento descrito por Plaut y Agoaichi (54). La aparición de NADPH se siguió espectrofotométricamente a 340 nm. Las concentraciones en cubeta de los elementos de la reacción fueron: tampón Tris-acetato 33 mM, pH 7,0; 6,6 mM MnCl₂; 0,25 mM NADP⁺; 0,66 mM de isocitrato y extracto en un volumen final de 1 ml. La reacción se disparó al añadir isocitrato a la cubeta problema.

Todas las actividades enzimáticas se midieron a 37°C y se han expresado siempre en micromoles sustrato transformado por minuto y por miligramos de proteína.

3.4.6. DETERMINACION DE PROTEINAS.

La determinación de la concentración de proteínas se ha realizado siguiendo el método de Lowry y col. (55) y el método de Brabford (56).

3.5. TITULACIONES DE LOS ANTICUERPOS.

Para la titulación de los anticuerpos anti-G-6-PDH, anti-6-PGDH, anti-EM y anti-IDH, (obtenidos previamente en nuestro departamento), se añadieron cantidades crecientes de los mismos, a una cantidad fija de sobrenadante obtenido tras centrifugar a 105.000xg. La mezcla de reacción se ajustó a un volumen constante con solución salina. También llevan tritón X-100 al 1,7%. Las mezclas se incubaron 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo se mantuvieron durante 18 horas a 4°C y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos en una micrufuga Mikroliter. Después se determinó la

actividad de la enzimas en 20 μ l del sobrenadante resultante.

3.6 INMUNOPRECIPITACIONES DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

En los ensayos de inmunoprecipitación de las actividades enzimáticas (en tejidos de joven y viejo), se usaron los sobrenadantes obtenidos por centrifugación a 105.000xg. Cantidades crecientes de antisuero se añadieron a una cantidad fija de enzima (100 mU de actividad enzimática). La mezcla se ajustó a un volumen constante con solución salina y Tritón X-100, este último añadido a una concentración final de 1,7% (p/v). Las mezclas de reacción se dejaron reaccionar durante 1 hora a 37°C y toda la noche a 4°C, al cabo de lo cual se centrifugaron a 12.000xg durante 10 min. a 4°C. Las actividades enzimáticas remanentes se ensayaron en alícuotas tomadas de los sobrenadantes obtenidos. Como control de la incubación, se utilizó suero pre-inmune de conejo no observándose pérdida de actividad en las enzimas estudiadas (57).

3.7 PURIFICACION DE LAS ENZIMAS.

Para la purificación de todas las enzimas estudiadas se han utilizado columnas cromatográficas de inmunoafinidad (Sepharosa 4B CNBr-activada de Pharmacia), utilizando los anticuerpos respectivos (las γ -globulinas se aislaron previamente de los respectivos antisueros tras precipitarlos con sulfato amónico al 40%, dializarlo y cromatografiar la solución resultante en una columna de DEAE-CM celulosa que fue equilibrada con tampón fosfato 10 mM, NaCl 15 mM, pH 7,2).

Las muestras (sobrenadante del homogeneizado que se centrifuga a 105.000xg) se cargan en la columnas de inmunoafinidad respectivas, con un flujo de 1ml/h. El lavado se realiza, con tampón Tris-HCl 0,05M pH 7,4 (en el caso de G6-PDH se le añade β -mercaptoetanol en una concentración de 1mM) a un flujo de 15ml/h. Se van recogiendo fracciones en las que vamos midiendo U.D.O a 280 nm y la actividad enzimática, hasta que éstas se hacen nulas, deteniendo el lavado. En esos momentos, llenamos las columnas de Inmunoafinidad respectivas con H₂O destilada, y se deja en reposo durante 12 horas (ésto se realiza para desligar la enzima correspondiente de su anticuerpo). Transcurrido el tiempo, obtenemos fracciones con actividad enzimática.

3.8 ELECTROFORESIS.

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS, se realizaron según el método descrito por Maizel (58). Las muestras se mezclaron en proporción 1:1 con el tampón de muestra, cuya composición se detalla a continuación, y posteriormente hervidas a 100°C durante 5 min.

SDS.....	3,3%
Sacarosa.....	20,0%
Azul de Bromofenol...	0,008%
Tris/HCl, pH 7,0.....	80mM
EDTA.....	17mM
DTT.....	17mM

Como tampón de corrido se empleó una solución cuya composición fue: Tris 0,05 M - glicina 0,383 M, pH 8,3 y SDS al 0,1%.

En cuanto a las condiciones de las electroforesis, éstas se llevaron a cabo a 75 V mientras la muestra corría dentro del gel espaciador y a 150 V hasta que el frente llegó a 1 cm del final del gel separador.

Los geles, una vez finalizadas las electroforesis, se tñieron durante 30 min. con Azul de Coomassie G al 0,25% (p/v) en etanol:agua:acético (5:5:1), tras lo cual se destñieron con una solución que contenía ácido acético glacial al 7,5% y metanol al 5%.

La determinación del peso molecular de las proteínas en geles de poliacrilamida con SDS, se debe a que la movilidad efectiva del complejo proteína-SDS es función de la masa molecular de la proteína y del efecto filtrante del gel.

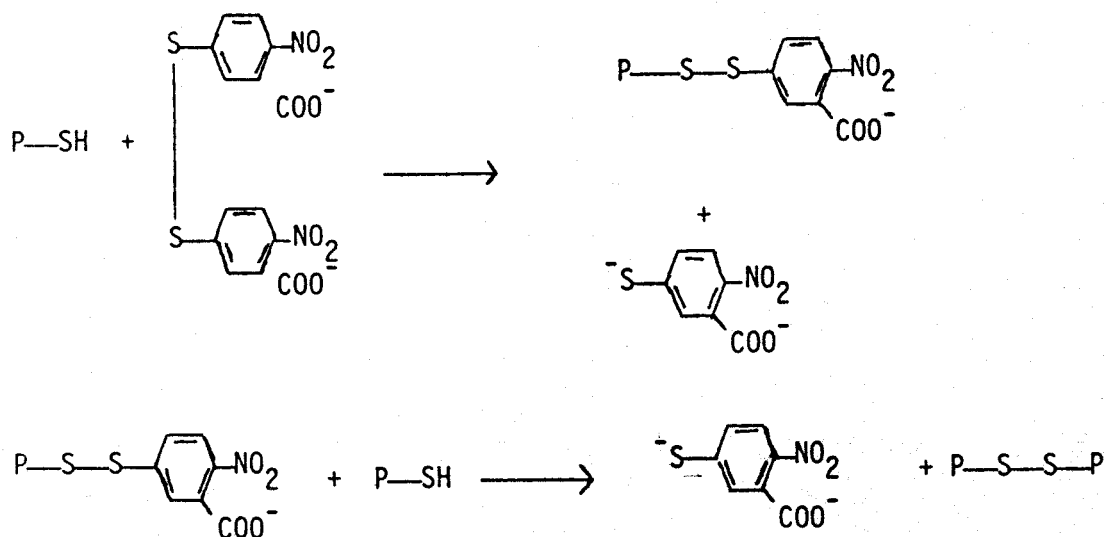
3.9 DETERMINACION DEL PUNTO ISOELECTRICO.

Los puntos isoelectrónicos de las enzimas estudiadas se han determinado en geles de poliacrilamida siguiendo básicamente el método descrito por Bravo y Celis (59).

Se han tomado 7 µg, aproximadamente, de cada una de las enzimas puras, de joven y de viejo, para la determinación de los puntos isoelectrónicos.

3.10 DETERMINACION DE GRUPOS SULFIDRILOS (-SH).

La determinación de grupos -SH se llevó a cabo con el reactivo DTNB, que es un disulfuro aromático. Este compuesto da lugar con los grupos -SH (P-SH) de las proteínas, una reacción de intercambio de grupos, formando un disulfuro mixto.



Un mol de 2-nitro-5-tiobenzoato equivale a un mol de P-SH. El 2-nitro-5-tiobenzoato absorbe fuertemente a 412nm, esto permite el seguimiento espectrofotométrico de la reacción. El coeficiente de extinción molar, para este compuesto, en esta longitud de onda, es de $\epsilon=1,36 \times 10^4 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. La reacción se realiza a pH 8-9.

Para la determinación de grupos -SH solubles en ácidos, se ha procedido a realizar el siguiente protocolo: a 1 ml de la solución de enzima pura obtenida, se le añade 1 ml de ácido perclórico al 15%. Se mezclan y se calientan durante 5 min., en un baño de agua hirviendo. Se centrifuga a 3.000xg y al sobrenadante, se le ajusta el pH a 7,5 y se lleva hasta a un volumen final de 10 ml con EDTA 0,2 M, pH 7,5 (para evitar la autooxidación de los grupos -SH). La concentración de los grupos -SH se ha realizado mediante el método de Ellman (60), modificado ligeramente por nosotros:

- 2 ml de muestra.
- 1,8 ml de tampón Tris-HCl 0,01 M, pH 8,2.
- 0,2 ml de ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) 0,01M disuelto en metanol, (preparado en el momento).
- Agitar bien.
- Leer absorbancia a 412 nm, frente a un blanco muestra.
- Para realizar los cálculos, se resta de la absorbancia leída la absorbancia correspondiente a un blanco-reactivo. Utilizar esta absorbancia neta y el coeficiente de extinción molar anteriormente mencionado. Se puede utilizar como estándar interno glutation reducido, teniendo en cuenta que la recuperación es del orden del 83-85%.

Para la determinación de grupos -SH totales directamente accesibles, se ha seguido básicamente el método descrito por Sedlak y Lindsay (61):

-Tomar 0,5ml de solución de enzima pura no desnaturalizada y mezclar con 0,4ml de tampón Tris-HCl 0,01M pH 8,2.

-Añadir 0,1ml de solución de DTNB 0,01M disuelto en metanol (preparado en el mismo momento de utilización).

-Mezclar bien y dejar desarrollar color a 37°C durante 60 min.

-Para realizar los cálculos, restar de la absorbancia leída la absorbancia correspondiente a un blanco con reactivo.

Los grupos -SH unidos a proteínas se determinan por diferencia, a partir de los valores de grupos -SH totales directamente accesibles y grupos -SH ácido-solubles.

Para la determinación de grupos -SH en muestras desnaturalizadas, a la solución de enzima pura, se le añade SDS al 2%, procediéndose seguidamente de la misma manera que se ha descrito anteriormente para las muestras nativas (62).

El análisis cinético de los grupos -SH presentes en las soluciones enzimáticas puras se ha realizado de la siguiente manera:

-Se toma 0,5ml de solución de enzima pura y se mezcla con 0,4ml de tampón Tris-HCl 0,01M pH 8,2. se prepara la muestra en la misma cubeta de medida.

-Se coloca la cubeta en el espectrofotómetro y se añade 0,1ml de solución de DTNB 0,01M. Se agita y tomamos la primera lectura (tiempo 0).

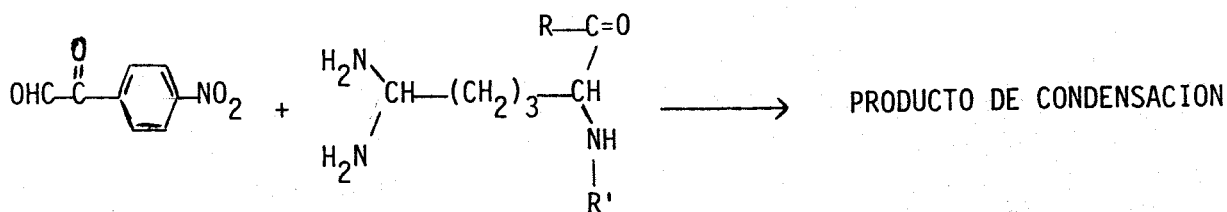
-Tomamos lectura cada 10 segundos durante el primer minuto. A partir de aquí tomamos lectura a los 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos a partir del tiempo 0.

-Representación gráfica del log. de la concentración de grupos -SH no modificados frente al tiempo.

Para la determinación de la actividad enzimática tras la modificación de los grupos -SH se ha procedido de la forma siguiente: a 0,5ml de la solución de enzima le añadimos 0,4ml de tampón Tris-HCl 0,01M pH 8,2. A continuación adicionamos 0,1ml de DTNB 0,01M y agitamos. De esta mezcla vamos midiendo la actividad enzimática a distintos tiempos: 0, 4, 8, 15 y 30 minutos.

3.11 DETERMINACION DE LOS GRUPOS ARGININA.

Las determinaciones cuantitativas de restos de arginina en las soluciones enzimáticas puras, se han realizado utilizando el reactivo p-nitrofenilgloxal (p-NPG) (Yamasaki, 1981) (63).



Los restos de arginina con este reactivo dan lugar a un producto de condensación, que absorbe a una longitud de onda 475nm. El procedimiento queda detallado a continuación:

-A 0,5ml de la solución enzimática se le añade 0,475ml de tampón fosfato sódico 0,15M pH 9,0 y 25µl de p-NPG al 10% en metanol.

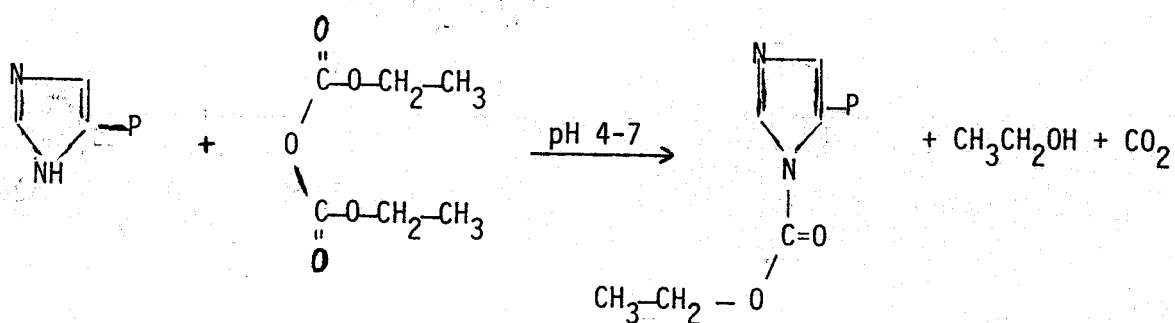
-Dejamos desarrollar la reacción a 23-25°C, tomando medidas de la absorbancia a 475nm, a intervalos de tiempo definidos, frente a un blanco patrón.

-La cuantificación de los restos arginina se realiza a partir de una recta de calibrado, previamente trazada con L-arginina como patrón.

También, al igual que con los grupos -SH, realizamos una determinación de la actividad enzimática tras la modificación de los restos arginina con p-NPG. Para ello vamos midiendo la actividad enzimática a distintos tiempos de la mezcla antes detallada en este apartado.

3.12 DETERMINACION DE GRUPOS HISTIDINA.

Para valorar el contenido de grupos histidina en las soluciones enzimáticas puras se ha utilizado como reactivo el dietil-pirocarbonato (DEPC) (64-65).



El número de histidinas modificadas se determina a partir del incremento de absorbancia para el N-carbetoxi-histidina a 240nm ($\epsilon=3200M^{-1}cm^{-1}$) (66). El procedimiento se describe a continuación:

-A 0,4ml de solución enzimática, añadimos 0,5ml de tampón Tris-HCl 0,1M pH 7,0 y 0,1ml de DEPC al 1% en tampón fosfato 0,1M.

-Dejamos desarrollar la reacción durante 60 min. a temperatura ambiente y vamos tomando lectura de la absorbancia a intervalos fijos de tiempo.

-La cuantificación de los restos de histidina se realiza a partir de la absorbancia molar a 240nm.

Al igual que en los casos anteriores, se ha determinado la actividad enzimática, a distintos tiempos, de la mezcla solución-tampón-reactivo.

3.13 DETERMINACION DEL NUMERO DE RESTOS DE METIONINA.

Para la determinación de la metionina como homoserina se ha seguido, básicamente, el método de Gross (67), que consiste:

- Digestión de la muestra (solución de enzima) con BrCN.
- Hidrólisis ácida en presencia de DTT.
- Determinación cromatográfica de homoserina (equivale a la metionina inicial) y metionina (equivale a la MetSO inicial). Las condiciones de análisis son las mismas que utiliza Gross en su trabajo.

Por otra parte se ha determinado la actividad enzimática tras la modificación de los restos metionina con Cloramina-T (68). Para esta determinación procedemos de la siguiente forma:

-Tomamos 0,5ml de solución enzimática y añadimos 0,3ml de tampón fosfato 0,15M pH 7,0 y 0,2ml de solución de Cloramina-T con una concentración que varía de 0,01-0,1mM.

-Medimos las actividades enzimáticas de estas mezclas a distintos tiempos.

3.14 DETERMINACION DEL NUMERO DE RESTOS DE LISINA.

Para la determinación de los restos de lisina en las soluciones enzimáticas puras se ha utilizado como reactivo el Trinitro benzol-sulfónico (TNBS) en agua (69). El número de restos de lisina por mol de enzima se determina a partir

del incremento de absorbancia a 342 nm ($\epsilon = 14,4 \text{ cm}^{-1} \mu\text{moles}^{-1}$). Para esta determinación se procede de la siguiente manera:

-Tomamos 250 μl de solución enzimática (10-30 μg) y añadimos 250 μl de tampón borato 0,5 M pH 9,5 y 250 μl de TNBS 0,1% en agua.

-Se deja la mezcla en incubación durante 3 horas a 40°C, y añadimos 250 μl de SDS al 10% y 125 μl de HCl 1N.

-Medimos a $\lambda = 342 \text{ nm}$ y cuantificamos los restos de lisina a partir del incremento de absorbancia frente a un blanco (sin solución enzimática).

3.15 MODIFICACION OXIDATIVA DE LA ENZIMA MALICO Y 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA DE JOVEN CON ASCORBATO.

La oxidación de la EM de joven con ascorbato ha sido realizada del siguiente modo: A 2 ml de solución de enzima (0,05 mg de proteína/ml en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,2) se le añaden 0,5 ml de una solución de ascorbato 60 mM y se deja incubando durante 15 min. a 37°C.

La oxidación de la 6-PGDH de joven con ascorbato se realiza de la siguiente forma: A 2 ml de solución de enzima (0,035 mg de proteína/ml en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) se le añaden 67 μl de una solución de ascorbato 60 mM y se deja incubando durante 15 min. a 37°C.

A distintos tiempos (0-15 min.), se toman alícuotas de 50 μl y medimos la actividad enzimática.

El exceso de ascorbato es eliminado, para evitar la interferencia en la medida de residuos de histidina con DEPC, mediante diálisis frente a una solución de 50 mM de

tampón acetato, pH 6,0 conteniendo 1 mM de EDTA, durante 48 horas.

3.16 IODACION, HIDROLISIS PARCIAL CON TRIPSINA Y ENDOPROTEINASA ARG-C Y SEPARACION POR HPLC DE LOS PEPTIDOS OBTENIDOS EN LA HIDROLISIS DE LA 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA DE JOVEN Y DE VIEJO.

Obtenidas las soluciones enzimáticas puras, estas se han sido liofilizadas y a continuación resuspendidas en tampón fosfato 0,2 M pH 7,5 para proceder a la Iodación de la proteína por el método de la Cloramina-T (70). Básicamente el método consiste en la utilización de Na^{125}I que es oxidado por la Cloramina-T en presencia de la proteína que se quiere marcar, con la susiguiente incorporación de Iodo (^{125}I) en los residuos de tirosina de la proteína. El exceso de Cloramina-T es reducido con un agente reductor (metabisulfito sódico) y el Iodo libre es reducido a Ioduro que se separa de la proteína mediante filtración en gel (G-25). En nuestro caso hemos procedido:

-Aproximadamente 10 μg de proteína (enzima 6-FGDH) en tampón fosfato 0,2 M pH 7,5 (es el pH óptimo para la actuación de la Cloramina-T) se le añaden 5 μCi Na^{125}I .

-Se adiciona 50 μg de Cloramina-T. El volumen total de la reacción es de aproximadamente 125 μl . Se deja reaccionar durante un minuto.

-Se para la reacción con 100 μg de metabisulfito sódico.

-Por último esta mezcla de reacción se pasa por una columna de G-25 para separar la proteína del Iodo que queda libre.

La proteína marcada con ^{125}I se le hace una electroforesis en geles de poliacrilamida (9%) con SDS para conocer la pureza y el estado de la proteína que se ha

marcado . La proteína en el gel es fijada con ácido acético:metanol:agua (2:1:7) y se realiza una autoradiografía con el objeto de visulizar la proteína marcada en el gel (aproximadamente con que se deje unos 10 minutos de exposición del gel con la película es suficiente) y tambien se revela el gel con azul de Comassie G para ver si la proteína marcada es la nuestra teniendo como referencia marcadores de peso molecular conocido. Por último, la banda de la enzima 6-PGDH es cortada del gel y se mide la radioactividad en un contador- γ . Esta radioactividad es la que tomamos como punto de partida.

La banda de la enzima 6-PGDH es lavada varias veces con el tampón bicarbonato de amónico 0,1 M pH 8,45 (al menos tres veces y dejando unos 30 minutos entre cada lavado) con el objeto de que la banda de gel este a un pH próximo a 8,45, que es el óptimo para la actuación de la tripsina Endoproteinasa Arg-C (71).

Una vez lavada la banda esta se divide en dos trozos y se les añade tampón bicarbonato amónico 20 mM pH 8,45 en cantidad suficiente para que los trozos de banda del gel con la proteína este completamente recubierta de tampón (las reacciones se van a realizar en tubos eppendorff y normalmente se necesitan entre 100-200 μ l de tampón). Por último se les añade a cada trozo de banda en un caso tripsina y en otro endoproteinasa Arg-C, en una cantidad de 1 o 2 μ g y se deja durante 12 horas a temperatura a 37°C con ligera agitación. Pasada las 12 horas se centrifuga en una microfuga y se separa el líquido de la banda (la proteína hidrolizada sale del gel) y se lleva a contar al contador γ para saber la radioactividad que existe en solución y en consecuencia conocer el grado de hidrólisis producido.

La solución con los péptidos obtenidos de la hidrólisis, se separan por cromatografía líquida de alta

resolución (HPLC) con una columna de fase reversa C₁₈ (83x3mm; 3µm de diámetro de partícula) en un gradiente de fases móviles. Como detector se ha utilizado un detector uv/vis (λ=215-225).

Como fase móvil A se ha utilizado agua con trifluoracético al 0,1%; como fase móvil B acetonitrilo con trifluoracético al 0,1%. El flujo ha sido 0,5 ml/min. Se lleva como patrón interno un hidrolizado triptico de albumina. El gradiente que se ha utilizado ha sido:

TIEMPO	% FASE A	% FASE B	CURVA
0	100	0	
5	100	0	
25	90	10	LINEAL
35	90	10	
55	80	20	LINEAL
65	80	20	
85	70	30	LINEAL
100	70	30	
140	60	40	LINEAL
180	20	80	LINEAL
200	100	0	LINEAL

Para observar el perfil de elución de los péptidos obtenidos, se van recogiendo fracciones de 0,5ml que se va midiendo su radioactividad en un contador-γ.



4. RESULTADOS

4.1. ISOCITRATO DESHIDROGENASA.

4.1.1. RELACION ACTIVIDAD/CANTIDAD DE ENZIMA.

Para ver esta relación, hemos utilizado ratas macho de 2-3 meses (jóvenes) y de 24 meses (viejos). Realizamos una inmunoprecipitación de homogenado de corazón de estas ratas. Como control de la incubación durante la inmunoprecipitación, se ha usado suero pre-inmune de conejo, no observándose pérdida de actividad IDH durante la misma. En la figura 1 podemos ver el resultado obtenido (el número de experimentos ha sido 5).

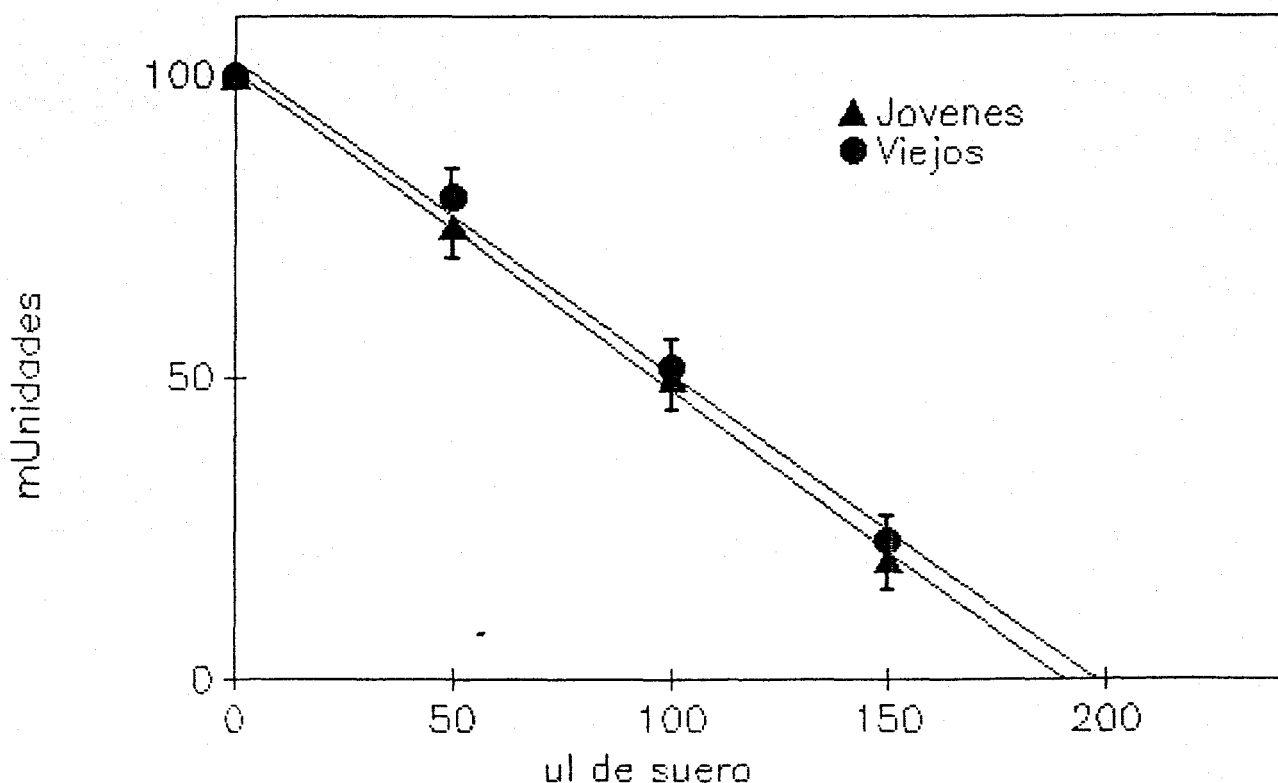


FIGURA 1. Inmunoprecipitación de la IDH de corazón de rata de animales jóvenes y viejos.

Como podemos observar en la figura 1, el volumen de suero anti-IDH utilizado en ambos casos no presenta diferencias significativas. Deducimos pues, que la relación actividad/cantidad de proteína inmunológicamente reactivas es semejante en jóvenes y en viejos. Es decir, que no existe acumulación de proteína inactiva o con menor actividad para la IDH de corazón de rata durante el envejecimiento.

4.2. ENZIMA MALICO DESHIDROGENASA.

4.2.1. RELACION ACTIVIDAD CANTIDAD DE ENZIMA.

Para ver esta relación, hemos utilizado ratas macho de 3 meses (joven) y 24 meses (viejo). Realizamos una inmunoprecipitación de homogenado hepático de estas ratas. En la figura 2 podemos ver el resultado obtenido (5 experimentos realizados).

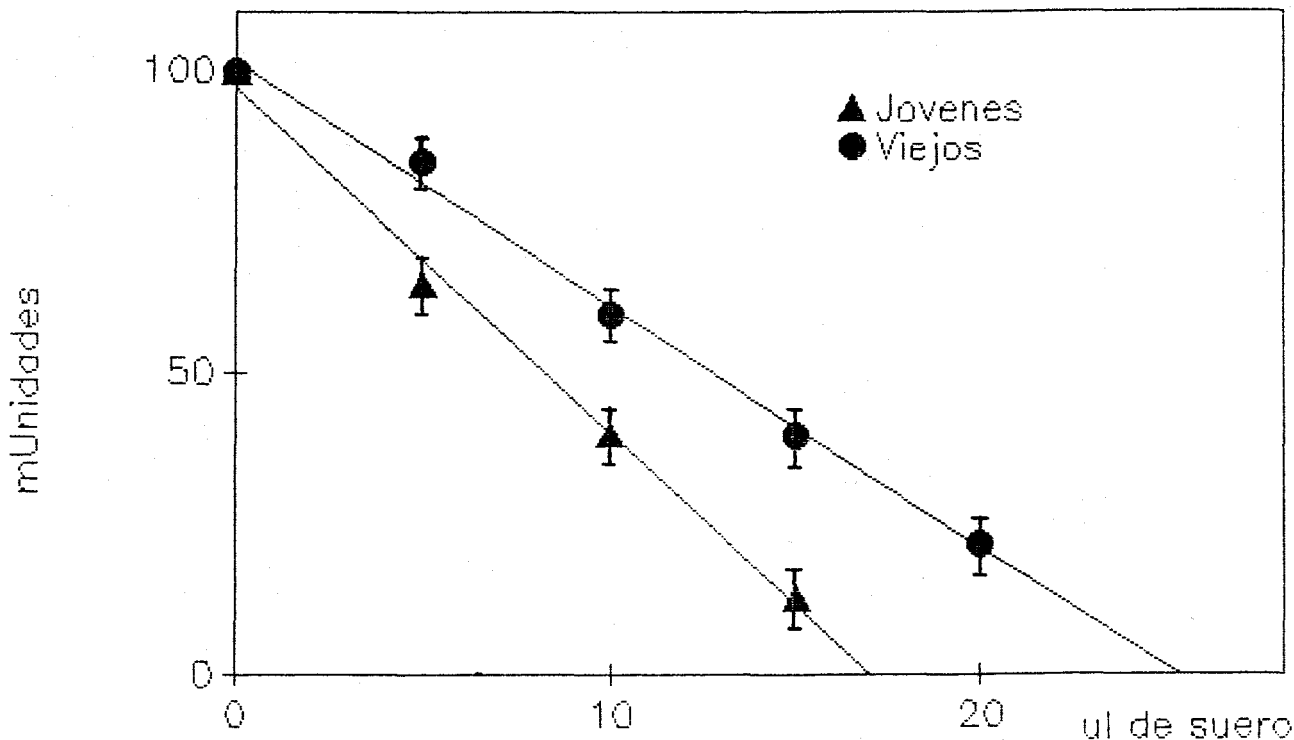


FIGURA 2. Inmunoprecipitación de la EM de hígado de rata de animales jóvenes y viejos.

Como podemos observar en la figura 2, el volumen de suero anti-EM utilizado, en el caso de viejos, es mayor que cuando se trata de tejido hepático de jóvenes. Deducimos pues, que la relación actividad/cantidad de proteínas inmunológicamente reactivas, es menor (entorno al 36%) en tejido hepático de ratas viejas que los que pertenecen a ratas jóvenes, para la EM.

4.2.2. PURIFICACION.

Ante la imposibilidad de una purificación de las enzimas de tejidos de ratas viejas por los métodos cromatográficos convencionales, debido a la poca actividad específica de estas enzimas en los animales viejos, así como a la poca cantidad de tejido disponible, se ha puesto a punto otro sistema de purificación, basado en la cromatografía de inmunoafinidad (se utilizan anticuerpos, contra estas enzimas de rata, obtenidos de conejos tras la inoculación repetida de las proteínas enzimáticas de ratas jóvenes, unidos, en cada caso, a columnas de Sepharosa 4B CNBr-activada)

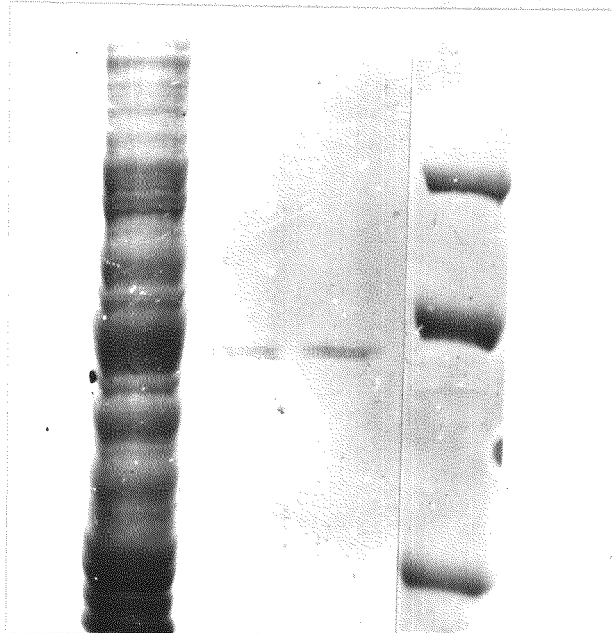
Un resumen de los procesos de purificación, mediante la cromatografía de inmunoafinidad, de la EM de ratas jóvenes y viejas se presenta en la tabla 2.

TABLA 2. PURIFICACION DE LA EM DE HIGADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS

	V (ml)	Prot (mg/ml)	Act. espc. (U/mg)	Act. Total (U)	Rend. (%)	F. Purif.	
HOMOGEN	JOVEN	15	46	0,013	8,9	100	1
	VIEJO	20	52	0,009	9,3	100	1
CROM. INMUN.	JOVEN	8	0,024	10,9	2,1	23,4	841
	VIEJO	8	0,028	8,93	2,0	21,4	992

Aunque el rendimiento, en el proceso de purificación con la cromatografía de inmutioafinidad, es bajo (entorno al 20%), se puede purificar la enzima de extractos viejo en cantidad suficiente y de una forma rápida y sencilla, hecho que resulta más complicado y si aplicáramos métodos cromatográficos convencionales (57,72-76). En cuanto a la actividad específica obtenida en las fracciones puras, en ambos casos (joven y viejo), para la EM, son muy semejantes lo que hace que el factor de purificación también sea parecido.

En la fotografía 1 podemos ver los resultados del proceso de purificación.



Fotografía 1. Purificación de la EM de hígado de rata por cromatografía de Inmutioafinidad.

Pocillo nº 1= Homogenado de hígado de rata. Pocillos nº2 y 3=Eluidos de la cromatografía de inmutioafinidad con actividad EM. Pocillo nº4= Fosforilasa b (97.400 daltons), Albúmina (66.000 daltons), Ovoalbúmina (45.000 daltons).

El perfil de elución de la EM de joven y de viejo, tras la cromatografía de inmunoafinidad se muestra en las figuras 3 y 4, que como podemos observar son muy semejantes.

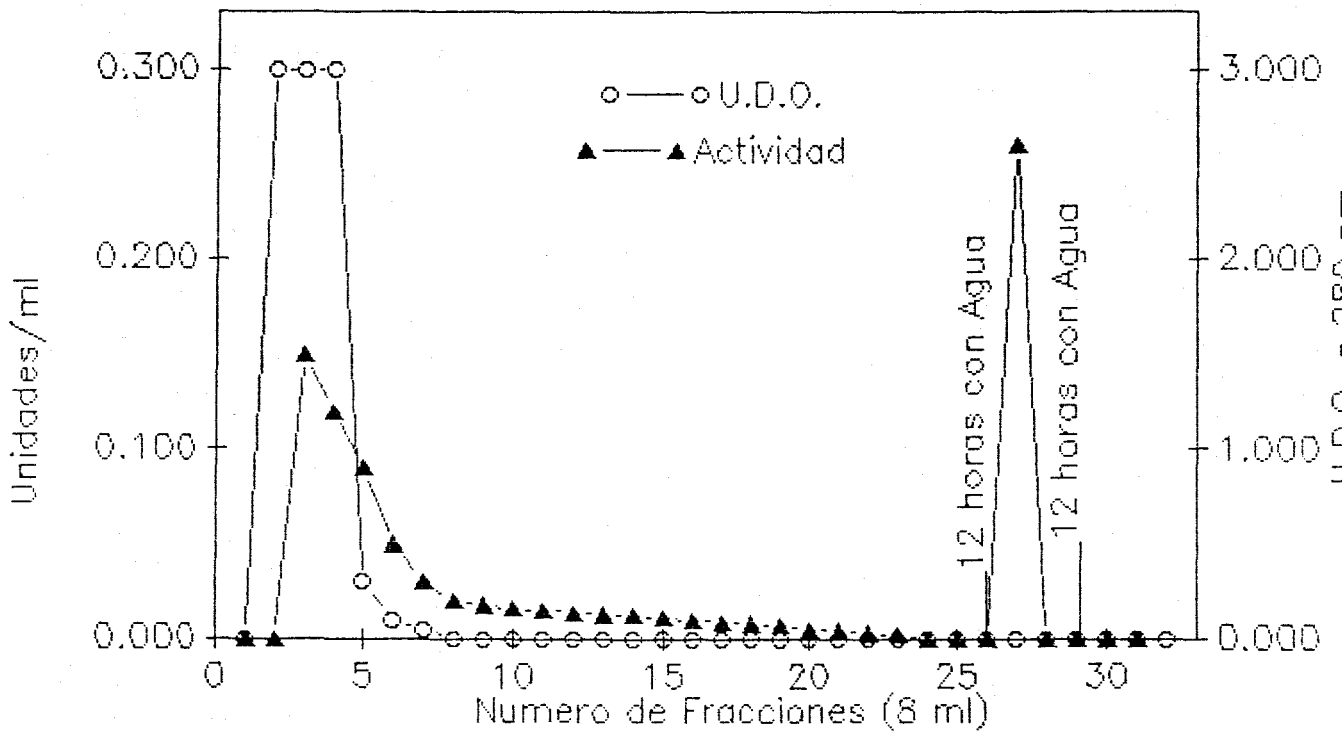


FIGURA 3. Perfil de elución de la EM de animales jóvenes por la Cromatografía de Inmunoafinidad.

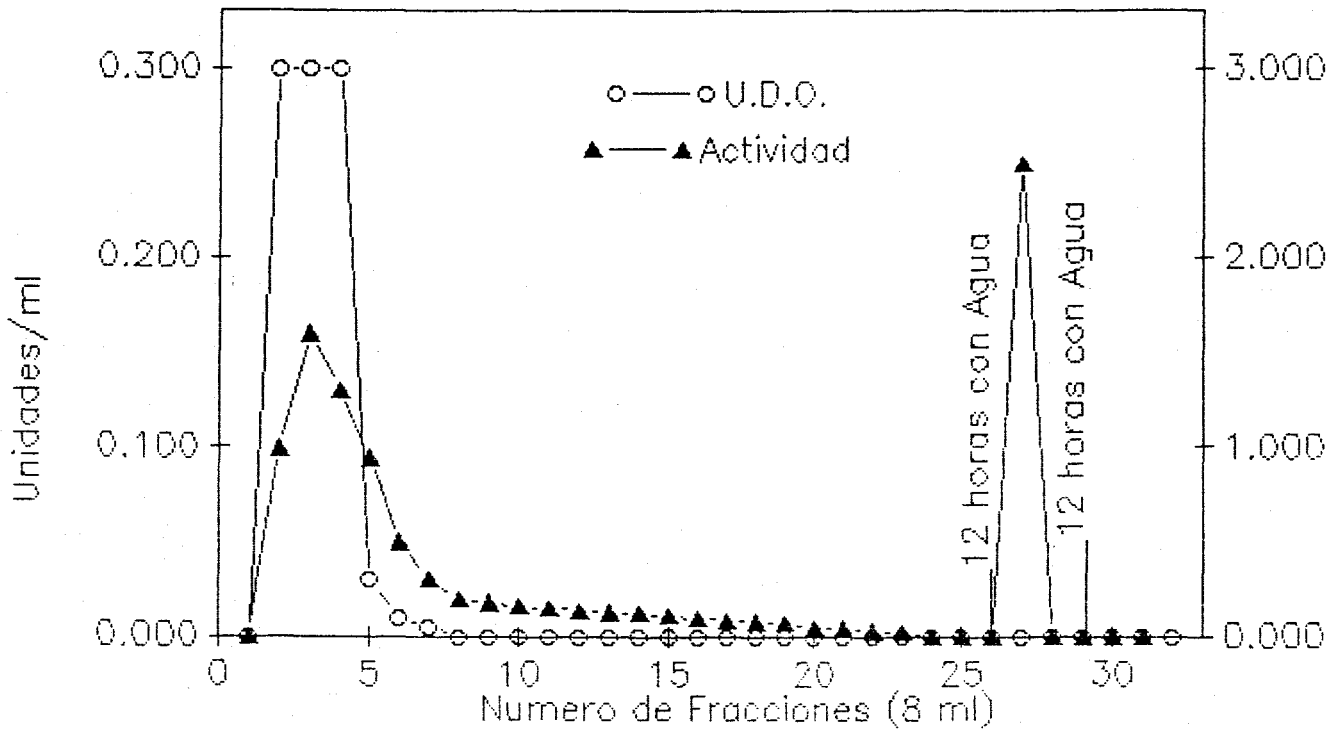


FIGURA 4. Perfil de elución de la EM de animales viejos por la Cromatografía de Inmunofinidad.

4.2.3. CARACTERIZACION.

4.2.3.1. Determinación del peso molecular.

La determinación del peso molecular de las enzimas se realiza, en este caso, en geles de poliacrilamida con SDS. El peso molecular de la EM, en ambos casos, es de aproximadamente 64.000 daltons. Este resultado lo podemos observar en la figura 5.

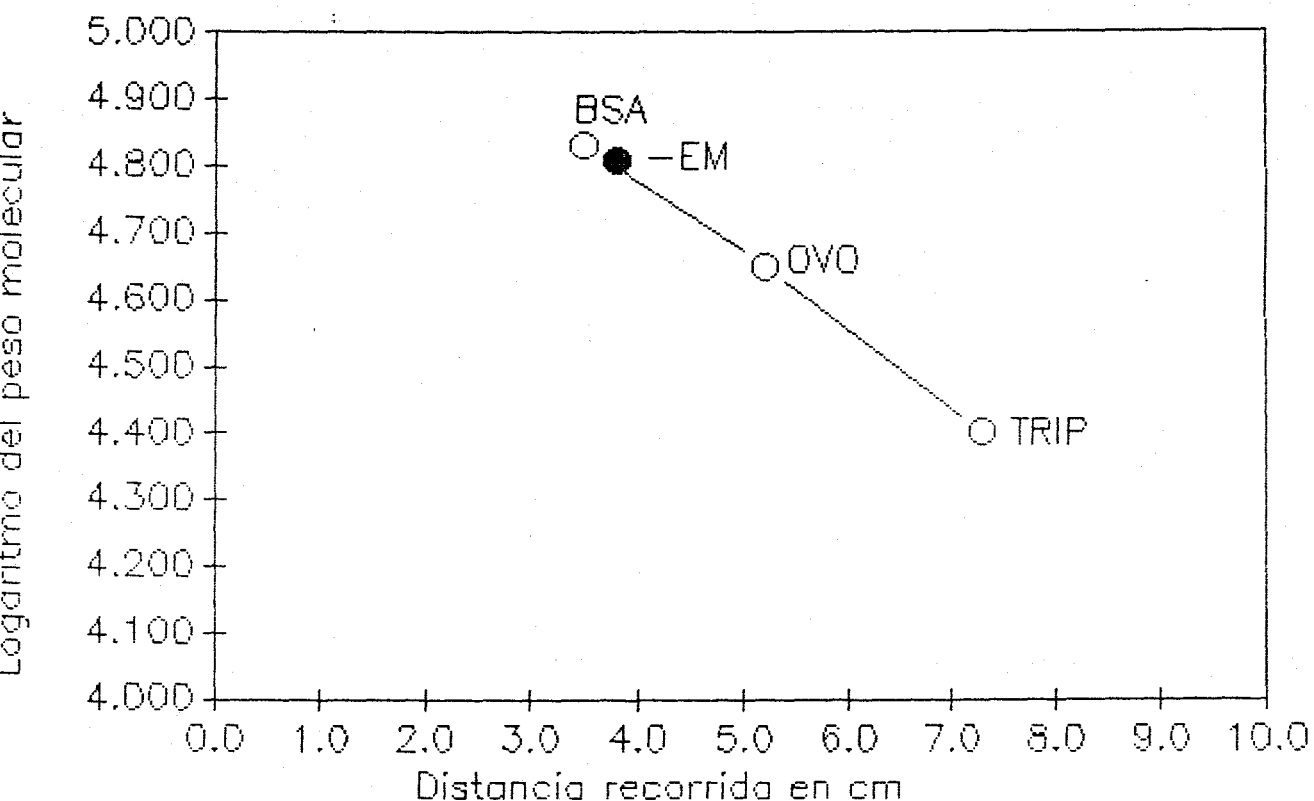


FIGURA 5. Determinación del peso molecular de la EM de hígado de rata.

Se ha representado el logaritmo de los pesos moleculares de las proteínas usadas como marcadores, frente a la distancia en cm recorrida por las mismas en el gel. Albumina bovina (BSA, 66.000 daltons), ovoalbumina (OVO, 45.000 daltons), tripsinógeno (TRIP, 24.000 daltons), EM (EM, 64.000 daltons).

4.2.3.2. Determinación del punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico de la EM de animal joven y viejo determinado por isoelectroenfoque es de 6,4 unidades de pH.

4.2.3.3. Estudios cinéticos.

Se han determinado las K_m del sustrato (málico) y cofactor ($NADP^+$), para la EM, en jóvenes y viejos. El método utilizado ha sido la medida de las velocidades iniciales y para su determinación la representación gráfica de Lineweaver-Burk. En la tabla 3 recogemos los resultados obtenidos (experimento representativo de 3 realizados).

TABLA 3. DETERMINACION DE LAS K_m PARA LA EM EN JOVENES Y VIEJOS.

	K_m (málico)	K_m ($NADP^+$)
EM de joven	120 μM	15 μM
EM de viejo	150 μM	18 μM

De los resultados obtenidos, podemos deducir, que la constante cinética K_m para el sustrato y el cofactor $NADP^+$ no varía significativamente durante el proceso de envejecimiento para la EM.

4.2.4. MODIFICACIONES AMINOACIDICAS.

Se han ensayado los siguientes grupos reactivos de aminoácidos: a) DTNB para grupos -SH (sulfidrilos); b) DEPC para las histidinas; c) p-NPG para las argininas; y d) Cloramina-T para la metionina. El número de experimentos realizados para cada aminoácido estudiado ha sido de 5.

4.2.4.1. Modificación y valoración de grupos -SH.

La EM ha sido modificada tanto en su forma nativa como desnaturada con SDS al 2%, tal como se describe en material y métodos. En un primer abordaje hemos intentado valorar el número y reactividad de los grupos -SH en jóvenes y viejos. Los resultados obtenidos se pueden observar en la tabla 4 y en la figura 6.

TABLA 4. VALORACION DE GRUPOS -SH DE LA EM DE HIGADO DE RATA

Método de valoración	EM de joven número de grupos -SH (equiv./mol)	EM de viejo
DTNB	Enzima nativa	2,4±0,2
	Enzima desnat.	2,71±0,2

En cuanto a la actividad de la EM modificada con DTNB, figura 7, se observa que esta decae cuando se modifican los grupos -SH reactivos, en todos los casos. Esto hace indicar que los grupos -SH tienen un papel muy importante en la actividad de estas enzimas (77-79).

grupos -SH/TIOT de enzima

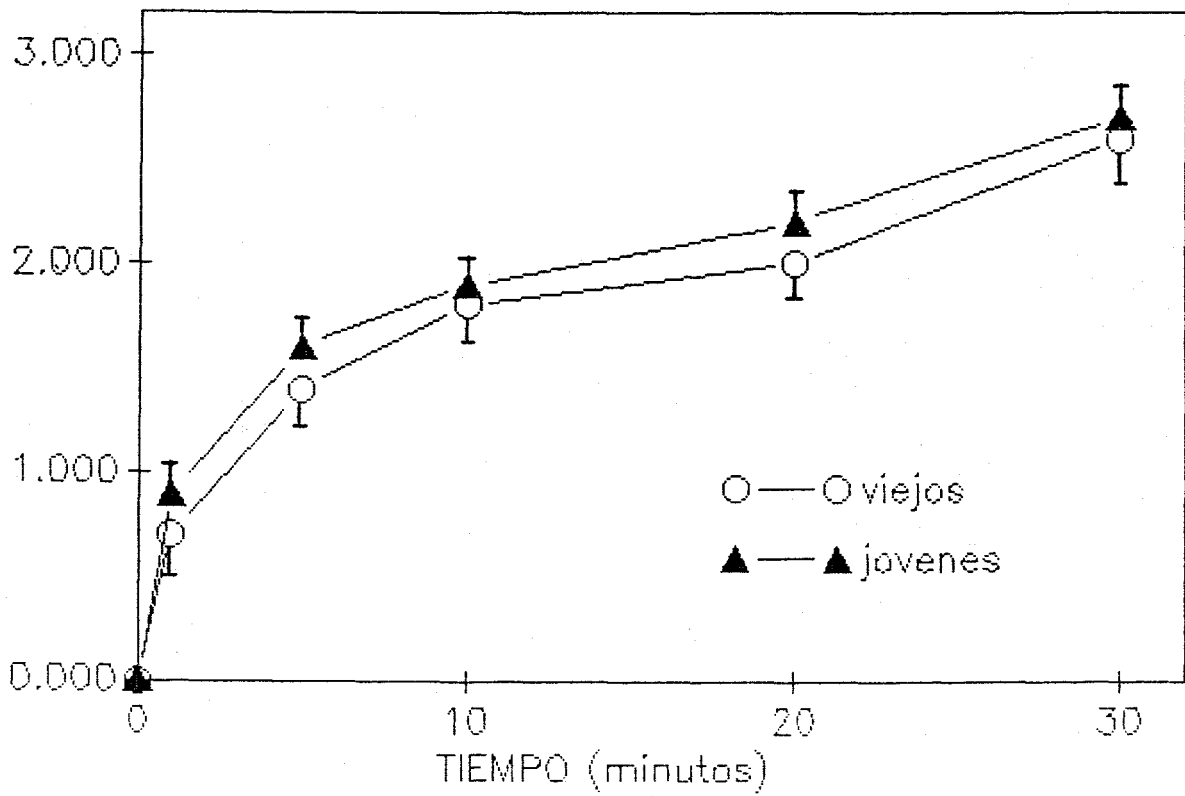


FIGURA 6. Reactividad de los grupos -SH de la EM de animales jóvenes y viejos con el reactivo DTNB

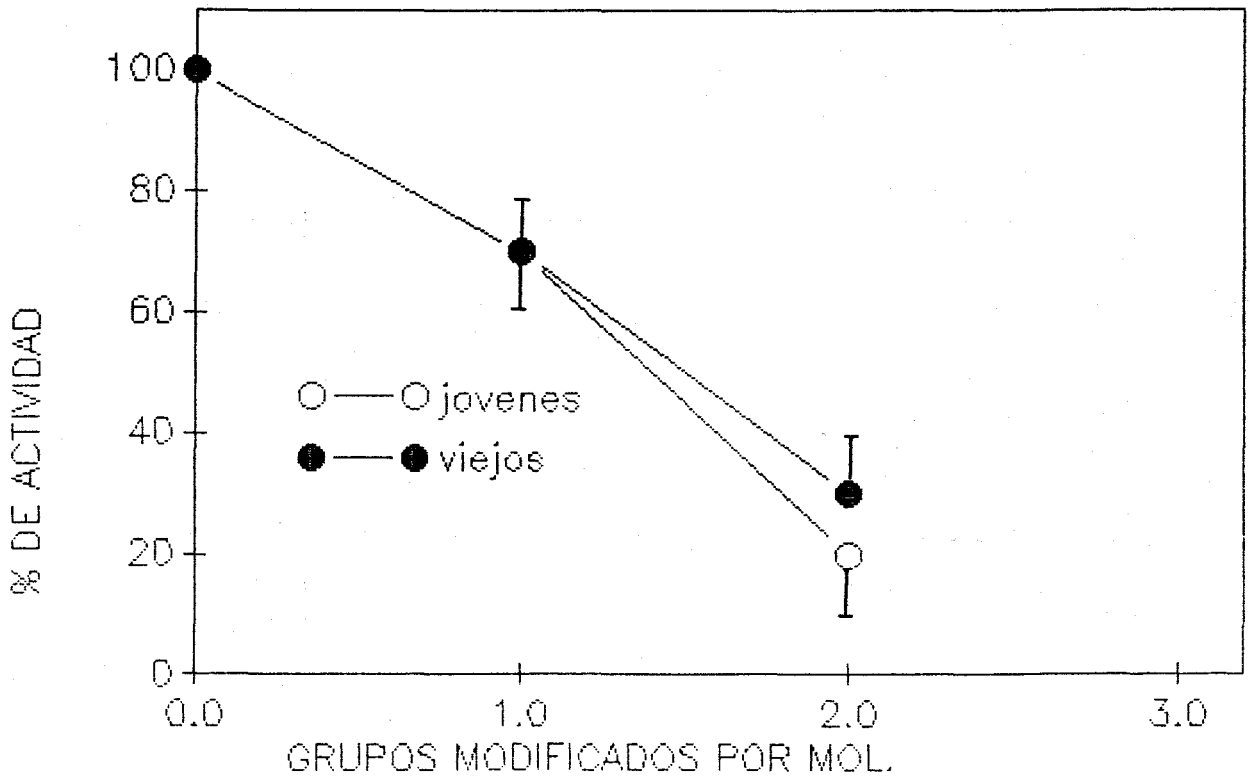


FIGURA 7. Actividad de la EM de animales jovenes y viejos durante la modificación con DTNB.

4.2.4.2. Modificación y valoración de restos de histidina con DEPC.

Las modificaciones observadas con DEPC pueden ser atribuibles exclusivamente a la modificación de los restos de histidina, ya que en las condiciones utilizadas no reacciona ni con la tirosina (el espectro u.v. presenta un máximo de absorvancia a 245nm, característico de la presencia de N-carbetoxihistidina, y, sin embargo, no se observa aumento de absorvancia en el rango de los 280nm) ni con los grupos -SH (la valoración de estos grupos en las enzimas nativas y modificadas con DEPC es prácticamente igual).

Los resultados obtenidos en cuanto a la valoración y reactividad de los restos histidina modificados en la EM se resumen en la tabla 5 y en la figura 8 .

TABLA 5. VALORACION DE LOS RESTOS HISTIDINA EN LA EM DE HIGADO DE RATA

	EM (joven) (mol/mol)	EM (viejo) (mol/mol)
Histidina accesible (nativa)	2,8±0,3	1,8±0,2
Histidina total (desnat.)	5,0±0,3	4,0±0,2

Como podemos apreciar, existe un resto de histidina por mol menos en la molécula de EM de viejos (4,0±0,2) en comparación con la molécula de joven (5,0±0,3). Este grupo de menos parece corresponder al tipo de grupos histidina reactivos (en EM de joven 2,8±0,3 restos/mol; en viejos 1,8±0,2 restos/mol). En cuanto a la reactividad, en la EM de joven existe un grupo que reacciona muy rápidamente.

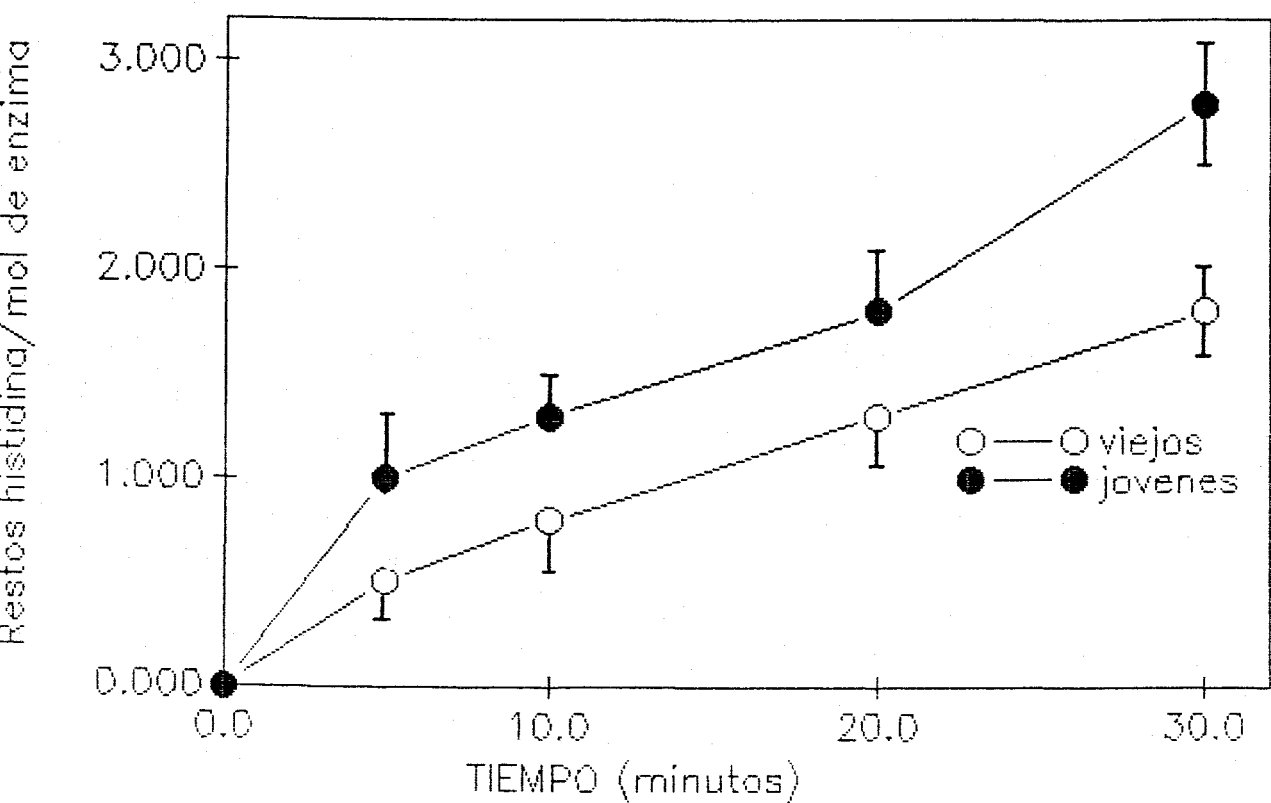


FIGURA 8. Reactividad de los restos histidina de la EM de animales jóvenes y viejos con el reactivo DEPC.

En cuanto a la actividad de estas enzimas modificadas con DEPC, podemos observar en la figura 9, que esta decae totalmente tanto en jóvenes como en viejos. Sin embargo en la de animal joven decae más tarde, debido, posiblemente, a que los restos de histidina en la molécula de joven sean menos reactivos (menos accesibles) que en la molécula de viejos.

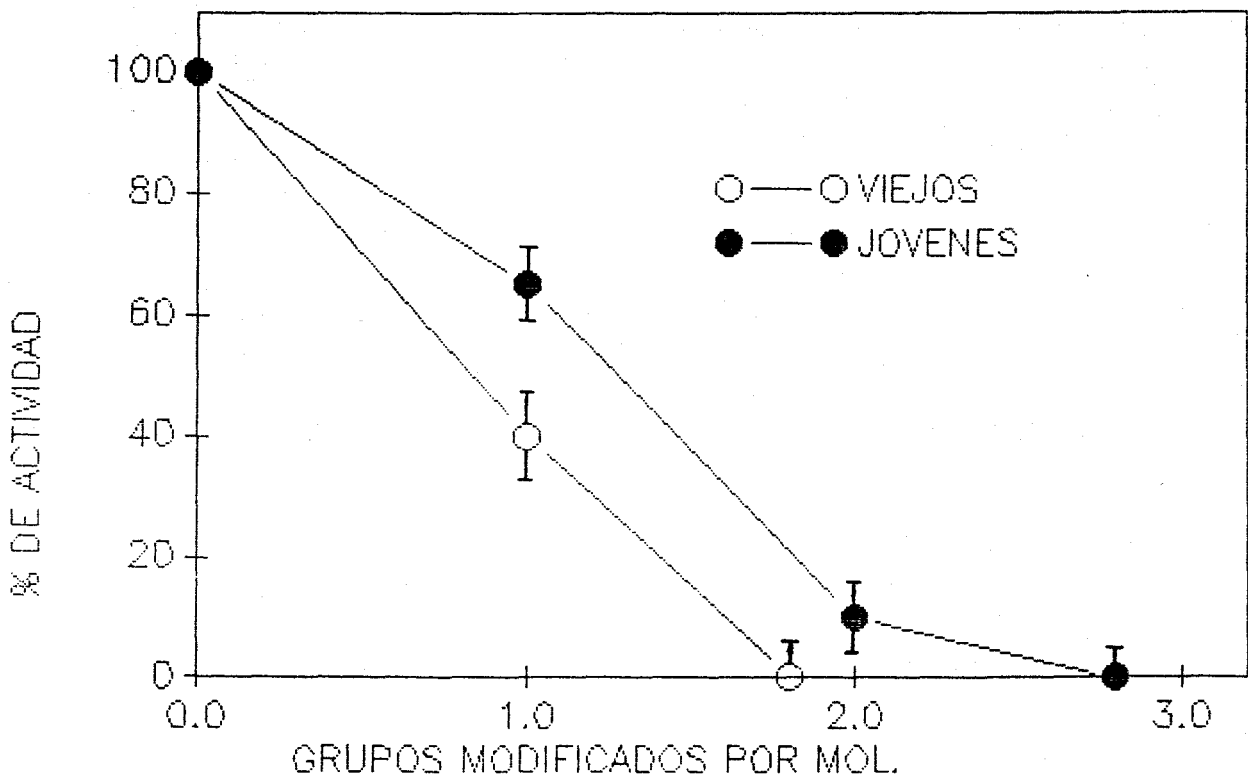


FIGURA 9. Actividad de la EM de animales jóvenes y viejos durante la modificación con DEPC.



4.2.4.3. Modificación y valoración de los restos arginina con p-NFG.

La valoración y reactividad de los restos arginina ofrece los siguientes resultados (tabla 6, figura 10).

TABLA 6. VALORACION DE LOS RESTOS ARGININA EN LA EM DE HIGADO DE RATA

	EM (joven) (mol/mol)	EM (viejo) (mol/mol)
Arginina accesible (nativa)	5,1±0,2	4,8±0,1
Arginina total (desnat.)	13,0±0,1	12,8±0,2

Como se observa el número y reactividad de los restos arginina valorados con p-NFG, es muy semejante para la EM en jóvenes y viejos. En cuanto a la actividad de estas enzimas durante la modificación, los resultados lo podemos observar en la figura 11. La actividad decae totalmente, lo que hace pensar que los restos arginina juegan un papel fundamental en la actividad de la EM (80).

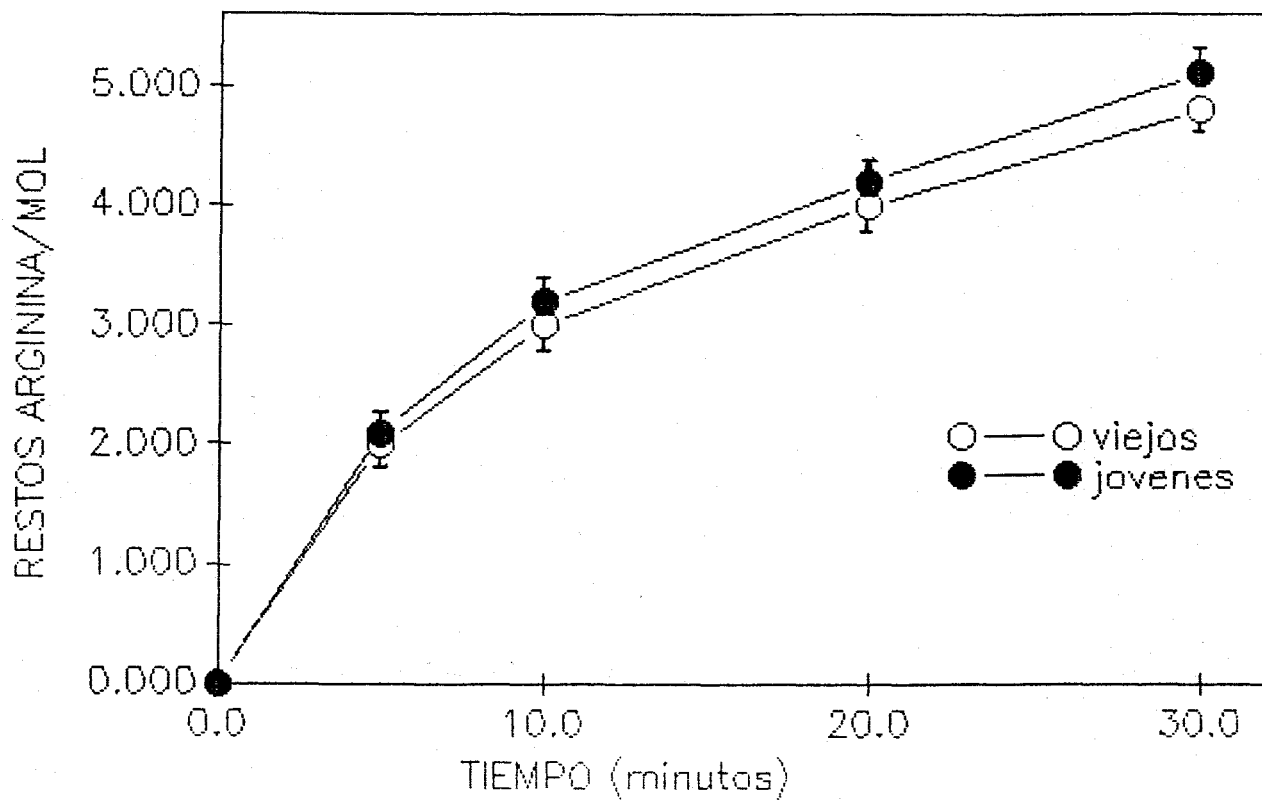


FIGURA 10. Reactividad de los restos arginina de la EM de animales jóvenes y viejos con el reactivo p-NPG.

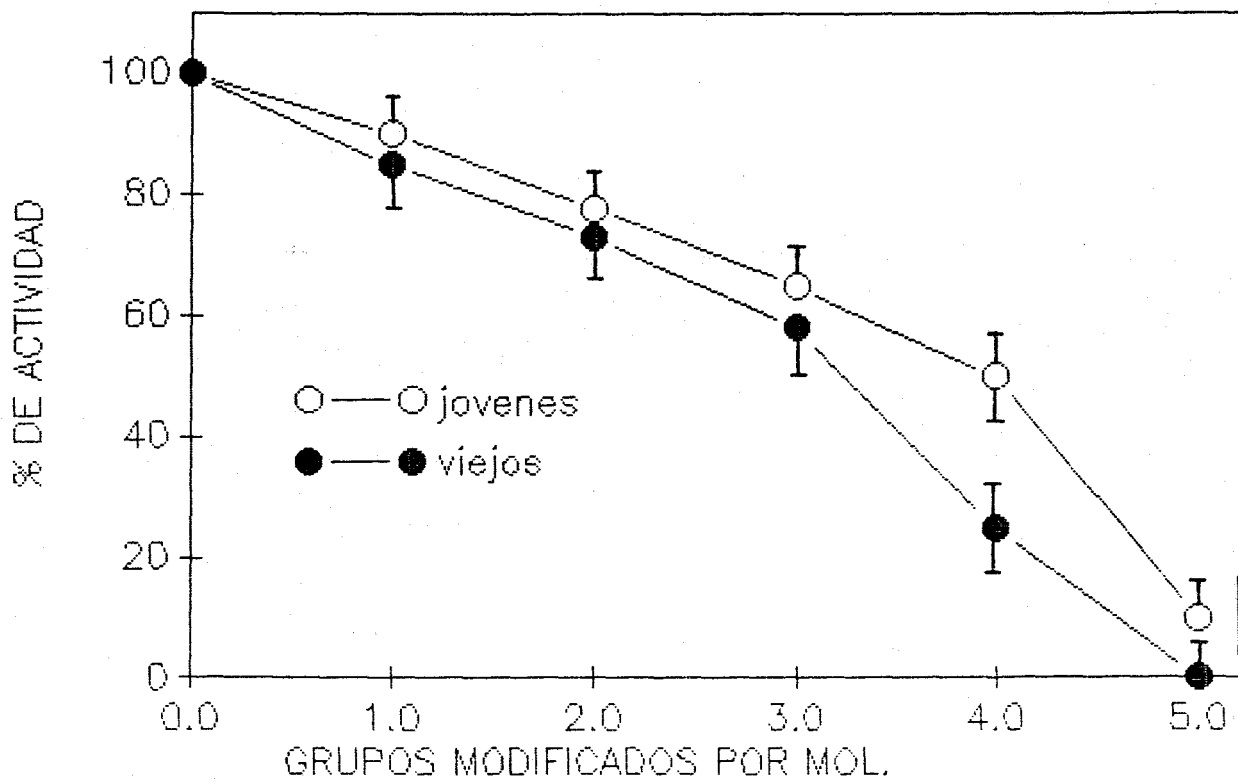


FIGURA 11. Actividad de la EM de animales jóvenes y viejos durante la modificación con p-NPG.

4.2.4.4. Modificación y valoración de los restos metionina con Cloramina-T.

El número total de restos de metionina se valora como homoserina siguiendo el método de Gross (1967) (67). Los restos metionina accesibles de las enzimas se valora con Cloramina-T (C-T). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 7 , figura 12.

TABLA 7. VALORACION DE LOS RESTOS METIONINA EN LA EM DE HIGADO DE RATA

	EM (joven) (mol/mol)	EM (viejo) (mol/mol)
Metionina modif. con C-T	0,8±0.05	0,9±0,05
Metionina total (Gross)	5,0±0.1	5,0±0,1

Como se observa, el número de restos de metionina valorable con Cloramina-T es muy semejante para la EM en jóvenes y viejos. Esto parece indicar, que no existe una modificación drástica entre la enzima de joven y de viejo, para dicha enzima. En cuanto a la reactividad de estos restos de metionina accesibles y la actividad durante la modificación, también es muy parecida de jóvenes a viejos, no observándose pérdida de actividad durante dicha modificación (figura 12). Esto indica que los restos metionina accesibles, en las moléculas de esta enzima, parecen no tener un papel importante en la actividad de las mismas.

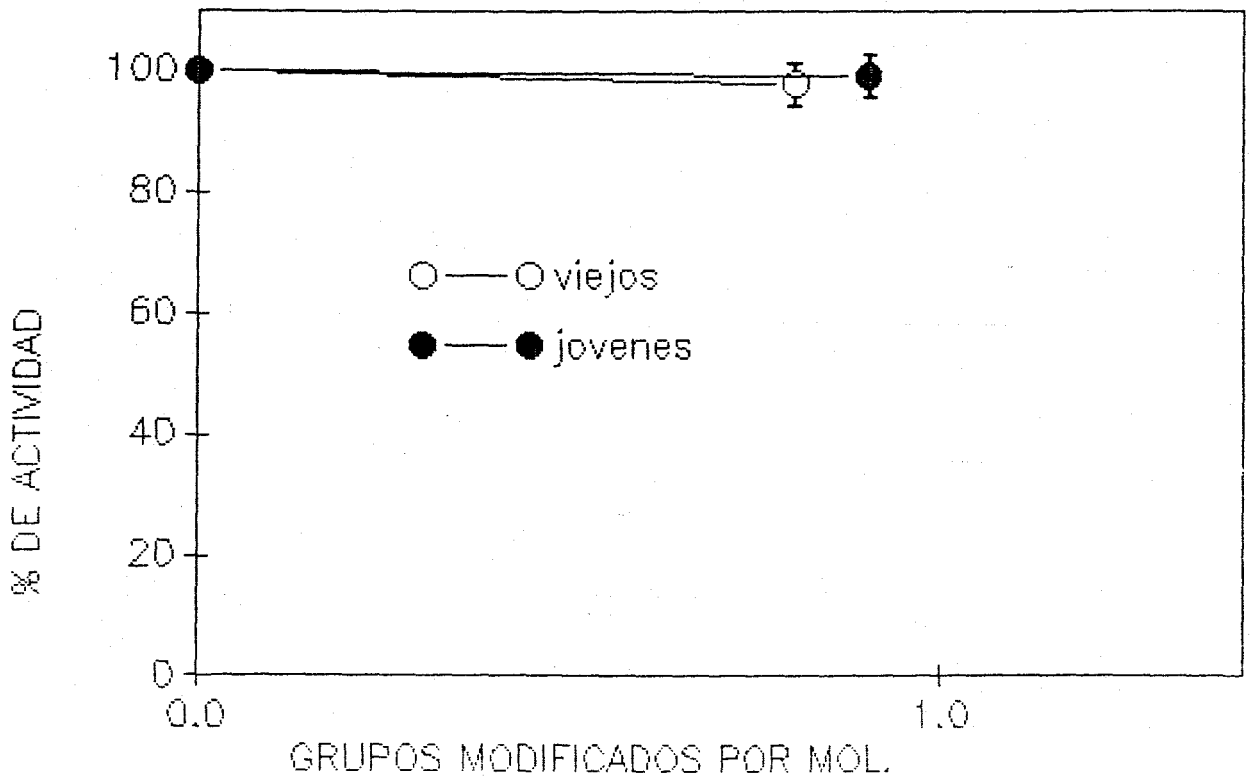


FIGURA 12. Actividad de la EM de animales jovenes y viejos durante la modificación con Cloramina-T.

4.2.4.5. Modificación y valoración de los restos de lisina con TNBS.

El número total de restos de lisina se valora siguiendo el método Tuengler y Pflétderer (1983) (69). Los resultados obtenidos, para la EM se resumen en la tabla 8.

TABLA 8. VALORACION DE RESTOS DE LISINA

	<u>Joven</u>	<u>Viejo</u>
EM	30,6±5,1	28,2±5,3

Como podemos observar no existe una diferencia significativa en cuanto al número de lisinas en la EM entre jóvenes y viejos.

4.2.5. OXIDACION DE LA EM DE JOVEN CON ASCORBATO.

La EM de joven ha sido oxidada según el método descrito en material y métodos. Esta oxidación se ha realizado con el objetivo de ver si el resto de histidina que encontramos de menos en la EM de viejo es producto de una oxidación, mediante radicales libres, en la molécula. El resultado obtenido se recoge en la tabla 9 (Se han realizado 5 experimentos).

TABLA 9. MODIFICACION OXIDATIVA DE LA EM DE JOVEN CON ASCORBATO.

<u>Enzima málico</u>	<u>residuos de histidina</u>	<u>% de actividad (15 min.)</u>
nativa	2,8±0,3	100
nativa + Ascorbato	1,6±0,2	64
desnat.+ Ascorbato	3,7±0,1	-

Como podemos observar la oxidación por el ascorbato , que produce radicales libres tanto directa como indirectamente (49-50), transcurridos 15 minutos produce una pérdida de actividad en la enzima del 36% y la pérdida de 1,2 restos de histidina valorados con DEPC. Este resultado obtenido indica que la perdida de actividad encontrada en la EM de animales viejos, al igual que el resto de histidina menos que se encuentra en dicha enzima, puede ser explicada como una oxidación en dicho resto de histidina en la EM durante el envejecimiento.

4.3. GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

4.3.1. RELACION ACTIVIDAD/CANTIDAD DE ENZIMA.

Esta relacion como podemos ver la figura 13, es menor en un 15% en tejido hepático de ratas viejas con respecto al tejido hepático de ratas juvenes. deducimos pues que existe una mayor cantidad de proteina inactiva o con menor actividad G-6-PDH en tejido de animales viejos que en los juvenes.

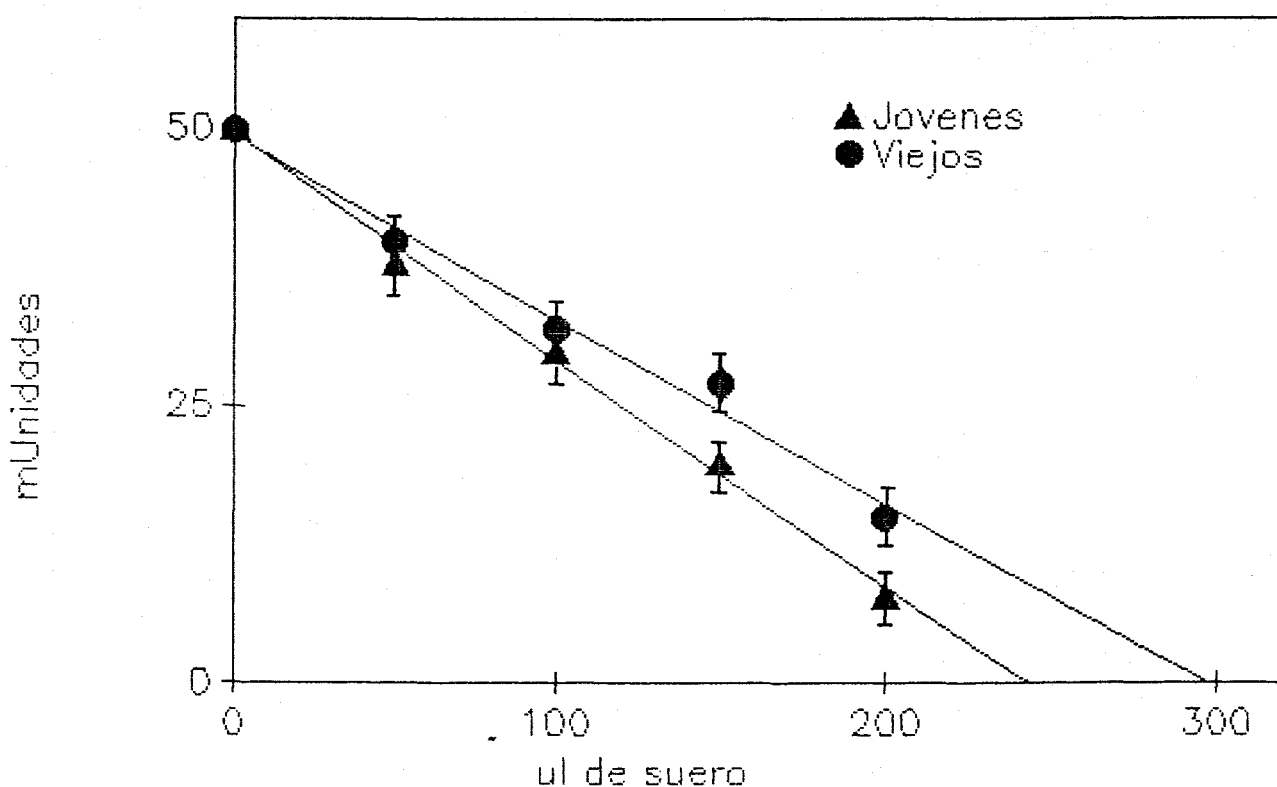


FIGURA 13. Inmunoprecipitación de la G-6-PDH de hígado de rata de animales juvenes y viejos.

4.3.2. PURIFICACION.

La purificación como en el caso anterior se ha realizado por cromatografía de inmunoafinidad. Un resumen de los procesos de purificación se presenta en la tabla 10.

TABLA 10. PURIFICACION DE LA ENZIMA G-6PDH DE HIGADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS

	V (ml)	Prot (mg/ml)	Act.espec. (U/mg)	Act.Total (U)	Rend. (%)	F.Purif.
HOMOGENADO	JOVEN 4	46	0,038	7,1	100	1
	VIEJO 10	52	0,015	7,8	100	1
CROM. INM.	JOVEN 8	0,034	5,51	1,5	21	145
	VIEJO 8	0,030	5,83	1,4	18	388

Como en el caso anterior el rendimiento esta entorno al 20%. El perfil de elución es semejante para jovenes y viejos y similar al de la EM y 6-PGDH como podemos observar en la figura 14.

En la fotografia 2, recogemos la electroforesis en geles de poliacrilamida del homogenado y de la fracción enzimática de G-6-PDH obtenida en la cromatografía de inmunoafinidad.

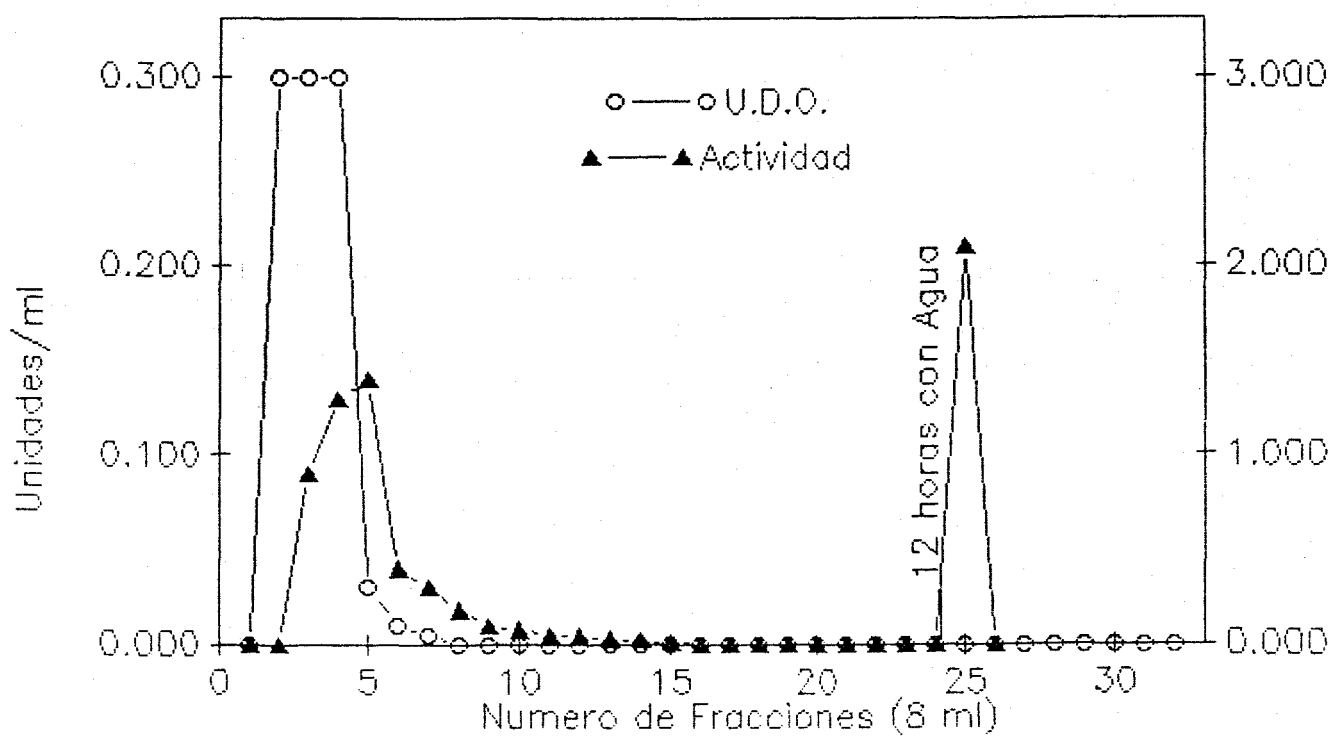
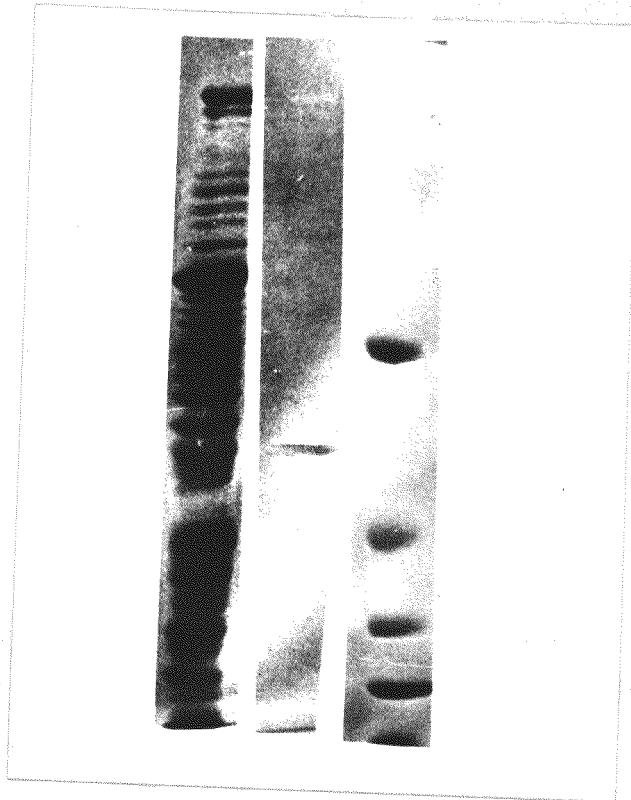


FIGURA 14. Perfil de elución de la G-6-PDH por la Cromatografía de Inmunoadfinidad.



Fotografía 2. Purificación de la G-6-PDH de hígado de rata por la cromatografía de Inmunofinidad.

Pocillo nº 1= Homogenado de hígado de rata. Pocillo nº 2= Eluido de la columna de inmunofinidad con actividad G-6-PDH. Pocillo nº 3= Albumina (66.000 daltons), Ovoalbumina (45.000 daltons), Anhidrasa carbónica (31.000 daltons).

4.3.3. CARACTERIZACION DE LA ENZIMA GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

4.3.3.1. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la G-6PDH, en ambos casos, es de aproximadamente 60.000 daltons.

4.3.3.2. Determinación del punto isoeléctrico.

El punto isoeléctrico obtenido por isoelectroenfoque para la G-6-PDH de joven y de viejo es de aproximadamente 6,9 unidades de pH.

4.3.3.3. Estudios cinéticos.

Se han determinado las Km del sustrato (glucosa-6-fosfato, respectivamente) y cofactor(NADP⁺), para dicha enzima, en jóvenes y viejos. En las tabla 11 recogemos los resultados obtenidos (experimento representativo de 3 realizados) .

TABLA 11. DETERMINACION DE LAS Km PARA LA G-6PDH EN JOVENES Y VIEJOS.

	Km (Glucosa-6-fosfato)	Km (NADP ⁺)
G-6PDH de joven	30 μ M	9 μ M
G-6PDH de viejo	35 μ M	6 μ M

De los resultados obtenidos, podemos deducir, que la constante cinética Km para el sustrato y el NADP⁺ no varia significativamente durante el proceso de envejecimiento para dicha enzima.



4.3.4. MODIFICACIONES AMINOACIDICAS.

El número de experimentos realizados para cada resto aminoacídico estudiado en esta enzima ha sido 4.

4.3.4.1. Modificación y valoración de grupos -SH.

Los grupos -SH valorados, así como, su reactividad estan recogidos en la tabla 12 y figura 15. En estos resultados no se aprecia diferencia significativa alguna entre la molécula de joven y la de viejo. En cuanto a la variación de la actividad durante el proceso de modificación con DTNB de la G-6-PDH, tanto en jóvenes como en viejos, observamos una pérdida total de la actividad cuando se modifican estos grupos -SH. Este resultado indica la importancia de los grupos sulfidrilos en la actividad de la enzima (81) (fig.16).

TABLA 12. VALORACION DE GRUPOS -SH DE LA G-6PDH DE HIGADO DE RATA

Método de valoración	G-6PDH de joven número de grupos -SH	G-6PDH de viejo (equiv./mol)
DTNB	Enzima nativa	5,9±0,5
	Enzima desnat.	10,4±0,5
		6,1±0,4
		10,2±0,5

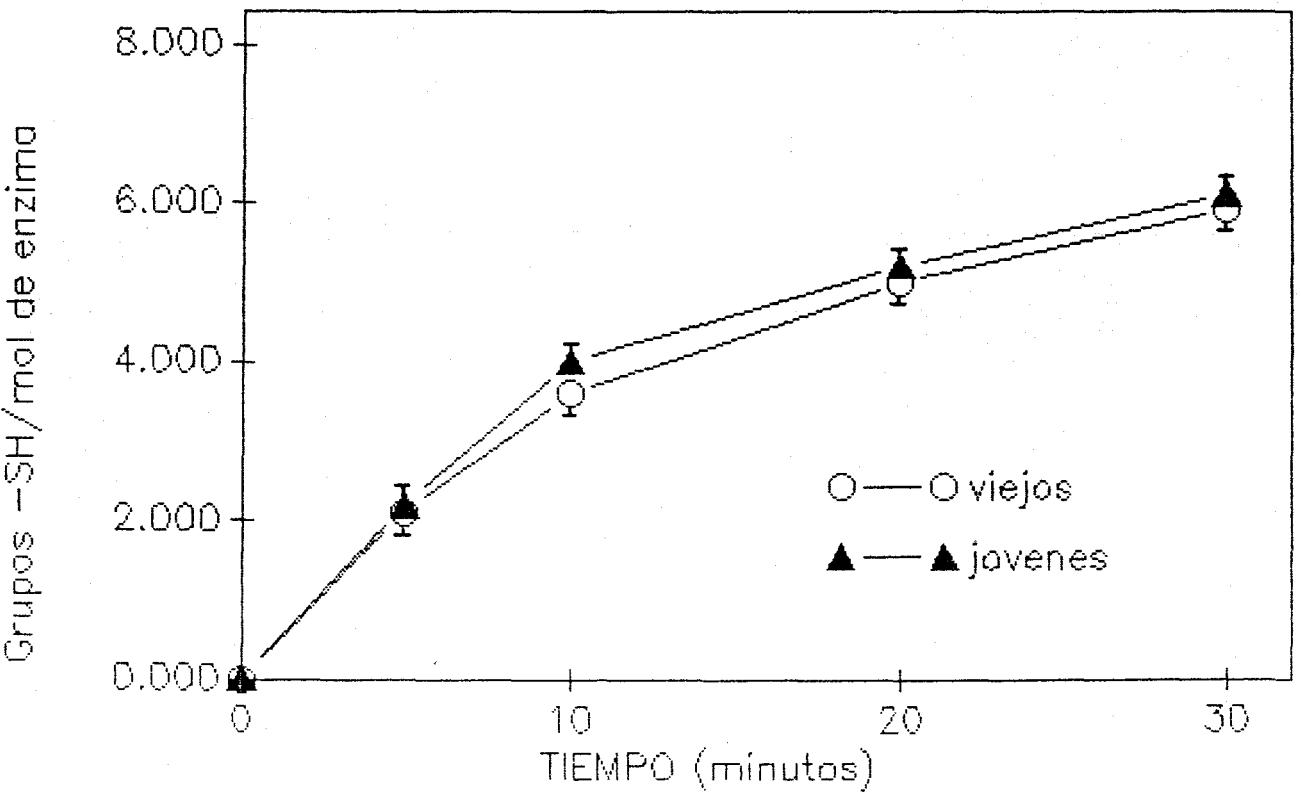


FIGURA 15. Reactividad de los grupos -SH de la G-6-PDH de animales jóvenes y viejos con el reactivo DTNB.

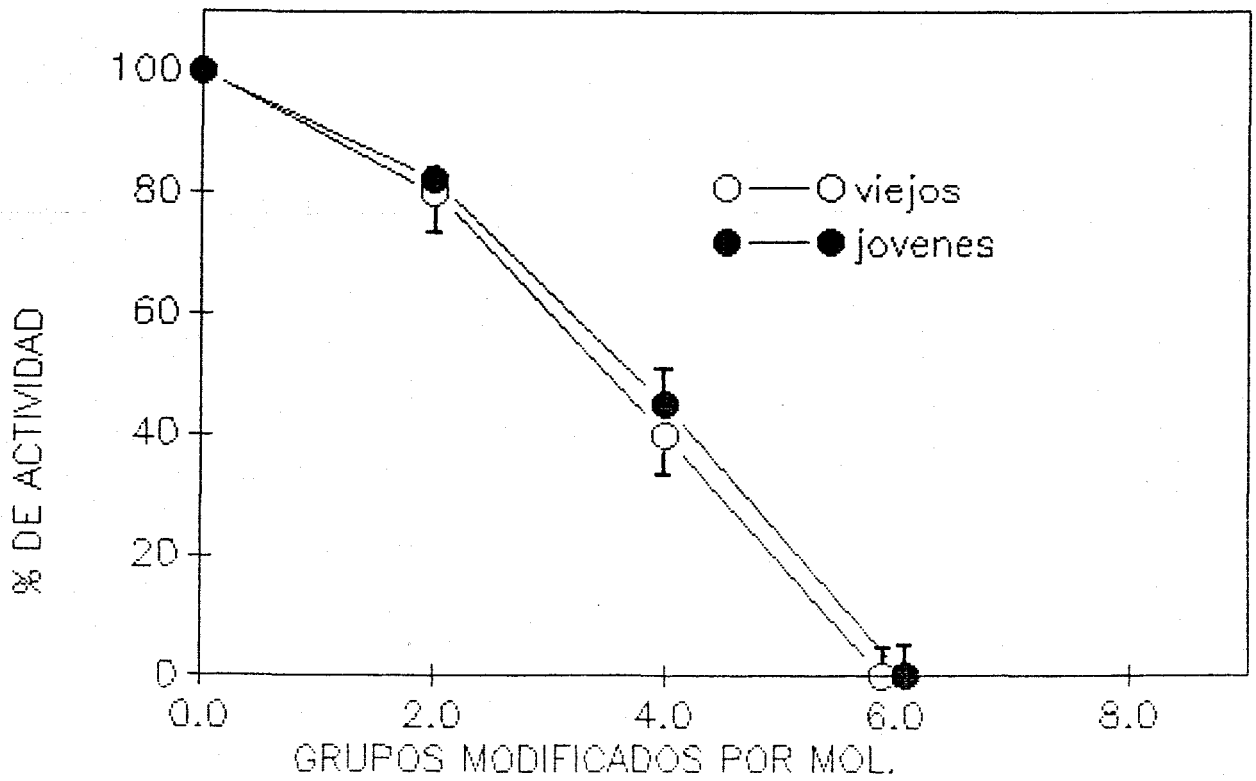


FIGURA 16. Actividad de la G-6-PDH de animales jovenes y viejos durante la modificación con DTNB

4.3.4.2. Modificación y valoración de restos de histidina.

La valoración y reactividad de los restos de histidina con DEPC es muy semejante de jóvenes a viejos en la G-6-PDH (tabla 13, figura 17). La actividad de esta enzima decae totalmente cuando se modifican dichos restos (figura 18), es decir, estos restos juegan un papel fundamental en la actividad enzimática de la enzima.

TABLA 13. VALORACION DE LOS RESTOS HISTIDINA EN LA G-6PDH DE HIGADO DE RATA

	G-6PDH (joven) (mol/mol)	G-6PDH (viejo) (mol/mol)
Histidina accesible (nativa)	4,0±0,1	4,2±0,1
Histidina total (desnat.)	6,8±0,2	7,0±0,3

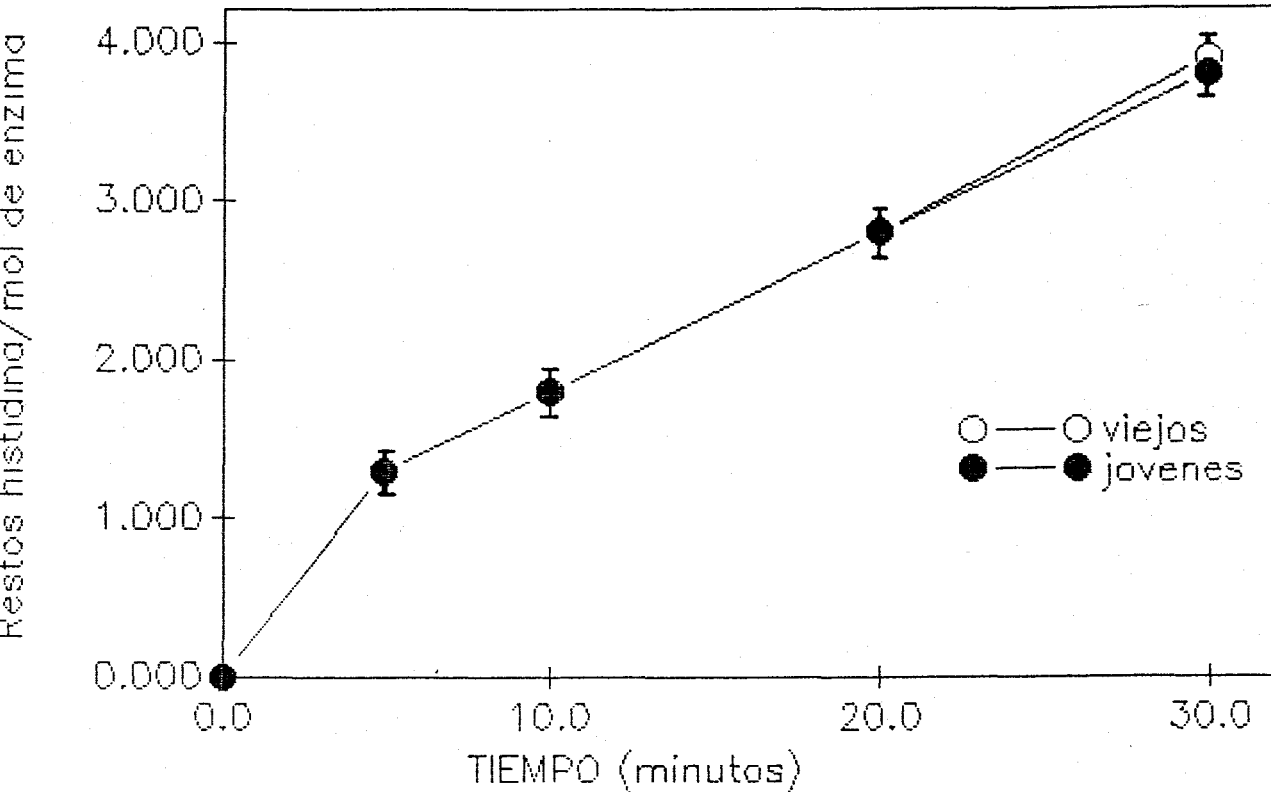


FIGURA 17. Reactividad de los restos histidina de la G-6-PDH de animales jóvenes y viejos con el reactivo DEPC.

4.3.4.3. Modificación y valoración de los restos arginina.

En los resultados obtenidos para los restos de arginina tampoco se aprecia diferencias importantes entre las moléculas de jóvenes y viejos en esta enzima. Los resultados vienen recogidos en la tabla 14 (valoración) y en las figuras 19 (reactividad) y 20 (variación de la actividad durante el proceso de modificación de los restos de arginina con p-NPG). De estos resultados, es interesante destacar, que, como en los casos anteriores, desaparece la actividad enzimática cuando se modifican los restos arginina.

TABLA 14. VALORACION DE LOS RESTOS ARGININA EN LA G-6PDH DE HIGADO DE RATA

	G-6PDH (joven) (mol/mol)	G-6PDH (viejo) (mol/mol)
Arginina accesible (nat.)	4,9±0,2	4,8±0,2
Arginina total (desnat.)	10,6±0,2	10,7±0,3

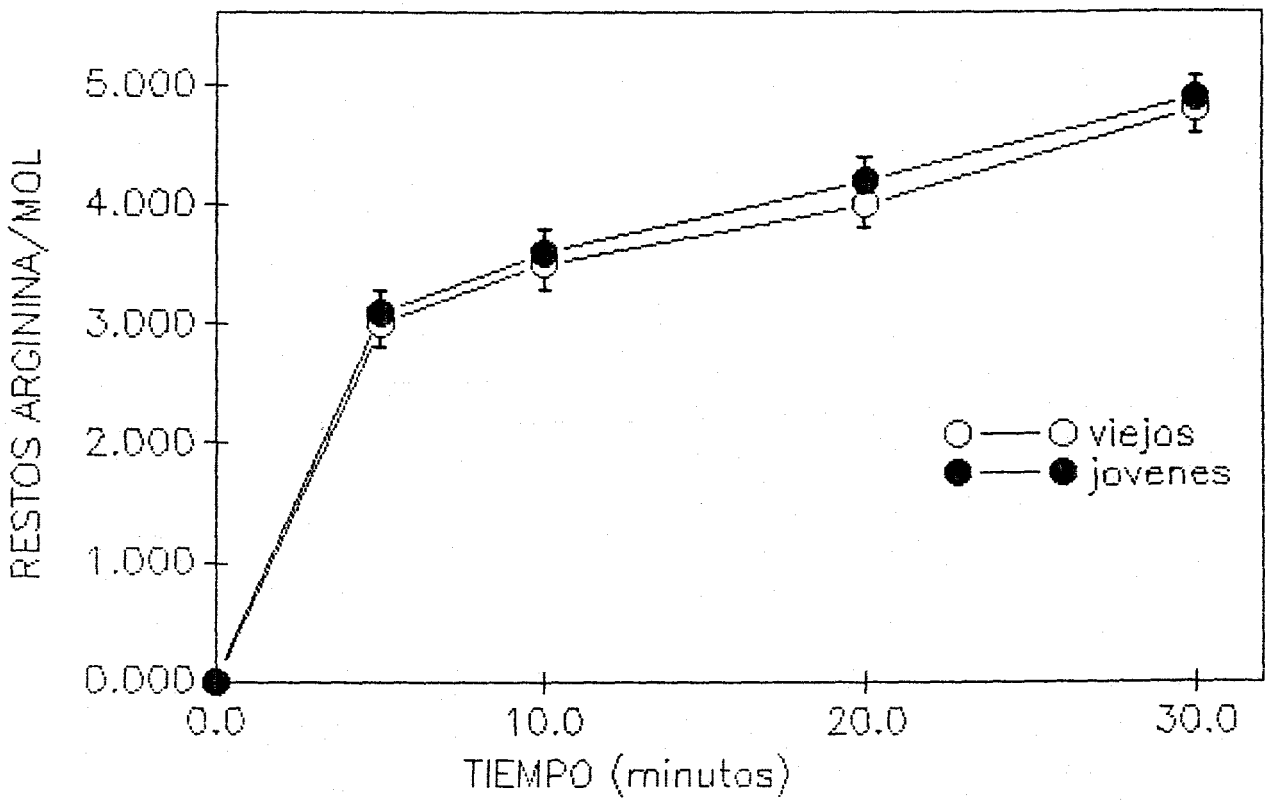


FIGURA 19. Reactividad de los restos arginina de la G-6-PDH de animales jóvenes y viejos con el reactivo p-NPG.

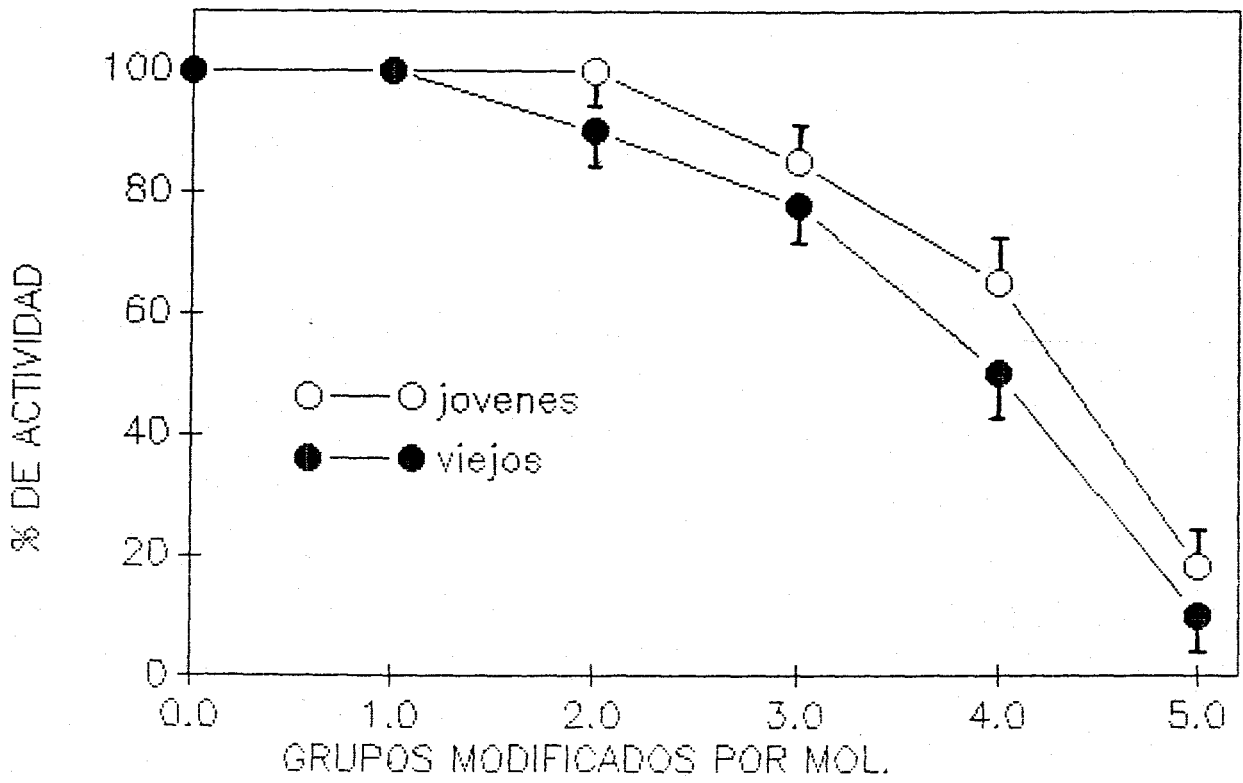


FIGURA 20. Actividad de la G-6-PDH de animales jovenes y viejos durante la modificación con p-NPG.

4.3.4.4. Modificación y valoración de restos metionina.

Los restos de metionina accesibles valoradas con Cloramina-T, así como la metionina total para la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa de joven y de viejo, están recogidas en la tabla 15.

TABLA 15. VALORACION DE RESTOS METIONINA EN LA G-6PDH DE HIGADO DE RATA

	G-6PDH (joven) (mol/mol)	G-6PDH (viejo) (mol/mol)
Metionina modif. con C-T	0,6±0,1	0,7±0,1
Metionina total	11,0±0,1	11,0±0,1

En cuanto a la variación de la actividad durante el proceso de modificación con C-T, se observa que no existe pérdida de actividad enzimática.

4.3.4.5. Valoración de los restos de lisina.

Los restos de lisina valorados con TNBS para esta enzima estan recogidos en la tabla 16.

TABLA 16.

VALORACION DE RESTOS DE LISINA

	<u>Joven</u>	<u>Viejo</u>
G-6-PDH	21,7±5,1	19,5±3,2

Como podemos observar, no existe tampoco una diferencia significativa entre los resultados obtenidos entre la enzima de joven y la enzima de viejo.

4.4. 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA.

4.4.1. RELACION ACTIVIDAD/CANTIDAD DE ENZIMA.

La relación actividad/cantidad de enzima obtenida por inmunoprecipitación en homogenados hepáticos de jóvenes (2-3 meses) y viejos (2 años) para la enzima 6-PGDH esta recogida en la figura 21 (experimento realizado 5 veces).

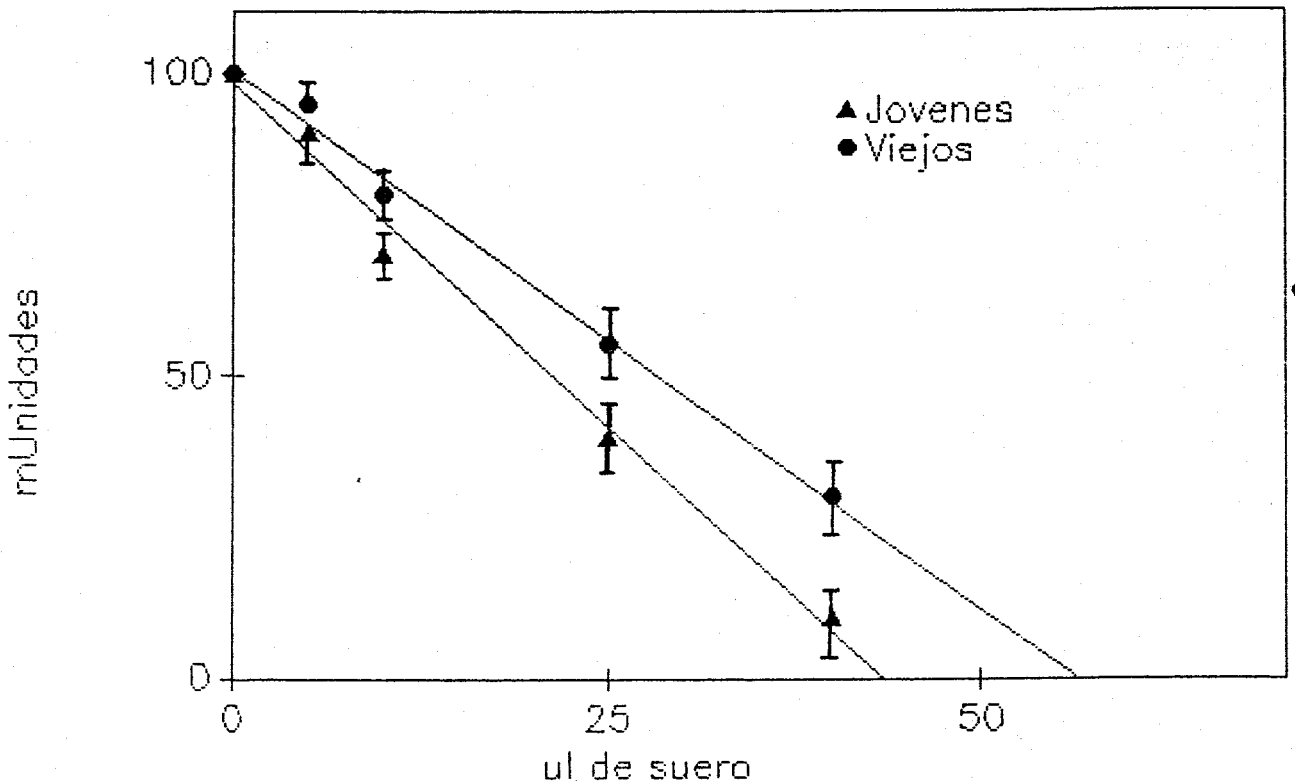


FIGURA 21. Inmunoprecipitación de la 6-PGDH de hígado de rata de animales jóvenes y viejos.

Como podemos observar la relación actividad/cantidad de proteína inmunológicamente reactivas para la 6-PGDH es menor, en un 25% en tejido hepático de ratas viejas que los que pertenecen a ratas jóvenes. Esto parece indicar, la existencia de una mayor cantidad de enzima inactiva o con menos actividad en viejos con respecto a jóvenes.

4.4.2. PURIFICACION.

La purificación de la 6-PGDH de hígado de rata por cromatografía de inmunoafinidad ha sido realizada con anticuerpos anti-6-PGDH obtenidos en conejos previamente inoculados con dicha proteína.

Un resumen de los procesos de purificación se presenta en la tabla 17.

Tabla 17. PURIFICACION DE LA ENZIMA 6-PGDH DE HIGADO DE RATAS JOVENES Y VIEJAS

	V (ml)	Prot (mg/ml)	Act.espec. (U/mg)	Act.Total (U)	Rend. (%)	F.Purif.	
HOMOGENADO	JOVEN	3	46	0,073	10,1	100	1
	VIEJO	4,5	52	0.037	8,7	100	1
CROM. INMUN	JOVEN	8	0,020	12	2,0	21,5	171
	VIEJO	8	0.029	8,1	1,9	21,8	218

Como en los casos anteriores, el rendimiento esta entorno al 20% en ambos casos. El perfil de elución es muy semejante en jóvenes y viejos, por lo que recogemos solo uno

de ellos en la figura 22. En la fotografía 3 podemos observar el proceso de purificación.

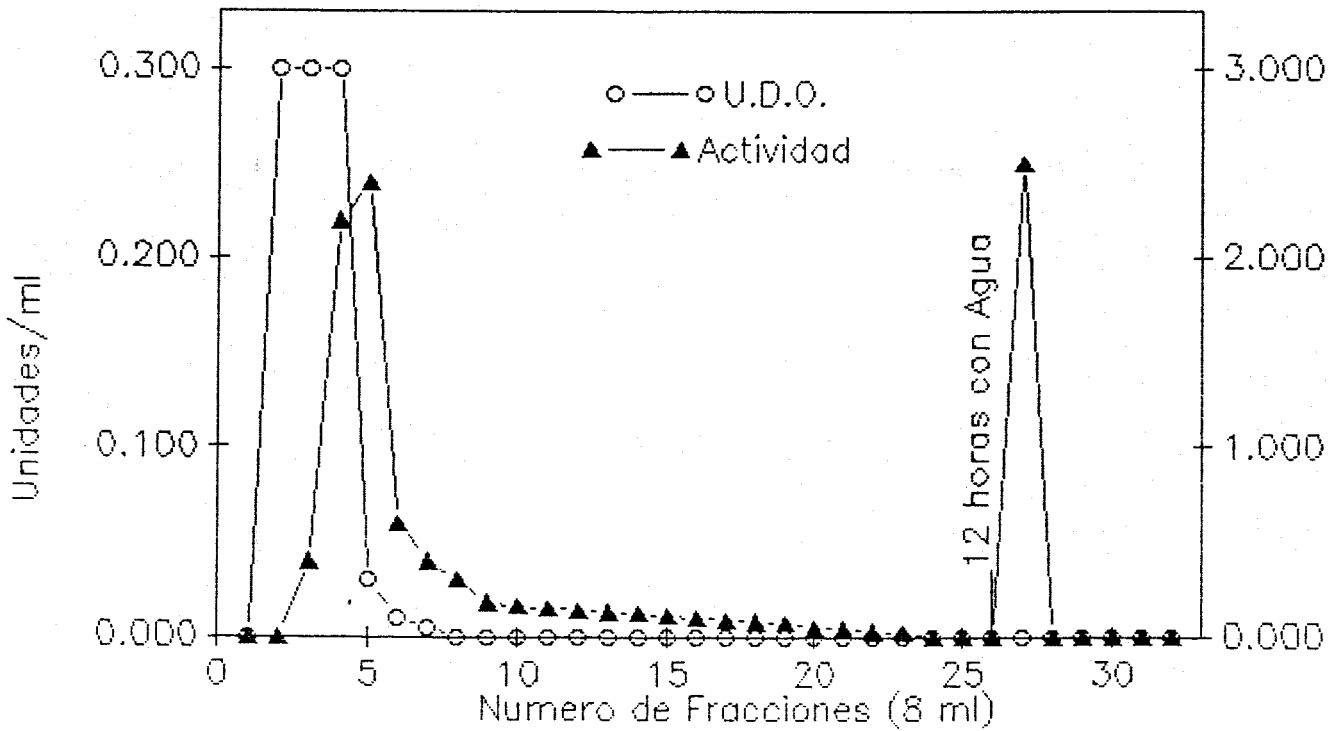
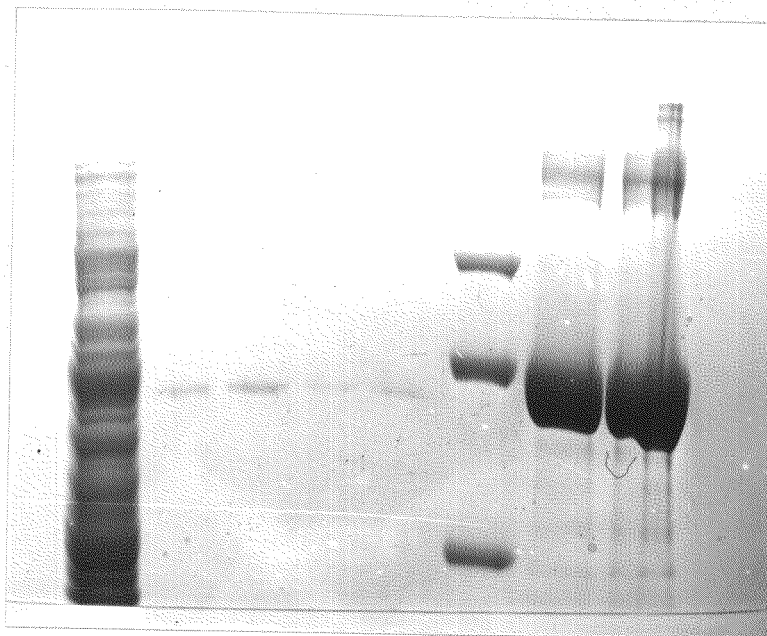


FIGURA 22. Perfil de elución de la 6-PGDH por la Cromatografía de Inmunofinidad.



Fotografía 3. Purificación de la 6-PGDH de hígado de rata por la cromatografía de Inmunoafinidad.

Pocillo n^o 1= Homogenado de hígado de rata. Pocillos n^o 2,3,4,5= Eluidos de la cromatografía de inmunoafinidad con actividad 6-PGDH.

Pocillo n^o 6= Fosforilasa b (97.400 daltons), Albumina (66.000 daltons), Ovoalbúmina (45.000 daltons. Pocillos n^o 7 y 8= Albúmina

4.4.3. CARACTERIZACION DE LA 6-PGDH.

4.4.3.1. Determinación del peso molecular.

El peso molecular de la 6-PGDH es de 63.000 daltons tanto para la molécula de joven como para la molécula de viejo (determinados en geles de poliacrilamida con SDS).

4.4.3.2. Determinación del punto isoelectrónico

En este caso el punto isoelectrónico determinado por isoelectroenfoque para jóvenes y viejos fue de 6,8 unidades de pH.

4.4.3.3. Estudios cinéticos.

Las K_m para el sustrato (6-fosfogluconato) y el cofactor ($NADP^+$) están recogidas en la tabla 18 (experimento representativo de 3 realizados).

TABLA 18. DETERMINACION DE LAS K_m PARA LA 6-PGDH EN JOVENES Y VIEJOS.

	K_m (6-fosfogluconico)	K_m ($NADP^+$)
6-FGDH de joven	170 μM	87 μM
6-FGDH de viejo	176 μM	95 μM

Como vemos la constante cinética K_m para el sustrato y el cofactor $NADP^+$ en la 6-PGDH no varía de jóvenes a viejos significativamente.

4.4.4. MODIFICACIONES AMINOACIDICAS.

El número de experimentos realizado para el estudio de cada uno de restos aminoacídicos ha sido de 4.

4.4.4.1. Modificación y valoración de grupos -SH.

La 6-PGDH modificada con DTNB, tanto en su forma nativa como desnaturalizada con SDS al 2% , para valorar el número y reactividad de los grupos -SH en jóvenes y viejos, ha dado los siguientes resultados recogidos en la tabla 19 y figura 23.

TABLA 19. VALORACION DE GRUPOS -SH DE LA 6-PGDH DE HIGADO DE RATA

Método de valoración	6-PGDH de joven número de grupos -SH	6-PGDH de viejo (equiv./mol)
DTNB	Enzima nativa	7,4±0,5
	Enzima desnat.	7,5±0,4
	Enzima nativa	9,7±0,5
	Enzima desnat.	9,3±0,5

Como podemos observar, la valoración de grupos -SH, de las moléculas en su forma nativa como desnaturalizada en jóvenes y viejos, con DTNB da lugar a un número muy similar para todos los casos estudiados. En cuanto a la reactividad de dichos grupos -SH tampoco se aprecia diferencia alguna entre las moléculas (figura 23).

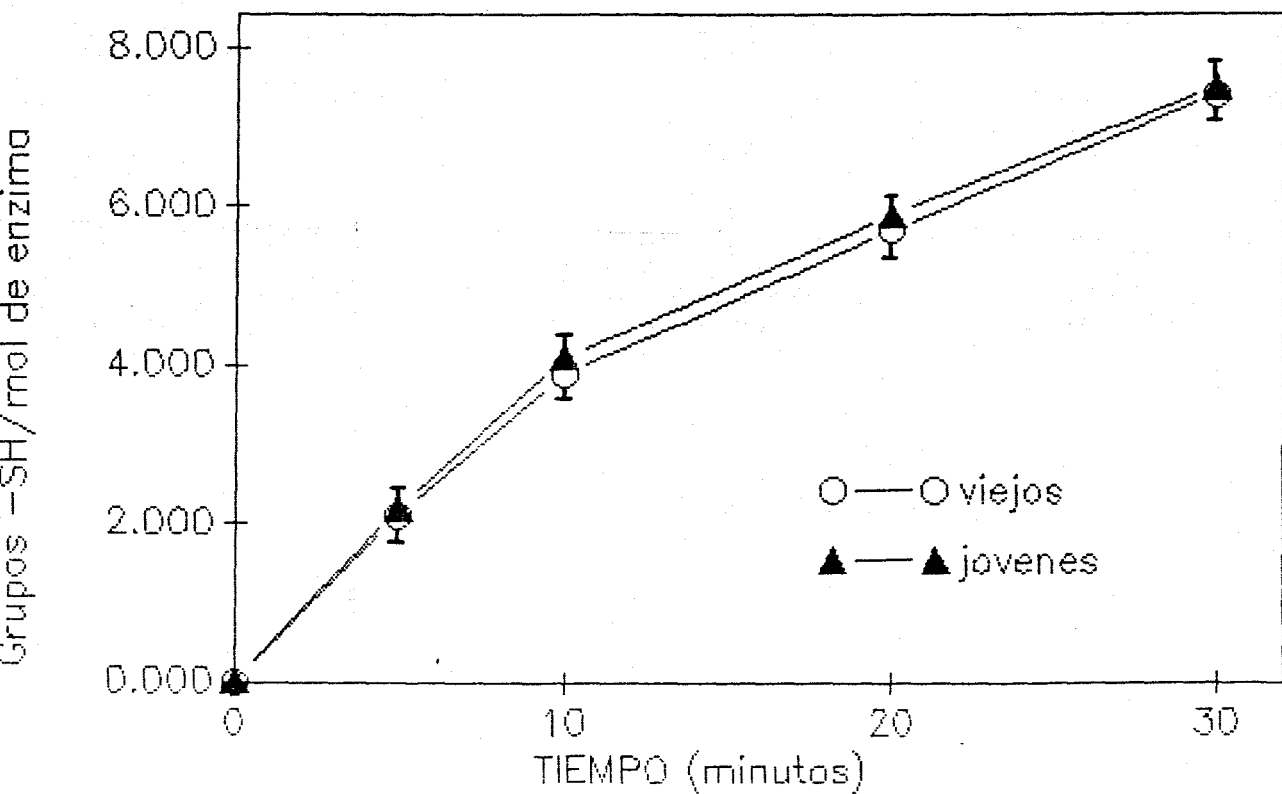


FIGURA 23. Reactividad de los grupos -SH de la 6-PGDH de animales jóvenes y viejos con el reactivo DTNB.



La actividad de la enzima modificada con DTNB, figura 24 , se observa que esta decae cuando se modifican los grupos -SH reactivos. Esto hace indicar que los grupos -SH tienen un papel muy importante en la actividad de esta enzima (82).

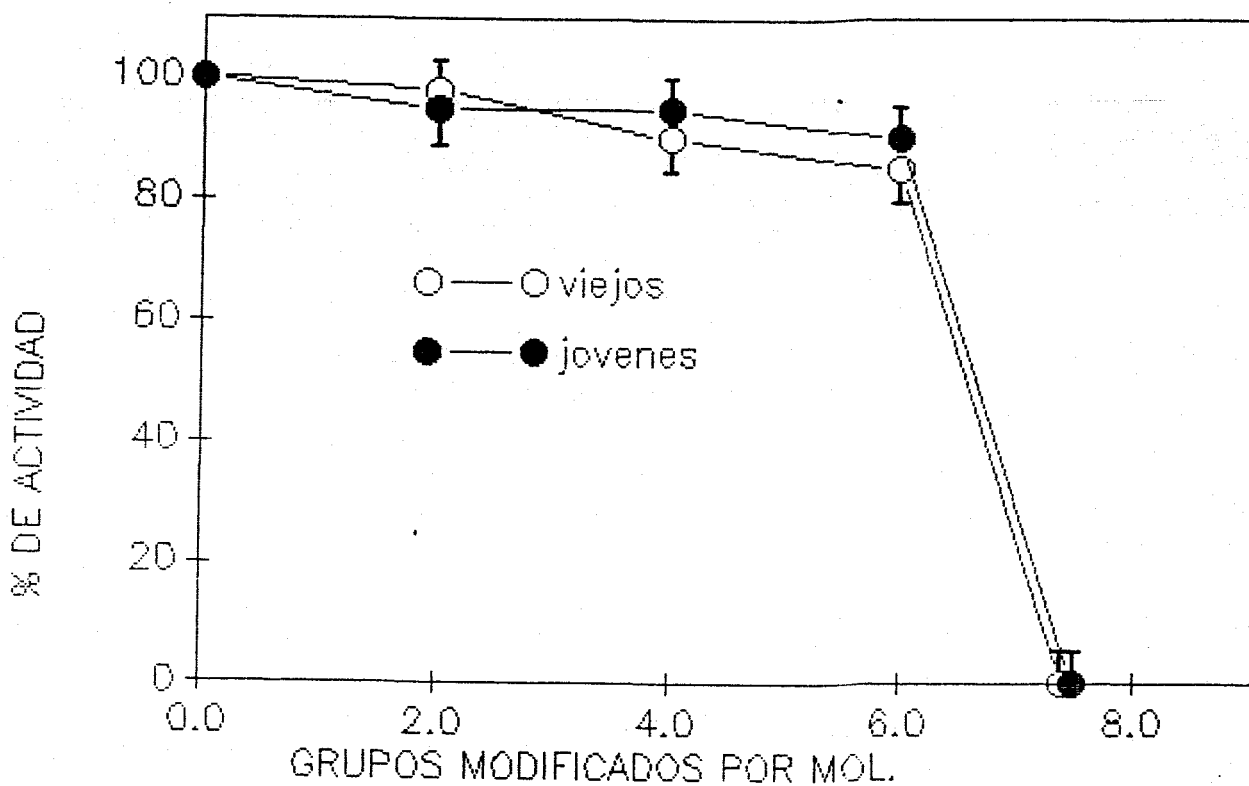


FIGURA 24. Actividad de la 6-PGDH de animales jóvenes y viejos durante la modificación con DTNB.

4.4.4.2. Modificación y valoración de restos de histidina con DEPC.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 20 y en las figuras 25 y 26.

TABLA 20. VALORACION DE LOS RESTOS HISTIDINA EN LA 6-PGDH DE HIGADO DE RATA

	6-PGDH (joven) (mol/mol)	6-PGDH (viejo) (mol/mol)
Histidina accesible (nativa)	4,0±0,1	3,6±0,2
Histidina total (desnat.)	7,4±0,2	7,2±0,2

La valoración de los restos histidina no muestra diferencias entre la molécula de joven y de viejo. Esto mismo ocurre cuando estudiamos la reactividad de dichos restos (figura 25). En cuanto a la actividad de estas enzimas cuando son modificadas con DEPC, como podemos observar en la figura 26, decae totalmente cuando se modifican. En estos resultados obtenidos, podemos decir en resumen, que no se aprecia ninguna diferencia de gran interés entre las enzimas de joven y de viejo.

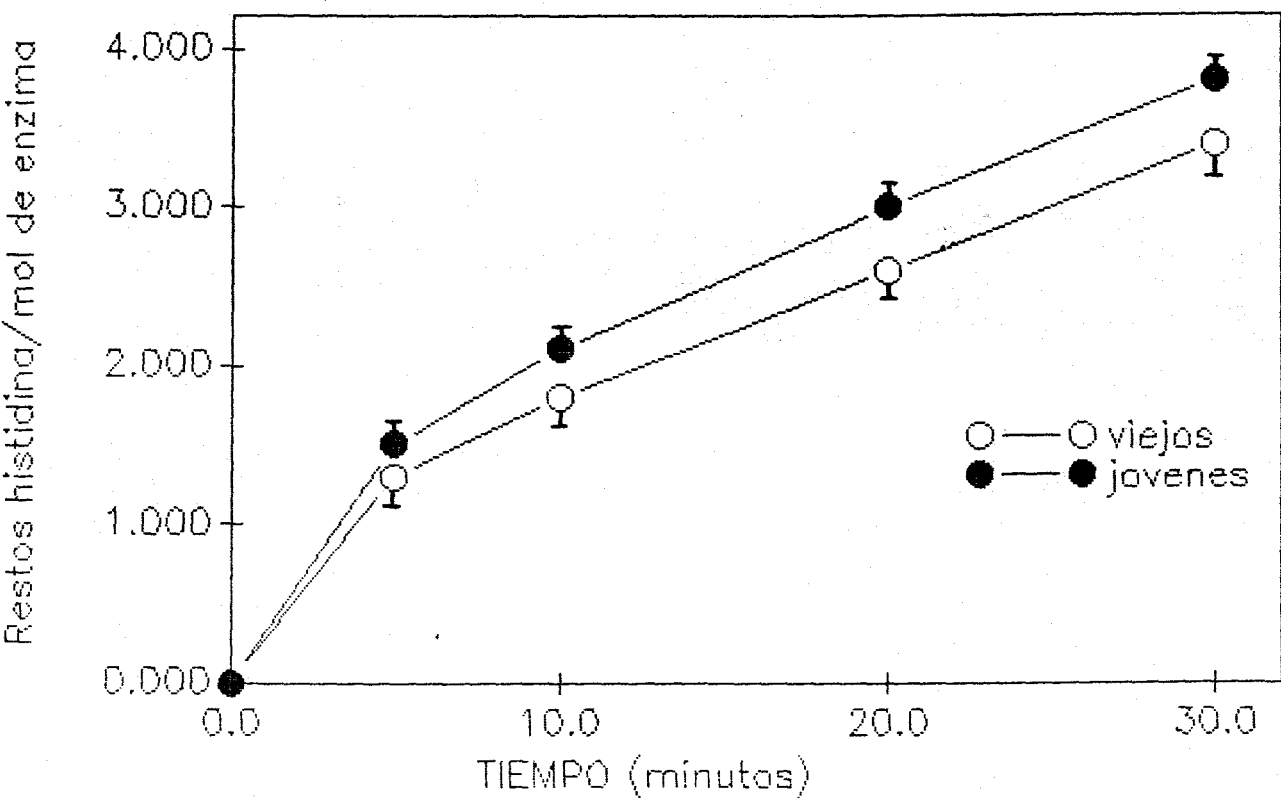


FIGURA 25. Reactividad de los restos histidina de la 6-PGDH de animales jovenes y viejos con el reactivo DTNB.

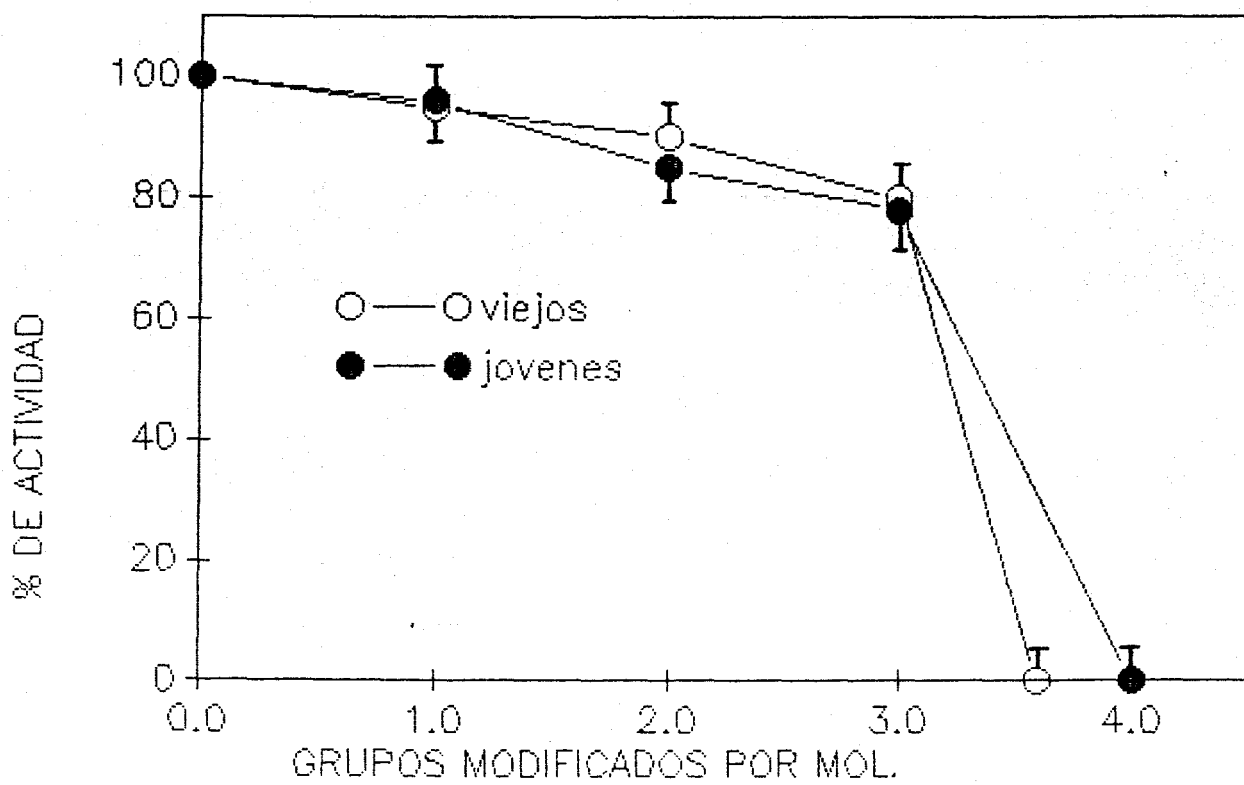


FIGURA 26. Actividad de la 6-PGDH de animales jóvenes y viejos durante la modificación con DEPC.

4.4.4.3. Modificación y valoración de los restos arginina con p-NPG.

La valoración y reactividad de los restos arginina ofrece los siguientes resultados (tabla 21 , figuras 27 y 28).

TABLA 21. VALORACION DE LOS RESTOS ARGININA EN LA 6-PGDH DE HIGADO DE RATA

	6-PGDH (joven) (mol/mol)	6-PGDH (viejo) (mol/mol)
Arginina accesible (nat.)	8,1±0,2	7,9±0,2
Arginina total (desnat.)	15,6±0,2	15,7±0,2

Como se observa el número y reactividad de los restos arginina valorados con p-NPG, es muy semejante para la 6-PGDH en jóvenes y viejos. En cuanto a la actividad de la enzima durante el proceso de la modificación, los resultados lo podemos observar en la figura 28. La actividad decae totalmente, lo que hace pensar que los restos arginina juegan un papel fundamental en la actividad .

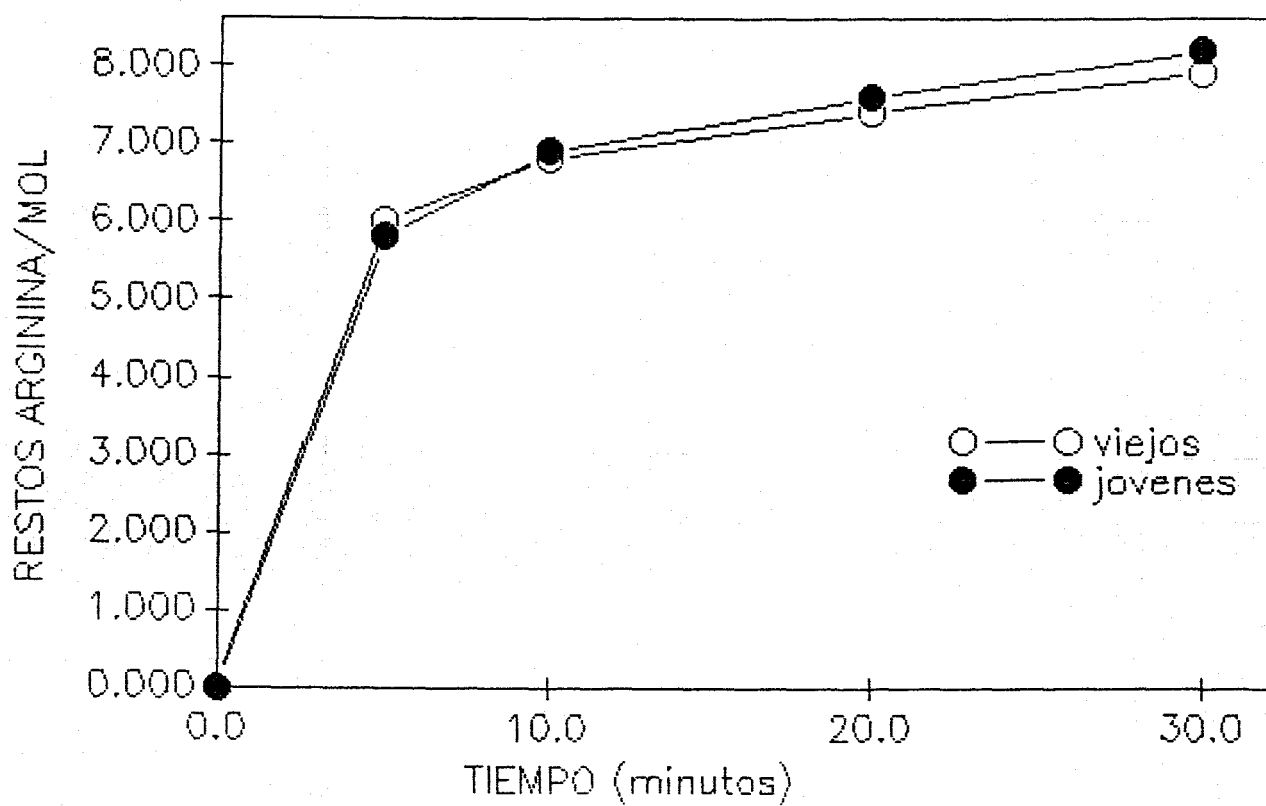


FIGURA 27. Reactividad de los restos arginina de la 6-PGDH de animales jóvenes y viejos con el reactivo p-NPG.

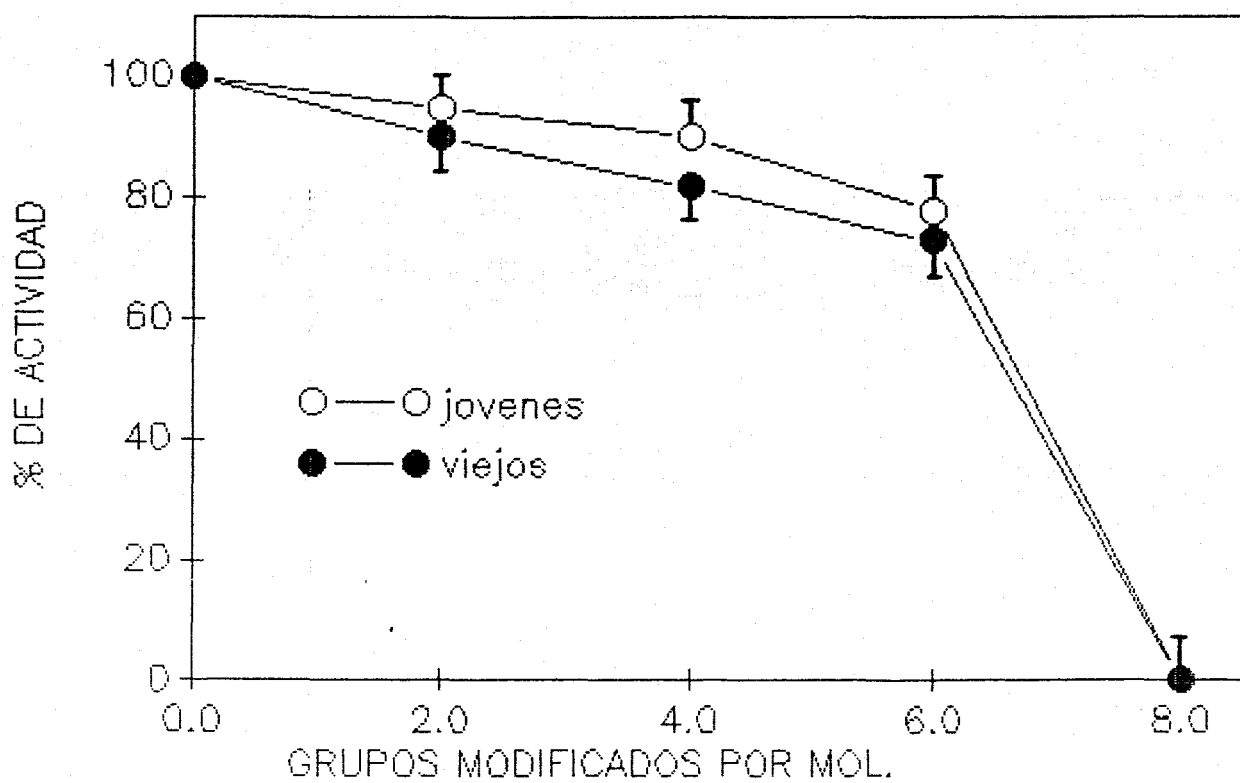


FIGURA 28. Actividad de la 6-PGDH de animales jovenes y viejos durante la modificación con p-NPG.

4.4.4.4. Modificación y valoración de los restos metionina con Cloramina-T.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 22 , figura 29. En este estudio tampoco se aprecian diferencias entre la enzima de joven y la de viejo, teniendo ambas moléculas un comportamiento similar. En cuanto al estudio de la actividad durante el proceso de modificación con Cloramina-T (reacciona con las metioninas accesibles), no se observa cambio alguno en la actividad (figura 29). Esto nos permite deducir los restos metionina no juegan un papel fundamental en la actividad de la 6-PGDH.

TABLA 22. VALORACION DE LOS RESTOS METIONINA EN LA 6-PGDH DE HIGADO DE RATA

	6-PGDH (joven) (mol/mol)	6-PGDH (viejo) (mol/mol)
Metionina modif. con C-T	0,8±0,05	0,9±0,05
Metionina total (Gross)	10±0,05	10±0,1

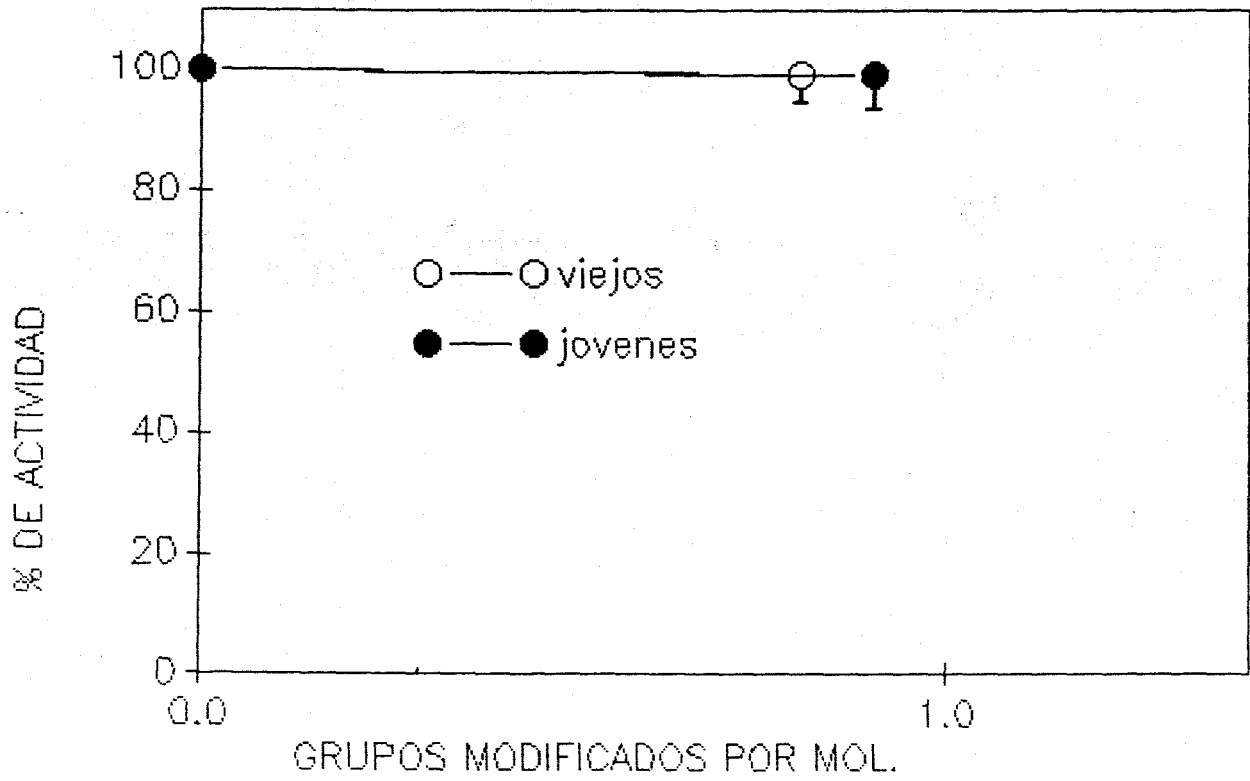


FIGURA 29. Actividad de la 6-PGDH de animales jovenes y viejos durante la modificación con Cloramina-T.

4.4.4.5. Modificación y valoración de los restos de lisina con TNBS.

Los resultados obtenidos lo podemos observar la tabla 23.

TABLA 23.

VALORACION DE RESTOS DE LISINA

	<u>Joven</u>	<u>Viejo</u>
6-PGDH	39,0±2,8	*28,1±5,4

Como podemos observar de estos resultados, en la 6-PGDH de hígado de rata, parece ser que existe una diferencia lo suficientemente significativa ($*p < 0,02$), entre los residuos de lisina de joven y los de viejos. Los residuos de lisina, que no cuantificamos en los animales viejos, podrían estar modificados (oxidados) (45) y esta podría ser la causa de la pérdida de actividad en esta enzima, observada en los animales viejos por nosotros (4.4.1. relación actividad/cantidad de enzima).

4.4.5. MODIFICACION CON ASCORBATO DE LA 6-PGDH DE JOVEN.

Con objeto de ver si la oxidación con ascorbato puede producir una disminución en el número de lisinas valorados en la molécula de joven y una pérdida de actividad en la misma semejante a la que ocurre en la molécula de animal viejo, se han probado distintas concentraciones de ascorbato en el medio. En la tabla 24 se recogen los resultados obtenidos cuando la concentración de ascorbato es de 2mM en el medio (experimento realizado 4 veces). En estas

condiciones, la 6-PGDH de animal joven, presenta características semejantes, en cuanto al número de lisinas valorados con TNBS ($31,1 \pm 4,7$), que la de animal viejo ($28,2 \pm 5,3$) y una pérdida de actividad del 25% respecto a la no oxidada.

TABLA 24. MODIFICACION OXIDATIVA DE LA 6-PGDH DE JOVEN CON ASCORBATO.

	<u>residuos de lisina</u>	<u>% de actividad (15 min.)</u>
6-PGDH de joven	$39,0 \pm 2,8$	100
6-PGDH de joven + Ascorbato (2mM)	$31,1 \pm 4,7^*$	75

El número de lisinas valorados en la enzima oxidada es significativamente diferente a la de la enzima no oxidada (* $p < 0.05$). Por otra parte hemos valorado los restos histidina con DEPC, para ver si en estas condiciones también eran oxidados, observando que el número de histidinas obtenido es semejante a la de la enzima nativa ($4,0 \pm 0,1$).

En la figura 30 hemos representado el número de lisinas e histidinas valorados en la 6-PGDH, cuando se oxida, utilizando distintas concentraciones de ascorbato. Como podemos observar los restos lisina en esta enzima son más sensibles a la oxidación que los restos de histidina. Así, a concentración 2mM, como apuntábamos anteriormente, no se aprecian en la valoración de los restos de histina diferencias con la enzima nativa. Sin embargo, los restos de lisinas valorados son menores a los de la enzima nativa. Cuando aumentamos la concentración de ascorbato a 10mM, prácticamente están casi todos los restos de lisina están

oxidados mientras que solo un 50% de las histidinas lo estan (aproximadamente dos restos por molécula). Esto parece indicar, que en esta enzima 6-PGDH los restos de lisina son más sensibles a la oxidación que los restos de histidina.

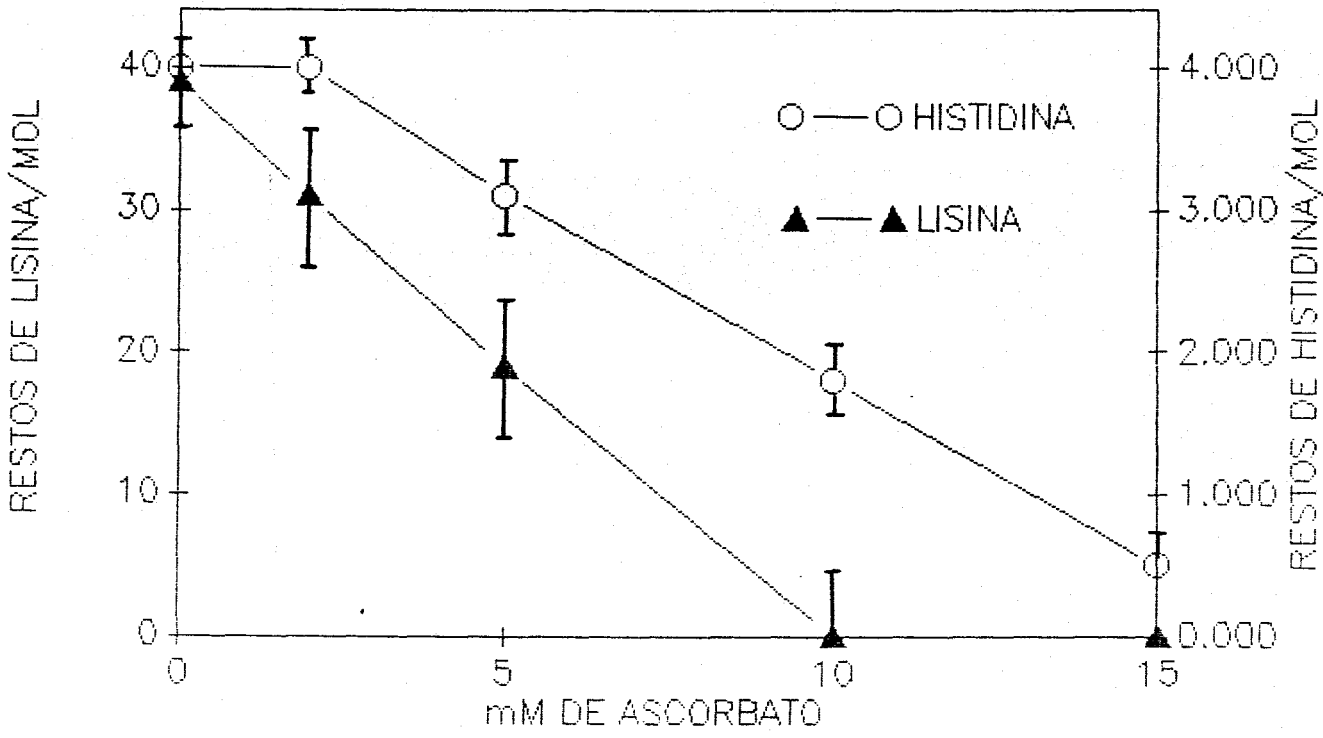


FIGURA 30. Valoración de los restos de histidina y lisina de la 6-PGDH de animales jovenes despues de la modificación con diferentes concentraciones de ascorbato.

4.4.6. IODACION, HIDROLISIS PARCIAL CON TRIPSINA Y ENDOPROTEINASA ARG-C Y SEPARACION DE LOS PEPTIDOS OBTENIDOS EN LA HIDROLISIS POR HPLC DE LA ENZIMA 6-FGDH.

Con el objeto de abordar con otra metodología el estudio de los restos de lisinas en las molécula de la 6-FGDH en jóvenes y viejos se ha procedido a la comparación de los mapas péptídicos obtenidos con dos proteasas: la tripsina (que rompe el enlace péptídico cuando hay una lisina o una arginina); y la endoproteinasa Arg-C (que rompe solo en donde hay restos de arginina). Previamente a estas hidrólisis, hemos procedido a la iodación de la 6-FGDH de joven, joven oxidada con ascorbato 2mM y viejo, con el objeto de seguir la separación de los péptidos en el HPLC a través de la radioactividad de los mismos.

La proteína iodada, según el método descrito en materiales y métodos, se ha corrido en el gel de electroforesis y hecho una autoradiografía con el objeto de ver donde se encuentran la bandas.

Cada banda una vez dividida y cortada en dos tiene aproximadamente: 580.000 cuentas por minuto (CPM) en el caso de cada trozo de la enzima 6-FGDH de joven; de 76.000 CPM en el caso de cada trozo de la de vieja; y de 95.000 CPM para la de joven oxidada.

La hidrólisis parcial con las proteasas se efectúa como hemos descrito anteriormente en material y métodos. Para comprobar el grado de hidrólisis separamos la banda de gel (con nuestra proteína) del tampón (donde se deben encontrar los péptidos obtenidos de la hidrólisis) tras centrifugar. Una vez realizada la separación contamos la radioactividad del líquido en el contador-γ. Si la radiactividad que tiene el líquido es mayor del 60% de la

radioactividad de partida en la banda en el caso de los hidrolizados de tripsina, o mayor del 40% en el caso de la endoproteinasa Arg-C, se da por terminada la reacción. Si no es así, se vuelve a añadir de nuevo 1 o 2 μg de cada proteasa y se repite la operación hasta coseguir que la hidrólisis supere estos niveles.

La separación de los péptidos obtenidos en la hidrólisis con tripsina y endoproteinasa Arg-C de la enzima 6-PGDH, de animales jóvenes, viejos, y enzima de animal joven modificada con ascorbato, mediante HPLC es seguida por la radioactividad observada en las distintas fracciones (de 1 ml).

El gradiente de fases móviles es siempre el mismo para todos los casos estudiados. Para ver si el cromatograma obtenido (en el que se representa CPM frente al tiempo de salida) en cada caso es comparable en el tiempo, llevamos un hidrolizado de albumina con tripsina que puede ser detectado a $\lambda=215-225$ como patron interno. El cromatograma obtenido para el hidrolizado de la albumina ha sido practicamente igual en todos los casos, esto implica que el cromatograma obtenido en cada caso puede ser perfectamente comparado con los demás. Por último hay que hacer constar, que en cada muestra se ha inyectado para hacer el cromatograma parecidas cantidades de CPM.

Los resultados obtenidos lo podemos observar en las figuras 31 y 32 (se recoge, en cada caso, un experimento representativo de 3 realizados).

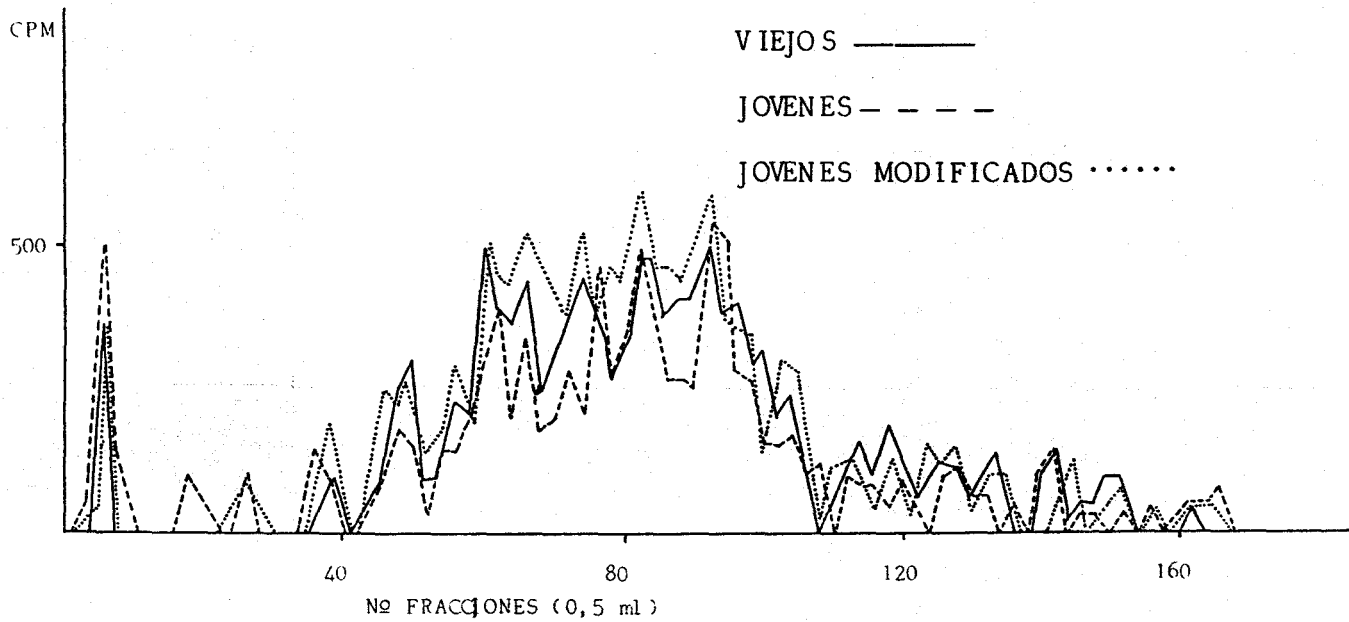


FIGURA 31. Cromatograma del hidrolizado obtenido con tripsina de la 6-PGDH.
 En la figura se muestra un experimento representativo de los tres realizados.

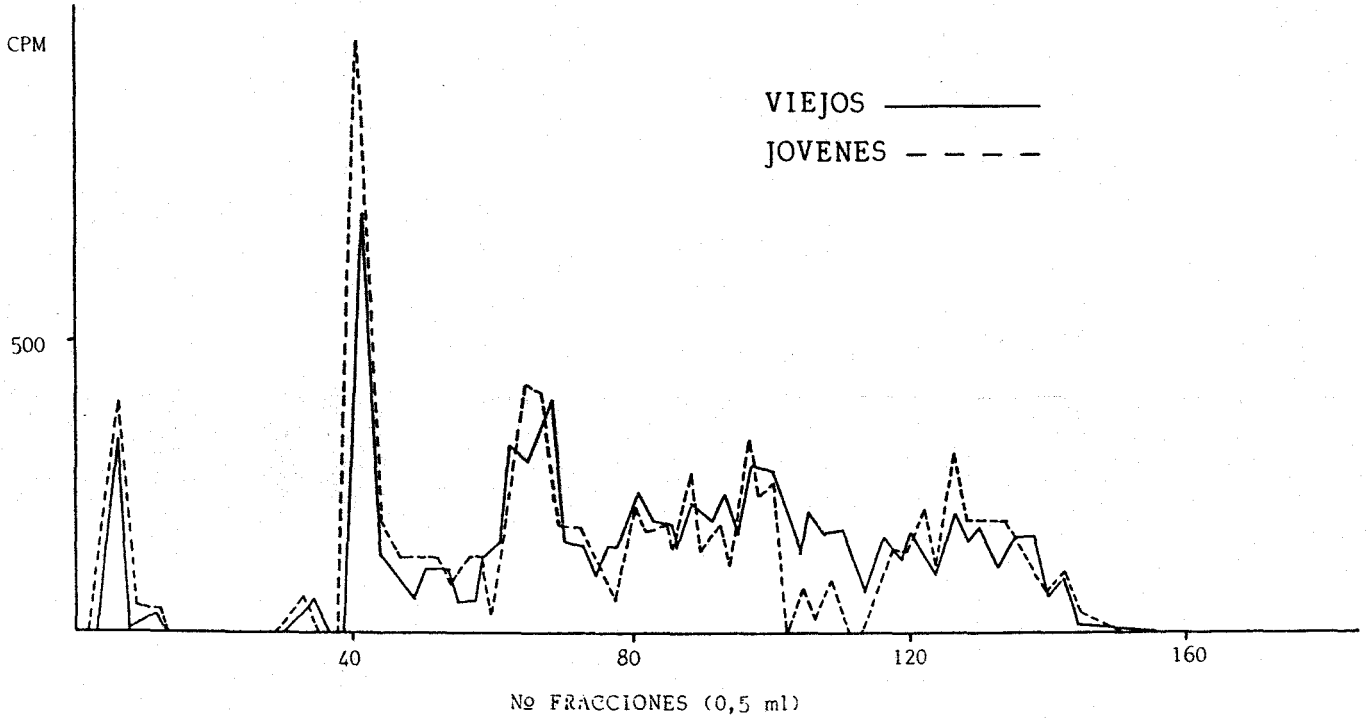


FIGURA 32 . Cromatograma del hidrolizado obtenido con Endoproteinasa Arg-C de la 6-PGDH
 En la figura se muestra un experimento representativo de los tres realizados.

Como podemos apreciar en los resultados obtenidos existe una clara diferencia entre el cromatograma de joven y de viejo cuando se utiliza tripsina para producir la hidrólisis (Fig.31). Sin embargo, cuando se utiliza Endoproteinasa Arg-C (enzima que sólo rompe a la proteína en los enlaces péptidicos que tienen como resto una arginina) para producir la hidrólisis, dicha diferencia no se aprecia (Fig.32).

Si recordamos que la tripsina rompe a las proteínas por los restos aminoacídicos lisina y arginina, podemos deducir que las diferencias encontradas, en los hidrolizados de la enzima 6-PGDH de joven y de viejo con la tripsina, estarán debidas unicamente a los restos de lisina.

Por otra parte, si tenemos en cuenta que, existe una mayor cantidad de picos en el cromatograma de la enzima de joven con respecto a la de viejo (Fig.31), esto podría implicar la existencia de un mayor número de péptidos obtenidos en la hidrólisis de la enzima de joven con tripsina y esto estaria de acuerdo con los resultados obtenidos con el reactivo TNBS que pone de manifiesto un menor número de restos de lisina ($28,1 \pm 5,4$) en la 6-PGDH de viejo frente a la de joven ($39,0 \pm 3,8$).

En la figura 31 tambien podemos apreciar el cromatograma del hidrolizado obtenido con tripsina de la 6-PGDH de joven modificãda con ascorbato en concentración de 2 mM (en estas condiciones, la valoración de restos de lisina con TNBS da $31,2 \pm 4,5$). En este caso podemos ver que el cromatograma obtenido parece ser intermedio entre el cromatograma obtenido para el joven y el obtenido para el viejo, con mayor número de picos (péptidos) que el viejo y menor número de picos que el joven.

5. DISCUSSION

5.1. ISOCITRATO DESHIDROGENASA.

5.1.1. Relación actividad/cantidad de enzima.

Los estudios de la relación actividad/cantidad de proteína para una enzima realizados mediante inmunoprecipitación, nos permiten comparar los resultados obtenidos para diferentes individuos. Diferencias en esta relación nos dará una idea de la mayor o menor actividad de la proteína enzimática en dichos individuos. Una relación menor, indicará la presencia de una proteína con menor actividad o la presencia de parte de esta proteína inactiva.

Esta técnica ha sido y es muy empleada por distintos autores (83-84). Por otra parte esta técnica de inmunoprecipitación es fiable y fácil de realizar, obteniéndose así una información muy importante en el estudio de las proteínas que queremos hacer en nuestro trabajo.

Estudios realizados en la IDH, han puesto de manifiesto, la existencia de una pérdida de actividad específica en viejos respecto a jóvenes (23,85).

En nuestro estudio de la relación actividad/cantidad de enzima para la IDH, podemos ver que no existe una clara diferencia en esta relación entre animales jóvenes y viejos (Fig.1, p.35). esto como decíamos antes, nos permite deducir que no existe una acumulación de proteína inactiva o menos activa en el viejo con respecto al joven. Por tanto, la pérdida de actividad observada en viejos debe ser debida a una disminución en la cantidad de proteína enzimática.

Al no existir pues una clara diferencia en esta relación, creemos que el estudio de las moléculas de joven y

de viejo con el objeto de ver posibles diferencias entre ellas, no merece la pena de ser continuado.

5.2. ENZIMA MALICO (NADP⁺).

5.2.1. Relación actividad/cantidad de enzima.

Los estudios de esta relación para la EM de joven y de viejo ofrecen una clara diferencia (Fig.2, p.37). Como podemos ver en dicha figura existe una relación menor en viejos con respecto a jóvenes, es decir, existe una mayor cantidad de proteína inactiva o menos activa en viejos (entorno al 36%).

Esto nos permite deducir que la menor actividad específica encontrada en animales viejos (23) puede ser debida a la presencia de proteína con menor actividad enzimática.

Este resultado nos ha inducido a estudiar las moléculas de EM de joven y de viejo para ver si encontramos la causa de esta pérdida de actividad.

5.2.2. Purificación y caracterización.

El primer paso para el estudio de las moléculas de EM de jóvenes y viejos es la purificación, a partir de los homogenados de hígado de animales jóvenes y viejos, de dicha proteína.

Para la purificación hemos puesto a punto un método basado en la cromatografía de Inmunofinidad (utilizando anticuerpos anti-EM unido a Sepharosa 4B CNBr-activada de

Pharmacia) que nos permite purificar la proteína de una forma rápida y sencilla y partir de pequeñas cantidades de muestra (evitando el inconveniente de la escasez de animales viejos), y, además, sin tener en cuenta su capacidad catalítica como sería el caso de una cromatografía de afinidad.

Este sistema de purificación ha sido utilizado, con anterioridad, para la purificación de muy diversas proteínas (86-89), con resultados muy satisfactorios. En nuestro caso, nos ha permitido obtener una proteína enzimática pura homogénea como lo demuestra criterios de pureza estudiados (fotografía 1).

Una vez purificadas las enzimas se dispone, de un material idóneo, para el estudio de las propiedades físico-químicas, cinéticas, etc.

Así, nosotros hemos procedido al estudio, en esta enzima de animales jóvenes y viejos, del: 1) peso molecular; 2) pI; 3) cinética (cálculo de la K_m (sustrato) y K_m (cofactor)).

Estos estudios no nos ofrece diferencias entre la EM de joven y la de viejo. esto por otra parte esta de acuerdo, según vimos en la introducción, con los estudios de realizados en distintas proteínas durante el envejecimiento por diversos autores (10-32).

El peso molecular para la EM de joven y de viejo es aproximadamente de 64.000 daltons por subunidad, resultado próximo al hallado por otros autores (90-91)

5.2.3. Modificaciones aminoacídicas.

Si la diferencia entre las moléculas de animales jóvenes y de animales viejos, es debida a modificaciones post-traduccionales, éstas podrían tener lugar por alteraciones, en el proceso de envejecimiento, a nivel de las cadenas laterales más reactivas de las moléculas (92). Por lo que decidimos estudiar el comportamiento de dichas moléculas enzimáticas frente a distintos reactivos específicos de aminoácidos.

Con este fin se han ensayado los siguientes reactivos específicos de aminoácidos: 1) DTNB para los grupos sulfhidrilos (-SH); 2) Dietil-pirocarbonato (DEPC) para las histidinas; 3) p-Nitrofenilglioxal (p-NFG) para las argininas; 4) Cloarmina-T (C-T) para las metioninas; y 5) Trinitro benzol-sulfónico (TNBS) para las lisinas.

Se han elegido estos restos aminoácídicos para su estudio debido:

- Los grupos -SH por su alta reactividad y estar generalmente implicados en la actividad catalítica y responsables de la estructura (93-96).
- Los restos aminoácídicos de histidina, arginina y lisina por estar frecuentemente implicados en el centro de unión del enzima con el sustrato y el cofactor (97-105).
- La metionina por ser un aminoácido con tendencia a situarse en las zonas hidrófobas de las moléculas, lo que una modificación de estas, de una forma drástica, conduciría a cambios en la estructura de la proteína (106).

De los resultados obtenidos de estos estudios podemos destacar: que los grupos -SH son muy semejantes para la EM de jóvenes y viejos, así como la importancia de estos grupos en la actividad enzimática, hecho que está de acuerdo con

algunos autores que relacionan estos grupos con el centro activo de esta enzima (77-79).

La existencia de un resto de histidina/mol menos en la EM de viejos en comparación con la de joven (en viejos hay 4 grupos/mol; en jóvenes 5 grupos/mol). Este grupo de menos parece corresponder al tipo de grupos de histidina accesibles en la proteína nativa (en joven 2,4 grupos/mol; en viejos 1,6 grupos/mol).

La actividad de la enzima decae hasta desaparecer cuando se modifican los restos de histina reactivos tanto en jóvenes como en viejos. Es importante destacar que en la EM de viejo la actividad decae más lentamente que en jóvenes. Esto puede indicar que los restos de histina en la molécula de viejo son menos accesibles debido a la modificación en uno de los restos de histidina. Chang y Hsu (107) señalan la existencia de restos de histidina y lisina en el sitio de unión para el nucleótido de piridina en la EM.

Según estudios realizados recientemente en la EM de jóvenes (80) , una arginina es fundamental para que la enzima se una al sustrato carboxilado. Los resultados obtenidos, parecen confirmar estos estudios, ya que la actividad decae cuando son modificados los restos arginina accesibles en estado nativo tanto en jóvenes como en viejos. Sin embargo, no hay variaciones en su número entre las dos proteínas estudiadas.

Tampoco se encuentran diferencias en las en el estudio de los restos de lisina ni de metionina.

5.2.4. Oxidación de la EM de joven con ascorbato.

La oxidación "in vitro" es un proceso que produce la inactivación de determinadas enzimas (40-47) debido a la oxidación de restos de aminoácidos. Nosotros efectuamos un experimento semejante al realizado por Levine (46-47) sobre la Glutamina sintetasa de E. coli.

Los resultados obtenidos en la oxidación "in vitro" de la EM con ascorbato, ponen de manifiesto, que dicha oxidación, da lugar a una pérdida de actividad, y esta es semejante a la que se produce en la enzima de viejo. También, en la enzima de joven oxidada, se valora el mismo número de restos de histidina que encontramos en la molécula de viejo. Por tanto, estos dos hechos permiten suponer que la pérdida de actividad encontrada por nosotros en la EM de viejos es debida, como hemos demostrado, a la modificación de una histidina, y esta modificación podría ser una oxidación lo que estaría de acuerdo con lo postulado por el grupo de Stadtman (40-45).

5.3. GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA.

5.3.1. Relación actividad/cantidad de enzima.

Los estudios de esta relación para la G-6-PDH de joven y de viejo ofrecen una clara diferencia ya que existe una relación menor en viejos con respecto a jóvenes, lo que permite suponer la presencia de proteína inactiva o con menor actividad en viejos (entorno al 15%) que en jóvenes (108).

5.3.2. Purificación y caracterización.

Para la purificación hemos utilizado también la cromatografía de Inmunofinidad (utilizando anticuerpos anti-G-6-PDH unido a Sepharosa 4B CNBr-activada de Pharmacia). La elución de la enzima se ha realizado, al igual que para la EM, utilizando el H₂O destilada .

En cuanto a la caracterización, estos estudios no nos ofrecen diferencias entre la G-6-PDH de joven y la de viejo. El peso molecular para esta enzima en joven y de viejo es aproximadamente de 61.000 daltons por subunidad, resultado próximo al hallado por otros autores (109-110).

5.3.3. Modificaciones aminoacídicas.

En este estudio no hemos encontrado diferencias entre la proteína de joven y de viejo en los grupos -SH, restos de histidina, arginina, metionina y lisina. Por otra parte, en la actividad catalítica, están implicados los grupos -Sh (81), histidina y arginina. Con respecto a los restos de arginina, algunos autores suponen que juegan un papel fundamental para que la enzima se una al sustrato carboxilado (111).

Estos resultados nos indican que la causa de la pérdida de actividad de esta enzima producida durante el proceso de envejecimiento tiene que ser debida a otra causa no puesta de manifiesto en este estudio.

5.4. 6-FOSFOGLUCONICO DESHIDROGENASA.

5.4.1. Relación actividad/cantidad de enzima.

Los estudios de esta relación para 6-PGDH de joven y de viejo muestran la existencia de una relación menor en viejos con respecto a jóvenes, es decir, existe en el animal viejo una cierta cantidad de proteína enzimáticamente inactiva o menos activa (entorno al 25%) que en el joven.

5.4.2. Purificación y caracterización.

Para la purificación hemos utilizado, como en los casos anteriores, la cromatografía de Inmunofinidad realizando la elución de la enzima con el H₂O destilada. En la fotografía 3 podemos observar una sola banda de proteína enzimática homogénea.

Los estudios de caracterización no nos ofrecen diferencias, al igual que ocurría con la EM y G-6-PDH, entre la G-6-PDH de joven y la de viejo. El peso molecular para esta enzima en joven y de viejo es aproximadamente de 63.000 daltons por subunidad, resultado próximo al hallado por otros autores.

5.4.3. Modificaciones aminoacídicas.

En este estudio, los grupos -SH y los restos de histidina, metionina y arginina no parecen sufrir modificaciones durante el envejecimiento. Al mismo tiempo, la modificación de los grupos -SH, y de los restos de histidina y arginina producen la pérdida de actividad enzimática, lo que parece demostrar su implicación en la

actividad catalítica de la enzima. Hecho que ha sido descrito con anterioridad por Tophan y Dalziel (112) para los restos de histidina.

los restos de lisina si muestra una diferencia significativa entre la proteína de joven ($39,0 \pm 2,8$) y la proteína de viejo ($28,1 \pm 5,4$).

5.4.4. Oxidación de la 6-FGDH de joven con ascorbato.

Este experimento se efectua con el fin de correlacionar los fenomenos de oxidación "in vitro" con la actividad catalítica de la 6-FGDH, así como, con la modificación de los distintos aminoácidos producidos por dicha oxidación.

La oxidación con ascorbato de la molécula de joven con lleva una pérdida de actividad semejante a la pérdida de actividad encontrada en los viejos. A la concentración de ascorbato utilizada en estos experimentos (2 mM), los restos de histidina no son modificados en esta enzima produciendose, sin embargo, pérdida en los restos de lisina ($31,1 \pm 4,7$ frente $39,0 \pm 2,8$). Por tanto, estos estudios, parecen indicar que la diferencias encontradas entre la molécula de joven y de viejo se pueden explicar por una oxidación de los restos de lisina en la molécula durante el envejecimiento.

5.4.5. Iodación, hidrólisis parcial y separación de los péptidos.

Mediante el estudio de la acción proteolítica de tripsina (proteasa que rompe las proteínas en los enlaces peptídicos donde existe arginina o lisina) y la Endoproteinasa Arg-C (proteasa que solo rompe los enlaces

peptídicos donde existe una arginina) sobre la 6-PGDH de joven, viejo y joven oxidada, hemos intentado corroborar o confirmar los resultados de la modificación producida en los restos de lisina descritos anteriormente.

La actuación de la Endoproteinasa Arg-C da lugar a un mapa peptídico muy semejante cuando actúa sobre la enzima de joven y la de viejo. Deducimos pues, que no existe diferencia en los restos de arginina en esta proteína durante el envejecimiento, lo que confirma los estudios realizados con el reactivo p-NPG, que cuantifica arginina.

La actuación de tripsina, sin embargo, da lugar a unos mapas peptídicos diferentes cuando actúa sobre la enzima de joven y la de viejo, lo que confirma las diferencias encontradas en los restos de lisina, con el reactivo TNBS, entre la proteína de joven y la de viejo.

Cuando se realiza este mismo experimento con la proteína de joven oxidada nos encontramos con un perfil del mapa peptídico intermedio entre el obtenido para la proteína de joven y la de viejo. Este resultado se podría justificar por el menor número de lisinas modificadas por oxidación que las encontradas en la proteína de viejo.

De todos estos datos podríamos resumir, que durante el envejecimiento se encuentran enzimas que presentan una menor actividad, EM, 6-PGDH y G-6-PDH. En el caso de la EM y 6-FGDH parece demostrado, que la pérdida de actividad puede ser debida a la modificación de un resto de histidina en la EM y de una serie de residuos de lisina en la 6-PGDH ($28,1 \pm 5,4$ frente $39,0 \pm 2,8$ en jóvenes). Al mismo tiempo, teniendo en cuenta los estudios de oxidación "in vitro" con ascorbato, podemos apuntar como la modificación más posible, la oxidación del resto de histidina en la EM y de los restos

de lisina en la 6-PGDH. Otros datos que pueden corroborar esta hipótesis es el hecho encontrado por Statdman de un aumento de grupos carbonilos en las proteínas de animales viejos, así como, en síndromes típicos de aceleración del proceso de envejecimiento (Síndrome de Werner y Progeria) (48). También, Statdman, ha demostrado el aumento de grupos carbonilos producidos por la oxidación de péptidos de polihistidina, polilisina (45).

La oxidación de restos de aminoácidos de las proteínas parece ser un hecho general y fisiológico en cualquier estadio celular, al que se le ha dado la función de marcadores para aumentar la sensibilidad a las proteasas (40-44). El hecho del aumento de concentración de estas proteínas oxidadas en animal viejo puede ser debida a:

-A) Un aumento de la capacidad o ambiente oxidante en el animal viejo, lo que está de acuerdo con la teoría de Harman del envejecimiento (51).

-B) Una disminución de la actividad de las proteasas específicas para estos marcadores oxidados. Así, algunos autores, han descrito una disminución de la actividad de estas proteasas (113-114).

Desde nuestro punto de vista, ninguna de estas dos causas son excluyentes y se pueden dar las dos, con el consiguiente aumento de estas proteínas.

6. CONCLUSIONES

1) La pérdida de actividad, producida durante el envejecimiento, de la IDH-NADP⁺ de corazón de rata, parece ser debida a una disminución de la cantidad de proteína enzimática.

2) La pérdida de actividad, producida durante el envejecimiento, de la enzima G-6-FDH de hígado de rata no es debida a la disminución de la cantidad de proteína enzimática, así como, tampoco, a modificación química producida en los aminoácidos estudiados.

3) La pérdida de actividad, producida durante el envejecimiento, en la EM de hígado de rata parece ser debida a disminución de su actividad por cambio en un resto de histidina de la proteína enzimática.

4) Los grupos -SH y los restos de histidina y arginina parecen estar implicados en la actividad catalítica de la EM de hígado de rata.

5) La pérdida de actividad, producida durante el envejecimiento, en la enzima 6-FGDH de hígado de rata parece ser debida a disminución de su actividad por cambios en los restos de lisina de la proteína enzimática (se valoran $39,0 \pm 2,8$ en la proteína de joven frente a $28,1 \pm 4,7$ en la proteína de viejo).

6) Los grupos -SH y los restos de histidina, arginina y lisina parecen estar implicados en la actividad catalítica de la enzima 6-FGDH de hígado de rata.

7) Los cambios producidos tanto en el resto de histidina de la EM, como en los restos de lisina de la 6-FGDH, producidos durante el envejecimiento, y, responsables

de la pérdida de actividad enzimática de las mismas, podrían ser debidos a una oxidación en dichos restos aminoacídicos.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Strehler, Bl.L. (1982) In Lectures on gerontology vol.1 on Biology of Ageing Part.A.Ed. Viidik. Acad. process. pp. 1-59.
- 2 Sacher, G.A. (1956); In Ciba Found Colloq Ageing, Wolstenholme GEW, O'Connor CM (eds): The lifespan of Animals. London, Churchill, vol.5, p.115.
- 3 Sacher, G.A. (1977); Finch CE, Hayflick K (eds): In Handbook of the Biology of Ageing. New York, Van Nostrand Reinhold, p. 582.
- 4 Orgel, L.E. (1963) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 49, pp. 517-519.
- 5 Ham, R.G. y Korntl, M.J. (1980) In Mechanisms of Development. The C.V. Mosly Company. St. Louis Toronto-London, pp.696-747.
- 6 Gershon, H.E. y Gershon, D. (1970) Nature 227, pp. 1214-1217.
- 7 Buchanan, J.H., Bunn, C.L., Lappin, R.I. y Etevens, A. (1980) Mech, Ageing Dev. 12, 339-353.
- 8 Wojtyk, R.I. y Goldstein, S. (1980) J. Cell Physiol. 103, 299-303.
- 9 Harley, C.B., Pollard, J.W., Chamberlam, J.W., Stanners, C.P. y Goldstein, S. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, pp. 1885-1889.
- 10 Rothstein, M. (1982) in: Biochemical Approaches to Aging. London, Academic Press, New York, pp 213-255.

- 11 Reiss, U and Gershon, D. (1976) Eur. J. Bioch. 63, 617-623.
- 12 Sharma, H.K., Prassana, H.R., Lana, R.S. and Rothstein, M. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 194, 272-282.
- 13 Sharma, H.K. and Rothstein, M. (1978) Biochemistry, 17, 2869-2876.
- 14 Gafni, A. (1981) Biochem. 20, 6035-6040.
- 15 Gorin, P., Reznick, A. y Gershon, D. (1982) Biochem. J. 202, 47.
- 16 Reznick, A. y Gershon, D. (1977) Mech. Age. Devel., 6, 345-353.
- 17 Gershon, D. (1979) Mech. Age. Devel., 9, 189.
- 18 Rothstein, M. (1977) Mech. Age. Devel., 6, 241-257.
- 19 Jacobus, S. y Gershon, D. (1980) Mech. Age. Devel., 12, 311-322.
- 20 Sharma, H.K., Gupta, S.K. y Rothstein, M. (1976) Arch. Biochem. Biophys., 174, 324-332.
- 21 Reznick, A.Z. and Gershon, D. (1979) Mech. Ageing Dev., 11, 403-415.
- 22 Machado, A., Satrustegui, J., Andres, A., Vitorica, J. y Cano, J. (1983) in: Cardiology and Aging (Ed. by Platt) pp. 65-80.

- 23 Reiss, W. y Rothstein, M. (1975) J. Biol. Chem. 250, pp. 826-830.
- 24 Vitorica, J., Cano, J., Satrustegui, J. y Machado, A. (1981) Mech. Ageing Develop. 16, pp. 105-116
- 25 Vitorica, J., Satrustegui, J. y Machado, A. (1981) Enzyme. 26, pp. 144-152.
- 26 Santa-Maria, C. y Machado, A. (1987) Mech. Ageing. Develop. 37, pp. 183-195.
- 27 Reznick, A.Z., Dovrat, L., Rosenfelder, S., Shpund, S. and Gershon, D. (1985) in: Modification of Protein during Aging, Alan R. Liss, Inc. pp.69-81.
- 28 Holliday, R. y Torrant, G.M. (1972) Nature 238, 26.
- 29 Prassana, H.R. y Lane, R.S. (1979) Biochem. Biophys. Res. Comm., 86,552.
- 30 Gershon, D., Reznick, A. y Reiss, U. (1979) In: Physiology and Cell biology of Ageing. (Clerkin A y col eds) N.Y. Raven Press., pp. 21-35.
- 31 Gershon, H. y Gershon, D. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 70,909.
- 32 Lavie, L., Reznick, A.Z. and Gershon, D. (1982). Biochem. J. 202, 47-51.
- 33 Cerami, A., Vliarsara, H. y Brownlee, M. (1987) Investigaciõn y Ciencia, 52-59.

- 34 Summerfield, J.A., Vergalla, J. y Jones, E.A. (1982) J. Clin. Invest., 69, 1337-1347.
- 35 Brownlee, M., Vlassara, H. y Cerami, A. (1983) Diabetes 32, 680-684.
- 36 Kesaniemi, Y.A., Witzum, J.L. y Steinbrecker, U.P. (1983) J. Clin. Invest., 71, 950-959.
- 37 Kohn, R.R. y Schnider, S.L. (1982) Diabetes 31, 47-51.
- 38 Rosenbloom, A.L., Silverstein, J.H., Reley, W.J. y Maclaren, N.K. (1985) Diabetes Care 6, 370-373.
- 39 Bunn, H.F. (1981) Diabetes 33, 19-25.
- 40 Stadtman, E.R., Chock, P.B. y Rhee, S.G. (1980) Fed. Eur. Biochem. Soc. Symp., 60, 57-68.
- 41 Fucci, L., Oliver, C.N., Coon, M.J. and Stadtman, R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. 80, 1521-1525.
- 42 Stadtman, E.R. (1986) TIBS, 11, 11-12.
- 43 Starke, P.E., Oliver, C.N. y Stadtman, E.R. (1987) FASEB Monogr. 1, 36-39.
- 44 Oliver, C.N., Levine, R.L. and Stadtman, E.R. (1987) J. Am. Geriatr. Soc. 35, 947-956.
- 45 Oliver, C.N., Ahn, B., Wittenberger, M.E., Levine, R.L. y Stadtman, E.R. (1985) Cellular regulation and Malignant Growth (Ebashi S. eds.) pp. 320-331., Springer-Verlag.

- 46 Levine, R.L. (1983) J. Biol. Chem., 258, 11823-11827.
- 47 Levine, R.L. (1983) J. Biol. Chem., 258, 11828-11833.
- 48 Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S. and Stadtman, E.R. (1987) J. Biol. Chem. 262, 5486-5491.
- 49 Lewin, S. (1976) Vitamin C.: Its Molecular Biology y Medical Potential, Academic Press, N.Y.
- 50 Winterbourn, C.C. (1981) Biochem. J., 198, 125-131.
- 51 Harman, D., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 7124-7128.
- 52 Ochoa, S., Mehler, A.H. y Kornberg, A. (1947) J. B.C., 167, 871-872.
- 53 Sapag-Hagar, M., Lagunas, R. y Sols, A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Comm., 50, 179-185.
- 54 Plaut, G.W.E. y Aogaichi, T. (1968) J. Biol. Chem., 243, 5572-5583.
- 55 Lowry, O.H., Rosebrogh, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) J. B.C. 193, 265-275.
- 56 Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem., 72, 248-254.
- 57 Ayala, A., F-Lobato, M. and Machado, A. (1986) FEBS Letters, 202, 102-106.

- 58 Maizel, J.V. jr (1971) in: *Methods in Virology*, vol.5, pp.179-246, Academic Press, London.
- 59 Bravo, R. and Celis, J.E. (1984) in: *Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins*. London. Academic Press.
- 60 Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.*, 82, 70-80.
- 61 Sedlak, J. y Lindsay, R.H. (1968) *Anal. Biochem.* 25, 195.
- 62 Glasser, C.B. (1970) *J. Chromatogr.*, 50, 115.
- 63 Yamasaki, R.B., Shimer, D.A. and Feeney, R.E. (1981) *Anal. Biochem.*, 111, 220-234.
- 64 Ovadi, J., Libor, S. y Elodi. P. (1967) *Biochim. Biophys. Acta.*, 2:455-450.
- 65 Ovadi, J. y Keleti, T. (1969) *Biochim. Biophys Acta* 4:365-372.
- 66 Miles, E.W. (1977) *Methods Enzymol.* Vol.XLVII, pp.431-442.
- 67 Gross, E. (1967) *Methods Enzymol.*, 11, 238.
- 68 Trout, G.E. (1979) *Anal. Biochem.*, 93:419-425.
- 69 Tuengler, T. and Piletderer, G. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 484, 1-8.
- 70 Greenwood, F.C., Hunter, W.M. y Glover, J. (1963) *Biochem. Journal*, 89:114-123.

- 71 Serrano, L., Wandosell, F., De la Torre, J. y Avila, J. (1988) *Biochem. Journal*, 252: 683-691.
- 72 Magnuson, M.A. y Nikoden, V.M. (1983) *J. Biol. Chem.*, 258:12712-12717.
- 73 Creme, G., Filliol, D. y Naksman, A. (1985) *Anal. Biochem.*, 150:332-336.
- 74 Allen, B.L. y Harris, B.G. (1981) *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2:367-372.
- 75 Nagel, W.O. y Sauer, L.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257:12405-12411.
- 76 Davisson, V.J. y Schulz, A.R. (1985) *Biochem. Journal*, 225:335-342.
- 77 Rutter, W.J. y Lardy, H.A. (1958) *J. Biol. Chem.*, 233:371-377.
- 78 Tkea, K. (1969) *Biochem.*, 66:379-387.
- 79 Reddy, V.A. (1983) *Biochem. Biophys. Acta.*, 743:268-280.
- 80 Vernon, R.G. and Hsu, R.Y. (1983) *Arch. Biochem. Biophys.*, 225, 296-305.
- 81 Yoshida, A. (1975) *Isozymes IV. Genetics and Evolution* (Markert)
- 82 Donohue, T.M., Mahowald, T.A., Adams, D.J. y Barker, K.L. (1981) *Biochim. Biophys. Acta.*, 658:356-368.

- 83 Toffoleto, O., Metters, K.M., Oliveira, E.B. Camargo, A.C.M. y Rossier, J. (1988) *Biochem. Journal*, 252:35-38.
- 84 Nishigaki, I., Ichinose, H. Tamai, K. y Nagatsu, T. (1988) 252, 331-335.
- 85 Singh, S.N. y Yadav, S.N. (1978) *Liver and Ageing*. Kitani, k. eds. Elsevier. North-Holland Biomedical Press.
- 86 Louvard, D., Vannier, C., Maroux, S., Pages, J.M. y Lazdunski, C. (1976) *Anal. Biochem.*, 76:83-84.
- 87 De Maeyer-Grignar, J., Tovey, H.G., Gresser, I. y De Maeyer, E. (1978) *Nature*, 271:622-625.
- 88 Ikeda, Y. y Steiner, M. (1976) *J. Biol. Chem.*, 251:6135-6141.
- 89 Davies, J.G. y Offord, R.E. (1988) *Biochem. Journal*, 250:389-383
- 90 Hsu, R.Y. y Lardy, H.A. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242:520-526.
- 91 Swierczynski, J. (1980) *Biochem. Biophys. Acta.*, 616:10-21.
- 92 Wolff, S.P., Garner, A. y Dean, R.T. (1986) *TIBS* 11, 27-31.
- 93 Gilbert, H.F. (1982) *J. Biol. Chem.*, 257:12086-12091.

- 94 Gilbert, H.F. (1984) *Methods Enzymol.*, 107:330-351.
- 95 Mannervik, B. y Axelsson, K. (1975) *Biochem. Journal.* 149:785-788.
- 96 Wood, D., Darlison, M.G., Wilde, R.J. y Guest, J.R. (1984) *Biochem. Journal*, 223:507-517.
- 97 Nakagawa, Y. y Bender, M.L. (1970) *Biochem.*, 9:259-257.
- 98 Kenney, W.L., Walker, W.H. y Singer, T.P. (1972) *J. Biol. Chem.*, 247:4510-4513.
- 99 Snell, E.E. y Di Mari, S.J. (1970) *Enzymes 3rd Ed.*, 2:335-370.
- 100 Boggaram, V. y Mannervik, B. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 83:558-564.
- 101 Kotliar, A.B. y Vinogradov, A.D. (1984) *Biochem. Int.*, 8:545-552.
- 102 Marshall, M. y Cohen, P.P. (1980) *J. Biol. Chem.* 255:7301-7305.
- 103 Hederstedt, L. y Hatefi, Y. (1986) *Arch. Biochem and Biophys.*, 247:346-354.
- 104 Cole, S.C.J., Yaghmaie, P.A., Butterworth, P.J. y Yon, R.J. (1986) *Biochem. Journal*, 233:303-306.
- 105 Gibbs, P.N.B. y Jordan, P.M. (1986) *Biochem. Journal*, 236:447-451.

- 106 Payne, J.W. y Tuffnell, J.M. (1981) FEMS Microbiol. Lett., 12:279-282.
- 107 Chang, G.G. y Hsu, R.Y. (1977) Biochem. Biophys. Acta, 483:28-235.
- 108 Rodgers, G.P., Lichtman, H.C. y Sheff, M.F. (1983) J. Am. Geriatr. Soc., 31:8-11.
- 109 Levy, H.R. y Christoff. M. (1983) Biochem. Journal., 214:959-965.
- 110 Kahler, S.G. y Kirkman, H. (1083) J. Biol. Chem., 236:754-758.
- 111 Levy, H.R., Ingulli, I. y Afolayan, A. (1977) J. Biol. Chem., 252:3745-3751.
- 112 Tophan, C.M. y Dalziel, K. (1986) Eur. J. Biochem., 155:87-94.
- 113 Goldstein, S., Stotland, D. and Cordeiro, R.A.J. (1976) Mech. Ageing Dev., 5:221-233.
- 114 Dice, J.F. (1982) J. Biol. Chem., 257:14624-14627.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Manuel Enrique Gordillo Rueda titulada Estudios de las modificaciones posttraduccionales de proteínas durante el proceso de envejecimiento acordó otorgarle la calificación de Apto cum laude

Sevilla, 28 de Abril 1989

El Vocal,

A. Ceballos

El Presidente

M. Muñoz

El Vocal,

M. S. S. S.

El Secretario,

Josefa Cano

El Vocal,

A. J. Regle

El Doctorado,

Manuel E. Gordillo