

Tesis de Posgrado

Estudios sobre tropomiosina de invertebrados

De Milstein, Celia Prilleltensky

1963

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

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

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

Cita tipo APA:

De Milstein, Celia Prilleltensky. (1963). Estudios sobre tropomiosina de invertebrados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1163_DeMilstein.pdf

Cita tipo Chicago:

De Milstein, Celia Prilleltensky. "Estudios sobre tropomiosina de invertebrados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1963.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1163_DeMilstein.pdf

FCEN-BA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudios sobre tropomiosina de invertebrados

Celia P. de Milstein

TESIS: 1163

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química

Año 1963

Este trabajo fué iniciado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Cambridge, Inglaterra y completado en la División de Biología Molecular del Instituto Nacional de Microbiología. El Dr. K. Hailey propuso el tema y dirigió el trabajo con dedicación máxima durante mi estada en Inglaterra, brindándome la oportunidad de entrenarme en la práctica de la investigación biológica. El Dr. C. Milstein, ex-jefe de la División Biología Molecular, supo brindarme su inestimable consejo y estímulo para la continuación del mismo. A ambos mi más profundo agradecimiento.

Al Dr. I. Pirotsky, que me otorgó la licencia que me permitió trabajar en Inglaterra y su estímulo entusiasta que dotó al Instituto no sólo de material sino del clima de tranquilidad y dedicación apropiados para la investigación.

A los Drs. D. S. Hartley y P. Johnson por sus provechosas discusiones.

Al Dr. O. Kühnemann, Director del Centro de Investigaciones de Biología Marina, por el suministro de choigas desde Puerto Deseado.

A la Sra. B. D. Brown por haber realizado los análisis de aminoácidos.

Al Dr. M. Vernengo por haber sintetizado hipuril arginina.

Al Dr. R. F. F. Celis por enseñarme el manejo de la ultracentrífuga.

Al Dr. M. Brennan por su ayuda en los cálculos del experimento

de difusión.

A la Sra.M.V.de Milstein por su inapreciable ayuda en la preparación de los originales.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por haberme otorgado una beca con la que realicé parte de este trabajo.

A todos los que me ayudaron de uno u otro modo, mi más sincero agradecimiento.

ABREVIATURAS

Las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos son las propuestas por ~~Mad~~ y Edsall (1947)

TM_A : tropomiosina A

TM_B : tropomiosina B

PM : paramiosina

ATP : adenosina trifosfato

TCA : ácido tricloroacético

FENB: 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno

DNP : N-2,4-dinitrofenil

EDTA: sal disódica del ácido etileno-diamino-tetraacético

BAEK: benzoinil-arginil-etil ester

INDICE

	<u>Pag.</u>
INTRODUCCION	1
TM_A (paramiosina). Nucleo trepomiosina. Función de la trepomiosina. Configuración molecular de la TM_A (paramiosina).	
CAPITULO I. <u>Material y Métodos</u>	13
Polvo alcohólico de músculo aductor de <u>Aulacomya magellanica</u> (cholga). TM_A. TM_B. Enzimas. Concentración de proteína. Determinación de constantes físicas. Ultracentrifugación. Medidas de difusión. Medidas de viscosidad. Procedimiento general para digestiones enzimáticas. Material difusible y no difusible. Material difusible. Material no difusible: fragmento tripsico "F". Fragmento quimotripsico "Ft." Hidrólisis ácida total. Análisis de aminoácidos. Grupos N-terminales. Grupos C-terminales. Cenizas. Metales en TM_A de <u>Pinna</u>. Procedimientos ionoforéticos. Técnica de "fingerprint". Reacciones de coloración sobre papel.	
CAPITULO II. <u>Trepomiosina de Aulacomya magellanica</u>	31
Propiedades fisicoquímicas. Constante de sedimentación y peso molecular. Viscosidad. Espectro de absorción. Grupos N-terminales. Grupos C-terminales. Comentario.	
CAPITULO III. <u>Generalidades sobre la Hidrólisis enzimática de Proteínas</u>	43
Productos de la proteólisis. Hidrólisis tripsica de TM_A de <u>Pinna</u>. Velocidad y extensión de la acción de la tripsina sobre TM_A de <u>Pinna</u>. Cinética de la pro-	

teólisis. Estudio comparativo de la digestión tríp-
sica de TM_A de Pinna mobilis, Pecten maximus y Aula-
comya magellanica.

CAPITULO IV. <u>Productos de la Digestión Trípica de TM_A de <u>Pinna</u></u>	68
Material no dializable; fragmento trípico. Propie- dades químicas. Propiedades físicoquímicas. Estabi- lidad del fragmento trípico frente a la ulterior digestión por tripsina. Material dializable.	
CAPITULO V. <u>Acción de la Quimiotripsina sobre TM_A de <u>Pinna</u></u>	94
Velocidad y extensión de la acción de la quimotrip- sina sobre TM_A de <u>Pinna</u> . Productos de la digestión quimotrípsica.	
CAPITULO VI. <u>Digestión Trípica de las TM_A y TM_B de <u>Pecten</u></u> <u>maximus</u>	101
Digestión trípica de miosina.	
CAPITULO VII. <u>Discusión</u>	106
RESUMEN	117
BIBLIOGRAFIA	121

INTRODUCCION

Las tropomiosinas son un grupo de proteínas aisladas a partir de músculos estriados y lisos de diversas especies de vertebrados e invertebrados. Se caracterizan por su composición de aminoácidos, asimetría molecular, relativa facilidad para cristalizar, relativa estabilidad frente a solventes orgánicos y por dar el modelo de α -hélice por difracción de rayos X.

La tropomiosina fué aislada por primera vez por K. Bailey en 1946 de las fibras del músculo estriado y cardiaco del conejo. Esta globulina de carácter asimétrico ha sido llamada tropomiosina, no para describir su función, la que aún no se conoce claramente, sino para implicar que por sus propiedades es un prototipo de miosina. La evidencia surge en parte de la consideración de sus propiedades físicas y su composición de aminoácidos y más particularmente su relación al grupo de proteínas keratina-epidermina-miosina-fibrinógeno como lo revelan estudios de difracción de rayos X y de microscopía electrónica realizados por Astbury, Reed y Spark (1948). Su composición de aminoácidos es similar a la de la miosina pero no idéntica. Los puntos isoeléctricos y algunas propiedades de solubilidad son también similares. Ambas, miosina y tropomiosina, poseen un espectro de difracción de rayos X del tipo de la α -keratina.

Más tarde, Tsao y colaboradores, (1954, 1957) utilizando el método de Bailey (1948) tal cual o con ligeras modificaciones, aislaron tropomiosina y nucleotropomiosina de músculos estriados y lisos de diferentes especies, vertebradas e invertebradas.

Cuando Bailey aplicó su método de extracción (1948) a los músculos aductores de Pinna nobilis y Ostrea (1956), notó que la fibra secada con alcohol y tratada con KCl 1M daba un extracto proteico viscoso que, a diferencia de la tropomiosina de conejo, se desnaturalizaba al acidificar a pH 4.6. Cuando el extracto fué dializado contra concentraciones decrecientes de dicha sal, apareció un precipitado de agujas cristalinas de una globulina desconocida que tenía características de miosina y tropomiosina. En la misma publicación Bailey sugirió su posible relación con la paramiosina de Schmitt (1947) y Bear (1944). La composición de aminoácidos de esta proteína demostró ser la de una tropomiosina y la llamó tropomiosina globulínica y más tarde, tropomiosina de invertebrados primero y tropomiosina insoluble en agua después (Bailey, 1956-1957) para distinguirla de la variedad soluble en agua encontrada por Rüegg en los músculos de los mismos invertebrados.

Esta variedad soluble fué purificada por Bailey y Rüegg combinando el método de extracción usado en la obtención de tropomiosina insoluble en agua con la cristalización isoelectrica y la precipitación alcohólica y salina. De este modo aislaron en forma cristalina, la variedad soluble a partir de músculos aductores estriados y lisos de Pecten maximus.

Independientemente, Laki en 1957 aisló de Venus mercenaria una tropomiosina insoluble, que daba el mismo tipo de cristales que la de Pinna y que purificó por un método diferente.

Komins, Saad y Laki informaron en 1957 el aislamiento de dos diferentes tipos de tropomiosina de tres phyla de invertebrados (moluscos, anélidos y artrópodos). Ellos distinguieron estas dos tropomiosinas por sus diferentes rangos de precipitación con sulfato de amonio, llamando a la que precipita entre 26 y 36 % de saturación, tropomiosina A y a la que precipita entre 40-55 % de saturación, tropomiosina B.

Los términos tropomiosina de invertebrados, tropomiosina globulínica, tropomiosina insoluble en agua (escuela de Bailey), tropomiosina A (Laki et al.) y paramiosina (Schmitt y col., Szent Györgyi), fueron usados independientemente refiriéndose a la que es ahora considerada como una misma proteína. Los músculos de invertebrados contienen junto con la tropomiosina globulínica o tropomiosina A, una cantidad mucho más pequeña de la variedad soluble en agua, llamada por Komins, Saad y Laki (1957) tropomiosina B.

En adelante, siguiendo a Bailey (1954) usaremos la notación TM_A (paramiosina) y TM_B para las variedades insoluble en agua y soluble en agua respectivamente.

Puede decirse que todos los tipos de músculo contienen una proteína del tipo de la tropomiosina. La TM_B ha sido aislada del músculo estriado y liso de vertebrados e invertebrados; la TM_A en cambio sólo ha sido obtenida del músculo liso de invertebrados (espátales).

mente aductores de moluscos) en los que se encuentra en gran cantidad.

La tabla 1 presenta algunas características de las tropomiosinas aisladas de diferentes especies.

La similitud de la TM_A (paramiosina) con los componentes conocidos del músculo es muy curiosa. En muchos aspectos, esta proteína es tan similar a la miosina que después de su aislamiento y antes que fuera hecho, su análisis de aminoácidos fué considerada como una proteína del tipo miosina (Bailey, 1956; Locker y Schmitt, 1957). A semejanza de la miosina, tiene pronunciadas propiedades de globulina y es extremadamente asimétrica, como lo indican su fuerte birrefringencia (Ranzi, citado por Bailey, 1956) y su alta viscosidad intrínseca (Bailey, 1956). Ambas proteínas dan un modelo de difracción típico de α -queratina aunque la tropomiosina dá los ángulos pequeño y ancho de los modelos de difracción de rayos X, mientras que la miosina dá solo el ángulo ancho (Aubury y Dickinson, 1940; Cohen y Szent Györgyi, 1957). Elliot y Worthington (1959) sugirieron que desde el punto de vista estructural parecía no haber gran diferencia entre miosina y paramiosina y bien podía ser que las diferencias fueran debidas a dos arreglos diferentes de unidades proteicas similares. Otra propiedad común es la incapacidad del reactivo de Sanger (FDNB) para poner en evidencia un grupo N-terminal en ambas proteínas (Bailey, 1951, 1957). Sin embargo, la TM_A no tiene actividad de ATPasa y ninguna de las otras actividades biológicas características de la actina, miosina o actomiosina.

Características analíticas y fisicoquímicas

Animal	Músculo	Cantidad presente %			Constante de sedimentación 10^{-13}	Constante de difusión $(10^{-7} \text{ cm}^{-2} \text{ seg}^{-1})$
		peso húmedo	peso seco	proteína miofibrilar		
Conejo	esquelético	0.5		12	2.6 (e=0.6)	2.4 (e=0.6)
"	"				2.95(e=0)	4.5 (e=0)
Cerdo	cardíaco	0.31	1.16	4.2		
rata	esquelético	0.21				
Carpa	esquelético	0.40			2.7	
Paloma	pechuga	0.59				
Sapo	esquelético	0.41				
Camarón	esquelético					
Serpiente		0.55				
Cangrejo		0.18				
Vaca	embriónico	0.09	1.23	10.5		
	útero grávido			11.1		
	útere				2.95 (e=0)	
	vejiga				2.95 (e=0)	4.5 (e=0)
Pato	estómago	1.1				
Sepia	manto					
Calamar		0.38				
<u>Pinna</u> <u>ovata</u>	aductor		30°		3.1 (e=0)*	2.21 (e=0)*
Ostra	aductor		25°			
<u>Pecten</u> <u>Maximus</u>	aductor liso		30°		3.0 (e=0)	
	aductor estriado		5°		3.0 (e=0)	2.3 (e=0.22)
<u>Phormia</u> <u>regina</u>	estado larval				2.6(e=0)	
	estado adulto				2.5	

* Estos datos se refieren a TM_A

Datos obtenidos de: Perry (1960); Jen y col. (1958); Kamins y col. (1962).

las tregoninas

Peso molecular	Forma molecular (a/b)	Residuos N-terminales	Residuos C-terminales	Forma cristalina.
56.200	21	Ninguno	{ 1 leu. 1 ser.	Láminas
89.000	36	Ninguno		
1.000-80.000	22	Ninguno		Agujas
				Agujas
17.000-135.000	50	Ninguno	1 leu, 1 Asp- { 1 leu, (NH ₂) 1 ser	Agujas finas Agujas gruesas
68.000	55	Ninguno (?)		Agujas
54.000				
135.000*	1400 Å x 18,5 Å			Agujas *
				Agujas
				Agujas*
				Láminas
				Agujas*
84.000	39			Agujas finas
65.600	28			Agujas finas

La diferencia más sorprendente entre TM_A y TM_B reside en sus solubilidades: la TM_A es insoluble hasta que la fuerza iónica alcanza 0.1 mientras que la TM_B es muy soluble aún en agua a pH neutro. La menor solubilidad de la TM_A puede ser parcialmente explicada por el aumento de arginina a expensas de lisina y por la disminución de carga neta a pHs fisiológicos como lo muestra la movilidad electroforética o la composición de aminoácidos (Kornitz y col., 1957; Bailey y Rüegg, 1960)

La viscosidad de las soluciones de tropomiosina del tipo soluble (grupo B) disminuye drásticamente cuando su fuerza iónica aumenta de 0.0 a 0.03 (Bailey, 1948). Este fenómeno constituye una característica distintiva de este grupo de tropomiosinas y ha sido interpretado por Tano, Bailey y Adair (1951) como un fenómeno de desagregación debido en gran parte al debilitamiento de las fuerzas electrostáticas a medida que la fuerza iónica se acrecienta.

Otra diferencia sorprendente entre las tropomiosinas soluble e insoluble reside en sus valores de viscosidad intrínseca. La viscosidad intrínseca de TM_A es cinco veces la de la TM_B (Bailey, 1956; Kay y Bailey, 1958; Rüegg, 1959). Esto es índice de la extrema asimetría de la molécula de TM_A .

Kornitz y col., (1957) determinaron las constantes de sedimentación de tropomiosinas de diferentes phyla y obtuvieron un valor extrapolado de alrededor $3 \cdot 10^{-13}$ s. para todas ellas, el que concuerda con los resultados de Kay (1958) y Rüegg (1959).

Considerando la composición de aminoácidos y algunas propiedades físico-químicas, ambas tropomiosinas tienen mucho en común; asime-

tría , relativa estabilidad frente a los solventes orgánicos, alto contenido de grupos cargados , ausencia de prolina y triptófano y la ausencia de grupos amino N-terminal revelables por el método de Sanger. Sin embargo, las diferencias que muestran en solubilidad, movilidad electroforética , viscosidad intrínseca, rango de precipitación, comportamiento frente a la tripsina (como se verá más adelante) y el hecho de que coexistan en algunos músculos, demuestra que no son estrictamente análogas (Kominz,et.al.,1957; Rüegg, 1959; Bailey y Rüegg, 1966).

TM_A (Paramiosina)

Bear (1944) describe en la parte lenta del músculo aductor de molusco una clase especial de fibra, que por métodos de rayos X da un modelo característico de ángulo pequeño con un espacio axial de 154 Å y un período completo de repetición de 725 Å , además del ángulo ancho del modelo tipo α . Hill y colaboradores, (1945) en una investigación paralela, aislaron un tipo de fibrilla que mostró en el microscopio electrónico, el mismo período de repetición, al que llamaron paramiosina.

Estudios preliminares con rayos X, de cristales de TM_A secados formando un film (Beighton citado por Bailey,1956) mostraron un

fuerte modelo de tipo α y un espacio meridional de 70 \AA el que coincidía con una de la dos refracciones fuertes obtenidas por Bear. Esto, así como la presencia de grandes cantidades de TM_A en los músculos aductores de lamelibranquios (25-30 % de la proteína total), sugirieron a Bailey (1956) la posibilidad de que dicha proteína fuera responsable de la estructura de la paramiosina. Los cristales de TM_A aislados de las fibrillas de paramiosina y coloreadas por el método usado por Hall y col., (1945) dieron el mismo modelo en bandas, (Hanson y col., 1957). Además, Hodge (1952) encontró que las fibrillas reconstituidas de paramiosina daban origen a un nuevo período de 1400 \AA , dimensión propuesta por Kay (1958) para la longitud de la molécula de TM_A en base a medidas de dispersión de la luz, sedimentación-difusión y viscosidad. Todos estos resultados han llevado a varios autores a concluir que la paramiosina y la TM_A son idénticas (Hanson y col., 1957).

Sin embargo, trabajos recientes de Riddiford y Scheraga (1962) dan para la PM de Venus mercenaria un peso molecular muy diferente al obtenido para la TM_A de Pinna nobilis por Kay (1958), si bien el método utilizado es diferente, lo que arrojaría una sombra de duda sobre dichas conclusiones.

Nucleotropemiosina

La tropemiosina aislada por Bailey no contiene ácido nucléico, pero Hamoir (1951) aisló por el método de Bailey (1948), a partir de múscu-

lo estriado de carpa, tropomiosina libre y tropomiosina conteniendo ácido nucleico. Este complejo pudo ser cristalizado y contenía de 10-20 % de ácido nucleico del tipo pentosa, no pudiendo diferenciarse electroforéticamente de la proteína libre. Sheng y Tsao (1954) aislaron nucleotropomiosina de diferentes especies, con un contenido de ácido nucleico (tipo pentosa) que oscilaba entre 0.7 % en estómago de pato a 16-17 % en útero y corazón de buey y músculo esquelético de cangrejo. No se sabe con certeza si la tropomiosina existe in situ como una ribonucleoproteína. Parece probable que la tropomiosina una vez extraída, bajo condiciones de fuerza iónica y pH apropiados, forme un complejo con ácido nucleico proveniente de las distintas estructuras presentes en la célula del músculo; en otras palabras se trataría de una contaminación de la ribonucleoproteína que se aísla independientemente de la miofibrilla. Así lo sugeriría el hecho de encontrar: 1) cantidades variables de ácido nucleico en tropomiosina de un mismo origen. 2) La cantidad de ácido nucleico en la nucleotropomiosina de corazón de cerdo aumenta con el grado de desintegración del tejido. 3) El ácido nucleico y los componentes proteicos no parecen estar asociados ya que migran independientemente por electroforesis.

Función de la tropomiosina

Poco se sabe acerca del rol de la tropomiosina. El hecho de que sólo ha sido aislada a partir del músculo y que se localice

en la miofibrilla (Perry, 1953) sugiere que tiene una función contráctil o es un componente estructural esencial del sistema contráctil.

En vista de ciertas semejanzas de la tropomiosina con la miosina, Bailey (1946) sugirió que la tropomiosina podría ser una sub-unidad de la miosina. Esta teoría sedujo a muchos autores -Komaz (1954) y Laki (1958, 1962) entre otros - quienes trataron de aportar bases teóricas e experimentales tendientes a sustentarla. Laki y col. (1958) y Laki (1962) sugieren una relación estrecha de las propiedades inmunológicas de la miosina y la TM_A .

Estos autores afirman que la TM_A se encontraría en los músculos de vertebrados, formando parte de la molécula de miosina. En los músculos de invertebrados en cambio, donde la cantidad de miosina es mucho menor, la TM_A se encontraría al estado libre. El contenido ligeramente más elevado de tropomiosina^{que} se encuentra en los músculos de animales jóvenes y fetos sustentaría esta idea (Perry, 1960). Sin embargo, no hay por el momento evidencia sólida en apoyo de esta teoría.

Como ya se ha visto, la TM_A es idéntica al componente proteico responsable de la estructura de paramiosina y que según Schmitt y col., (1947) no tiene una función contráctil, sino una puramente mecánica. Por otra parte los datos de difracción de rayos X no aportan pruebas de que filamentos individuales de músculo liso se acorten al contraerse (Bear y Selby, 1956), y de ahí que se excluya una función contráctil. La presencia de grandes cantidades de TM_A en el músculo tónico de moluscos sugiere la posibilidad de que esta proteína fuera

responsable de la habilidad de dichos músculos de sostener la tensión durante largos períodos de tiempo sin ningún consumo de energía, posiblemente por medio de un mecanismo especial de "agarre" ("catch"). Este fué sugerido por Hügge (1959) a raíz de que el ATP en concentraciones fisiológicas interactúa con la TM_A dando un producto más soluble de diferente movilidad electroforética. Dicho autor observó que las fibras artificiales de TM_A eran plastificadas por el ATP.

En cuanto a la TM_B , Tsao y sus col. (1955, 1957) le atribuyen la función de "sostener" ("holding") el estado contraído e relajado. Esta idea está basada en el hallazgo experimental: los músculos lisos de vertebrados contienen más treponosina que los estriados. Sin embargo, Perry y Corsi (1956) demostraron que la TM_B constituía por lo menos el 10 - 12 % del total de la proteína miofibrilar de músculo estriado de conejo. Esto es más que el doble de la cantidad informada por la escuela de Tsao para varios músculos estriados y lisos.

Configuración molecular de la TM_A (paramiosina)

El valor del coeficiente de fricción de esta proteína (Kay, 1958) - uno de los más altos registrados para una proteína de peso molecular comparable - indica la pronunciada asimetría de la molécula de treponosina, un hecho ya observado por Bailey y colaboradores (1948) en la treponosina de conejo.

Las medidas de disimetría angular realizadas por dispersión de la luz permiten afirmar que la molécula tiene forma de bastón o bien es una espiral monodispersa dispuesta al azar (Kay, 1958) ; consideraciones teóricas derivadas de estas medidas y de los datos de viscosidad de una solución de TM_A de Pinna, indujeron a Kay (1958) a proponer para esta proteína la forma de un bastón de longitud molecular de 1400 Å y diámetro medio de 10.5 Å . Esta longitud es aproximadamente el doble del período de 725 Å encontrado en fibrillas intactas de paramiosina (Dear, 1944; Hall et al., 1945) e igual a la banda de repetición de la paramiosina reconstituida en medio ácido por Hodge (1952) , fibrilla que él llamó " paramiosina de período largo".

El ángulo ancho obtenido por difracción de rayos X puede ser usado para determinar la configuración de la cadena principal de las regiones cristalinas de las moléculas de proteínas fibrosas. Investigaciones preliminares de rayos X llevadas a cabo por Beighton (Malley, 1956) sobre films orientados formados por cristales húmedos de TM_A , mostraron un fuerte modelo de tipo α . Este método sin embargo, no permite estimar el contenido helicoidal de la molécula. Esto puede ser hecho por estudios de dispersión óptica rotatoria de soluciones acuosas. Tales estudios fueron llevados a cabo por Kay (1958) sobre TM_A de Pinna . Dicho autor concluyó que la molécula de esta proteína, al igual que la paramiosina de Venus , se presenta probablemente en la mayor parte de su longitud con la configuración de α -hélice. Uno de los factores que contribuye al predominio del α -hélice en la TM_A es

la ausencia en su estructura de prolina y sistina (Bailey, 1957) ,
dos aminoácidos que se sabe impiden la formación de la hélice (Sanger,
1956; Szent - Györgyi y Cohen, 1957) .

A continuación se consignan las constantes físicas químicas
obtenidas por Kay en un estudio detallado de T_M^A de Pinna (Bailey,
1958) : (Tabla II)

En el presente trabajo se describe el aislamiento de tro-
pomisina a partir del músculo aductor de un molusco argentino (Aula-
comaya magellánica) . Se estudiaron algunas de las características de
dicha proteína a fin de compararla con la tropomisina A obtenida a
partir del mismo músculo de los moluscos europeos Pinna nobilis y
Pecten maximus .

Además se estudió la acción prolongada de enzimas proteolíticas
sobre la tropomisina A encontrándose que aparte de bastante material
difusible , quedaba un fragmento que apesar de contener uniones pep-
tídicas teóricamente susceptibles a la acción enzimática no era ulterio-
rmente atacado por la enzima . El fragmento fué purificado y se estudia-
ron sus propiedades físicas y químicas a fin de caracterizarlo y dife-
renciarlo de la proteína nativa.

Finalmente se hizo un estudio comparativo del comportamiento
de las tropomisinas A y B frente a la acción de la tripsina .

TABLA II

$$n_{20}^0 = 3.01 \times 10^{-13}; D_{20,w} = 2.21 \times 10^{-7}; f/f_0 = 2.9$$

$$\bar{v} = 0.736 \text{ (calc. } 0.729\text{)}; [\eta] = 2.4$$

Peso de la partícula (s y D)	= 131,000
" " " (dispersión de la luz)	= 137,000
" " " (presión osmótica en urea)	= 133,000

La dispersión de la luz sugiere:

(a) bastón de 1400 Å ó

(b) espiral distribuida al azar de 960 Å

De $[\eta]$ y \bar{v} , relación axial = 72

p. ejem. para bastón de 1400 Å, diámetro = 19.4 Å

De n , \bar{v} y M , diámetro = 17.5 Å coincide aproximadamente con el valor calculado para el modelo bastón.

(Nota: longitud calculada utilizando $[\eta]$ y M para espiral distribuida al azar = 540 Å; según (b) 960 Å)

Rotación específica $(\alpha)_D$ pH 7	= 11.7°
Constante helicoidal, b_D , de representación de Moffit	= -650°
Rotación específica (α) en dm urea	= -109°
Constante de dispersión, λ_C en dm urea	= 2100 Å

Capítulo I

MATERIAL Y METODOS

Pelvo Alcohólico de Músculo Aductor de Aulacomya magellanica (cholga)

La preparación del pelvo alcohólico se basa en el método descrito por Bailey (1956) para la preparación del pelvo alcohólico de músculo aductor de Pinna, con ligeras modificaciones.

Lotes de cholgas (*Aulacomya magellanica*) fueron enviados periódicamente por la estación de Biología Marina de Puerto Deseado en botellas e bolsas de plástico conteniendo agua de mar y mantenidos a una temperatura entre 0° y 4°C. Se extrajeron los músculos aductores que inmediatamente fueron congelados.

Los músculos se licuaron con 2 a 3 volúmenes de agua, se centrifugaron y el precipitado fué lavado una vez con agua a 4°C, dos veces con etanol frío y secado con éter frío en un buchner primero y luego extendido sobre papeles de filtro por una noche. El pelvo alcohólico así obtenido se mantiene perfectamente en heladera durante un año.

TM_A: La TM_A fué preparada a partir del pelvo alcohólico del músculo aductor de Pinna nobilis, Pecten maximus y Aulacomya magellanica por

o: método de Bailey (1956). Las muestras usadas fueron recristalizadas por lo menos 3 veces .

TM_R: Una muestra preparada según el método de Bailey y Rüegg (1960) fué amablemente cedida por el Dr. J.C. Rüegg.

Tripsina : Fué usada la tripsina una vez cristalizada (50% Mg SO₄) de los laboratorios Armour y Worthington Biochemical Corp.

Quimotripsina: Se utilizó la quimotripsina cristalizada de los laboratorios Novo y quimotripsina α , 3 veces cristalizada de Nutritional Biochemical Corp, Cleveland, Ohio.

Carboxipeptidasa A: Se utilizó una suspensión en agua tres veces cristalizada, libre de quimotripsina, de Worthington Biochemical Corporation Freehold, New Jersey y Nutritional Biochemical Corp, Cleveland, Ohio.

Carboxipeptidasa B : Se prepararon 2 lotes: uno a partir de pancreas de vaca por el método de Folk y Gladner (1958) y el otro partiendo de pancreas de porcino según el método de Folk y col. (1960). Su actividad se midió utilizando en algunos casos hipuril arginina preparada gentilmente por el Dr. M. Vernengo y en otros el mismo reactivo de Mann Research Laboratories.

Elastasa: Se utilizó una suspensión de elastasa, 3 veces cristalizada de los laboratorios Nutritional Biochemical Corp.

Pepsina: Se utilizó enzima 3 veces cristalizada de Nutritional Biochemical Corp.

Concentración de proteína : Esta fué determinada por el micro método de Kjeldahl adaptado por Chubball, Rees y Williams (1945) tomando 18.5

y 19 % como los contenidos de nitrógeno de TM_A de Pinna nobilis y Pecten saxiosus respectivamente (Bailey y Rüegg, 1960) e por densidades ópticas a 278 $m\mu$. El coeficiente de extinción determinado en una solución de ClK M pH 7.5 es de $E_{1cm}^{1\%} = 1.9$ valor que coincide con el contenido de tirosina que da el análisis de aminoácidos (Bailey y Rüegg, 1960). La TM_A no contiene triptofano, de ahí que la tirosina es el único aminoácido responsable de la absorción a 278 $m\mu$ (Beaven y Holiday, 1952). En general se consideró más seguro determinar las concentraciones de proteínas por el primer método ya que algunas preparaciones de TM_A de Pinna dieron valores del coeficiente de extinción muy altos, que no corresponden con su contenido en tirosina.

Determinación de constantes físicas.

Todas las determinaciones físicas se realizaron en soluciones de ClK fosfato de la siguiente composición :

ClK 0.3M, Na_2HPO_4 0.035M, NaH_2PO_4 0.015^M, pH 7.0 .

Ultracentrifugación :

Las mediciones se realizaron en una ultracentrífuga analítica Spinco modelo E. Las medidas de sedimentación se efectuaron a 59,780 r.p.m. a varias concentraciones de proteína. El logaritmo de la distancia del límite solución-solvente al eje de rotación se representó en función del tiempo. La inclinación de la recta obtenida fue utilizada para calcular las constantes de sedimentación para cada concentración de proteína de acuerdo a la fórmula

$$s = \frac{1}{\omega^2 x} \frac{dx}{dt}$$

dónde x es la distancia en cm. del límite solución-solvente al eje de rotación, t es el tiempo en segundos y ω es la velocidad angular en

radianes por segundo.

$$s = \frac{2.303 \, d \log x/dt}{60 (\omega^2)} = \frac{(\text{pendiente } \phi (2.303/60))}{\left[2 \pi \frac{59.780}{60} \right]^2}$$

Las constantes fueron corregidas para la viscosidad y densidad del agua a 20°C como lo describieron Svedberg y Pedersen (1940).

$$s_{20,w} = s \frac{\eta}{\eta_{20,w}} \frac{(1 - \bar{V} \rho_{20,w})}{(1 - \bar{V} \rho_t)}$$

donde s es la constante de sedimentación observada. El término

$\left(\frac{\eta}{\eta_{20,w}} \right)$ en el que η es la viscosidad del solvente a la temperatura del experimento y $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del agua a 20°C ;

$\rho_{20,w}$ y ρ_t son las densidades del agua a 20°C y del solvente a t y \bar{V} es el volumen parcial específico y se supone que es el mismo en el agua que en el solvente usado.

Una determinación de peso molecular por el método rápido de Archibald (aproximación al equilibrio) fué realizada según Elias a 3225 rpm a temperatura ambiente durante 20 min. Se utilizó una celda standard (12 mm ϕ) con una gota de silicona Dev-Corning 555 en el fondo. La silicona fué gentilmente cedida por Silicona Argentina S.R.L. El peso molecular fué calculado para el menisco superior aplicando la fórmula:

$$\frac{1}{\bar{M}} = \frac{(1 - \bar{V} \rho_{\text{solv}}) \omega^2 A x_m}{R T s_0}$$

\bar{M} Peso promedio molecular, \bar{V} volumen parcial específico, ρ_{solv} densidad solvente, ω velocidad angular, A área que se mide en la primera foto, x_m distancia del ojo de rotación al menisco, R constante

de los gases, T temperatura absoluta y z_0 es el $\lim_{h \rightarrow 0} z$, siendo z_m la altura del menisco.

El menisco inferior no se utilizó ya que generalmente se producen desviaciones grandes debidas a la interacción silicona-proteína.

Medidas de difusión.

Se realizaron en un aparato de electroforesis libre Spince modelo H a 4°C . Se utilizó como celda de difusión, la micro celda del aparato de electroforesis tipo Tiselius. El gradiente de concentración producido por la proteína al difundir se registró fotográficamente durante un período de 72 h. usando la técnica de Schlieren y la de bandas de interferencia. La constante de difusión se calculó por el método de las áreas máximas (Neurath, 1942) para el Schlieren y por el método de Longworth (1952) cuando se usó las bandas de interferencia de Rayleigh.

La constante de difusión está dada por la fórmula:

$$D = \frac{1}{4\pi t} \frac{A^2}{H_{\max}^2} \quad (\text{método de las áreas máximas})$$

t es el tiempo en segundos, A es el área bajo la curva del diagrama Schlieren fotografiado en la placa, H_{\max} es la altura máxima de dicha curva.

En el método de Longworth (1952), la constante de difusión en su forma mas abreviada está dada por

$$D = \frac{(\Delta H/\Delta h)^2}{4t}$$

donde $\Delta N/\Delta h$ es el factor de magnificación de la lente de la cámara que relaciona las distancias en la celda de difusión con las de la placa fotográfica, D es la constante de difusión en $\text{cm}^2 / \text{seg.}$

Las constantes de difusión se corrigieron para la viscosidad del agua a 20°C , como lo describe Gosting (1956).

$$D_{20,w} = D_{\text{obs.}} \left(\frac{293}{273 + T} \right) \left(\frac{\eta}{\eta_w} \right) \left(\frac{\eta_{t,w}}{\eta_{20,w}} \right)$$

D_{obs} constante de difusión observada, T temperatura a la que se realizó el experimento, η/η_w es la viscosidad relativa del solvente con respecto a la del agua, $\eta_{t,w}$ es la viscosidad del agua a la temperatura T y $\eta_{20,w}$ es la viscosidad del agua a 20°C .

Medidas de viscosidad :

Estas medidas fueron hechas con un viscosímetro tipo Ostwald cuyo tiempo de flujo fué para el solvente utilizado, de 30 y 46 seg. Las medidas fueron realizadas en un baño de temperatura constante a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$. El método consiste en medir la viscosidad relativa, es decir los tiempos de escurrimiento a través de un capilar, de un volumen standard de una solución y del líquido de referencia.

viscosidad relativa $\eta_{\text{rel.}} = \frac{\eta}{\eta_0}$

siendo η_0 la viscosidad del líquido de referencia. Si las densidades de los líquidos comparados difiere apreciablemente, debe hacerse la corrección.

$$\frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \frac{\rho}{\rho_0}$$

donde t_0 y ρ_0 son el tiempo de escurrimiento y la densidad del líquido de referencia. En nuestro caso se hicieron correcciones correspondientes a las densidades de las soluciones de proteína comprobándose que son despreciables. La viscosidad específica, η_{sp} es por definición.

$$\eta_{sp.} = (\eta_{rel.} - 1)$$

Se suele representar η_{sp}/c en función de c (concentración) y extrayendo a $c=0$ se obtiene la viscosidad intrínseca

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp.}}{c} \right)$$

Procedimiento general para digestiones enzimáticas

La TM_A fué suspendida en un buffer de borato (ácido bórico 0.2M, tetraborato de sodio 0.03M) a pH 8.2; la concentración de proteína usada fué de 6-8 mg/ml, salvo indicación diferente. La enzima proteolítica fué agregada a esta suspensión en la proporción de 1/100 por peso y la mezcla incubada a 25°C.

La proteína se disolvió por completa al cabo de 6 horas aproximadamente, pero a las 2-3 h. de iniciada la reacción ya estaba disuelta en su mayor parte. Se tomaron muestras a diferentes tiempos, donde se tomaron nitrógeno total, α -amino nitrógeno y arginina por los métodos detallados mas abajo. Después de 24 h. la digestión se detu-

ve por el agregado de DPP (di-iso-propil-fluoro-fosfato) en la relación molecular de una parte de inhibidor por una ^{de} enzima. La velocidad y la extensión de la reacción fueron seguidas por los procedimientos que se mencionan a continuación:

a) Se agregó al digerido igual volumen de TCA 3 %. El precipitado obtenido fué centrifugado y lavado 3 veces con TCA 1 %. Se dosó nitrógeno total en las fracciones soluble e insoluble en TCA por el método de Kjeldahl modificado por Chibnall, Rees y Williams (1943).

b) El α -amino nitrógeno fué dosado por el método de Chibnall, Mangan y Rees (1958) (usando ninhidrina). Se hicieron determinaciones como se indica en las secciones correspondientes, en el TCA soluble y el TCA insoluble, antes y después de la hidrólisis ácida total.

c) Los contenidos de arginina de las fracciones soluble e insoluble en TCA, fueron determinados - después de hidrolizar con HCl 6N en un baño de agua hirviendo durante 6 horas (Chervenka y Wilcox, 1956) - por el método de Sakaguchi (1930) modificado por Weber. Bailey (1957) utilizó el método de Moore y Stein (1954) para determinar la composición de aminoácidos de la TN_A . Los valores para la arginina así obtenidos, se compararon con los obtenidos por el método de Sakaguchi aplicado a hidrolizados ácidos de la proteína y a sus digeridos triplicados (tabla III). El contenido de arginina obtenido por el método de Sakaguchi después de la hidrólisis, fué consistentemente más elevado que los valores obtenidos por el método de Moore y Stein. Esto coincide con lo hallado por Kay y Bailey (1960).

TAOLA III

Contenido en arginina de TM_A de Pinná y de su digerido trípico

	<u>Peso de aminoácido anhidro</u> (100 g. de proteína)
TM_A (Moore y Stein)	13.2
hidrolizado ácido de TM_A (Sakaguchi)	16.6- 17.2 - 18.2
Hidrolizado ácido de un digerido trípico de TM_A (Sakaguchi)	18.2

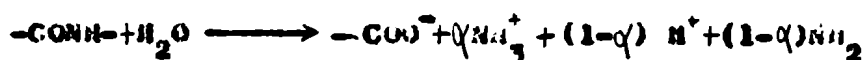
Con respecto a esto es interesante notar que Bhattacharya y col. (1959) encontraron que varios aminoácidos (metionina, glutamina y asparagina entre otros) interfirieron en la reacción de Sakaguchi.

d) FDNB (para medir la extensión de la reacción) : La mezcla resultante de la digestión trípica de la TM_A fué tratada con FDNB como lo describió Sanger (1945). Después de la extracción con éter a pH alcalino del exceso de FDNB, la mezcla se hirvió a refluje con HCl 6 N durante 3 h. y los DNP-aminoácidos solubles en éter se separaron de artificios (derivados del diatrefenol) que pasaron en el frente del solvento al correrse la mezcla en la columna de sílica-gel lavada con áci-

do y equilibrada con cloroformo (Bailey, 1957). La cantidad de DNP-aminoácidos residuales se estimó colorimétricamente siguiendo la técnica de Sanger (1945). La DNP-arginina, que después de la hidrólisis permanece en la fase acuosa junto con grandes cantidades de DNP- ϵ -lisina, fue separada por conversión de la ϵ -DNP-lisina en ϵ -DNP- α -metoxi-carbonil-lisina, que pasa a ser soluble en éter, dejando la DNP-arginina en solución (Bailey, 1957). La DNP-arginina fue dosada colorimétricamente siguiendo la técnica de Sanger (1945). Una curva standard de DNP-glicina fue usada para dosar cuantitativamente los DNP-aminoácidos solubles en éter. Las lecturas se efectuaron a 360 m μ y se supuso que la pérdida por hidrólisis fue del 25 % (Sanger, 1945). Una curva standard de DNP-arginina fue utilizada para estimar la DNP-arginina. En este caso las lecturas fueron hechas a 350 m μ y se admitió que la pérdida por hidrólisis fue del 10 % (Sanger, 1945).

e) El consumo de álcali fue seguido por medio de un autotitulado del tipo descrito por Jacobsen y col. (1957), trabajando con el vaso de reacción en un baño de temperatura constante. En este método la proteína fue suspendida en agua y el pH mantenido constante por el agregado de NaOH 0.1 N. Se evitó la presencia de anhídrido carbónico en el vaso de reacción mediante el pasaje de una corriente de nitrógeno sobre la superficie del contenido de la celda, salvo indicación contraria. Las digestiones se realizaron en las condiciones establecidas en cada caso.

La rotura de una unión peptídica a pH alcalino por una enzima proteolítica está representada por la siguiente ecuación:



donde α es la constante de disociación de los grupos amino y es una función de los valores de pH y pK . De este modo, el consumo de álcali total a pH entre 6 y 9 será una función de α . Esto significa que no todos los grupos amino fueron titulados a los pH s usados (8.2-8.5). Suponiendo que a pH 9 tiene lugar la titulación completa de los grupos amino libres, el número total de las uniones peptídicas rotas puede ser calculado, como lo sugirió Haugaard y Haugaard (1955), después de haber hecho la corrección de otros grupos disociables en la proteína. La corrección es (álcali agregado durante la reacción enzimática + álcali necesario para traer la mezcla de la reacción del pH usado a pH 9) - (álcali necesario para llevar la T_M del pH usado a pH 9).

Material difusible y no difusible

El hidrolizado enzimático fué dializado durante 3 días con varios cambios de agua destilada que fué juntada y mantenida en el congelador. Alícuotas de ambos materiales, difusible y no difusible, fueron separados a fin de determinar nitrógeno total, α -amino nitrógeno y arginina.

Material difusible

El material que se juntó fué liofilizado; en los casos en que el volumen inicial era demasiado grande, se concentró primero a un volumen menor en un evaporador rotatorio a $30-35^{\circ}C$.

El material liofilizado fué disuelto en agua , el pH ajustado a 6 con HCl 0.1 N y desalificado mediante el uso de Amberlita IRC 50 de acuerdo al procedimiento de Bizen (1959). La muestra fué colocada en la columna y lavada con ácido acético 0.1 N hasta que estuvo libre de iones de sodio. Cuando el efluente estuvo libre de sal, la muestra fué eluída con ácido acético (v/v)50 % . Fué necesario usar un gran exceso de resina, pues de otro modo los péptidos no eran retenidos completamente. Por ejemplo , para aproximadamente 17 mg. de péptidos una columna de 5." x 2 cm. sólo retenía alrededor de 70 %. Una columna de 14 x 7.5 cm. retuvo completamente 80 mg. de péptidos.

Material no difusible : Fragmento tripsico "F":

El material no difusible fué precipitado con 5 volúmenes de acetate de sodio 0.1 N a pH 5.4. El precipitado fué disuelto en agua ajustando el pH a 7.5 con NaOH diluído. Una solución neutra saturada de sulfato de amonio fué agregada lentamente hasta 38 % de saturación. El precipitado obtenido fué desechado y a la solución que quedó se le agregó más sulfato de amonio hasta alcanzar el 50 % de saturación. El precipitado resultante fué disuelto en agua a pH 7.0-7.5 y dializado hasta que estuvo libre de iones amonio. En todas las preparaciones la pureza fué controlada por electroforesis sobre papel usando buffer de veronal 0.06 M pH 8.4 con un gradiente de voltaje de 4.7 V/cm durante 15 h. Después de secado, el papel fué rociado primero con anhídrido para detectar el material de bajo peso molecular y luego coloreado con azul de bromo fenol para revelar el fragmento . En caso de que hu-

biera material de reacción positiva frente a la ninhidrina, se continuaba la diálisis hasta su completa eliminación.

Fragmento quimtripsico "FG"

El material no difusible fué precipitado con 3 volúmenes de acetato de sodio 0.1N pH5.6 . El precipitado fué disuelto en KCl M y precipitado con solución neutra saturada de sulfato de amonio entre 23 y 38 % de saturación . Cuando la muestra fué examinada por electroforesis en papel a pH 8.4 en un buffer de veronal (gradiente de voltaje 4.7 V/cm.) se encontró que contenía una pequeña cantidad de material neutro que reaccionaba con la ninhidrina. A fin de purificarla se diálizó contra agua y se utilizaron procedimientos de precipitación salina con sulfato de amonio. Ninguno de los dos métodos dió el resultado esperado. Finalmente se consiguió eliminar totalmente dicho material neutro por diálisis contra KCl 0.5 M durante una noche.

Hidrólisis ácida total

Las muestras fueron hidrolizadas con HCl de punto de ebullición constante, bajo reflujo durante 24 h.

Los eluidos de las bandas electroforéticas fueron totalmente hidrolizados con HCl 5.7 N en un tubo cerrado a la llama a 105°C durante 24 h.

Análisis de aminoácidos

Análisis cualitativo

Los análisis de aminoácidos de los péptidos hidrolizados con ácido fueron hechos por cromatografía bidimensional sobre papel Whatman N° 52. El procedimiento que se siguió fué el de Levy y Chung (1953) usando butanol:ácido acético:agua en una dirección y fenol:cresol:borato en la otra.

Análisis cuantitativo

El hidrolizado ácido total fué fraccionado de acuerdo a una modificación del procedimiento de columna ^{de} Moore, Spackman y Stein (1954). La primera columna de 150 cm. de longitud separa todos los aminoácidos, salvo la arginina, histidina y lisina que junto con el amoníaco son separados en una segunda columna de 15 cm. Los rendimientos de la serina, treonina y metionina fueron corregidos por pérdidas destructivas y la lisina y el amoníaco por rendimientos de la reacción de coloración. La composición de aminoácidos ha sido calculada convirtiendo el rendimiento en α -amino-nitrógeno a peso de aminoácidos anhidros. Parece más exacto deducir el peso de la proteína utilizado del peso total de aminoácidos anhidros recuperados de la columna y no del contenido de nitrógeno de la muestra (Bailey y Hugg, 1960). La recuperación total del nitrógeno de la columna dividido por el peso total de aminoácidos anhidros da el contenido teórico del nitrógeno de la proteína.

Grupos N-terminales

Estas determinaciones se llevaron a cabo utilizando el método de Sanger (1945) y los DNP-aminoácidos fueron corridos en papel tamponado en el sistema ftalato:alcohol amílico terciario de Black-

burn y Lowther (1951) . Los patrones cromatográficos de DNP-aminoácidos usados fueron preparados según la técnica de Sanger (1945). Se preparó: DNP-arg, DNP-ser, DNP-leu, DNP-ala, DNP-phe, DNP-val, DNP-gly, DNP-glu, y DNP-thr. La pureza de estos derivados se controló por cromatografía.

Grupos Cterminales

Para efectuar estas determinaciones se utilizó carboxipeptidasa A o carboxipeptidasa B de acuerdo a las necesidades. La carboxipeptidasa A se empleó siguiendo el procedimiento de Locker (1954) pero utilizando una solución de la enzima (Fraenkel-Conrat, Harris y Levy, 1955) en lugar de una suspensión. Se comprobó su actividad haciéndola actuar sobre insulina. La carboxipeptidasa B se hizo actuar tratando de utilizar el método empleado por Locker (1954), pero en la desalificación de la mezcla de proteína y enzima, utilizando Dowex 50 o Amberlita MB 3 mixed bed se producían pérdidas muy grandes. Estas pérdidas fueron controladas mediante el uso de aminoácidos radioactivos. Se utilizó fenilalanina y arginina marcadas con ^{14}C .

En algunos casos se consiguió solubilizar la proteína en una solución de $CO_3(NH_4)_2$ M con lo que se evitó el uso de resina, eliminando la sal mediante sucesivas evaporaciones en el desecador utilizando como agentes secantes álcali y P_2O_5 . La muestra se corrió :
a) sobre papel Whatman N° 1 por ionoforesis a pH 6.5, 1400 V durante 1 h.
b) sobre papel Whatman N° 4 por ionoforesis a pH 2.1, 2000 V durante 25 minutos en una dirección y por cromatografía descendente en el

alcohol amílico terciario: piridina : ácido acético: agua, (200: 10: 0,5: 190) (L. Smith, comunicación personal) . El revelado cuantitativo se efectuó sumergiendo el papel en una solución acetónica de ninhidrina 0.5 % y dejándolo en la oscuridad durante más de 12 h. Luego se sumergió el papel en una solución conteniendo iones Cu (Wieland y Kawerau, 1951) a fin de estabilizar el color y se dejó secar durante media hora. Se recortaron las manchas del papel y se eluyeron en 1 ml de metanol absoluto durante no menos de 4 h. en la oscuridad con agitación ocasional. La cantidad de aminoácido presente se determinó en un espectrofotómetro a 550 m μ usando curvas de calibración de aminoácidos patrones. También en este método se utilizaron aminoácidos radioactivos marcados con ^{14}C en carbonos no carboxílicos agregados al material antes de someterlo al secado y a la ionoforesis. Ello permitió la ubicación segura de los aminoácidos después de la ionoforesis y la cromatografía, que se distorcionaban por la eliminación incompleta de sales, así como el control permanente de los rendimientos.

Cenizas

La proteína fué calcinada en un horno a 600°C hasta obtención de peso constante. Se comprobó la presencia de Ca^{++} con una solución diluida de oxalato de amonio (Treadwell-Nell, 1921).

Metales en TM_A de Pinna

La presencia de metales en TM_A de Pinna fué investigada por el método de la 8-hidroxiquinalina (Mileteia, 1960).

Procedimientos ionoforéticos

En general, la electroforesis en papel se efectuó siguiendo el método de Michl (1951). Fueron usados papeles de filtro Whatman N°52, 3MM y N° 1 y un gradiente de voltaje de 40 V/cm. Los sistemas de buffers utilizados fueron:

Acido fórmico pH 2.1 (ácido fórmico:agua, 2.5:97.5 v/v)

Piridina:acetato pH 3.5 (piridina:ácido acético:agua, 1:10:189 v/v)

Piridina:acetato pH 6.5 (piridina:ácido acético:agua, 10:10.1:90 v/v)

Carbonato de amonio pH 9 (carbonato de amonio 2 %)

Los tanques fueron llenados con tolueno o varsol.

Técnica de "fingerprint"

Una alícuota, conteniendo aproximadamente 3 mg. de proteína, fué tomada de un digerido proteolítico. Esta muestra fué aplicada a una hoja de papel de filtro Whatman 3MM y fué sometida a una cromatografía descendente en butanol:ácido acético:agua (4:1:5) durante 17 h. y a electroforesis buje tolueno en piridina:acetato pH 6.5 durante 1h. a un gradiente de voltaje de 40 V/cm.

Reacciones de coloración sobre papel

Solución de ninhidrina: 50 ml de una solución alcohólica de ninhidrina 0.1 %, 15ml. de ácido acético glacial y 2 ml de colidina.

Reactivo de Sakaguchi: Solución A: solución de β -hidroxiquinolina 0.2 % en acetona.

Solución B: bromo 0,2% en NaOH N.

El papel fué sumergido en A , secado y rociado con B.

Azul de bromo fenol :

Una solución al 0.1 % de azul de bromo fenol en alcohol 97 % fué saturada con Cl_2 Hg. El papel seco fué sumergido completamente en una solución de azul de bromo fenol durante 5 minutos; luego lavade con agua hasta que el fondo estuvo claro.

Método de cloración de la telidina (Reindel y Heppe, 1954)

Este método está basado en la tinción de los derivados clorados de las proteínas, péptidos y aminoácidos con telidina.

Capítulo II

TROPOMIOSINA DE AULACOMYA MAGELLANICA

En este capítulo se describe el aislamiento de una tropomiosina a partir de una especie argentina de molusco, así como el estudio de algunas de sus propiedades a fin de compararla con las tropomiosinas ya conocidas, en particular con tropomiosinas de moluscos de origen geográfico diferente.

Como ya se detalló en el capítulo I se aplicó el método alcohólico de Bailey (1956) para obtener polvo alcohólico a partir del músculo aductor de cholga (Aulacomya magellanica). La tabla III muestra los rendimientos de polvo alcohólico obtenido a partir del músculo aductor y de la proteína obtenida a partir de dicho polvo. Se puede observar que los rendimientos tanto de polvo alcohólico como de tropomiosina A son algo mayores en Aulacomya que en Pecten. El rendimiento de la proteína es en cambio, mucho mayor en Pinna de ahí que se haya preferido su uso.

TABLA III'

Rendimientos de polvo alcohólico y de TM_A obtenidos por la aplicación del método de Bailey (1956) al músculo aductor de diferentes especies de moluscos.

<u>Molusco</u>	<u>polvo alcohólico</u>	<u>tropomiosina A</u>
<u>Pinna nobilis</u>	-	2.3
	-	2.5
<u>Pecten maximus</u>	17.7	0.5
	16.5	0.7
<u>Aulacomya magellanica</u>	21.6	0.7
	20.0	0.9

Al dializar el extracto proteico disuelto en ClK M, obtenido a partir del polvo alcohólico, contra diluciones crecientes de dicha sal, a una fuerza iónica de 0.2-0.1, se depositan agujas finas que forman resetas de naturaleza cristalina (fig. 1). Estos cristales son intensamente birrefringentes al ser observados en el microscopio polarizador. Los cristales así obtenidos se purifican disolviéndolos en ClK M, centrifugando en caso de obtener una solución turbia y dializando contra ClK 0.2 y Cl M sucesivamente. Esta operación vuelve a repetirse y una vez que se tiene cristales 3 veces cristalizados, se disuelven en ClK M y se les agrega una pequeña cantidad de timol para preservarlos. Esta solución e sus cristales se conservan con timol en la holdera de

Fig.1 CRISTALES DE Tm_A DE AULACOMYA MAGELLANICA



Observados con contraste de fase, 1200 aumentos

o menos a un año.

Se estudió el rango de precipitación de esta solución en concentraciones crecientes de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a pH neutro. La proteína precipitó entre 21 y 34 % de saturación. El rango de precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ obtenido para la TM_A es de 26-36 % según Komins y col. (1957) y de 23-30 % según Bailey (1957).

Propiedades Físicoquímicas

Constante de sedimentación y peso molecular

Al examinar la TM_A de cholga en la ultracentrífuga se observó un pico simétrico (fig.2). La constante de sedimentación se calculó como se describe en el capítulo I. En la fig. 3 están representadas las velocidades de sedimentación en función de la concentración. Por extrapolación de la recta así obtenida se tiene el valor de $S_{20,w}^0 = 3.13$. El valor de dicha constante para la TM_A de Pinna es de 3.1 (Kay, 1958) y el de varias tropomiosinas (A y B) es de 3 aproximadamente (Komins y col., 1957).

Se realizó una determinación del peso molecular de acuerdo a la técnica rápida de Archibald descrita en el capítulo de "Métodos". Como control se determinó por este método el peso molecular de la gamma globulina para el que se obtuvo un valor de 160.000 ± 10.000 valor que coincide con el de 156.000 (Porter, 1950; Hughes, 1954).

La determinación, como todas las determinaciones físico químicas se efectuó en CLK-buffer de fosfato pH 7, con una concentra-

Fig.2 Examen de T_M de Anlaconya efectuado en la ultracentrífuga. Fotografías tomadas a los 6, 38, 70, 102 y 134 min. después de haber alcanzado la velocidad máxima de 56.100 rpm. Concentración 0.4 %. La corrida se efectuó en buffer de fosfato-CKK 0.55 M, pH 7, a 20°C.

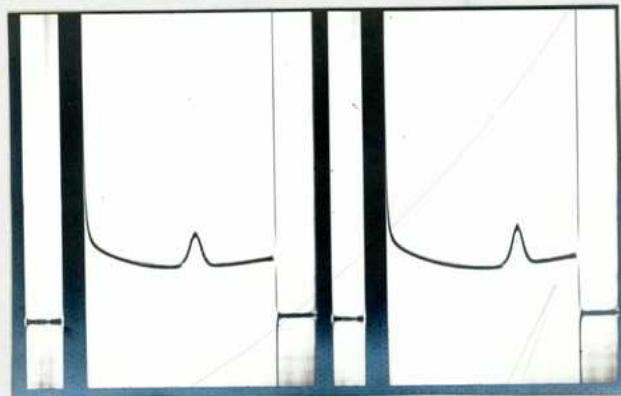
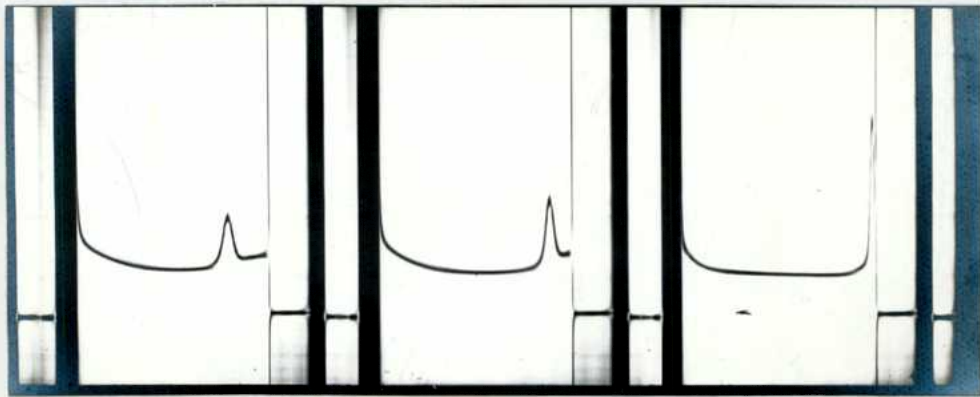
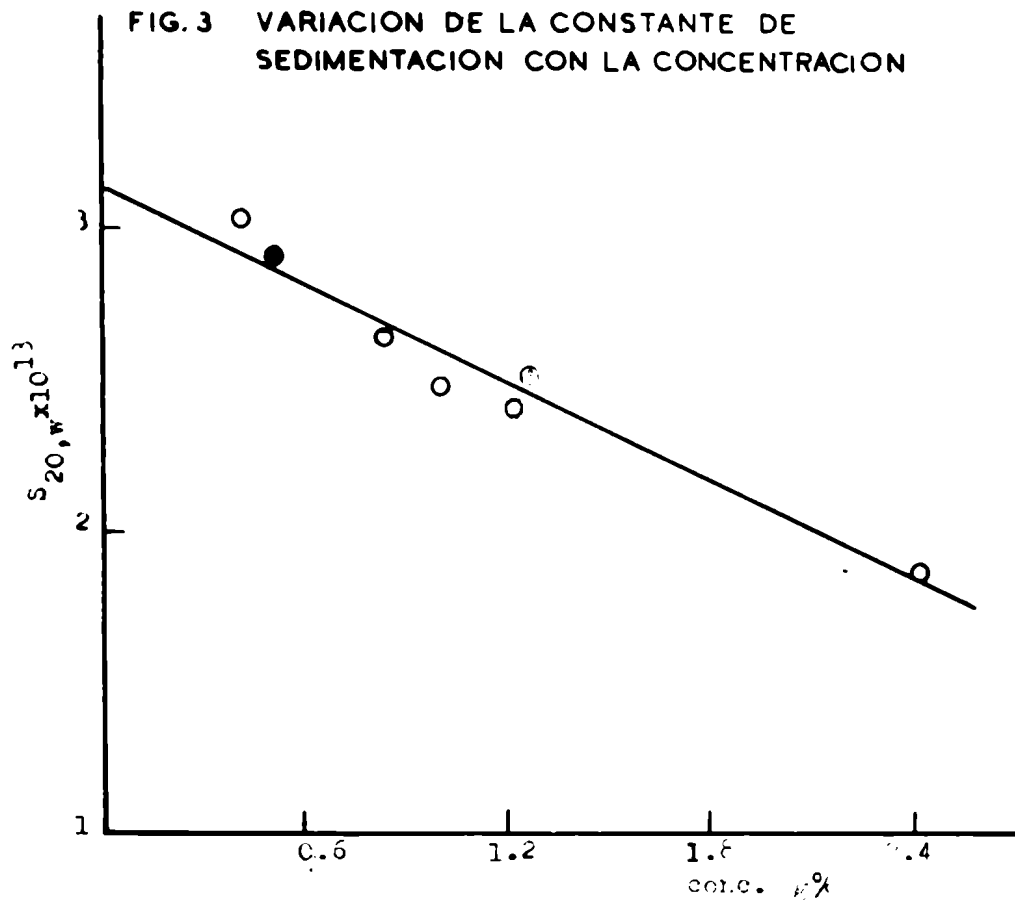


FIG. 3 VARIACION DE LA CONSTANTE DE SEDIMENTACION CON LA CONCENTRACION



Los dos tipos de puntos indican diferente procedencia.

ción de proteína de 1 % aproximadamente. La fig. 4 muestra la fotografía de la placa obtenida al correr la TM_A de cholga en la ultracentrífuga por el método rápido de Archibald. Los cálculos dieron un valor del peso molecular de 258.000 ± 16.000 . El peso molecular de la TM_B de fecten es de aproximadamente 100.000 (Rüegg, 1959), la de TM_A de Pinna es de 135.000 (Kay, 1958). Estos valores sin embargo, no fueron obtenidos por el método de Archibald. Los únicos autores que utilizaron este método para determinar el peso molecular de la paramiosina de Venus mercenaria son Riddiford y Scheraga (1962). Estos autores hicieron determinaciones a distintas concentraciones de proteína, fuerza iónica y pH de las soluciones obteniendo valores que oscilaban entre 328.000 y 618.000. El primer valor es el que dichos autores dan para las condiciones más cercanas a las utilizadas en este trabajo. Ellos trabajaron a velocidades de 5,784-8,225 rpm, con una concentración proteica de 0.7% en una solución de fuerza iónica 0.6 y pH 7. Riddiford y Scheraga sugieren que si bien las evidencias son pocas, la molécula de paramiosina parece sufrir un fenómeno de agregación lateral. Kay en cambio, al efectuar medidas de sedimentación a diferentes niveles de fuerza iónica (0.6 y 1.1), encontró iguales valores de las constantes de sedimentación.

Viscosidad :

La figura 5 ilustra los resultados obtenidos en las determinaciones de viscosidad de soluciones de TM_A de cholga. En ella se representó viscosidad específica/concentración de la TM_A de cholga en función de concentración. La intersección de la recta así obtenida con la orde-

Fig.4 Fotografías obtenidas en la ultracentrífuga al correr TN_A de Aulacomya magellanica por el método de Archibald. Estas fueron tomadas a los 8, 12, 16 y 20 min. luego de alcanzar la velocidad de 8225 rpm. La corrida se efectuó en buffer de fosfato-ClK 0.55 M, pH 7, a 20°C

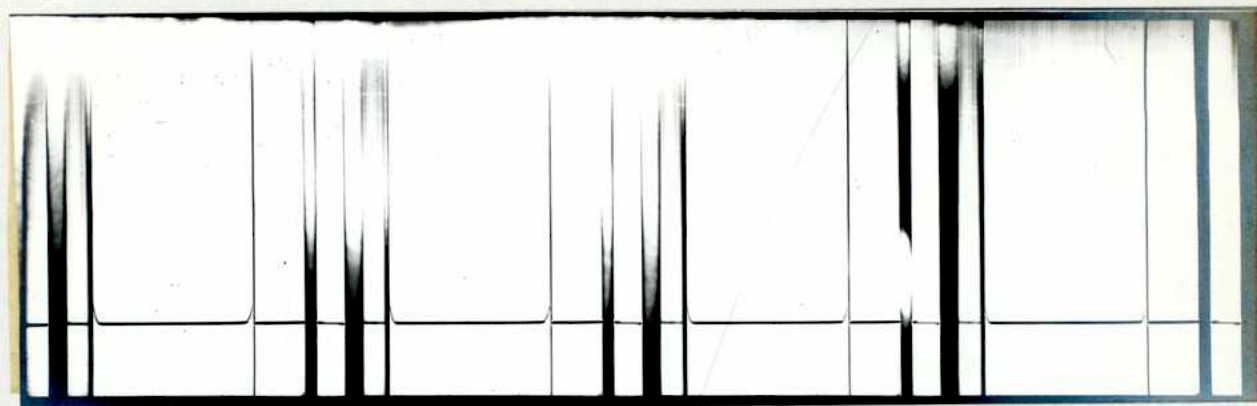
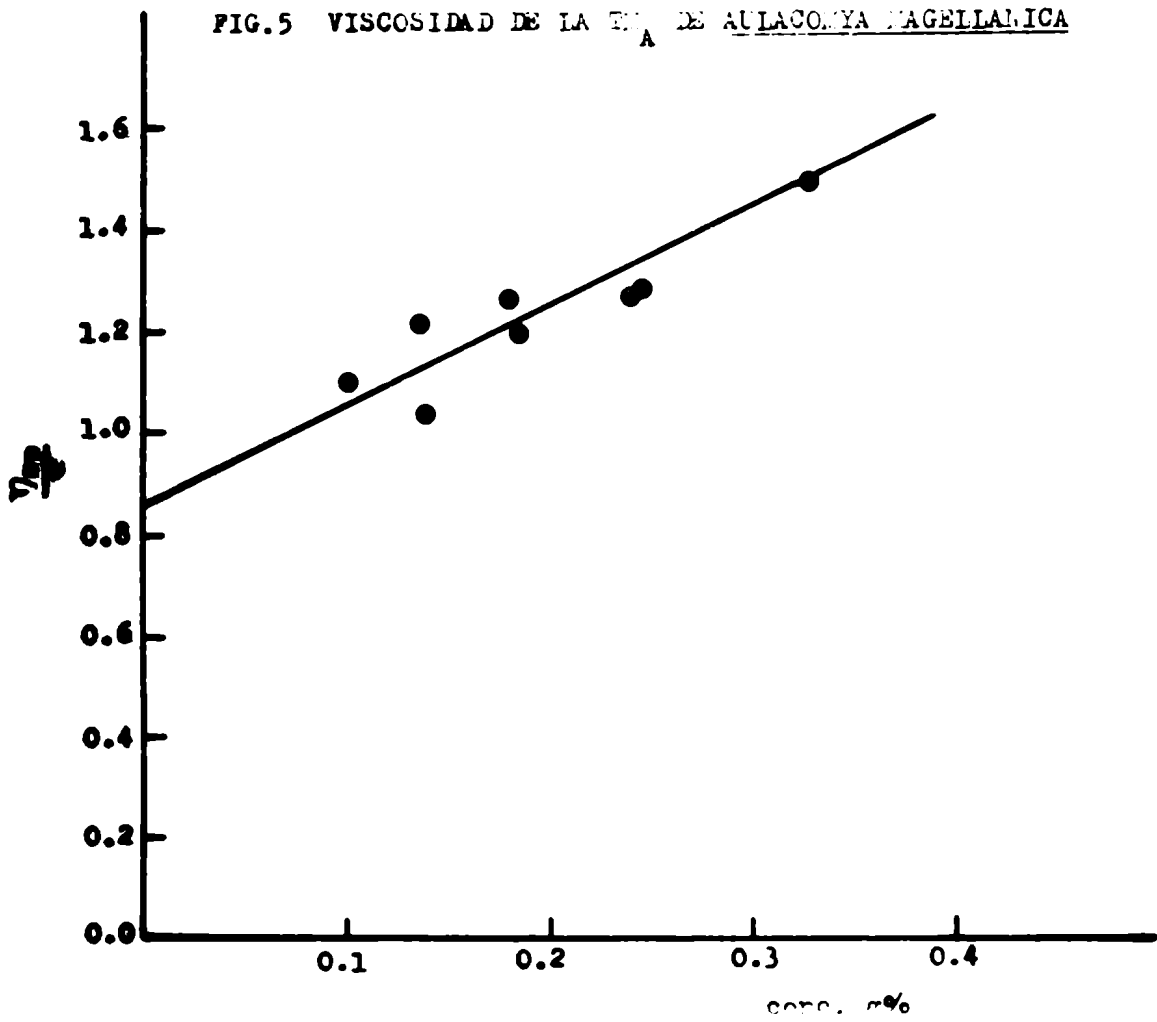


FIG.5 VISCOSIDAD DE LA TIA DE AULACOMYA MAGELLANICA



Determinaciones efectuadas en buffer de fosfato-ClK 0.55 M, pH 7 a 25°C

nada (concentración 0) de la viscosidad intrínseca. Se observa que el valor de la viscosidad intrínseca obtenido para la TM_A de chelga es 0.84 que está muy por debajo del valor 2.4 correspondiente a la TM_A de Pisna (Kay y Hailey, 1959). Ese valor está mas próximo en cambio, al de la viscosidad intrínseca de la TM_B de conejo que es de 0.52 (Tano y col., 1951) o de Pecten que es 0.5 (Rüegg, 1959).

El valor de la viscosidad intrínseca nos permite calcular la relación axial mediante tablas hechas con los valores del incremento de la viscosidad (Mehl y col., 1940). El incremento de la viscosidad ν , está dado por

$$\nu = \frac{[\eta] 100}{\bar{v}}$$

lo que se deduce de la ecuación de Simha y donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca y \bar{v} el volumen parcial específico. Dado que el volumen parcial específico no varía gran cosa de una proteína a la otra (Pedersen, 1945), se usó el valor obtenido para TM_A de Pisna nobilis de 0.735 (Kay 1951). Se encontró así una relación axial de 38.5, valor que a pesar de ser algo inferior a la relación axial de la TM_A de Pisna, refleja la alta asimetría de la molécula, característica propia de este grupo de proteínas.

Espectro de absorción

El espectro de absorción se determinó en un espectrofotómetro Beckman modelo DK2A (fig.6). A pH neutro presenta un máximo a 276 m μ y un mínimo a 250-251 m μ . La relación de las densidades ópticas de 260

Fig 6 - ESPECTRO DE ABSORCION EN EL ULTRAVIOLETA

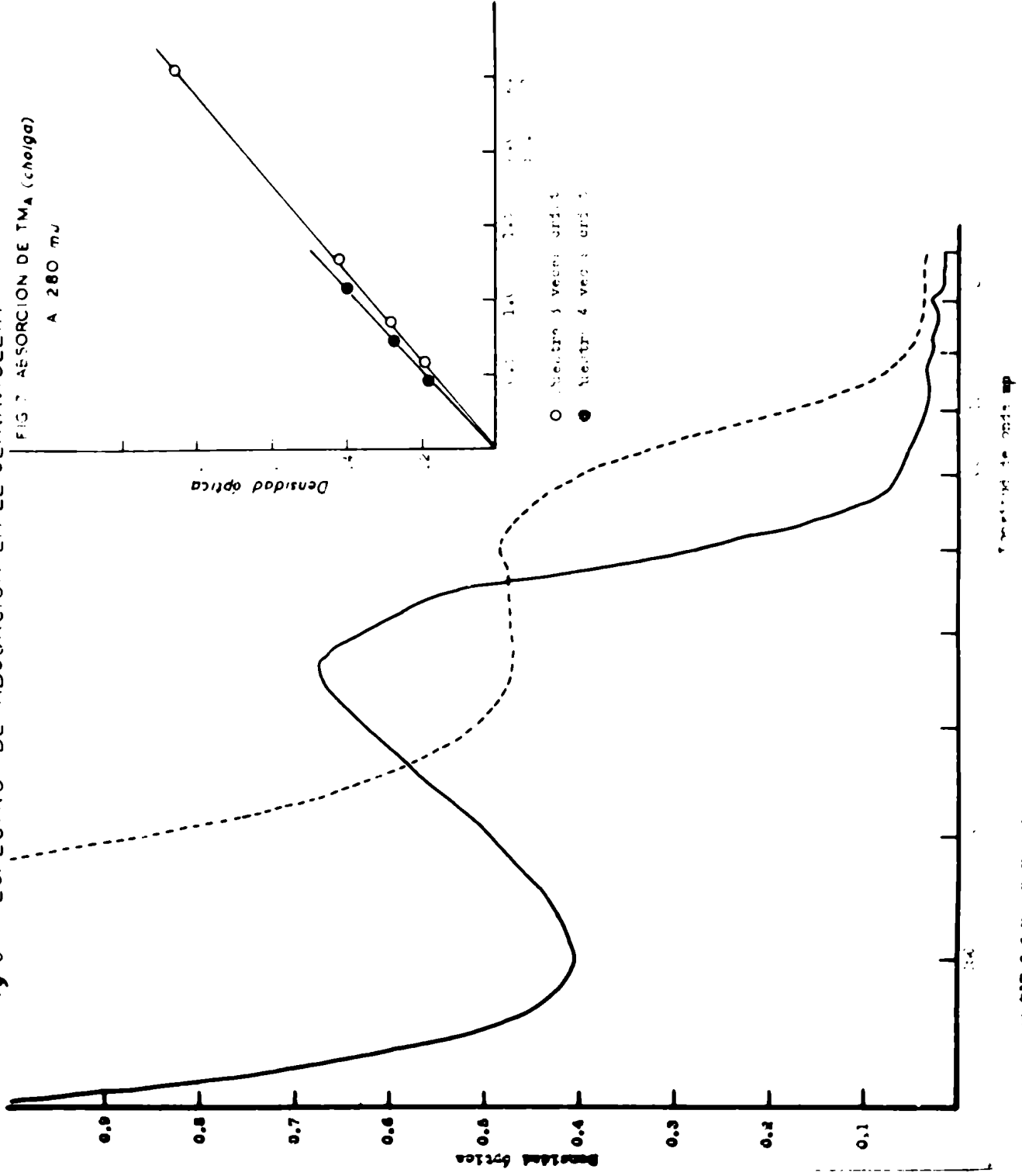


FIG 7 - ABSORCION DE TMA (cholega)
A 280 mμ

----- en ClH 0.6 M + NaOH 0.1 N

----- en ClH 7.6 M + NaOH 0.1 N

----- 5 veces unit

----- 4 veces unit

a 280 m μ de la preparación recristalizada 3 veces es de 0.889, lo que indicaría una contaminación con ácido nucleico. En una cuarta recristalización esa relación disminuyó a 0.787. Teniendo en cuenta que en la T M_A de Pinnax subilis libre de ácido nucleico, la relación de densidades ópticas de 260 a 280 m μ es de 0.5 una relación de 0.79 como la obtenida para la T M_A de Aulacomys magellanica sugeriría una contaminación de ácido nucleico del 1-2 %. De acuerdo con estos datos el material no puede ser considerado como una nucleotromionina, en las que el contenido de ácido nucleico es de 15-20 % (Hameir, 1951).

En cuanto al coeficiente de extinción a 280 m μ , determinado en un espectrofotómetro Beckman modelo DU, es de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3.4$ en solución de ClK M pH 7.5. Dicho valor se mantuvo al recristalizar la proteína por cuarta vez. (fig. 7). El coeficiente de extinción correspondiente al máximo de 276 m μ es de $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3.7$

Grupos N-terminales :

La proteína se trató con FDNB de acuerdo al método de Sanger (1945). 27 mg. de T M_A e igual peso de CO $_3$ Na se disolvieron en ClK M y se agregó un volumen doble de una solución alcohólica de FDNB al 5 %. La mezcla se agitó mecánicamente a temperatura ambiente durante 2 horas. El precipitado amarillo de DNP-proteína se centrifugó y se lavó con agua, alcohol y éter tibios y se dejó secar al aire durante la noche. Las DNP-proteínas equilibradas al aire contienen alrededor de 70 % de proteína si se tiene en cuenta el contenido de DNP y de humedad (Porter y Sanger, 1948; Bailey 1951). La DNP-proteína se hidrolizó a reflujo con HCl de

punto de ebullición constante durante 8 h. Aliquotas de las capas solubles en éter y en agua se sembraron en papel Whatman N° 1 previamente mojado en ftalato, al lado de DNP-aminoácidos marcadores. Se aplicaron los factores de corrección debidos a pérdidas por hidrólisis (Sanger, 1948). La tabla IV muestra los resultados obtenidos.

TABLA IV

Aplicación del método de DNP a la determinación de grupos N-terminales en la TM_A de chelga

<u>Experimento</u>	<u>Cantidad de proteína que contiene un DNP-residuo</u>		
	DNP-ala	DNP-glu	DNP-gly o DNP-ser
N ^o 1	194,000	285,000	370,000
2	222,000	346,000	-

Esto indicaría que la TM_A tiene como grupo N-terminal el aminoácido alanina. Este resultado debe tomarse sin embargo con cierta cautela. El peso molecular que resulta de estos valores para TM_A de chelga sería de 210,000, algo alto si consideramos que la TM_A de Pinna y Pecten tienen un peso molecular de 135,000 y 100,000 respectivamente y más bajo que su propio peso molecular determinado por el método de Archibald que es de 260,000.

El método del DNP no reveló grupos N-terminales en la TM_A de Pinna nobilis (Bailey, 1957) ni en la TM_A de conejo (Bailey, 1951).

En cambio en una publicación reciente Saad y Kemins (1961) afirman que el FDNB aplicado en condiciones especiales (en urea 6 M a 50°C durante 3-5h.) revelan un ácido glutámico e glutamina como grupo N-terminal de la TM_B de conejo. Estos mismos autores informan que de la proteína previamente oxidada con peróxido se desprenden DNP-serina y DNP-alanina.

Grupos C-terminales

Estas determinaciones se realizaron por el método de la carboxipeptidasa.

A 3.9 mg de TM_A disueltos en $CO_3(NH_4)_2$ a pH 8.1 se le agregó una suspensión de carboxipeptidasa A en la proporción de 1:50 (en peso). La mezcla se dejó 1 h. a 37°C. Simultáneamente se hicieron blancos de la proteína y de la enzima. El contenido de los tubos se evaporó en el desecador hasta quedar libres de sales y se sembraron sobre papel Whatman N° 1. Se corrieron por cromatografía descendente en butanol:ácido acético:agua, 4:1:5. El papel se reveló cuantitativamente de acuerdo a lo descrito en el capítulo I utilizando sucesivamente ninhidrina y la solución de iones Cu^{++} . Aparecieron ligerísimas trazas de treonina, alanina y metionina o valina (1 residuo por 1.3×10^6 g. de proteína) y serina en una proporción de 1 residuo por 430,000 g. de proteína o sea mucho menos que un mol de aminoácido por mol de proteína (suponiendo como peso molecular máximo de la TM_A 260,000).

Frente a este resultado se probó la acción de la carboxipeptidasa B. Las determinaciones se efectuaron siguiendo la técnica ya descrita (capítulo I). Se emplearon 3.9 mg. de proteína a los que se agre-

gó carboxipeptidasa B en la proporción de 1:50 (en peso). A los diferentes tubos se les agregó 0.005 μ curie de arginina marcada con 14 C. Los papeles se sometieron a ionoforesis a pH 5.5. Una vez realizada la reacción colorimétrica cuantitativa, alícuotas de la solución se colocaron en planchetas cuya radioactividad se midió en un contador automático a flujo gaseoso Nuclear Chicago. La tabla V muestra el resultado de la acción de la carboxipeptidasa B sobre la TM_A de cholga.

TABLA V

Acción de la carboxipeptidasa B sobre TM_A de Aulacomya (temp. 37°C)

<u>Experimento</u>	<u>tiempo</u>	<u>aminoácidos liberados</u>	<u>Nº de residuos por 150,000 g. de proteína</u>
1	1 h.	neutros	2.5
		his	7.7
		arg + lys	35.4
		glu + asp	26.8
2	10 min.	his	trazas

Se han determinado los grupos C-terminales de varias tropomiosinas, ya sea utilizando el método de la carboxipeptidasa A o el de la hidrazina. La tabla VI ilustra algunos resultados.

TABLA VI

Grupos C-terminales de varias treponemiasis

<u>Animal</u>	<u>C-terminal</u>	<u>Referencia</u>
Conejo	ala.ileu.met.thr.ser.ileu.	Locker, 1954
Rana	ileu	Saad y col., 1959
Carpa	(ser, thr o ileu)	" " " "
Lamprea	(ileu, ser y thr)	" " " "
Cerdo	ileu.ileu	Jen y col., 1958
Pato	leu.leu	" " " "
Sepia	thr.leu	" " " "
<u>Pinna nobilis</u>	(arg y lys)	Este trabajo

La secuencia de los aminoácidos que figuran entre paréntesis es desconocida.

Comentario

Como ya se ha dicho los resultados obtenidos al determinar el aminoácido N-terminal deben interpretarse con cierta cautela ya que el método es sumamente sensible como control de pureza y cualquier péptido pequeño, despreciable como contaminación puede inducir a un posible error dado su bajo peso molecular. El hecho es que el peso molecular encontrado por este método es menor que el hallado por el método de

Archibald y en cambio resulta alto si se lo compara con el Δ ^{de} TM_A de Pinna o Pecten (130,000 y 100,000 respectivamente). Es posible que también la TM_A de cholga no muestre N-terminal por el método de Sanger. En efecto, se conoce bien el gran poder de agregación que presenta la TM_B (Tsuu y col., 1951). La TM_A de Pinna en cambio, no parecía presentar este fenómeno (Kay, 1958; Kay y Bailey, 1959). Sin embargo, una publicación muy reciente (Riddiford y Scheraga, 1962) nos informa de la posibilidad de que la paramiosina de Venus mercenaria presente dicho fenómeno de agregación. Esos autores informan que los pesos moleculares por ellos obtenidos por el método de Archibald son aproximadamente múltiplos integrales de 131,000 que es el peso molecular dado por Kay (1958) para la TM_A de Pinna. El peso molecular obtenido en el presente trabajo es también un múltiplo de aquel. Así pues, si bien no se ha estudiado en la TM_A de cholga el fenómeno de agregación el mismo sería factible. Ello surge al comparar la constante de sedimentación igual a la de las otras troponosinas y el comportamiento similar al de la paramiosina de Venus en la aproximación al equilibrio (Archibald). Así pues, monómeros de peso molecular 130,000 deben ser considerados como probables.

En cuanto a los resultados de C-terminal, si bien sería de desear tener los correspondientes a tiempos de ataque más cortos, resultan sumamente interesantes ya que revelan la existencia de una alta densidad de cargas próxima al C-terminal. Los resultados sugieren que el aminoácido histidina está como grupo C-terminal y que la alta proporción de residuos básicos en la zona C-terminal hace a la proteína inaccesible a la carboxipeptidasa A.

Un dato curioso lo da la viscosidad intrínseca . En efecto ésta resulta muy baja al compararla con la de la TM_A de Pinna pero en cambio no tan alejada de la TM_B de conejo o de Pecten . La viscosidad intrínseca está relacionada con la relación axial. En la TM_A de Pinna, May (1958) postula que la molécula es un bastón formado por una sola cadena peptídica totalmente organizada con α -hélice. En la paramecina de Venus, Riddiford y Scheraga (1962), sugieren agregación lateral de dichos bastones lo que implica la disminución de su relación axial. Tal podría ser también el caso de la TM_A de chelga.

Resumiendo , hechos como los siguientes:

- 1) método de obtención
- 2) solubilidad
- 3) poder de cristalización
- 4) rango de precipitación con $SO_4 (NH_4)_2$
- 5) valor de la constante de sedimentación
- 6) comportamiento frente a la tripsina (como se verá mas adelante)

permite afirmar que la trepanocina aislada a partir del músculo aductor de chelga, es del tipo A, muy similar a la de otros moluscos pero que tiene como característica curiosa un valor bajo de la viscosidad intrínseca lo que significa una disminución de la asimetría o de la hidratación de la molécula.

Capítulo III

GENERALIDADES SOBRE LA HIDROLISIS ENZIMÁTICA DE PROTEÍNAS

El progreso en este campo ha sido lento, debido fundamentalmente a la falta de técnicas experimentales capaces de solucionar la complejidad del problema. Antes de la introducción de la cromatografía, no existía método físico o químico específico, capaz de seguir la destrucción de los sustratos proteicos. La primera fue la enzima de uso más generalizado, probablemente por ser la primer enzima proteolítica que logró cristalizarse. Actualmente se sabe que esta enzima no es homogénea cuando se somete a electroforesis sobre papel (Merten y col., 1952), o a electroforesis libre (Timelidus y col., 1938). Se obtenía tal grado de extensión en las degradaciones proteicas que el análisis detallado del proceso era prácticamente imposible. Sin embargo se hicieron observaciones de importancia. La mayoría de las primeras contribuciones sobre proteólisis fueron hechas por la escuela de Carlsberg (Linderström-Lang y Ottensen, 1949; Linderström-Lang, 1949; Christensen, 1952).

Hoy día, la hidrólisis enzimática sola o combinada con hidrólisis

química, es el procedimiento que comunmente se aplica a la resolución de estructuras proteicas. Sanger fué el pionero en este campo. El y sus colegas fueron los primeros en usar este método en el caso de la insulina (Sanger y Tuppy, 1951; Sanger y Thompson, 1953). La hemoglobina (Braunitzer y col., 1961) y la proteína del virus del mosaico del tabaco (Anderer y col., 1960) pueden citarse entre las últimas aplicaciones.

Una ventaja evidente del uso de enzimas proteolíticas en esos estudios es su especificidad; la hidrólisis ácida y la hidrólisis alcalina en cambio, no son específicas. La reacción enzimática generalmente se detiene antes de que todas las uniones peptídicas se rompan obteniéndose espontáneamente un hidrolizado parcial, que contiene péptidos que la hidrólisis química jamás produciría.

El descubrimiento de sustratos sintéticos de estructura conocida que son hidrolizados por endopeptidasas (Bergman y col., 1942) ha hecho posible predecir qué tipo de uniones son atacadas por determinadas enzimas. Bergman demostró que el factor determinante en la proteólisis de la molécula de sustrato no era su tamaño real sino la naturaleza de los grupos de aminoácidos y otros grupos presentes en la cercanía de las uniones susceptibles. Sin embargo, parece que la velocidad por la cual se atacan los péptidos sintéticos es considerablemente menor que la velocidad de ataque de las uniones peptídicas de proteína (Northrop y col., 1948). De ahí que al querer aplicar el ataque enzimático surja el siguiente problema: cuáles son las uniones más lábiles en una proteína? Las mismas que se observan usando sustratos sintéticos u otras?

Desde muy temprano se supo que las proteínas nativas no eran atacadas o se atacaban muy lentamente y que después de su desnaturalización la velocidad de proteólisis aumentaba significativamente. Esto es especialmente cierto para las proteínas globulares (Anson y Mirsky, 1934; Lineweaver y Hoover, 1941; Neurath y col., 1942; Haurowitz y col., 1945). La literatura está llena de ejemplos tales como los siguientes: la hemoglobina es digerida por tripsina solamente después de una desnaturalización parcial con salicilato 0.3 M (Anson y Mirsky, 1934); la hemoglobina nativa es digerida por tripsina pero la velocidad de la digestión aumenta enormemente al calentar la proteína o al disolverla en soluciones neutras o alcalinas de urea de concentraciones mayores que 6 M (Lineweaver y Hoover, 1941); la tripsina hidroliza ovalbúmina o globulina de suero al estado nativo muy lentamente (Haurowitz y col., 1945); la ribonucleasa es digerida por la tripsina solo después de haber sido oxidada con ácido per fórmico (Mira y col., 1956). Más aún, las proteínas son digeridas más rápidamente si son inestables en el pH óptimo en el que actúa la enzima. De este modo, la ovalbúmina es digerida por la pepsina pero no por la tripsina mientras que la β -lactoglobulina muestra un comportamiento inverso. (Christensen, 1952).

La explicación aceptada ha sido que en la molécula desnaturalizada las cadenas polipeptídicas están desnlegadas de modo que las uniones peptídicas son más accesibles a la acción de la enzima.

Sin embargo, ciertas hidrólisis tienen lugar sin la desnaturalización del sustrato. Presumiblemente sólo algunas uniones en la proteína nativa están expuestas a la acción de la enzima.

Estas uniones se atacarían sin producirse desnaturalización en la proteína y dejarían expuestas otras uniones susceptibles, teniendo lugar así una hidrólisis específica. Son ejemplos, la formación de plakalbúmina de ovoalbúmina (Linderström-Lang y Ottosen, 1949) y el ataque de la γ -globulina por papaína (Petermann y Pappenheimer, 1941; Petermann, 1942; Porter, 1959).

Otro factor que tiene gran influencia en el ataque por enzimas proteolíticas de las proteínas es el que se refiere a la influencia de los aminoácidos vecinos. De este problema nos ocuparemos más extensamente al discutir los resultados obtenidos en la digestión de la $T_M A$.

Productos de la proteólisis

En algunos casos una enzima puede atacar todas las uniones susceptibles presentes en un sustrato proteico. Esto ocurre con la insulina (Butler y col., 1948; Sanger y Tuppy, 1951; Harris y Li, 1952; Sanger y Thompson, 1953); con la hormona adrenocorticotrófica (Li y col., 1951; Shepherd y col., 1956); con la hormona melanocítica (Harris y Rees, 1956; Harris y Lerner, 1957) y con la ribonucleasa oxidada (Hirs y col., 1956).

En otros casos, sin embargo, la enzima solo ataca a algunas uniones susceptibles de la proteína nativa, estando el resto de las uniones enmascaradas o escondidas por alguna razón. En algunos casos la oxidación, reducción u otra clase de desnaturalización es suficiente para desenmascarar las uniones ocultas por la estructura secundaria o terciaria, exponiéndolas a la acción de la enzima. Desde este punto de vista, las llamadas "proteólisis limitadas" son especialmente interesantes,

p.ej.: la transformación de ovalbúmina en plakalbúmina por subtilisina (Linderström-Lang y Ottemen, 1949; Ottemen 1956); la conversión fibrinógeno-fibrina inducida por trombina (Bailey y col., 1951 demostraron la naturaleza proteolítica del proceso) y la activación de los zimógenos pepsinógeno, quimotripsinógeno y tripsinógeno en las correspondientes enzimas proteolíticas. La acción de la tripsina sobre TM_A , es otro ejemplo, como se verá más adelante en la que la tripsina ataca aproximadamente a la mitad de las uniones susceptibles.

Consideremos la acción de las enzimas proteolíticas en proteínas fibrosas, ya que la TM_A (P₁) pertenece a esta clase.

Gergely (1950) y Perry (1951) observaron independientemente que un tratamiento corto de miosina con tripsina produce dos fracciones: meromiosinas L (light: liviana) y H (heavy: pesada). El proceso fué estudiado por Mihalyi y Harrington (1959), quienes lo siguieron por el consumo de álcali, cambios en viscosidad, formación de nitrógeno no proteico, cambios en las propiedades de sedimentación y rotación óptica. Ellos postularen la existencia de dos reacciones paralelas de primer orden con muy diferentes constantes de velocidad y sugirieron que la enzima ataca las regiones de la molécula dispuestas al azar a mayor velocidad que las regiones plegadas.

También se han hecho estudios sobre la acción de la tripsina en el colágeno, otra proteína fibrosa cuya estructura está complicada por su alto contenido de prolina e hidroxiprolina. Contrariamente a lo que fué sostenido primero (Gallen y col., 1957), Hodge y col. (1960) encontraron que la tripsina rompe un número pequeño de uniones peptídi-

cas del colágeno nativo, pero la misma enzima ataca las cadenas polipeptídicas dispuestas al azar del colágeno denaturalizado (gelatina) reduciéndola a péptidos con grupos terminales compatibles con la especificidad conocida de esta enzima (Grassmann y col., 1956). Esto sugiere que la denaturalización térmica destruye aquellos rasgos estructurales de la proteína nativa que ocultan algunas de las uniones a la acción de las enzimas proteolíticas.

La keratina, otra proteína fibrosa tipo α , en la forma de cabello y lana, resiste la acción de la tripsina y proteínas similares probablemente por la presencia de puentes disulfuros muy estables. La lana, por prolongado hinchamiento, disminuye su resistencia a la tripsina y los productos resultantes por rompimiento de las uniones S-S, las keratosas, son fácilmente atacadas por la tripsina (Gustavson, 1956).

El hecho de que la TN_A no tenga uniones S-S (Szent-Györgyi y col., 1959) y que sea una molécula altamente organizada, invita a reflexionar sobre la posible acción de las enzimas proteolíticas.

Es interesante hacer notar que si la interpretación de los datos ópticos es correcta la molécula de la TN_A existe completamente como α -hélice. Además la TN_A de Pisna se diferencia de la tropomiosina de conejo y de la L-meromiosina (cuyo contenido de α -hélice es el mismo, Szent-Györgyi y Coran, 1957) por tener una única hélice. Por lo tanto resulta ser un sustrato ideal para investigar el efecto de enzimas sobre una estructura helicoidal regular en la que la estructura terciaria (p.ej. interacciones entre cadenas e cadenas laterales) no complica mayormente el cuadro.

Locker y Schmitt (1957) encontraron que un corto tratamiento tripsico de paratiosina (TM_A) de Venus mercenaria produce un gran cambio en la proteína, el cambio ocurre entre 2.5 y 7 minutos después de iniciada la reacción. Ellos creyeron que este cambio era idéntico al encontrado por Macfarlane (1955) al estudiar la descomposición de tropomiosina de conejo por acción de una enzima aislada de Clostridium oedematiens y que fué interpretado por Kekwick como una ruptura general de la molécula.

El trabajo que se describirá demuestra por el contrario que los productos obtenidos por acción tripsica prolongada sobre TM_A (PH) especialmente proveniente de Pinna nobilis y también de Pecten maximus y Aulacomya magellanica no son solamente productos dializables sino que, se forma además, un fragmento de aproximadamente la mitad del peso molecular de la proteína nativa, que aún contiene una alta proporción de arginina y lisina. Se estudiaron las propiedades químicas y físicas a fin de caracterizar y diferenciar este fragmento de la proteína nativa.

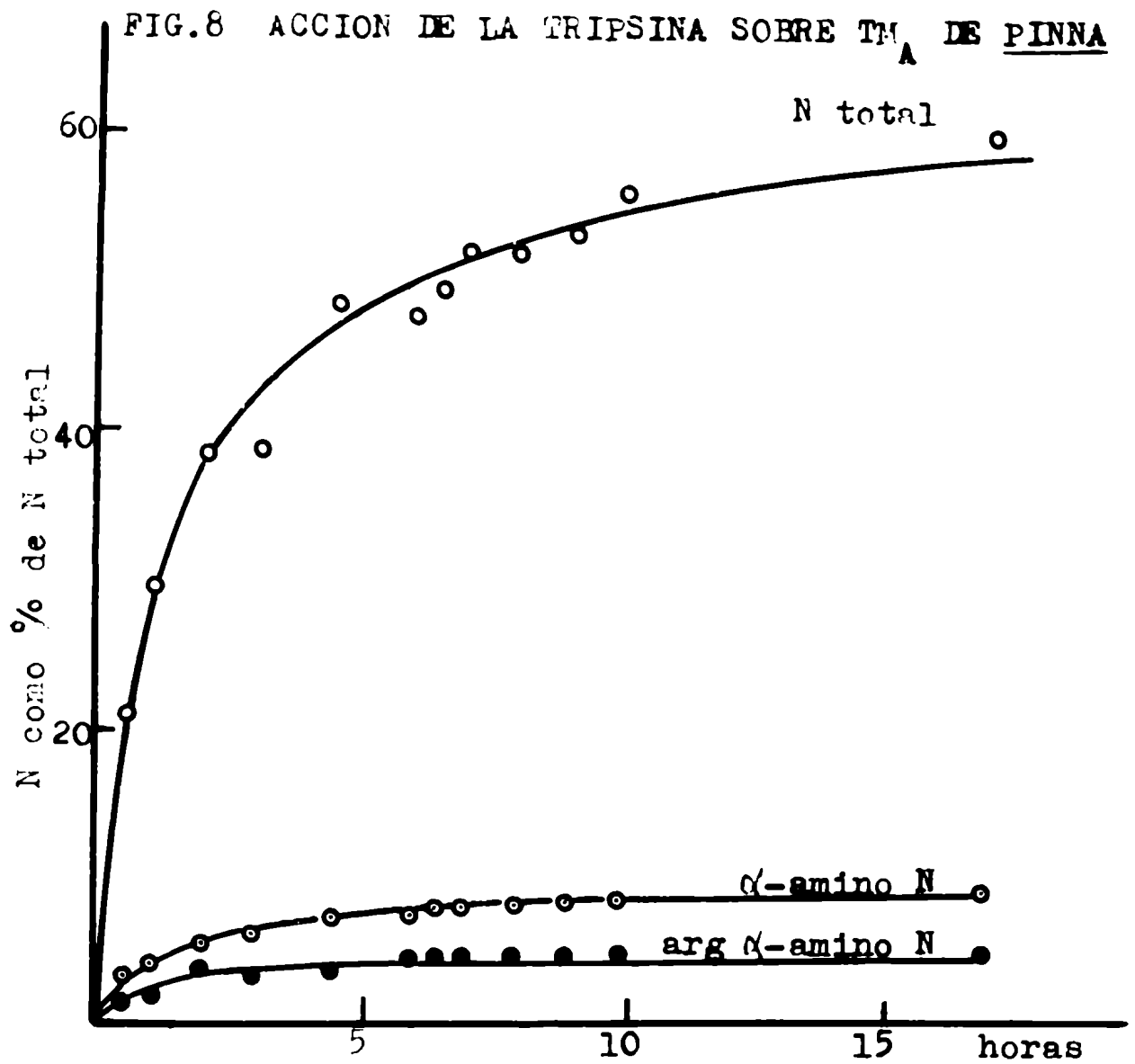
HIDRÓLISIS TRIPSICA DE TM_A DE PINNA

Después de una hidrólisis de 24 h. de TM_A de Pinna nobilis, realizada bajo las condiciones establecidas, se obtuvo mucho material dializable y quedó un fragmento "F" no dializable que precipitó después del agregado de TCA 3%. Este fragmento una vez aislado bajo condiciones

neutras, demostró ser altamente resistente a ulterior acción tripsinica. Tiene un peso molecular que es aproximadamente la mitad del peso molecular de la proteína nativa y su composición de aminoácidos se asemeja mucho a la de la TM_A .

Velocidad y extensión de la acción de la tripsina sobre TM_A de Pinna

La proteólisis fué seguida de acuerdo a lo descrito en "Métodos" y los datos obtenidos fueron representados en función del tiempo. Como puede verse en las figuras 8, 9 y 10, la tripsina actúa al principio muy rápidamente sobre la TM_A . Durante la primer hora ya ha tenido lugar el 50 % de la hidrólisis total. En adelante la reacción continúa lentamente hasta el punto final, el que se alcanza aproximadamente 6 h. después de iniciada la proteólisis. El número de uniones rotas por molécula se calculó usando datos obtenidos por diferentes métodos: consumo de álcali, contenido de α -amino nitrógeno en la fracción soluble de TCA y dinitrofenilación de los grupos terminales en la mezcla de la digestión. La tabla VII muestra los resultados obtenidos en algunos experimentos en los que se utilizaron diferentes concentraciones de proteína y aproximadamente la misma relación enzima sustrato. Esta tabla muestra que las variaciones de la concentración proteica de 6.5 a 9.5 mg/ml, no producen una variación importante en el número de uniones atacadas por molécula, cosa que también se observó usando el método de la ninhidrina.



Análisis efectuados en el sobrenadante después del agregado de TCA 3%. Expto. N°6 (ver tabla VIII)

FIG.9 CURVAS COME IDAS EN LA TITULACION A pH CONSTANTE DURANTE LA NITROSIACION DE LA HEMOGLOBINA

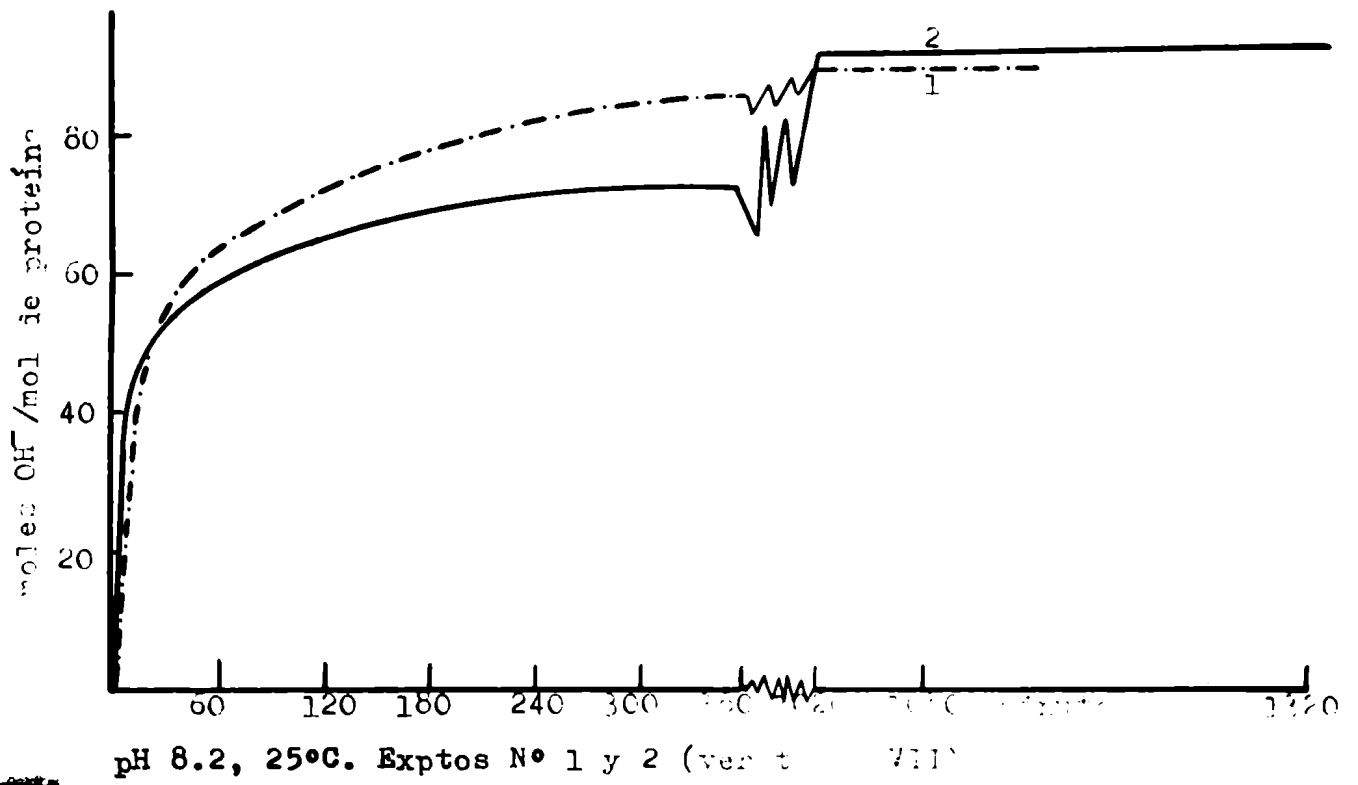


FIG.10 CURVAS COME IDAS EN LA TITULACION A pH CONSTANTE DURANTE LA NITROSIACION DE LA HEMOGLOBINA

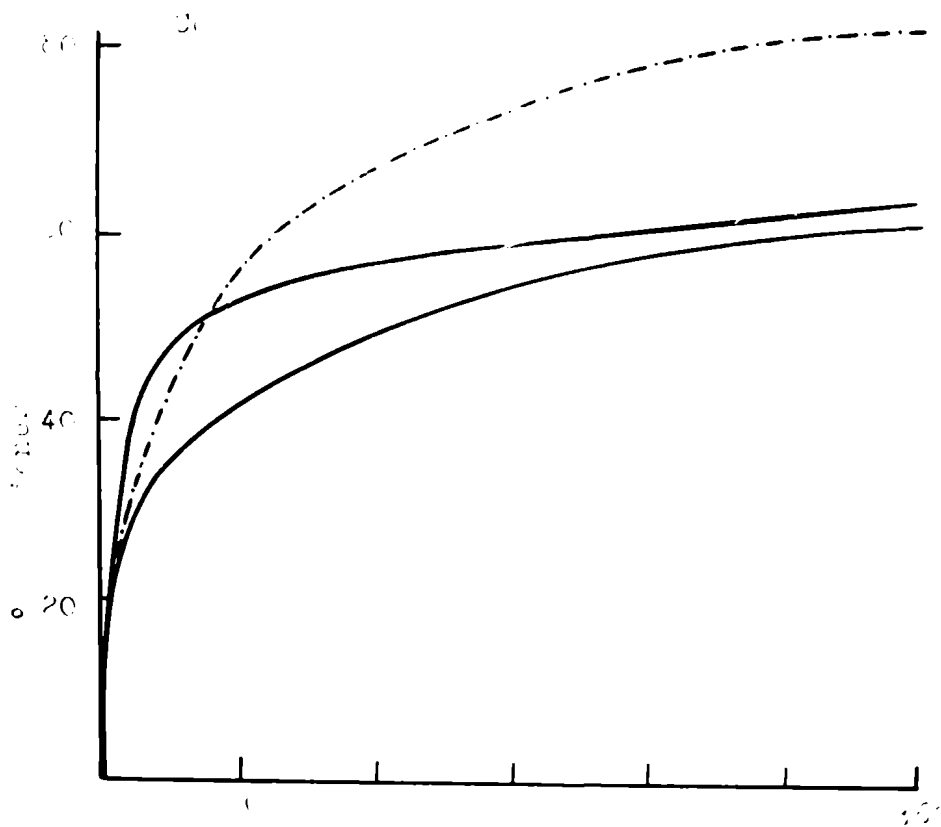


TABLA VII

Acción de la tripsina sobre la TM_A de Pinnas

(pH 8.2, 25°C)

<u>Exp. N°</u>	<u>Concent. de prot. mg/ml</u>	<u>Enzima: sustrato (por peso)</u>	<u>Tiempo</u>	<u>N° de uniones atacadas /moles.</u>		
				<u>EDNH</u>	<u>matada la ninhidrina</u>	<u>suavizada de álcali</u>
1	5.7	1.2:100	19h.30min.			89
2	6.2	1.4:100	19h.30min.			89
			23h.30min.	97		92
3	6.5	1.25:100	19h.30min.		123	
			23h.		137	
			24h.		141	
4	6.6	1.1:100	19h.30min.		116	
5	9.5	0.9:100	19h.30min.		135	
			24h.		150	

Los cálculos del contenido de α -amino nitrógeno de la fracción soluble en TCA (ver tabla VIII) también confirman esos resultados.

La figura ocho ilustra un experimento en el que la relación enzima sustrato es más elevada que la que se utilizó generalmente. En el comienzo de la digestión tripsina, la relación fué de 10:100 por peso y después de 6 h. se agregó más enzima, levantando la relación a 16:100. Este ulterior agregado de enzima no introdujo cambio alguno en la pen-

TABLA VIII

Acción de la Tripulina sobre la TM₂ de Pinnis

Las digestiones se hicieron a 25°C en buffer de borato a 0.25 M pH 8.2

Las determinaciones se hicieron en muestras retiradas después de 24h. de digestión

Exp.	Conc. de prot. mg/ml	sustrato (por peso)	N (% de N total)		α -amino N (% de N total)		α -amino N de arg		
			TCA sol.	TCA ins.	TCA soluble hidrolizado	TCA ins. no hidrolizado	TCA ins. hidrolizado	Sakaguchi TCA sol.	TCA ins.
6	4.3	16:100	59.4	35.2	-	8.85	24.1	4.3	2.9
7	5	1.2:100	49.4	35.2	36	-	26.1	4.5	3.1
3	6.5	1.25:100	-	-	-	8.7	-	-	-
6	7	1:100	57.2	31	31.4	-	28	-	-
4	8.6	1:100	45.1	42.7	32.4	7.1	30.5	4	3.4
3	9.5	0.9:100	-	-	-	9.3	-	-	-

α - amino nitrógeno teórico : 65.9 % de N total

α -amino nitrógeno de arginina: 6.0 " de N total (Moore y Stein);

8.1 % de N total (Sakaguchi)(ver cap.I pág.20)

diente de la curva. A pesar de la gran cantidad de enzima utilizada los valores de nitrógeno total, α -amino nitrógeno y α -amino nitrógeno de arginina no variaron con respecto a los valores obtenidos en digestiones tripsínicas hechas bajo las mismas condiciones (pH y temperatura) pero con una relación enzima sustrato de 1:100. Sin embargo, si comparamos los resultados de la tabla VII con los de la tabla IX, en los que la hidrólisis se llevó a cabo a pH y temperatura levemente mas elevadas parecería que esto no es manticas para concentraciones de proteína por debajo de 4 mg/ml. Por lo tanto a bajas concentraciones de proteína el número de uniones peptídicas atacadas por molécula parece ser menor que el obtenido al utilizar altas concentraciones de proteína. En la tabla VII se muestran los resultados de dos experimentos (N^o 1 y 2) en los que la extensión de la reacción se siguió mediante el consumo de álcali. La concentración de proteína y la relación enzima:sustrato fueron similares a las que se utilizaron cuando la digestión fué seguida por el método de coloración con ninhidrina. Los valores sin embargo no coinciden ya que el valor medio obtenido por el consumo de álcali después del mismo tiempo de digestión es de 0.9. El número teórico de las uniones susceptibles atacadas por molécula es de 193, según la composición de aminoácidos de M_A de Pinna (Bailey y Nuegg, 1960). La tabla IX muestra dos experimentos más (N^o 9 y 10) en los que la proteólisis fué seguida por el consumo de álcali y del digerido se tomaron alícuotas a diferentes tiempos a fin de determinar el α -amino nitrógeno en la fracción soluble en TCA. Una vez más los resultados obtenidos por el método de la ninhidrina son más elevados que los obtenidos por el consumo ^{de} álca-

TABLA IX

Acción de la tripsina sobre T_M de Pinnas
(pH 8.5, 30°C)

<u>Exp. N°</u>	<u>Concent. de prot. mg/ml</u>	<u>Enzima: sustrato (por peso)</u>	<u>Tiempo</u>	<u>N° de uniones atacadas/molec. método de la ninhidrina</u>	<u>consumo de álcali</u>
9	3.4	1:100	3h.30min	65	60
			6h.	70	62
			15h.	88.5	69
			23h.	99	79
10	3.4	2.5:100	6h.	115	82
			23h.	149	-
11	4	0.6:100	6h.	-	65
			24h.	114	-

11. Después de una hidrólisis tripsina de 6h. el número de las uniones atacadas por molécula en el experimento N° 10 dió 115 (por ninhidrina) y 82 (por consumo de álcali); la relación 115/82 es igual a 1.4 . Esta misma relación obtenida de los valores medios de experimentos reunidos en la tabla VII es de 1.4. Esto significa que el método de la ninhidrina da valores para el número de uniones atacadas por molécula

que son de alrededor de 40 % más elevados que los obtenidos por el método de consumo de álcali.

A fin de controlar el método de la ninhidrina sobre un péptido se determinó el α -amino nitrógeno de un tripéptido Ileu.Gly.Gly. antes y después de la hidrólisis ácida total. La determinación por el método de ninhidrina, de los aminoácidos libres coincidió con el valor esperado teóricamente, pero en el caso del tripéptido sin hidrolizar el valor de la ninhidrina fue un 35 % menor que el valor esperado.

g. de α -amino N/100 g. de tripéptido

	<u>Sin hidrolizar</u>	<u>Hidrolizado</u>
Teórico	5.7	17.1
Experimental	3.7	17.4

Debiéramos esperar pues que el método de la ninhidrina diera valores bajos para el número de uniones atacadas. Pero, en realidad, los valores fueron siempre mayores que aquellos obtenidos por consumo de álcali.

Debido a la incertidumbre provocada por el método de la ninhidrina, se utilizó una forma diferente para determinar los grupos N-terminales liberados durante la proteólisis. Esto se efectuó haciendo reaccionar el hidrolizado triásico con FDNB según lo describe en "Métodos". El número total de los grupos α -amino obtenido por este método, 6.0 (ver tabla λ) equivale a 97 uniones por molécula, valor que coincide con el

TABLA I

Determinación de los DNP-amino ácidos en el hidrolizado tripsico de
TN_A de Finna

<u>α-amino nitrógeno como % de N total</u>	
DNP-amino ácidos solubles en éter (DNP-leu, DNP-His, di-DNP-lys, DNP-phe, DNP-ala DNP-gly o DNP-ser)	5.7 %
DNP-arg	2.3 %
Total	6.0 %

número de uniones rotas obtenidas en el autotitulador, (tabla VII).

Este experimento indicaría que la ruptura de las uniones peptídicas podría ser determinada con exactitud por el consumo de álcali siempre que se incluyan blancos apropiados y que se tenga en cuenta el pK de los grupos amino formados (según se indicó en Métodos).

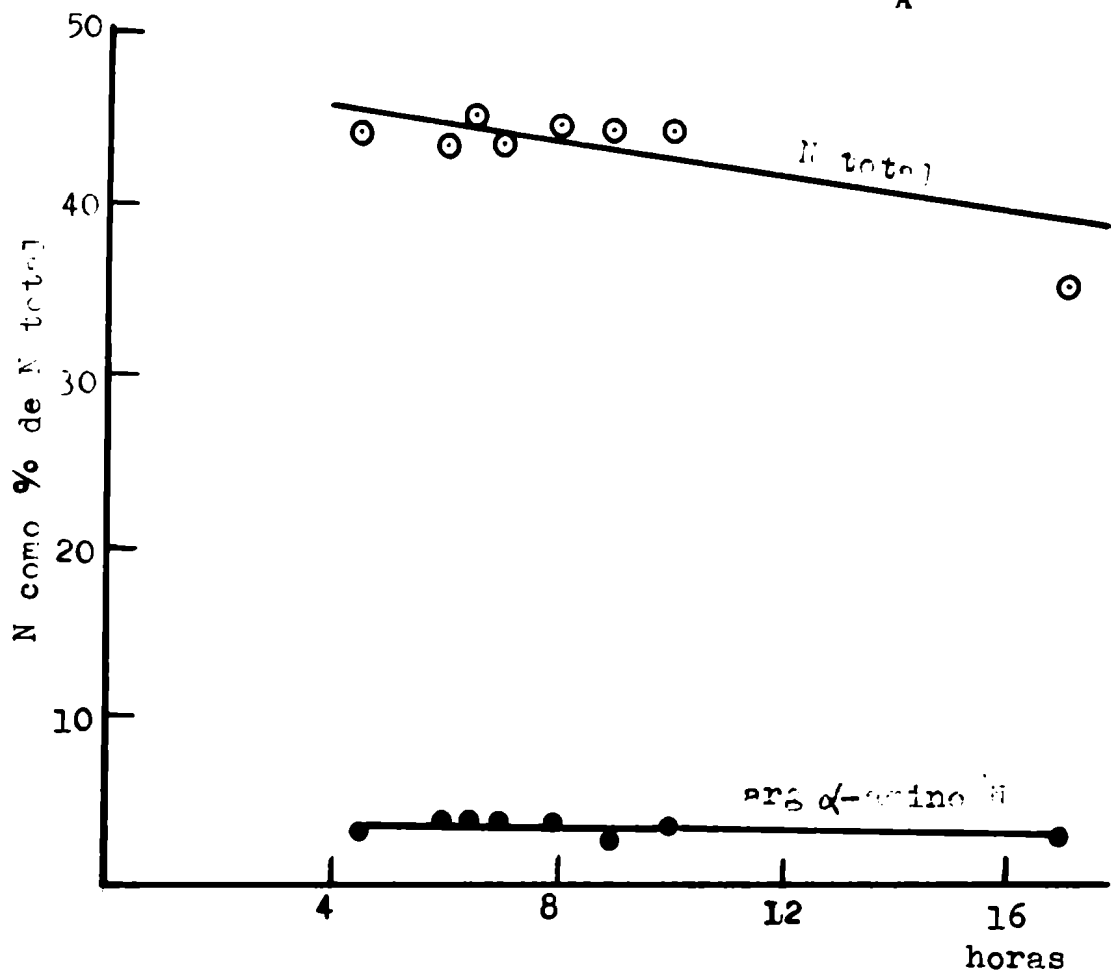
En las fracciones soluble e insoluble en TCA se determinó nitrógeno total, α -amino nitrógeno por el método de la ninhidrina (antes y después de hidrólisis ácida total), y α -amino nitrógeno de arginina después de hidrólisis, por el método de Sakaguchi. La tabla VIII muestra estos valores para diferentes concentraciones de proteína y diferentes relaciones enzima sustrato. Puede verse que variaciones en las concentraciones

de proteína comprendidas entre 4.3 y 9.5 mg/ml con relaciones enzima-sustrato de alrededor de 1:100 (con una excepción en la cual esta relación fué aumentada a 16:100) no influyen en el contenido de nitrógeno total de la fracción soluble en TCA; lo mismo ocurre con el contenido de α -amino nitrógeno y α -amino nitrógeno de arginina en las fracciones soluble e insoluble en TCA. El nitrógeno de la fracción soluble en TCA, es de alrededor de 50 % del nitrógeno total. El α -amino nitrógeno después de la hidrólisis total también se divide en partes iguales entre las fracciones soluble e insoluble en TCA. En la fracción soluble en TCA es de alrededor del 33 % del nitrógeno total del hidrolizado y en la fracción insoluble alcanza al 30 % del nitrógeno total del hidrolizado. Según la composición de aminoácidos de la T_A (Bailey y Nüegg, 1960), el α -amino nitrógeno después de la hidrólisis total sería de 65.9 % del nitrógeno total. El α -amino nitrógeno de arginina en la fracción soluble en TCA es otra vez de alrededor del 50 % del contenido total de α -amino nitrógeno de arginina (estos son valores medios de los datos de la tabla VIII).

El aumento del color producido por la ninhidrina después de la hidrólisis total (ver tabla VIII) fué aproximadamente 4 veces; lo que demuestra que los péptidos liberados por la tripsina, contienen en promedio menos de 4 residuos.

La proteólisis fué también seguida por el contenido de nitrógeno total y el α -amino nitrógeno de arginina en el precipitado obtenido por el agregado de TCA. La fig. 11 muestra los resultados. Debido a la poca precisión del método esta forma de seguir la proteólisis sólo

FIG.11 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE TM_A DE PINNA



Determinaciones efectuadas en la fracción insoluble en TCA después de hidrólisis total, expto n°6 (ver tabla VIII).

fué utilizada en un experimento.

Considerando todos estos resultados, podemos decir que el número de uniones atacadas es de aproximadamente la mitad de las uniones susceptibles presentes en la molécula. Esta conclusión es confirmada a su vez por los estudios físicos y químicos realizados sobre el fragmento que queda después del tratamiento tripsico de la proteína nativa.

Resulta interesante comprobar que después de la proteólisis cerca del 50 % de la arginina queda en el precipitado. Esto sugiere que muchas de las uniones dentro del orden de especificidad de la tripsina no son atacadas salvo que una gran proporción de los péptidos sean insolubles en TCA y no sean dializables. En efecto, en la tabla XI se comparan los contenidos de α -amino nitrógeno y arginina de las fracciones soluble e insoluble en TCA con los de los materiales dializable y no dializable. De la observación de dicha tabla surge la equivalencia de las fracciones soluble e insoluble en TCA con las fracciones dializable y no dializable respectivamente.

La arginina total (como % de α -amino nitrógeno) liberada en la digestión tripsica se calculó a partir de los datos obtenidos por los métodos de Sakaguchi y ninhidrina respectivamente y el mismo valor se calculó a partir de datos obtenidos por el método del FIMB según se describe en el capítulo de "Métodos".

TABLA XI

Distribución de nitrógeno en hidrolizados tripaicos de TM, de Pinna

Las digestiones se realizaron en buffer de borato 0.25 M a pH 8.2 a 25°C

Los análisis se hicieron sobre muestras retiradas después de 24h. de digestión.

			<u>Exp. N° 7</u>	<u>Exp. N° 8</u>
α -amino nitrógeno después de hidrólisis ácida, como % de nitró- geno total	Digerido tratado con TCA	TCA sol.	36.1	32.4
		TCA pp	26.1	30.5
	Digerido dializado	Dializable	35.6	32.6
		No dial	27.5	33.0
	<u>Total (teórico 65.9)</u>		<u>62.1</u>	<u>63.1</u>
α -amino nitrógeno de arginina como % de nitrógeno total	Digerido tratado con TCA	TCA sol.	4.5	4.0
		TCA pp	3.1	3.4
	Digerido dializado	Dializable	3.9	4.7
		No dialis	2.6	3.5
	<u>Total (teórico 6)</u>		<u>7.6</u>	<u>6.7</u>
Concentración de proteína (mg/ml)			3.0	8.6
Relación enzi- ma sustrato (por peso)			1.2:100	1:100

Cantidad de α -amino nitrógeno arginínico liberado por digestión
tripsina en 1M de Pinná

Sakaguchi	46% del α -amino nitrógeno liberado
FDNB	30% del α - " " "

Puede observarse que cerca del 30% de la arginina presente en la parte soluble del digerido tratado con FDNB existe como ONP-arginina. Esto señala un hecho muy interesante: una gran cantidad de arginina liberada durante la proteólisis se encuentra en posición N-terminal o como arginina libre. De acuerdo a la especificidad de la tripsina los residuos arginina y lisina debieran encontrarse como grupos C-terminales. El hecho de encontrar valores tan grandes de ONP-arginina surtiría de la existencia en la proteína nativa de un número considerable de secuencias polibásicas conteniendo arginina, siempre que la acción de la tripsina sobre poliarginina sea sea similar a su acción sobre polilisina (Waley y Watson, 1953). En ese caso se encontraría tri y diarginina y cierta cantidad de arginina libre. En el capítulo IV se discute más detalladamente este punto.

Cinética de la proteólisis

Las figuras 9 y 10 representan curvas típicas del consumo de

álcali a pH constante obtenidas durante la proteólisis de TN_A por tripsina a $25^{\circ}C$ y $30^{\circ}C$. En ellas se representa el consumo de álcali por molécula de proteína en función del tiempo.

Los datos obtenidos a pH constante fueron representados gráficamente en forma analítica, similar a la usada por Léonis (1948). Las reacciones de primer orden pueden representarse en su forma integrada por la siguiente ecuación:

$$A_0 - A = A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$\ln (A_0 - A) = \ln A_0 - kt \quad (2)$$

$$2.3 \log (A_0 - A) = 2.3 \log A_0 - kt \quad (3)$$

donde A es el número de uniones atacadas al tiempo t y A_0 el número de uniones susceptibles en la molécula. De este modo, representando $\log.(A_0 - A)$ en función del tiempo se obtiene una recta para una reacción de primer orden, con pendiente igual a $-k$ y ordenada al origen igual al $\log. A_0$. Tal representación se muestra en la fig. 12 (ordenada izquierda) para una digestión en la que se utilizó una concentración de proteína de $4mg/ml$, relación enzima sustrato 0.6:100 a pH 8.5 y a $30^{\circ}C$ (exp. N° 11). Se puede ver en este experimento que la última parte de la representación es lineal, lo cual demuestra que la reacción es de primer orden en este período. Cuando esta línea extrapolada a tiempo cero es sustraída de la curva experimental y la curva obtenida por diferencia se representa en función del tiempo, se obtiene otra recta de mostrándose así que dos reacciones independientes con diferentes velocidades ocurren simultáneamente (fig.13). La rec-

FIG.12 ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TIPICA

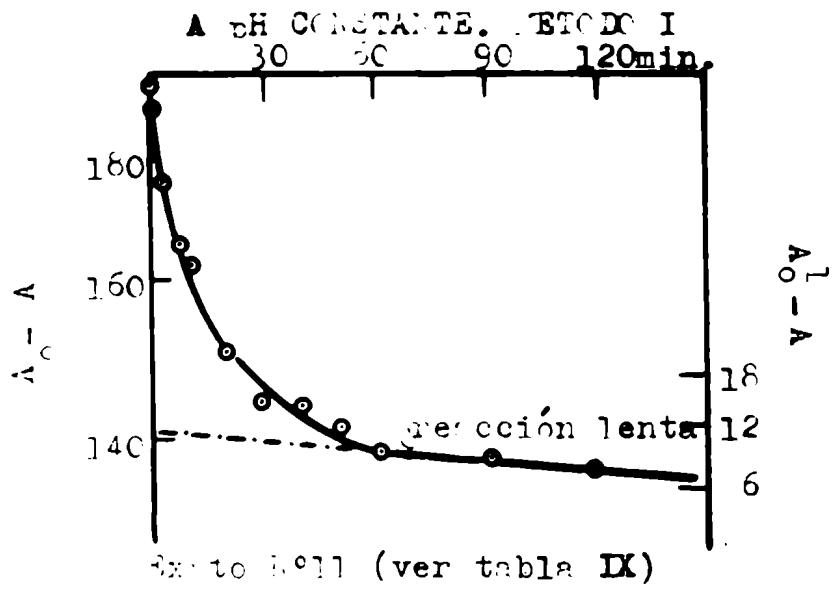
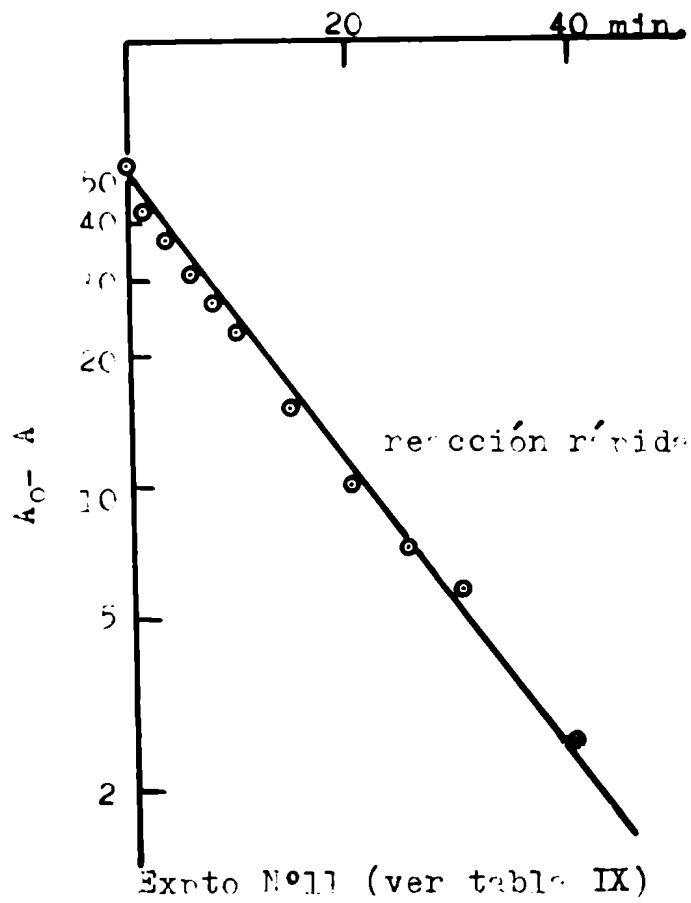


FIG.13 ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TIPICA

A pH CONSTANTE. CURVA DIFERENCIA. METODO I



ta que representa la reacción lenta intercepta a la ordenada a un valor de $\log A_0$ que da un número inicial arbitrario de uniones susceptibles para esta reacción lenta. Este valor es arbitrario porque se considera que A_0 es igual al número total de grupos arginina y lisina presentes en la molécula y, como se verá mas adelante (capítulo IV), no todas las uniones básicas presentes son atacadas por la enzima. Un medio de determinar el valor real de A_0^1 (uniones rotas en la reacción lenta) sería calcular primero A_0^r (uniones rotas en la reacción rápida) y calcular A_0^1 restando A_0^r del número total de uniones rotas obtenidas experimentalmente cuando la reacción es completa. Ahora, volviendo a representar la reacción lenta, utilizando el valor de $\log A_0^1$ así obtenido, $-k_1$ puede ser calculado de la pendiente de la recta (fig. 12 ordenada derecha). La constante de la velocidad de la reacción rápida es la pendiente de su recta. La reacción rápida se completa en 1 h. aproximadamente y su constante de velocidad es aproximadamente 20 veces mayor que la constante de velocidad de la reacción lenta (tabla XII, método I, exp. N° 11).

También se empleó otro procedimiento analítico (método II) en el que el número de uniones realmente accesibles es calculado a partir de datos experimentales. Para una reacción de primer orden dA/dt es una función lineal de A y si al representar dA/dt en función de A se extrapola para el valor $dA/dt = 0$ se obtiene A_0 (fig 14). La fórmula 3 puede ser también escrita:

$$2.3 \log. \left[\frac{A_0 - A}{A_0} \right] = -kt \quad (4)$$

TABLA XII

Comparación de las Constantes Cinéticas de Reacción Calculadas por los dos Métodos Analíticos

Exp N ^o	Método I			Método II		
	Reacción rápida		Reacción	Reacción rápida		Reacción
	<u>1^a</u>	<u>2^a</u>	<u>lenta</u>	<u>1^a</u>	<u>2^a</u>	<u>lenta</u>
1	-k	9.6	1.7	11.4		8.0
	A ₀	34	17	31		34
2	-k	26.9	5.6	15.1	0.9	0.7
	A ₀	37	14	37	15	47
9	-k	23	0.2	50.4	10.2	0.5
	A ₀	11.2	23.2	17	12	41
11	-k	7.9	0.4	7.7		6.5
	A ₀	53	12	55		15

k min⁻¹ 10² está calculada con logaritmos naturales

FIG.14 VELOCIDAD DE ATAQUE EN FUNCION DEL N° DE UNIONES HIDROLIZADAS (DATOS DE LA FIG.10 CURVA II)

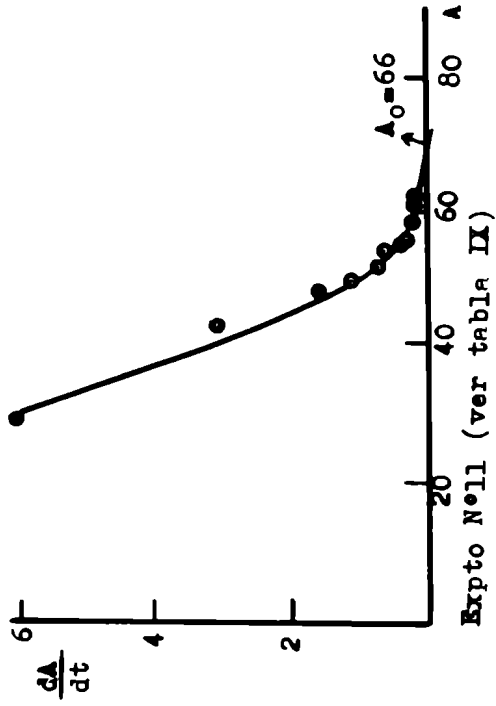


FIG.16 ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TIPICA DE pH CONSTANTE. METODO II

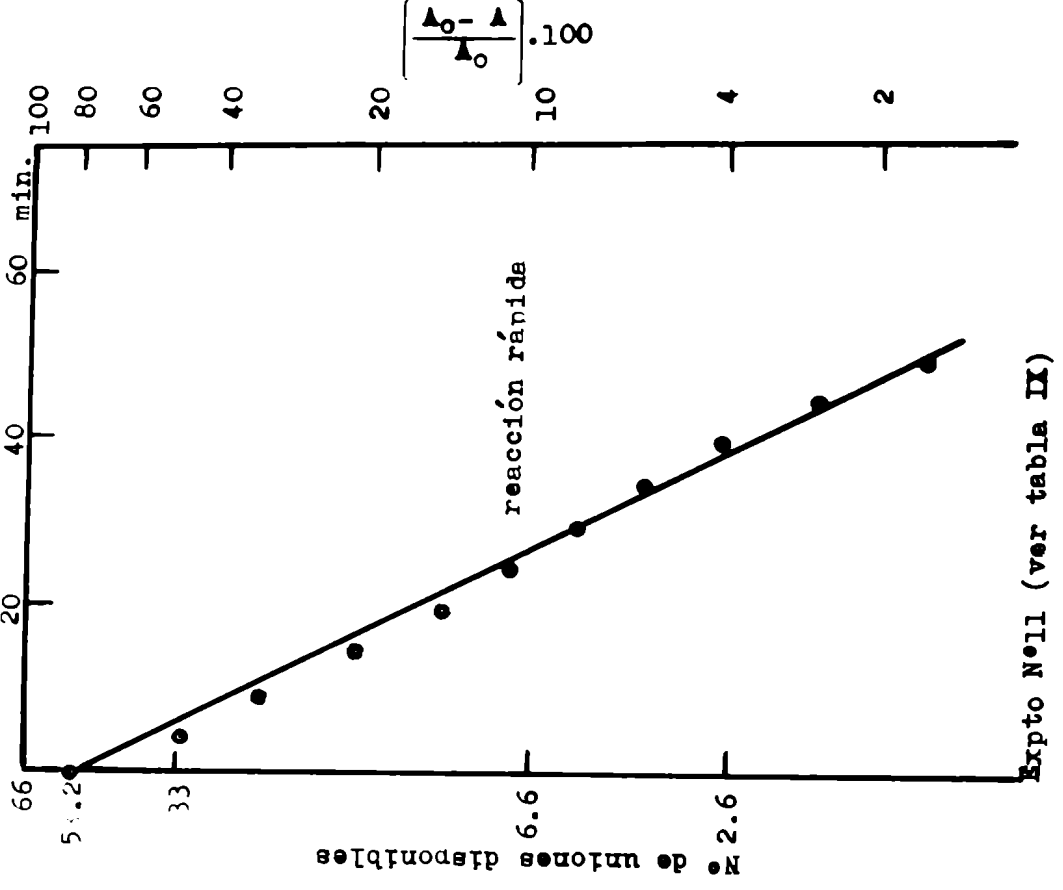
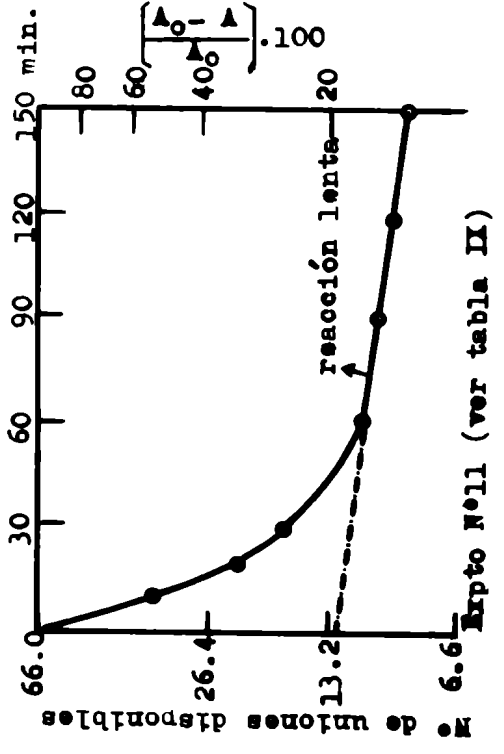


FIG.15 ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TIPICA DE pH CONSTANTE. METODO II



La representación de $\log. (A_0 - A/A_0)$ en función de t da una recta para las reacciones de primer orden. Como puede verse (fig 15), la última parte de la representación es lineal. Siguiendo el mismo procedimiento gráfico utilizado antes, es decir, representando la curva obtenida por diferencia en función del tiempo se obtiene nuevamente una recta (fig. 16). La pendiente de cada recta representa la constante de velocidad correspondiente a cada reacción. Las constantes calculadas por este segundo método coinciden, en este experimento, con las calculadas por el primer método (tabla XII, método II, exp. N° 11). Sin embargo los valores de las constantes de velocidad obtenidos en algunos experimentos por ambos métodos son diferentes, debido a las diferencias en los distintos valores de A_0 obtenidos por ambos procedimientos de cálculo (tabla XII); más aún, en algunos experimentos ambos métodos dieron tres reacciones de primer orden en lugar de dos (fig. 17, tabla XII). Vemos pues que el análisis cinético de los datos obtenidos a pH constante indica claramente la existencia de por lo menos dos, y posiblemente tres reacciones simultáneas que ocurren a velocidades diferentes. Los dos métodos analíticos empleados muestran claramente que existe una gran diferencia en las velocidades de las reacciones rápida y lenta, sin embargo la evaluación cuantitativa de los resultados es pobremente reproducible y no permite estudios cinéticos precisos.

Estos resultados sugieren que existe una clase de uniones peptídicas mucho más susceptibles al ataque que otras. La resistencia relativa o completa de algunas de las uniones teóricamente susceptibles puede explicarse por una secuencia específica de aminoácidos en su cer-

17 ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TIPICA

DE pH CONSTANTE. METODO I

Ejemplo N°2 (tabla VIII)

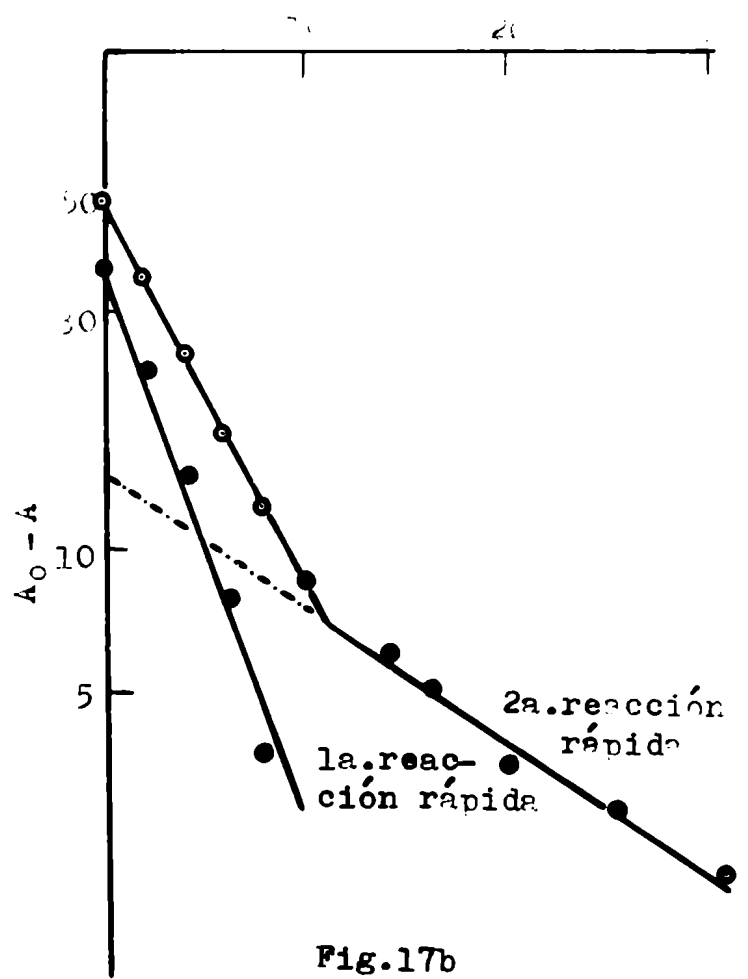
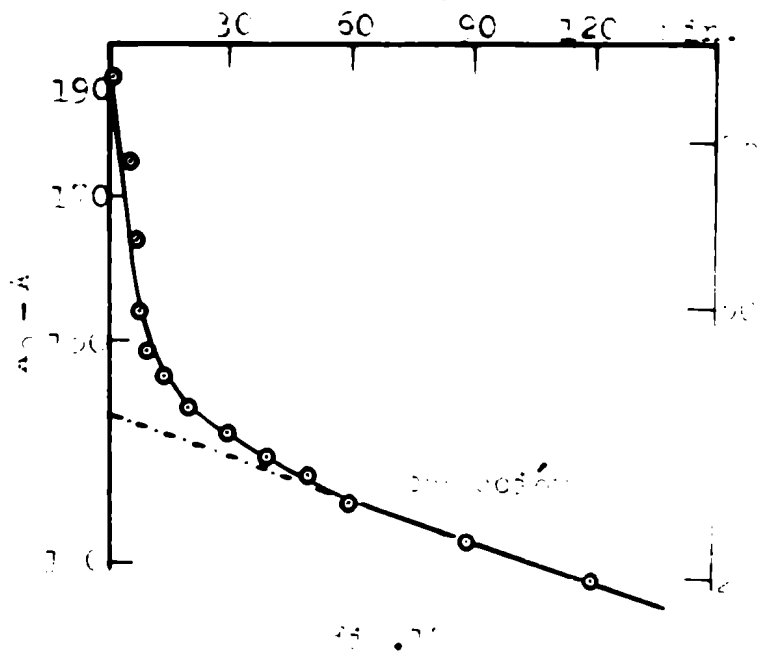


Fig.17b

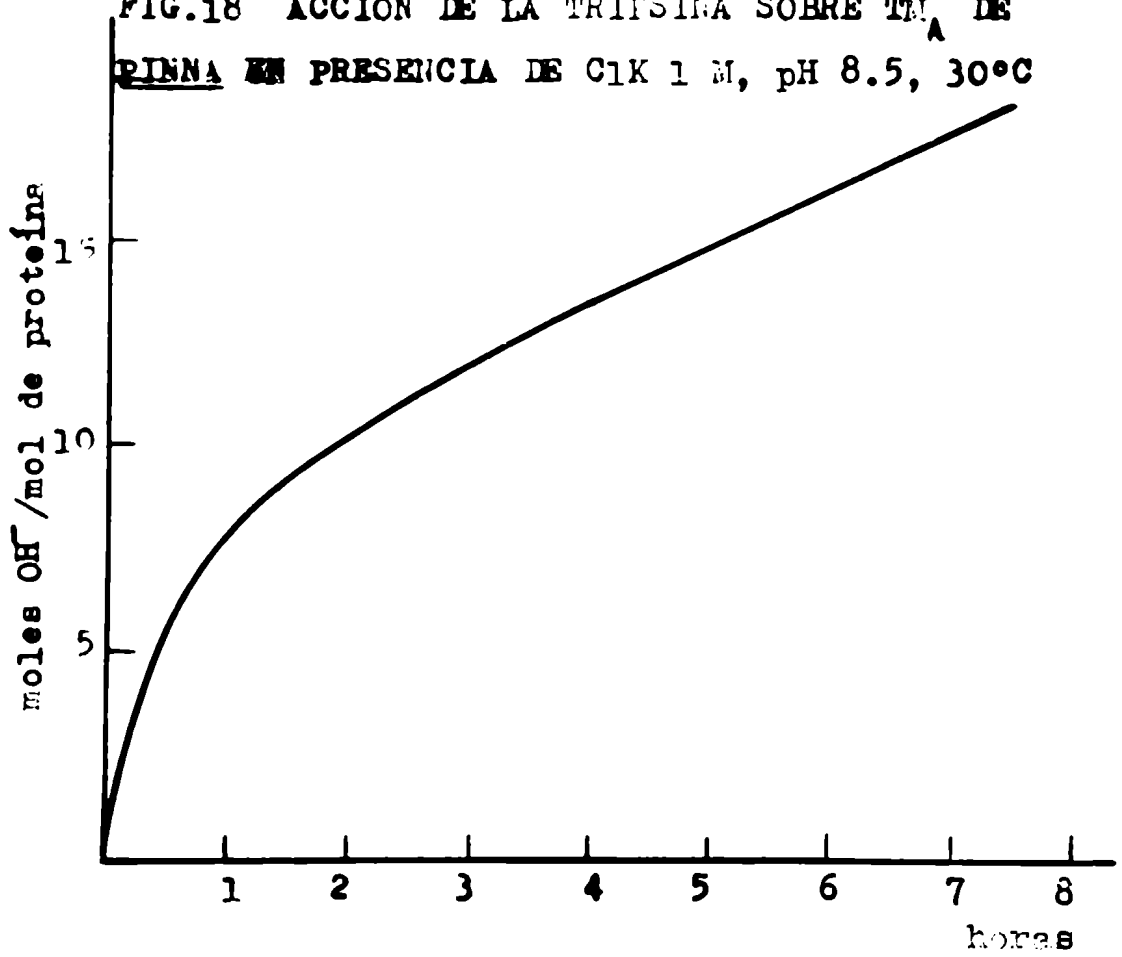
canía. Es bien sabido que la tripsina es altamente específica, atacando solo los grupos carboxilos de los residuos lisina y arginina en la cadena polipeptídica, pero no existe razón alguna para creer que la velocidad de ataque cerca de estos dos aminoácidos básicos sea siempre la misma. Un buen ejemplo de ésto es el interesante trabajo realizado por Kaley y Watson (1953) sobre la acción de la tripsina sobre polilisisina; en él los autores muestran la falta de acción de la tripsina en las uniones peptídicas terminales (vecinas a un grupo carboxilo o amino) y la diferente reactividad de tetra, tri y dilisisina. La tetralisisina reacciona lentamente con la tripsina dando en su mayor parte dilisisina; la trilisisina es mucho menos reactiva y la dilisisina es completamente inerte. La acción de la tripsina sobre ribonucleasa oxidada es otro buen ejemplo (Redfield y Anfinsen, 1956; Hirs y col., 1956). Un examen de la velocidad de aparición de los péptidos que se midió cromatográficamente, sugiere que las secuencias tales como Arg. Glu y Lys. Glu son atacadas mucho más lentamente que secuencias tales como Lys. Thr, Lys. His o Arg. Ala; Arg. Pro y Lys. Pro en cambio no son atacadas.

El hecho de que la molécula de TM_A no tiene puentes S-S y está compuesta por una única cadena elimina la posibilidad de que la estructura terciaria o interacciones entre cadenas actúen interfiriendo en el ataque de la enzima. Sin embargo, la molécula tiene una proporción elevada de residuos básicos y ácidos. La elevada densidad de las cargas negativas, orientada quizá de alguna manera específica, puede ocultar a los grupos básicos de la molécula de TM_A , contribuyendo al ataque selectivo por tripsina. Se ha postulado que este tipo de es-

estructura interviene en el ataque de uniones selectivas que ocurre durante la activación tripsica del tripsinógeno (Davio y Neurath, 1955). No se extraen de este trabajo datos experimentales que sostengan esta teoría y por el contrario, cuando la proteólisis se realizó a fuerza iónica elevada (KCl 1 M) el número de uniones atacadas por molécula fué muy bajo. Este experimento se realizó a bajas concentraciones de proteína (0.8 mg/ml) y la relación enzima sustrato (por peso) fué de 2:100 (fig.18) . 18 es el número de uniones atacadas por molécula obtenido en este caso; no está claro, sin embargo si este resultado se debe a las bajas concentraciones de proteína utilizadas o a una inhibición provocada por el KCl 1 M. Este es el resultado de un experimento y podría ser interesante estudiar la influencia de la fuerza iónica sobre la proteólisis.

Mihalyi y Harrington, (1959) sugirieron que las diferencias en la velocidad de reacción de la proteólisis se debe a diferencias regionales en la estructura secundaria y terciaria. Según ellos las porciones de la molécula distribuidas al azar reaccionan más rápidamente que las regiones en las que las uniones hidrógeno estabilizan la estructura. Esta hipótesis no puede explicar el caso presente en el que la molécula, si la interpretación de los datos ópticos es correcta, existe completamente en la configuración de α -hélice, y sólo el 50 % es atacado en la proteólisis.

FIG.18 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE T_A DE
PINNA EN PRESENCIA DE ClK 1 M, pH 8.5, 30°C



Estudio Comparativo de la Digestión Tripsica de TM_A de Pinna nobilis
Pecten maximus y Aulacomya magellanica

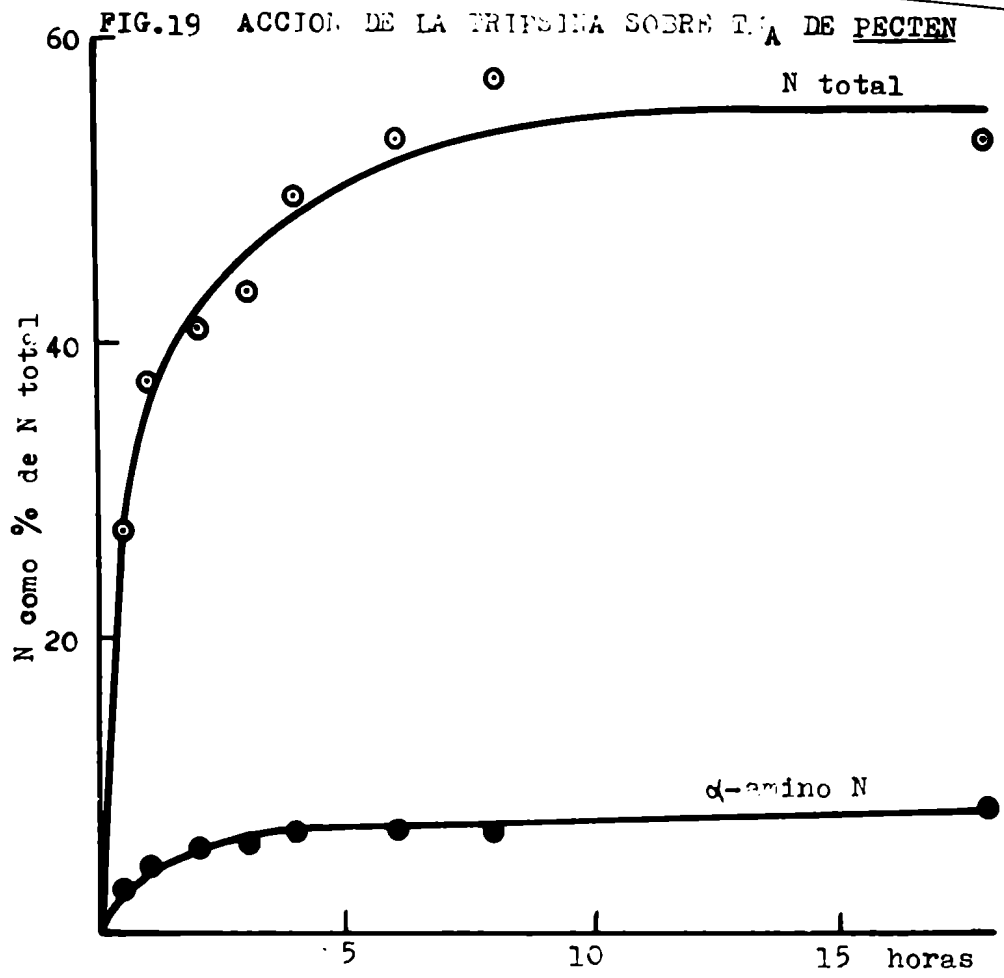
Se realizaron algunos experimentos con TM_A de Pecten y Aulacomya bajo las mismas condiciones descriptas para Pinna nobilis, salvo indicación diferente.

Un experimento (fig.19), realizado con Pecten con una concentración de proteína de 4.6 mg/ml y una relación de enzima: sustrato de 6:100 dió, por el método de la ninhidrina 147 uniones atacadas por molécula, resultado comparable con el obtenido por digestión tripsica de TM_A de Pinna, realizada bajo condiciones similares (tabla XIII)

TABLA XIII

Digestión Tripsica de TM_A de Pecten y Pinna
(temp. 25°C pH 8.2)

<u>Concentración</u> <u>de proteína</u> <u>mg/ml</u>	<u>Relación</u> <u>enzima:</u> <u>sustrato</u> <u>(por peso)</u>	<u>tiempos</u>	<u>Uniones</u> <u>atac/sol</u> <u>(ninhidrina)</u>	<u>N en la fracción</u> <u>sol.en TCA co-</u> <u>mo % de N total</u>
<u>Pecten</u> 4.6	6:100	18h.	147	53.4
<u>Pinna</u> 4.3	16:100	17h.	144	59.4



Determinaciones efectuadas en la fracción soluble en TCA. (Las condiciones de la T.M.A. son las mismas que en la T.M.A. soluble)

El contenido de nitrógeno total en la fracción soluble en TCA aumenta ligeramente al disminuir la relación enzima:sustrato, lo que significaría que en este caso, como en la digestión trípica de TM_A de Pinna, los cambios en la relación enzima sustrato no afectan la extensión de la proteólisis (tabla XIV).

TABLA XIV

Acción de la Tripsina sobre TM_A de Pecten
(temp 25°C, pH 8.2)

<u>Concentración proteica</u> <u>mg/ml</u>	<u>Relación enzima sustrato</u> <u>(por peso)</u>	<u>N en la fracción</u> <u>soluble en TCA</u> <u>como % del N total</u>
4.6	6:100	53.4
3.9	0.9:100	63

La digestión fué también seguida por el consumo de álcali, en el autotitulado. La TM_A de Pecten muestra un comportamiento similar al de la TM_A de Pinna en el número de uniones atacadas al final de la reacción (tabla XV).

TABLA IV

Digestión Tripsica de TM_A de Pinna y Pecten

<u>Concentración de proteína mg/ml</u>	<u>Relación enzima sustrato (por peso)</u>	<u>Condiciones pH</u>	<u>temp.</u>	<u>Uniones atacadas (antititulado)</u>
<u>Pecten</u>	1.9	1:100	8.2	30°C 48(2h.30 min.)
<u>Pinna</u>	3.4	1:100	8.5	30°C 52(2h.30 min.)

Como se muestra en las tablas XIII, XIV y XV, la acción de la tripsina sobre la TM_A de Pecten y Pinna es muy similar tanto en velocidad como en extensión de reacción. Nuevamente alrededor del 50 % de N total es soluble en TCA al final de la reacción y el material insoluble en TCA aún contiene arginina.

Respecto a la TM_A de Aulacomya se realizó el siguiente experimento. De una suspensión de TM_A en buffer de borato 0.23M pH 8.2 de concentración 2.7 mg/ml, se separó 1 ml que fue utilizado como blanco. Al ml restante se le agregó tripsina en la proporción de 1:30 (en peso), dejándose la mezcla a 30°C durante 24 h. A ambos tubos se les agregó igual volumen de TCA 3 %, se centrifugó y en el sobrenadante se determinó α -amino nitrógeno por el método de la ninhidrina. La tabla XVI muestra el resultado obtenido.

TABLA XVI

Digestión Tripsina de TN_A de Aulacomya

Determinaciones efectuadas en la fracción soluble en TCA

<u>tiempos</u>	<u>α-amino N como % de N total</u>
0	0.57
24	5.66

Los valores son promedio de dos determinaciones.

Se puede comparar este resultado con el experimento N^o6 presentado en la tabla VIII por ser sus condiciones las que más se asemejan. Puede observarse que el grado de extensión de la reacción enzimática es menor en la TN_A de Aulacomya que en la de Pinna. Luego de 24h. de ataque proteolítico queda material precipitable por TCA 5%, es decir, material de naturaleza proteica. Esta observación resulta importante para ubicar esta treponemiasina en el grupo A, ya que como se verá más adelante las treponemiasinas del grupo B son totalmente atacadas por la tripsina y después de 2 h. de digestión no queda material precipitable por TCA .

Capítulo IV

PRODUCTOS DE LA DIGESTIÓN TRÍPSICA DE TM_A DE PINNA

Como se describió anteriormente en el capítulo de "Métodos", la digestión trípica prolongada (24 h.) de TM_A de Pinna produce material dializable y un fragmento "F".

Material no Dializable: Fragmento Trípico

El rendimiento del fragmento, después de la purificación realizada según la descripción que figura en "Métodos", fue entre el 45 y 46% del contenido de nitrógeno de la proteína original. A diferencia de la TM_A nativa, el fragmento trípico es soluble en agua a pH 7-7.5. Una solución del fragmento "F" fue dializada contra una solución neutra de sulfato de amonio 1.6 M y se bajó gradualmente el pH de la solución mediante el agregado de acetato de sodio 4 M pH 5.4. En esta forma se logra cristalizar la TM_A , no así el fragmento que precipitó en forma amorfa. Un nuevo intento de cristalización se efectuó de manera similar pero disolviendo previamente el fragmento en una solución de $PO_4H_2Na^+$ PO_4HNa_2-ClK 0.55 M pH 7. Nuevamente se obtuvo un precipitado amorfo.

Propiedades químicas

La composición de aminoácidos del fragmento es notablemente similar a la de la TM_A de Pinna (tabla XVII). Se incluye también la composición de aminoácidos de la TM_B de Pecten en vista de algunas semejanzas que ésta posee con el fragmento tripsico, que más tarde se discutirá. La composición de aminoácidos del fragmento tripsico que se muestra en la tabla XVII es un valor promedio obtenido de las dos determinaciones que se muestran en la tabla XVIII.

En efecto, la semejanza entre el fragmento tripsico y la TM_A de Pinna es tal que teniendo en cuenta solamente este resultado se podría concluir que la tripsina no ataca a la proteína. Las proporciones lys/arg. y glu/aap de ambas proteínas son también similares (tabla XIX). La única diferencia entre ellas es la carga neta, que en el fragmento tripsico se acerca a la carga de TM_B de Pecten. Sin embargo, la TM_A es atacada por la tripsina, mientras que el fragmento es esencialmente resistente. La presencia de una gran proporción de residuos básicos en el material resistente a la acción tripsica resulta sumamente interesante de ahí que se realizara un estudio más detallado de esta fracción.

Se pensó que los residuos N- y C-terminales podrían esclarecer las diferencias entre el fragmento tripsico y la proteína nativa; por este motivo se llevaron a cabo ambos tipos de determinación. La determinación del grupo N-terminal se realizó por el método del FDNH. Se observó así una importante diferencia entre el fragmento tripsico "F" y la TM_A . Dicho método no reveló un residuo N-terminal en TM_A de Pinna (Bailey, 1957), ni aún cuando la proteína se trató en condiciones es-

TABLA XVII

Comparación de Fragmento Tríptico, TM_A y TM_B

	<u>Peso de aminoácido anhidro</u> <u>100 g. de proteína</u>			<u>Residuos / 10³ g. de proteína</u>		
	<u>Fragmento</u> <u>tríptico</u> <u>de TM_A de</u> <u>Pinna</u>	<u>TM_A de</u> <u>Pinna*</u>	<u>TM_B de</u> <u>Pecten*</u> <u>(músculo</u> <u>estriado)</u>	<u>Fragmento</u> <u>tríptico</u> <u>de TM_A de</u> <u>Pinna</u>	<u>TM_A de</u> <u>Pinna*</u>	<u>TM_B de</u> <u>Pecten*</u>
Asp	14.3	13.5	14.1	124	117.3	123
Thr	3.4	2.4	6.0	33.6	23.7	39
Ser	4.6	4.5	2.9	52.3	51.6	33
Glu	25.5	23.6	25.6	197.6	183	198
Gly	0.73	0.13	0.7	12.7	13	12.5
Ala	7.9	7.7	7.4	110.3	101	104
Val	3.0	3.75	3.7	30.2	37.0	37
Meth	1.9	2.15	1.5	14.1	16.3	11
Ileu	3.5	3.4	2.7	30.5	29.8	24
Leu	13.2	12.4	11.0	116.3	105.3	97
Tyr	2.0	2.45	1.7	12.2	15	10.5
Phe	0.0	1.3	1.5	5.5	8.7	13
Lys	6.8	8.2	12.9	53.0	64.1	101
His	1.1	0.65	-	0.0	4.7	-
NH_2-N				(151)	(116)	(117)
Arg	<u>11.6</u>	<u>13.2</u>	<u>7.0</u>	<u>74.0</u>	<u>84.6</u>	<u>59</u>
Total	<u>100.3</u>	<u>99.95</u>	<u>99.9</u>	<u>674.9</u>	<u>666.9</u>	<u>673</u>
		Peso medio				
		por Residuo		114	113	114.5
		N % calculado		17.6	16.9	17.7

* Resultados de Bailey y Kuegel (1960)

TARLA XVIII

Análisis del Fragmento Tripsina "r"

	<u>Peso de aminoácido anhidro/100g.</u>		<u>Residuos/10⁵ de proteína</u>	
	<u>Exp. N^o 4</u>	<u>Exp. N^o 7</u>	<u>Exp. N^o 4</u>	<u>Exp. N^o 7</u>
Asp	14.3	14.3	124	124
Thr	3.3	3.4	32.6	33.6
Ser	4.2	4.9	43.2	56.4
Glu	25.9	25.1	201	194.2
Gly	0.7	0.75	12.2	13.1
Ala	7.65	8.1	107.6	114
Val	3.1	2.9	31.3	29.2
Meth	2.9	1.7	15.2	12.9
Ileu	3.6	3.3	31.8	29.2
Leu	13.2	13.2	116.3	116.3
Tyr	1.9	2.1	11.6	12.6
Phe	1.0	0.6	6.8	4.1
Lys	6.9	6.7	53.7	52.2
His	1.0	1.2	7.3	8.7
NH ₃ -N			(145)	(158)
ARG	<u>11.3</u>	<u>11.8</u>	<u>73.4</u>	<u>75.2</u>
Total	<u>100.05</u>	<u>100.05</u>	<u>872.0</u>	<u>876.2</u>
N %	17.6	17.9	Peso medio por residuo 114	

TABLA XIX

Características Analíticas del Fragmento Tripsico, TM_A y TM_B

Los resultados se expresan como % de residuos totales

	<u>Fragmento</u> <u>Tripsico</u>	<u>TM_A</u> <u>de Pinnas</u>	<u>TM_B</u> <u>de Iveten</u>
Grupos ácidos totales (a)	36.3	34.6	37
Grupos básicos totales (b)	15.4	17.7	17
N-amídico (c)	14.7*	13.5	12.9
Carga aniónica neta (a-(b+c))	6.7	3.4	7.1
Residuos no polares	36.8	37	35
Lys/Arg	0.72	0.76	1.9
Glu/Asp	1.6	1.57	1.8

* Este valor se calculó con el amoníaco obtenido de la columna, que es generalmente mayor (Bailey y Nüegg, 1960) que el nitrógeno amídico verdadero liberado por el método de Bailey (1957). El nitrógeno amídico verdadero es probablemente 30 % más bajo, trayendo la carga neta aproximadamente a 0.2.

peciales, en urea 6 M a 50°C durante 3-5 h., como lo aconsejan Sand y Komins (1961). En cambio permitió establecer claramente la presencia de ácido glutámico como residuo N-terminal en el fragmento triptico. 0.2 µmol de fragmento triptico fué tratado como lo recomienda Sanger (1945). La hidrólisis de la DNP-proteína se realizó con HCl 6N en tubo cerrado a la llama a 105°C durante 3 h. y se aplicaron los factores de corrección debido a pérdidas en la hidrólisis y cromatografía (20 y 10 % respectivamente). Estos factores de corrección fueron calculados por Sanger (1945) para cromatografía en columna de sílica-gel, por lo tanto son sólo una aproximación cuando se aplican a cromatografía sobre papel. En la tabla IX se presentan los resultados obtenidos.

Las impurezas encontradas se deben a trazas de pequeños péptidos (ver "Métodos", aislamiento del fragmento triptico) que parecen ser adsorbidos por el fragmento triptico. Estas impurezas pudieron ser eliminadas eficazmente por diálisis contra HCl 0.5 M.

La cantidad de ε-DNP-lisina presente en el hidrolizado ^{del} DNP-fragmento triptico fué determinada, después de haber fraccionado el material soluble en agua por cromatografía sobre papel ^{en} ftalato:alcohol metílico terciario, por su absorción a 390 mµ en HCl N. Aquí de nuevo fueron aplicados factores de corrección debido a las pérdidas por hidrólisis y cromatografía (5 y 10 % respectivamente). El contenido de lisina encontrado fué de 5.1 g/100 g. de proteína. El contenido de lisina (por el método de Moore y Stein) es de 6.8, de modo que por lo menos el 75 % de la lisina presente en el fragmento es accesible al FDNB.

Por lo tanto los resultados de los N-terminales parecen indicar

TABLA XX

Aplicación del método del FINE para determinar grupos N-terminales
en el Fragmento Trípsico

Exp. N°	<u>Cantidad de proteína conteniendo 1 DNP-residuo</u>	
	<u>N-terminal</u> <u>(DNP-gly)</u>	<u>Contaminantes</u>
5	53000	DNP-ala + DNP-phe + (DNP-ser o DNP-gly) = 32000
12°	62000	
	85000	DNP-gly o DNP-ser = 43000

* Determinaciones independientes realizadas por el Dr. K. Mailey

que el fragmento trípsico se deriva del extremo N-terminal de la molécula de TM_A . El método del FINE da un valor promedio de 75.000 para el peso molecular del fragmento.

Las determinaciones de grupos C-terminales se llevaron a cabo por el método de la carboxipeptidasa. Después de un tratamiento de 3 h. de TM_A de Pinna con carboxipeptidasa a 37°C (relación enzima sustrato por peso, 1:25), se observó una traza de leucina. Un tratamiento más

largo, 6 horas, bajo las mismas condiciones mostré trazas de leucina, lisina y serina o glicina. Se utilizó una cantidad de 0.02 μ moles y la intensidad del color de la ninhidrina obtenido para cada mancha fué siempre menor que la mitad de lo que correspondería a 0.01 μ mol. El experimento fué repetido tomando 0.04 μ moles de TM_A , pero aún así la cantidad del aminoácido liberado fué mucho menor que un residuo por mol.

La prolongada acción de la carboxipeptidasa A (8h.) sobre 0.06 μ moles del fragmento trípico "F" (Exp.13) bajo las mismas condiciones descritas para la TM_A , mostraron sólo trazas de lisina (cerca de 0.01 μ mol) y de serina o glicina (menos que 0.01 μ mol). La incapacidad de la carboxipeptidasa A para mostrar un grupo C-terminal en la proteína nativa o en su fragmento trípico podría deberse a la presencia de arginina o lisina en el extremo C-terminal de la cadena o a la presencia de otros residuos (C-terminales) no atacables por la enzima.

Se utilizó entonces carboxipeptidasa B que se hizo actuar sobre la TM_A así como sobre su fragmento trípico. A 0.05 μ moles de TM_A disueltos en $ClNH_4$ 1 M, se les agregó carboxipeptidasa B en la proporción de 1:50 en peso y se dejó a 37°C, tomándose una alícuota a los 30 min. y otra a los 60 min. Las muestras se pasaron por Dowex 1 previamente equilibrada con CO_3Na y lavada con agua destilada hasta libre de Na^{++} , y se eluyó con agua. Este método fué altamente satisfactorio dando rendimientos comprendidos entre 95 y 105 %. A 0.15 μ moles de "F" disueltos en $CO_3(NH_4)_2$ se les agregó carboxipeptidasa B en la proporción de 1:100 en peso y se mantuvo a 37°C, retirándose alícuotas a los 10 min. y a la hora. Las muestras se pasaron a través de Amberlita MB 120 y

se eluyó con NH_4OH 7 N. Tanto en los experimentos realizados con TM_A como en los realizados con "F" se procedió como ya se describiera en "Métodos" controlando el rendimiento con aminoácidos marcados. El uso de este método no dió resultados satisfactorios ya que el rendimiento fué sumamente bajo, de 20 %. De aquí que estos resultados deban tomarse con cautela. Lo mismo se aplica a un experimento realizado con el fragmento en el que se tomaron alícuotas a los 4, 10, 25, y 50 min. En él se observó que a los 4 min. no había arginina presente y había cerca de un residuo de lisina por mol de fragmento. Esto sugeriría la presencia de lisina como grupo C-terminal seguido por arginina. Sin embargo, esto debe tomarse con gran cautela debido al muy bajo rendimiento de la columna y a la gran dispersión de resultados. La tabla XXI muestra los resultados.

Puede observarse la alta densidad de cargas positivas que se encuentran en el extremo del C-terminal de ambas proteínas. La existencia de cadenas de poliarginina ya fué sugerida por el alto contenido de DNP-arginina en el material soluble en TCA después de la hidrólisis de TM_A . Llama la atención sin embargo que una secuencia conteniendo alrededor de 15 lisinas y argininas no sea atacada por la tripsina.

Si bien se encuentra lisina y arginina en los extremos de cada una de las dos proteínas, su número no coincide, lo cual indica que el fragmento no proviene del extremo C-terminal de la proteína nativa si la velocidad de ataque en ambos casos es la misma.

TABLA XXI

Acción de la Carboxipeptidas B sobre TM_A de Piama y su Fragmento Trípsico

<u>Proteína</u>	<u>Tiempos</u>	<u>Aminoácidos</u>	<u>Nº de residuos/mg</u>
TM_A	60 min.	lys	2.5
		arg	6.0
TM_A	60 min.	lys	3.0
		arg	5.0
"P"	10 min.	manchas muy débiles no identificadas	
"P"	60 min.	lys	8.6
		arg	3.6
		leu α'	
		leu	0.3

Propiedades Físicoquímicas

Cuando se examinó el fragmento trípsico en la ultracentrífuga, y en el Tiselius por electroforesis libre, se obtuvo un pico simétrico (fig. 20). Se calculó la constante de sedimentación según la descripción que figura en "Métodos". Los valores corregidos que se obtuvieron en dos corridas diferentes realizadas con muestras obtenidas en diferentes digestiones coincidieron perfectamente bien para la misma concentración de proteína (tabla XXII).

Se pensó que el estudio de la variación de la velocidad de sedimentación con la concentración de proteína podría dar una respuesta clara

Fig.20a Examen del fragmento trípico efectuado en la ultracentrífuga. Fotografías tomadas a los 0, 32, 64, 96, 128, 160, 224 y 288 min. después de alcanzada la velocidad máxima de 60,000 rpm. Concentración 0.7 g.%. La corrida fue efectuada en buffer de fosfato-ClK 0.55M, pH 7 a 20°C.

FIG.20 a

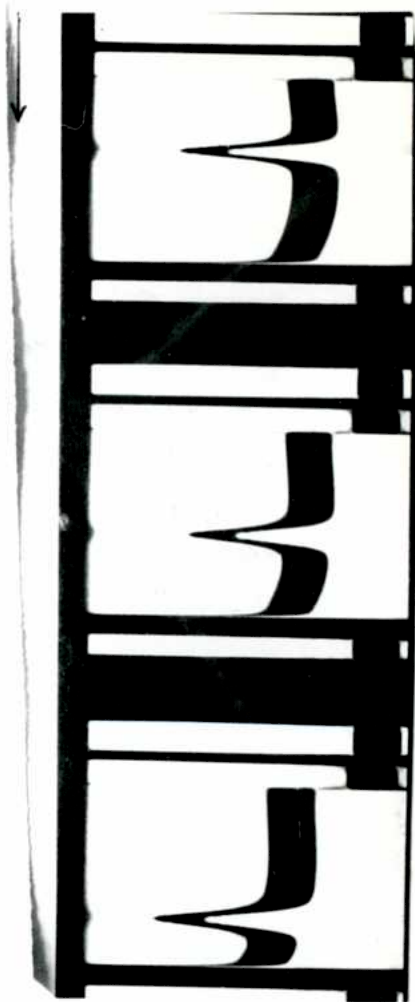


Fig. 20b Electroforesis libre del fragmento tripsico de TM_A de Pinna disuelto en buffer de fosfato-ClK 0,55 M, pH 7 Concentración 0.7 %, temp. $4^{\circ}C$, 1.8 V/cm. Fotografía tomada a los 450 min. que muestra los límites ascendente (superior) y descendente (inferior).

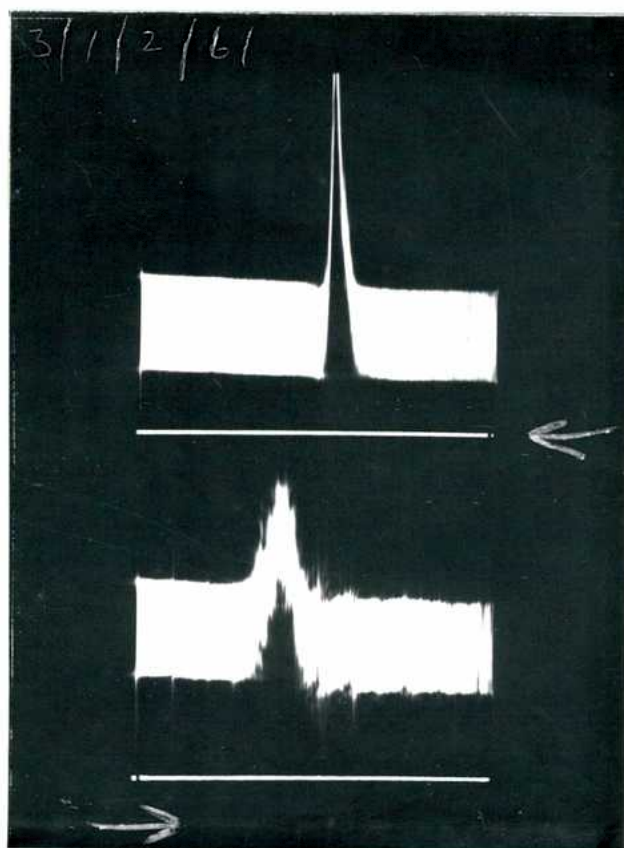


TABLA XXII

Comparación de las Constantes de Sedimentación de TM_A de Pinná y su Fragmento Trípsico a una concentración de Proteína de 0.7 %

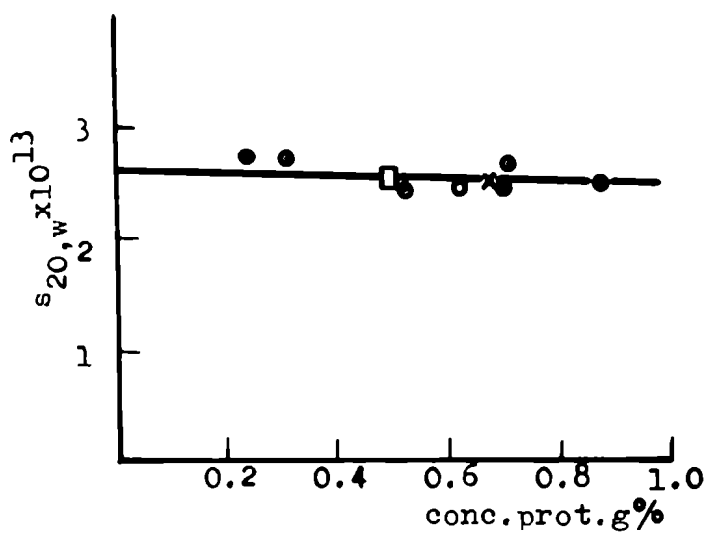
	$s_{20,w} \times 10^{13}$
TM_A de Pinná (Kay, 1958)	2.6
Fragmento trípsico (Exp. N° 7)	2.39
Fragmento trípsico (Exp. N° 14)	2.44

a la cuestión de la relación de "F" con la proteína nativa. La constante de sedimentación extrapolada a concentración cero (s_{20}^0) es de 2.6 para el fragmento trípsico (fig. 21) y de 3.1 (Kay, 1958) para la proteína nativa. El peso molecular y la constante de sedimentación están relacionados por la ecuación de Svedberg (Svedberg y Pedersen, 1940):

$$M = \frac{4 \pi s}{\omega (1 - \bar{v} \rho)} \quad (5)$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura absoluta, s la constante de sedimentación, D la constante de difusión, \bar{v} el volumen parcial específico y ρ la densidad del solvente. Las determinaciones para ambas proteínas se realizaron en el mismo solvente de modo que s es constante y \bar{v} no varía mucho de proteína a proteína (Pedersen, 1945). El cambio obtenido en el valor de la constante de sedimentación parecería no corresponder con el gran cambio de peso molecular producido: de 131.000 para la TM_A disminuyó a 75.000 para su fragmento trípsico (ver

FIG.21 VARIACION DE LA VELOCIDAD
DE SEDIMENTACION CON LA
CONCENTRACION



Las distintas clases de puntos indican determinaciones efectuadas con diferentes preparaciones.

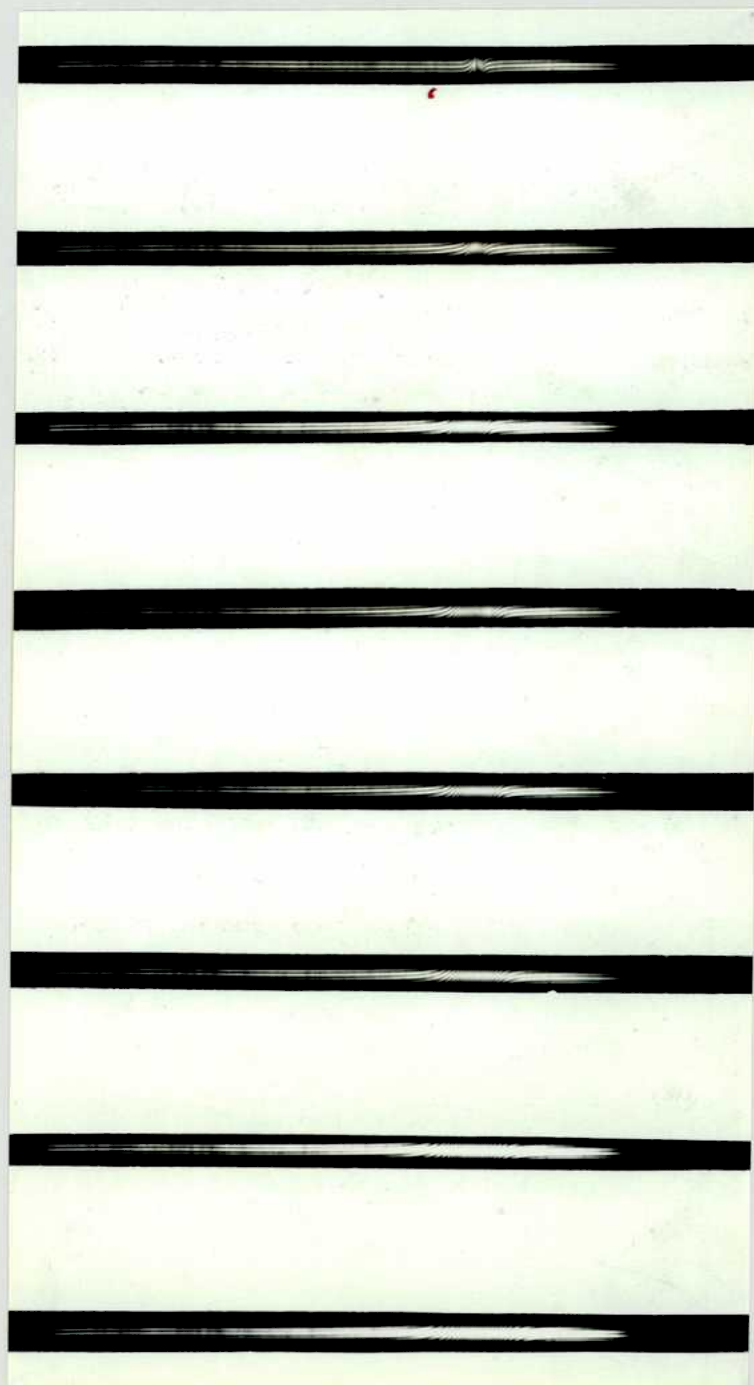
pág.72). Esto sugeriría una gran diferencia en las constantes de difusión .

Sin embargo, la medición no acusó esa diferencia. La constante de difusión de la TM_A calculada por Kay (1958) es de $2.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ La constante de difusión del fragmento tripsico se determinó a 4°C usando una solución de concentración 0.8 %. La fig.22 muestra las franjas de interferencia de Rayleigh obtenidas durante el experimento. La constante de difusión calculada dió un valor de $1.5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ que corregida para el agua a 20°C como solvente dió $2.6 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ Se realizó también el cálculo por el método de las áreas máximas. Se obtuvo así un valor de $1.4 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ que al corregirlo para el agua a 20°C dió $2.3 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ Se realizó como control una determinación de la constante de difusión con lisuzima, obteniéndose un valor de $5.0 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ (bandas de interferencia) y $7.1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ (áreas máximas) que es bajo con respecto a los valores dados por la literatura, los que oscilan entre 8.6 y $11.2 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ (Fox y Foster, 1957).

Aplicando la fórmula (5) y utilizando el valor obtenido por el método de interferencia que se supone más exacto, se obtiene para el fragmento un valor del peso molecular de 91.900 que quizá sería un valor algo alto ya que M y D están en relación inversa y el control con lisuzima sugiere que el valor de la constante de difusión hallado para el fragmento tripsico es un límite inferior del mismo.

Se examinó una mezcla de TM_A de Pinna y su fragmento tripsico en la ultracentrífuga. La concentración de la solución fué de 1 % siendo 0.5 % la concentración de cada una de las proteínas. No hubo separación

Fig. 22 Serie de fotografías de bandas de interferencia de Rayleigh obtenidas en un experimento de difusión del fragmento triptico de TN_A de Pinna efectuado en buffer de fosfato-ClK 0.55 M, pH 7, a $4^{\circ}C$. Concentración de proteína 0.8 g.-%. Las fotografías fueron tomadas de arriba hacia abajo, a los 7,143, 813, 1756, 1926, 3126, 3435 y 5947 min. respectivamente luego de haber afinado el límite inicial.



de los dos componentes, pero que se obtuvo un pico asimétrico indicativo de la heterogeneidad de la muestra (fig. 23). La misma solución diluida a 0.5 % fué estudiada por electroforesis libre en el aparato de Tiselius. La corrida se realizó a 2.3 V/cm y 18.8 mA durante 8 h. Se obtuvo un pico muy asimétrico en ambas zonas, ascendente y descendente (fig. 24), lo que indica de nuevo heterogeneidad en la muestra y una gran semejanza de algunas propiedades de ambas proteínas.

Una diferencia notable entre el fragmento tripsico y la proteína nativa fué obtenida de las medidas de viscosidad. En la fig. 25 la viscosidad específica/concentración de "F" se representó en función de concentración y de la intersección de la recta con la ordenada (concentración 0), se obtuvo la viscosidad intrínseca. "F" tiene un valor de viscosidad intrínseca 0.56 comparado con 2.4 para la proteína nativa. Por lo tanto, las medidas de viscosidad constituían otra fuerte prueba de que la TM_A de Pinna y el fragmento tripsico no son idénticos. La viscosidad intrínseca del fragmento tripsico se asemeja mucho a la de la TM_B de Pecten, que es de 0.5. Al agregar sales neutras, la tropomiosina de conejo (Bailey, 1958); y la TM_B de Pecten (Nüegg, 1959) muestran una disminución dramática de la viscosidad entre las fuerzas iónicas de 0 y 0.1 pero el agregado de sales neutras a una solución de "F" no produce cambio en la viscosidad comparable al observado en la tropomiosina de conejo (tabla XXIII).

Se midió también la viscosidad relativa de "F" usando un buffer de fosfato y variando la fuerza iónica por el agregado de KCl. No se observó ninguna variación en la viscosidad relativa con variaciones

Fig.23 Examen de una mezcla de TM_A de Pinna y su fragmento tripsico, efectuado en la ultracentrífuga. Fotografía tomada a los 224 min. después de alcanzada la velocidad máxima de 60,000 rpm. La corrida se efectuó en buffer de fosfato-ClK 0.55 M, pH 7 a 20°C. Concentración de proteína 1g.% .

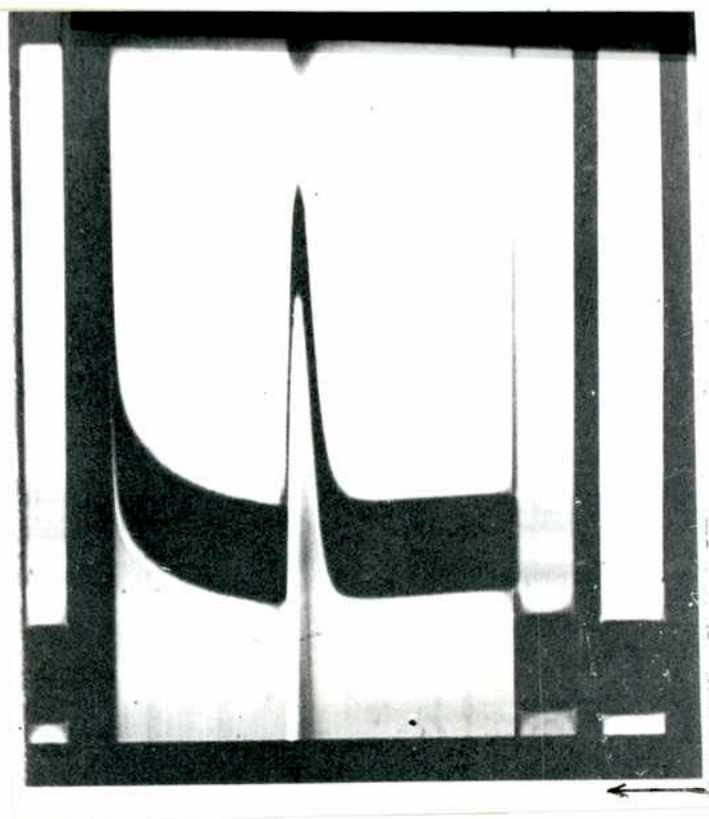


Fig.24 Electroforesis libre de una mezcla de TM_A de Pinna y su fragmento tripsico disueltos en buffer de fosfato-ClK 0.55 N, pH 7. Concentración 0.5 g. %, temp. 4°C, 2.3 V/cm.

Fotografía tomada a los 480 min. Límites ascendente (arriba) y descendente (abajo).

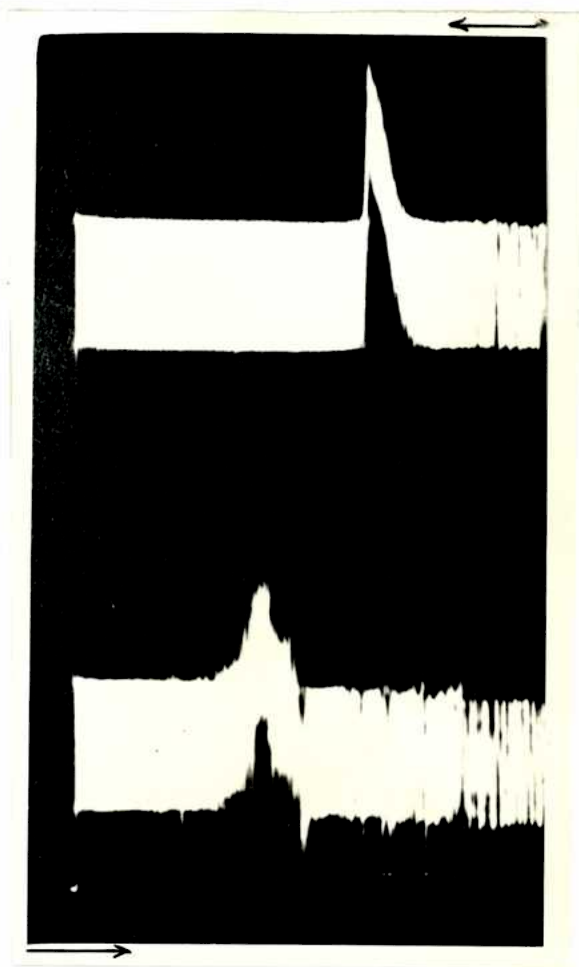


TABLA XXIII

Comparación de la Viscosidad Relativa de "F" y de la Trepomiosina de Conejo a Diferentes Fuerzas Iónicas

Las proteínas se disolvieron en agua y se agregó la cantidad de NaCl necesaria para obtener una solución 0.01 M.

	<u>"F"</u> (1.7mg/ml; 25°C; pH7.3)	<u>Trepomiosina de Conejo*</u> (0.15 mg/ml; 20°C; pH 6.5)
η	η	η
0	1.163	32
0.1	1.142	32

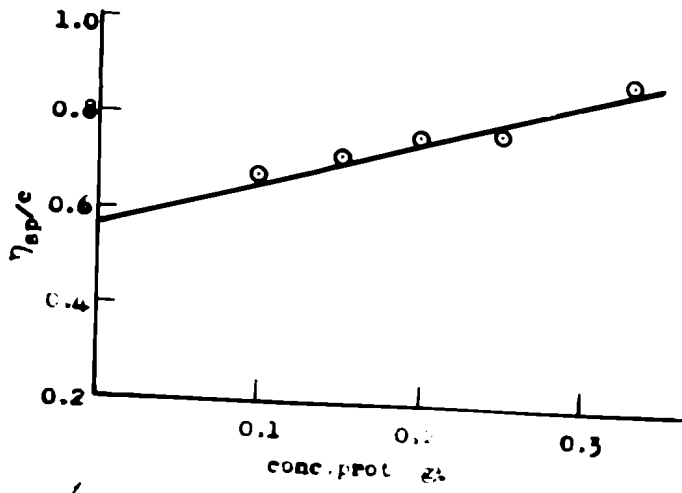
* K. Bailey, 1948

TABLA XXIV

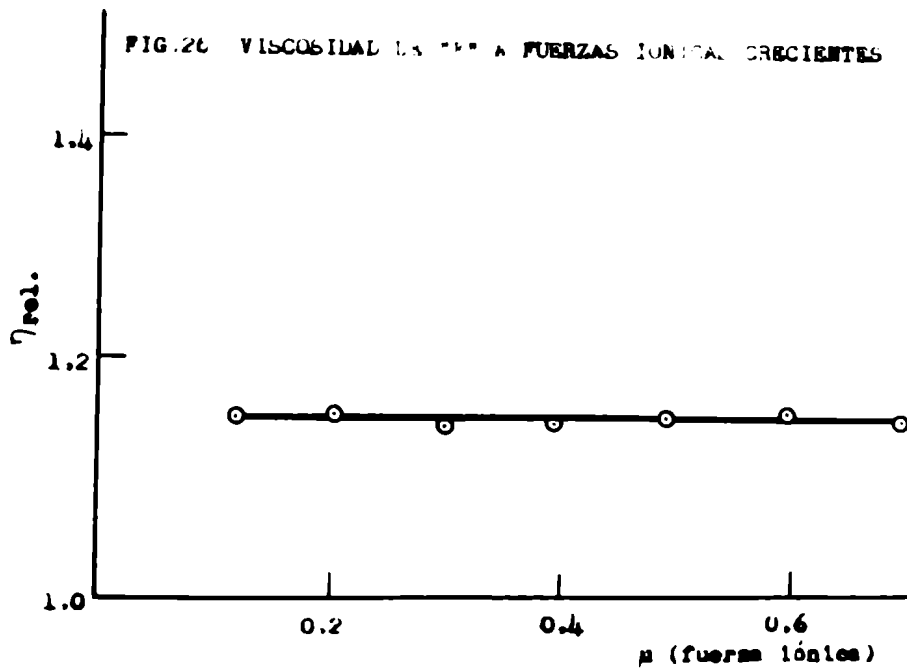
viscosidad Relativa del Fragmento Tripsico "F" a Diferentes Fuerzas Iónicas

<u>Buffer de fosfato</u>	<u>Fuerza iónica</u>	<u>$\eta_{rel.}$</u>
<u>0.05 M+ClK</u>		
0.05 M	0.1	1.142
0.1 M	0.2	1.140
0.2 M	0.3	1.137
0.3 M	0.4	1.132
0.4 M	0.5	1.141
0.5 M	0.6	1.153
0.6 M	0.7	1.143

FIG. 25 VISCOSIDAD DEL TRÁMANTO TRIPOLICO
DE $T_{1/2}$ DE PUNTO (25°C)



Las determinaciones se realizaron en buffer de fosfato-ClK (pH 7.2).



Determinaciones efectuadas en buffer de fosfato-ClK 0.05M a 25°C.

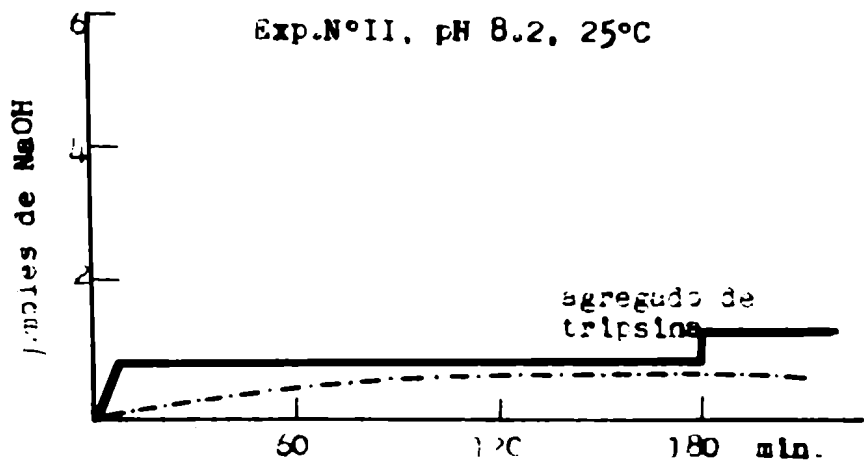
de la concentración salina de hasta 0.65 M (tabla XXIV y fig.26).

Estabilidad del Fragmento Tripsico frente a la Ulterior Digestión por Tripsina

El fragmento es altamente resistente a ulterior digestión tripsica. Esto puede observarse durante la digestión de TM_A con tripsina así como también cuando el fragmento es previamente purificado y luego tratado con la enzima, demostrándose así que la resistencia no se debe a un efecto inhibitor del material dializable. El hecho de que el fragmento purificado no es digerido por la tripsina se verificó por el consumo de álcali y por el contenido de α -amino nitrógeno de la fracción soluble en ICA. Las condiciones empleadas en este caso fueron las mismas que se emplearon para la digestión de TM_A , excepción hecha de la concentración de proteína que fué más baja. Los resultados obtenidos por ambos métodos demostraron que la tripsina no tiene ulterior acción sobre el fragmento (tabla XXV y fig.27) ya que para la cantidad de proteína utilizada los valores permanecen dentro del error experimental.

Hofstee (1960) observó que la suero albúmina y otras proteínas en concentraciones del orden de la quimotripsina inhibían a dicha enzima frente a un sustrato sintético. A raíz de este artículo se pensó que el fragmento podría tener una acción inhibitora sobre la tripsina. Se incubó durante 30 min. a $37^{\circ}C$ una mezcla de "P" y tripsina y luego se le agregó BAFE (benzoyl arginyl ethyl ester) observándose en el autotitulado la actividad de la tripsina. Se hizo un control incubando tripsina sola durante 30 min. y agregando luego el BAFE (ver tabla XXVI).

FIG. 27 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 Exp. N° II, pH 8.2, 25°C



medido en el autotitulado a pH constante.

----- "P" (control)

———— "P" + tripsina (en res)

concentración proteína 1.0%

TABLA XXIV

Acción de la Tripsina sobre el Fragmento Tripsico obtenido de la
TM_A de Pinna

Las digestiones se efectuaron a pH 8.2 y 25°C

Las muestras fueron retiradas despues de 24 h. de proteólisis

<u>Exp. N°</u>	<u>Concentración proteica</u> <u>mg/ml</u>	<u>Relación enzima:</u> <u>sustrato</u>	<u>α-amino N</u> <u>como% de</u> <u>N total</u>	<u>Consumo de álcali</u> <u>µmoles de</u> <u>álcali/mol</u> <u>de prot.</u>	<u>Uniones atacadas</u> <u>per molé- cula</u>
I	2.8	1.5:100	<0.45	-	<4
II	1.0	1:100	-	0.7	<1

TABLA XXVI

Acción de la Tripsina sobre un Sustrato Sintético en Presencia y
Ausencia de "F"

<u>Productos</u>	<u>Incubación</u>	<u>Agregado</u>	<u>Velocidad</u> <u>µmoles/min.</u>
7 mg. BAÆE+0.05mg. Tripsina	-	-	0.34
5.2 mg. "F"+7 mg. BAÆE+			
0.05 mg. tripsina	-	-	0.36
0.05 mg. tripsina	30 min.	7 mg. BAÆE	0.33
5.2 mg. "F"+0.05mg. tripsina	30 min	7 mg. BAÆE	0.30

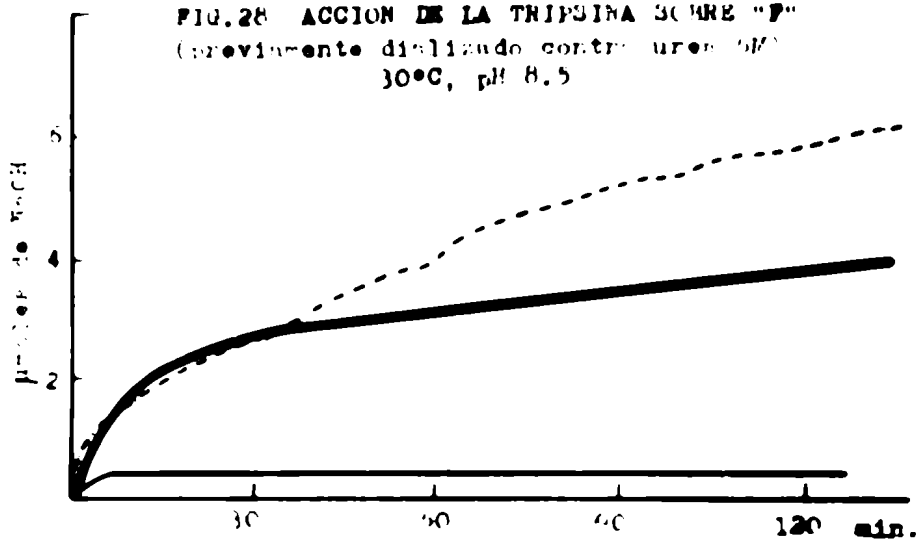
No se observó ningún cambio en el comportamiento de la tripsina debido a la presencia de "F". De modo que puede afirmarse que "F" no tiene acción inhibitoria sobre la tripsina.

Por lo tanto, se trató de digerir el fragmento con tripsina utilizando un método más drástico que desnaturalizara la proteína. Se probaron primero dos métodos de desnaturalización: a) dializando la proteína contra urea $5M$ a temperatura ambiente durante 4 h. y dializándola contra urea $4M$ durante la noche. Antes de agregar la tripsina, la solución fué diluída a una concentración final de urea $1.5M$. Como la urea da una reacción positiva de ninhidrina la digestión solo pudo seguirse por el consumo de álcali. b) calentando la proteína en un baño de agua hirviendo durante 30 min. La extensión de la reacción en este caso fué seguida por el contenido de α -amino nitrógeno en la fracción soluble en TCA y por el consumo de álcali.

No se encontró diferencia en el consumo de álcali al seguirse la acción de la tripsina sobre "F" previamente dializado contra urea e sobre un control (fig.28).

Los resultados obtenidos por el método de la ninhidrina para el fragmento tripsico previamente calentado sugieren que tuvo lugar una pequeña digestión, desde que 35 uniones por mol fueron atacadas des ués de 24 h. Sin embargo, este fué un resultado aislado y cuando la velocidad de la digestión fué seguida mediante el consumo de álcali, no se encontró ninguna diferencia entre el consumo de álcali de una digestión tripsica de "F" previamente calentado y el de un control (fig.29). Según se discute en el capítulo III, este método ha demostrado ser más seguro. El consumo de álcali aparentemente elevado del control se debe

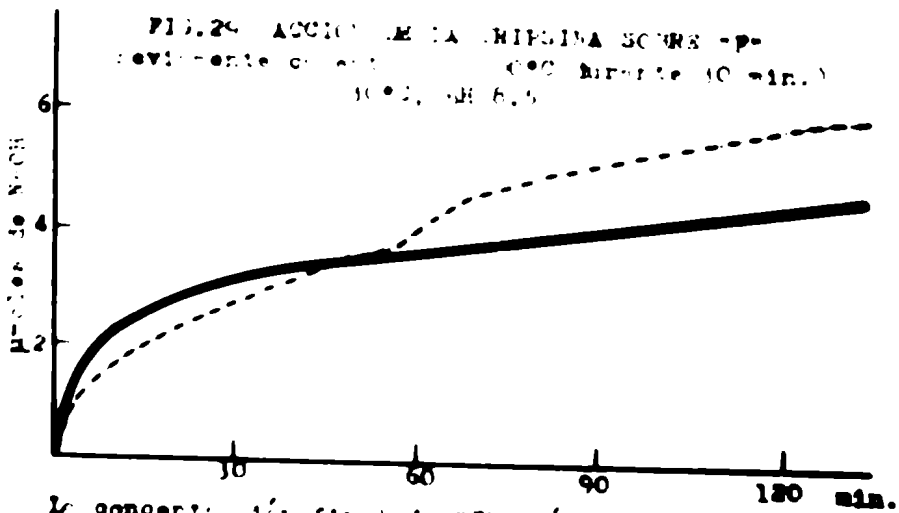
FIG. 28 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 (previamente diluido contra urea 5M)
 30°C, pH 8.5



La concentración de "P" es de 0.6 mg/ml.
 La concentración de urea es de 5M.
 La actividad ambiente.

- "P" en urea 5M.
- "P" + tripsina (100:1 en peso) en urea 4M.
 (La actividad ambiente + tripsina 100:1 en peso).
- "P" + tripsina (100:1 en peso) en urea 0.02 M.
 (La actividad ambiente).

FIG. 29 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 (previamente diluido contra urea 5M)
 30°C, pH 8.5



La concentración de "P" es de 2 mg/ml.

- "P"
- "P" + tripsina (100:1 en peso)

probablemente al anhídrido carbónico del aire, ya que en este experimento no se burbujeó nitrógeno através de la solución.

En ambos casos, esto es para "F" previamente dializado contra urea e previamente calentado, al agregar TCA 3 % al digerido de 24 h. se obtuvo un precipitado de naturaleza proteica.

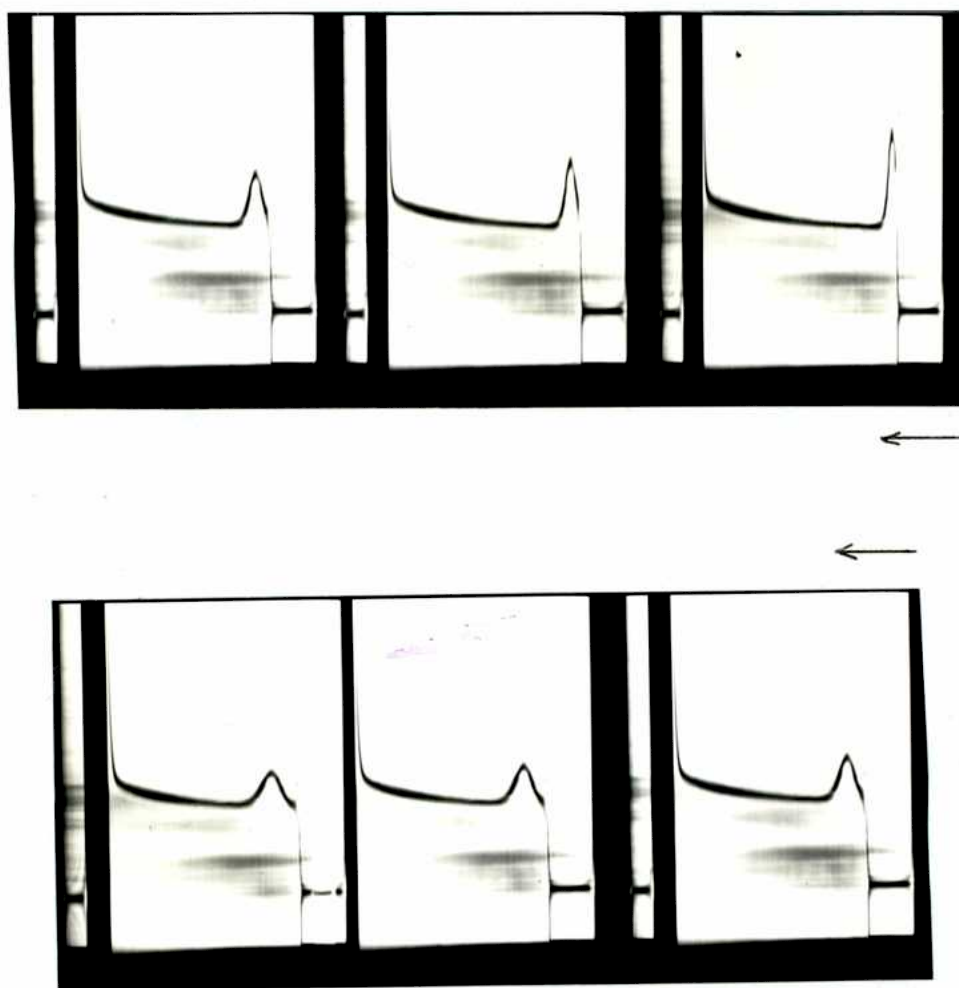
Kay y Bailey (1959) observaron que los cambios de viscosidad y rotación óptica producidos al someter la TN_A de Pinna nobilis a la acción de la urea 6 M son, en gran parte, reversibles al eliminar la urea por diálisis. Podría ocurrir que cualquier "desnaturalización" o "hinchamiento" provocados por el tratamiento con urea 6 M se invirtiera al disminuir la concentración de urea previa al agregado de enzima. Si la desnaturalización por urea es reversible, es lógico pensar que su eliminación por diálisis dará tiempo a una reordenación de la proteína que mantendría su resistencia a la proteólisis. Esto se ha obviado en otros casos disminuyendo la concentración de urea hasta 1.5 M por dilución con una solución de tripsina en lugar de dializar. De esta manera la tripsina entra en contacto con la proteína antes de que ésta tenga tiempo de reordenarse. De allí que se repitiera el experimento dializando el fragmento contra urea 6 M durante 4 h. a la temperatura ambiente y diluyendo a una concentración final de urea de 1.5 M en el momento mismo de agregar la tripsina (fig. 28). Tampoco este método fué efectivo.

Se pensó que una de las causas posibles de la resistencia presentada por el fragmento a la ulterior digestión trípica podía provenir de la presencia de uniones hidrofóbicas que mantuvieran la molécula plegada en presencia de solventes acuosos. Se trató entonces de dige -

rir el fragmento en presencia de dioxano, previo control de que dicho solvente no tuviera efecto inhibitor sobre la enzima, lo cual se probó con BAKK. El curso de la digestión se siguió en el autotitulado pero sin gran éxito ya que el blanco resultó elevado aún en presencia de gas N_2 . "Y" se trató con tripsina (relación en peso 1:50) en presencia de dioxano 75% durante 24 h. y la mezcla se dializó. El producto no dializable se ajustó a pH 6, siendo la concentración de la solución 0.4 mg/ml. La muestra se corrió en la ultracentrífuga a 56,100 rpm, a 20°C (fig.30) y se obtuvo un valor de la constante de sedimentación corregida para agua de 2.55×10^{-13} S. Este valor coincide con el del fragmento para esa concentración. En otro experimento en dioxano 50 %, después de 24 h. de digestión trípica (relación enzima:substrato 1:50) se observó precipitación al agregar igual volumen de TCA 3 %. Resumiendo, la tripsina en presencia de dioxano tampoco fué efectiva en la digestión de "Y".

Se hizo otro ensayo para digerir el fragmento trípico desnaturalizándolo con TCA. Datos de la tabla XI (capítulo III) sugieren que la fracción insoluble en TCA es equivalente al material sin dializar. Por eso el fragmento fué aislado con TCA 3 % y lavado según la descripción de "métodos". La proteólisis fué seguida por el método de la anhidri-
na, determinando el contenido de α -amino nitrógeno en la fracción soluble en TCA. El contenido de α -amino nitrógeno (como % de nitrógeno total) en la fracción soluble en TCA fué de 0.9 % (fig.31) en una muestra retirada después de 24 h. de digestión. Esto alcanza a 6 uniones atacadas por mol, valor doble al contenido en el exp. N° 1. Aunque en este último caso se observó un ligero ataque, la extensión de la reacción

Fig. 30 Examen de "F" digerido con tripsina en presencia de dioxano 75 %, efectuado en la ultracentrífuga. Fotografías tomadas a los 4, 12, 20, 28, 36 y 44 min. después de alcanzada la velocidad máxima de 56,100 rpm. La corrida se efectuó a 20°C, pH 8.8 y la concentración fue 0.4 %.



fué realmente muy pequeña y quedó una fracción precipitable por TCA 3 % que se teñía con azul de bromo fenol, y que ocupó la posición de "F" después de ser sometida a electroforesis sobre papel a pH 8.4 durante 15 h. (4.7 V/cm).

La presencia de calcio firmemente ligada a la TM_A cristalina fué observado por el Dr. K. Bailey. Se pensó que una explicación de la resistencia del fragmento a ulterior acción tripsica sería la presencia de metales unidos a los grupos carboxílicos del fragmento. Se hizo un ensayo para eliminar estos iones de la molécula de TM_A por diálisis exhaustiva contra EDTA (sal disódica del ácido etilen-diamino-tetracético) y luego contra agua destilada sobre vidrio. Se investigó calcio en ceniza (Treadwell-Mail, 1921) y presencia de metales por el método de o-Hx (o-hidroxiquinolina) (Milstein, 1960) en TM_A antes y después de dializar contra EDTA 0.001 M. Antes de la diálisis la determinación de o-Hx dió un valor de $\Delta E_{253}/mg = 0.161$, el que se redujo después de la diálisis a $\Delta E_{253}/mg = 0.030$ (los iones calcio, bario y magnesio no responden al análisis o lo hacen en muy pequeña medida). La determinación de calcio en ceniza se hizo utilizando 95 mg. de proteína por vez. La precipitación de Ca^{++} y Mg^{++} con oxalato de amonio dió un resultado positivo antes y después de la diálisis, aunque en este último caso el precipitado se redujo a la mitad. De modo que la diálisis contra EDTA 1mM no eliminó completamente el Ca^{++} y/o Mg^{++} de la molécula de TM_A . El fragmento fué dializado pués contra EDTA 0.1 M, luego una muestra se dializó contra agua hasta obtener una concentración de EDTA de 0.001 M y otra muestra fué dializada contra agua hasta eliminación

FIG.32 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 previamente dializada contra EDTA 30°C pH 8.5

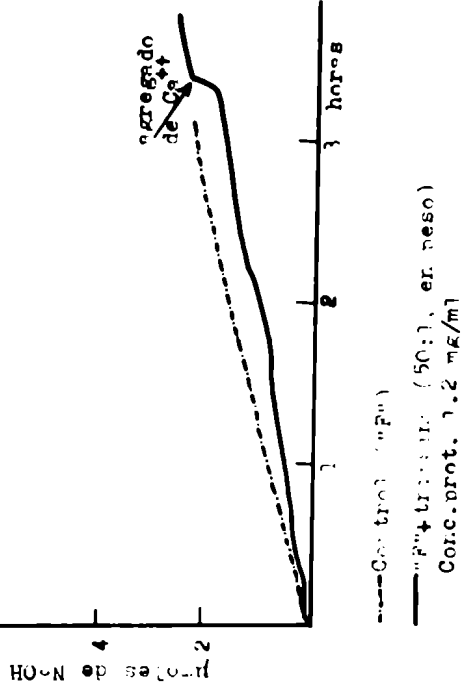


FIG.33 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 en presencia de EDTA 1mM
 30°C pH 8.5

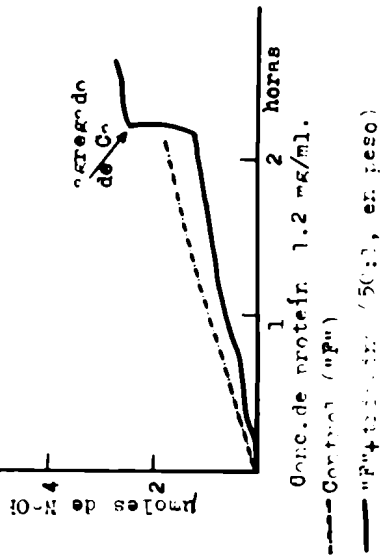
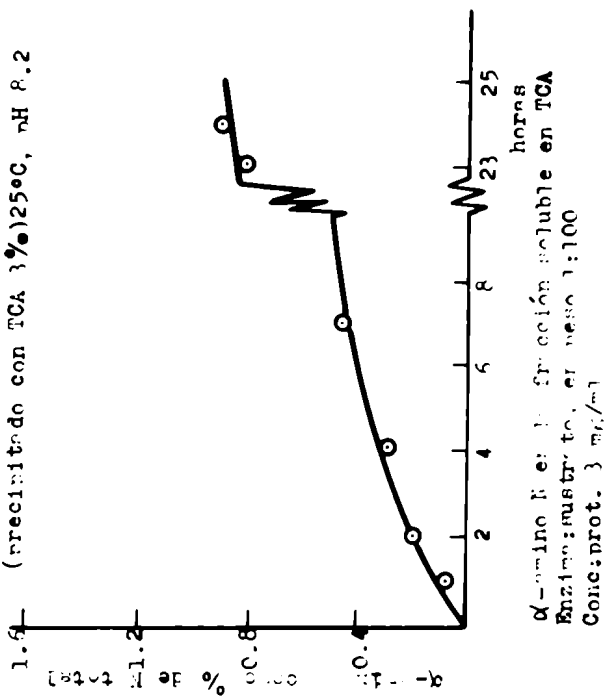


FIG.31 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P"
 (precipitado con TCA 3%) 25°C, pH 8.2



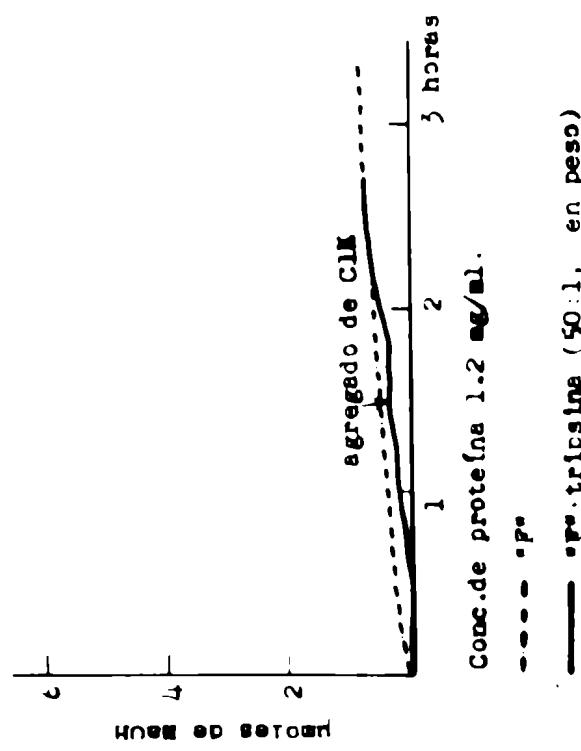
α-amino N et 1:1 fracción soluble en TCA
 Enzima: sustrato, ex. peso 1:100
 Conc:prot. 3 mg/ml

completa de EDTA. Se agregó tripsina a ambas muestras en la relación de 1:50 (por peso) y se siguió el consumo de álcali en el autotitulador (fig. 32 y 33). La tripsina no actuó en ambas muestras, ni lo hizo después del agregado CaCl_2 hasta obtener una concentración de iones Ca^{++} de 9×10^{-6} M.

La resistencia del fragmento frente a la tripsina podría atribuirse a razones de orden estérico ya que la TM_A tiene una alta proporción de residuos ácidos y básicos. Existía la posibilidad de disminuir este efecto mediante el uso de un solvente de alta fuerza iónica. Se usó KCl 0.5 M y como no se observó ninguna digestión después de 1h. del agregado de tripsina, se agregó una solución concentrada de KCl (pH ajustado a 8.2), haciendo la concentración final de sal de 1M (fig. 34); nuevamente el resultado fue negativo.

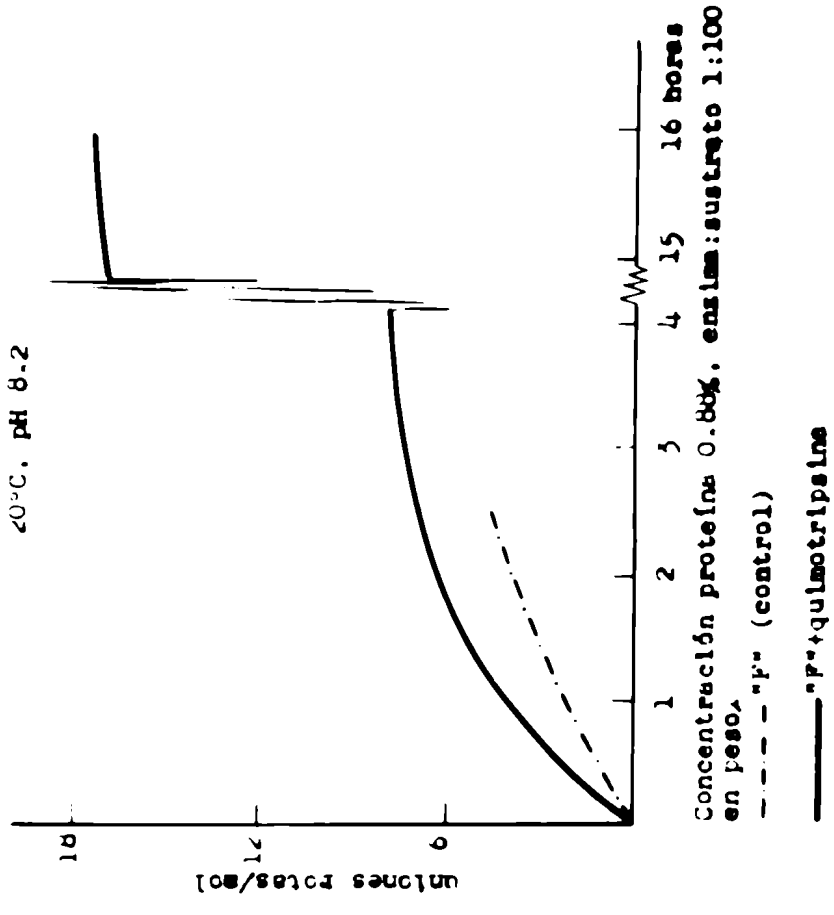
El fragmento puro fue hidrolizado con HCl de punto de ebullición constante durante 5 min. a 100°C y luego secado 3 veces en un desecador. Este tratamiento produce péptidos relativamente grandes (Milstein y Sanger, 1961). La muestra se llevó a pH 6 y se hizo actuar tripsina que fue agregada en la proporción de 1:100 en peso. La digestión se controló mediante el método de la anhidrina efectuado en la fracción soluble en TCA. El resultado fue de 72 uniones rotas por mol (el fragmento tiene 69 residuos básicos por mol, de acuerdo al análisis de aminoácidos, capítulo IV tabla XVIII). Una alícuota del digerido fue corrida por electroforesis de alto voltaje a pH 6.5 y se observó la presencia de ácidos glutámico y aspártico, lisina y arginina libres, así como también aminoácidos neutros y péptidos conteniendo arginina.

FIG. 34 ACCION DE LA TRIPSINA SOBRE "P" en CLK 0.5M y 1 M, 50°C, pH 8.5



Conc. de proteina 1.2 mg/ml.
 - - - - - "P"
 ——— "P" + tripsina (50:1, en peso)
 En el punto señalado se aumentó la concentración de CLK de 0.5 a 1M.

FIG. 35 ACCION DE LA QUIMOTRIPSINA SOBRE "P" 20°C, pH 8.2



Concentración proteina 0.80%, enzima: sustrato 1:100
 - - - - - "P" (control)
 ——— "P" + quimotripsina

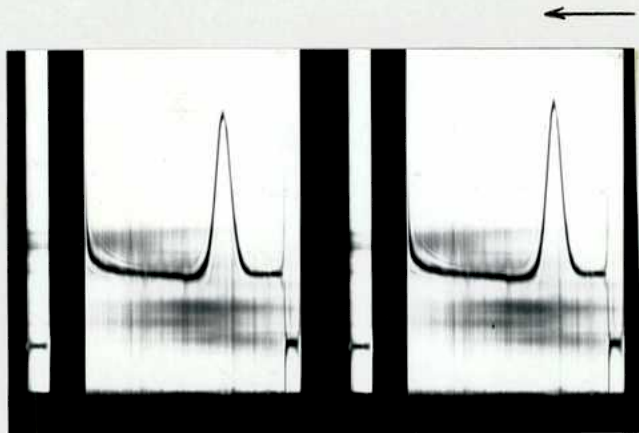
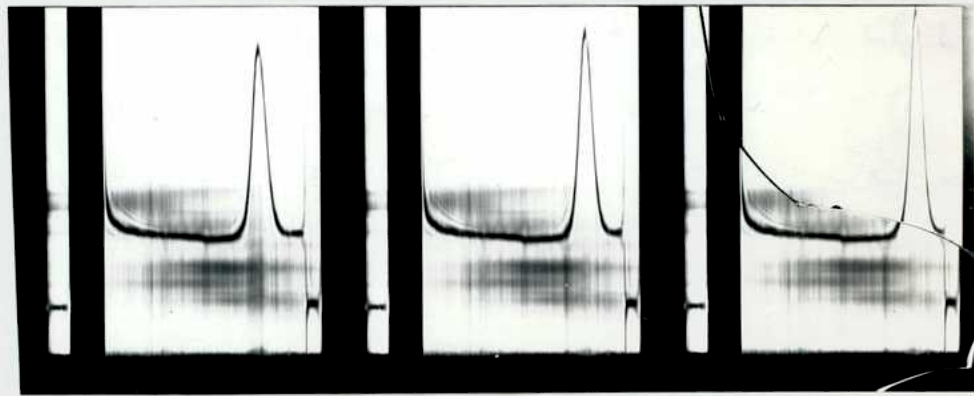
Este experimento sirvió como control para demostrar que el fragmento es sensible a tratamientos realmente drásticos. Sugiere que una vez rota la estructura terciaria el mismo pierde su resistencia es decir que $\overset{n}{\Lambda}$ el fragmento, los aminoácidos básicos estarían fuera del alcance de las enzimas proteolíticas, esultes probablemente por factores de orden estérico o de carga que son destruidos por la hidrólisis ácida pero no por tratamientos menos drásticos como los otros ensayados. Desde el punto de vista del estudio estructural este tratamiento no es recomendable, pues se producen péptidos chicos y con rendimientos bajos.

Se probó la acción de otras enzimas proteolíticas : quimotripsina, elastasa y pepsina.

La quimotripsina es de menor especificidad que la tripsina y ataca las uniones de los aminoácidos aromáticos como fenilalanina y tirosina y también metionina y triptofano, de ahí que se probara su acción. Sin embargo el número de residuos aromáticos presentes en el fragmento es bajo 12.4 residuos por molécula. A una solución de 7 mg/ml de "F" se le agregó quimotripsina en la proporción de 1:100 y se siguió la digestión en el autotitulador. Al cabo de 3 h. hay $\overset{7}{\Lambda}$ uniones rotas por molécula de proteína y luego la reacción continúa en forma suavemente lenta, 17 uniones rotas por molécula al cabo de 16 h. (fig. 35). El digerido de quimotripsina se corrió en la ultracentrífuga (fig. 36) y se calculó la constante de sedimentación que dió un valor de $2.51 \times 10^{-13} \text{s}$ para una concentración de proteína de 1 % que coincide con el valor de $s_{20,w}$ de "F" para dicha concentración .

Se probó la acción de la elastasa que ataca uniones adyacentes a

Fig. 36 Examen de "F" digerido con quimotripsina, efectuado en la ultracentrífuga. Fotografías tomadas a los 58,74,90 106 y 122 min. después de alcanzada la velocidad máxima de 56,100 rpm. La corrida se efectuó a 20°C, pH 9 y la concentración de proteína fué de 1% .



los aminoácidos neutros como leucina, valina y también serina, glicina, isoleucina, alanina (Naughton y Sanger, 1961). La digestión que se realizó con una concentración de proteína de 6 mg/ml aproximadamente y una relación enzima:substrato 1:50, se siguió en el autotitulado. El ataque fué de 1.6 residuos por molécula al cabo de 2 h. (fig. 37) y la constante de sedimentación del producto de la digestión fué de 2.58×10^{-13} para una concentración de 0.6 % (fig. 38). Es decir muy cercana al valor de la de "P" que es 2.50×10^{-13} .

La tabla XXVII resume los resultados referentes al ulterior ataque del fragmento tripeico y ellos demuestran el fracaso en el intento de romperlo mediante enzimas proteolíticas que actúan entre pH 7 y 9 después de haber usado las técnicas más usuales recomendadas en estos casos y otras sugeridas por la naturaleza del material. A este resultado bastante sorprendente se hace referencia en el capítulo VII.

Tanto la tripsina como la quimotripsina y la elastasa están a pH entre 7 y 9. Al ver la gran estabilidad que presenta el fragmento a ese pH se decidió estudiar el efecto de la pepsina que actúa a pH 2. Esta enzima tuvo un comportamiento sumamente curioso. A una solución de "P" de aproximadamente 6 mg/ml cuyo pH se ajustó a 2 con HCl 0.1 N se le agregó pepsina en la proporción de 1:50 y se dejó durante 24 h. a 25°C. El ataque se siguió por el método de la ninhidrina en la fracción soluble en TCA y se encontró un valor del α -amino nitrógeno como % de nitrógeno total correspondiente a una rotura de aproximadamente 100 uniones por mol (tabla XXVII, exp. A). Cuando el digerido péptico se corrió por electroforesis sobre papel en veronal 0.06 M, pH 8.6 a

FIG. 37 ACCION DE LA ELASTASA SOBRE "F"

20°C, pH 8.8

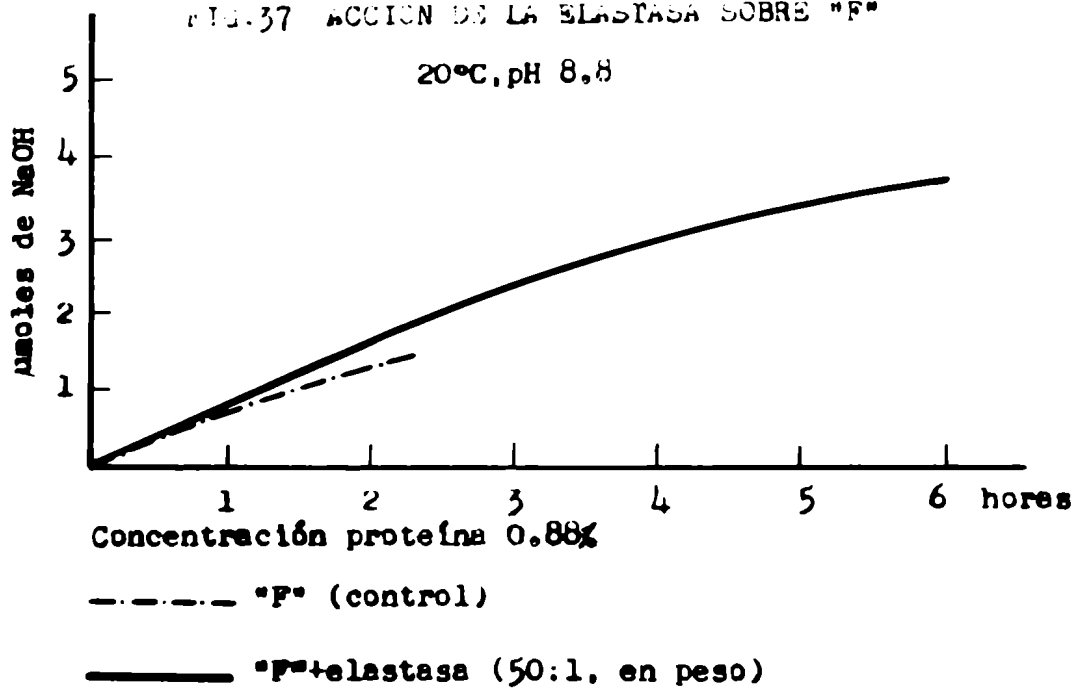


Fig.38 Examen de "p" digerido con elastasa, efectuado en la ultracentrífuga. Fotografías tomadas a los 8,16,24,32,40,65,81,97 y 113 min. después de alcanzada la velocidad máxima de 56,100 rpm. La corrida se efectuó a 20°C, pH 9 y la concentración de proteína fué de 0.8%.

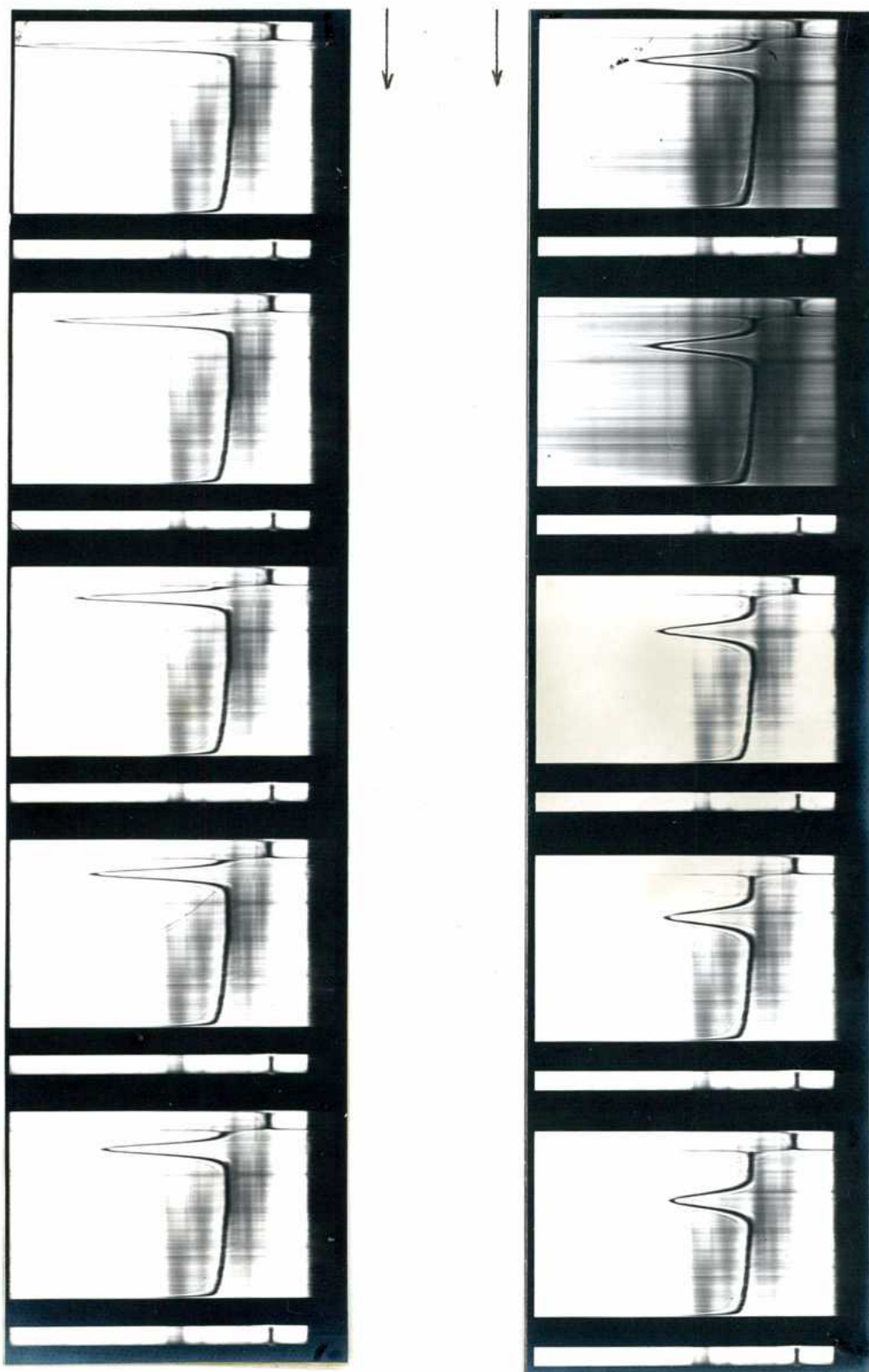


TABLA XXVII

Resistencia del Fragmento Tripsico

<u>Pretratamiento</u>	<u>Digerido con</u>	<u>Uniones rotas/mol</u>	<u>TCA</u>	$S_{20,w} \cdot 10^{13}$
-	tripsina	3h. <1	ins.	-
100°C 30min	"	" <0.8	"	-
urea 6 M	"	" <0.6	"	-
-	" dioxano 50%	-	"	-
-	" " 75%	-	"	2.55 (e = 0.4 %)
TCA 3%	"	" 8	"	mov.electrof.
EDTA 0.1 M	"	" <1.5	"	-
EDTA 0.1 M	" EDTA 1 mM	2h. <1	"	-
-	" Cl ₂ 0.5 M	" <0.5	"	-
-	" " 1 M	3h. <0.5	"	-
-	quimotripsina	" 7	"	2.51 (e = 1%)
-	elantasa	2h. <2	"	2.55 (e = 0.8 %)

4.7 v/ca durante 16 h., la cianidrina reveló un fragmento (positivo frente al azul de bromo fenol), un péptido positivamente cargado y otras dos manchas. Sin embargo, el blanco de "F" corrido juntamente con el digerido, también presentaba el mismo péptido positivamente cargado (de carácter no proteico), es decir el fragmento usado estaba impurificado por un péptido. El digerido se llevó a pH 8 y se corrió en la ultracentrífuga obteniéndose un sólo pico (fig.39a) de constante de sedimentación $2.8 \times 10^{-13} S$ para una concentración de proteína de 0.8%. Este resultado contrasta con las 1.5 uniones rotas durante la digestión y más aún porque el valor de la constante de sedimentación está por en-

cima de la correspondiente al fragmento para la concentración usada, que es de 2.56×10^{-13} S.

Se repitió el experimento en diferentes condiciones. A una solución de "F" electroforéticamente pura de concentración 3.4 mg/ml llevada a pH 2, se le agregó enzima en la proporción de 1:100 y se mantuvo durante 24 h. a 25°C (tabla XXVIII exp.B). La digestión se siguió del mismo

TABLA XXVIII

Acción de la Pepsina sobre "F"

Análisis efectuado sobre la fracción soluble en TCA de muestras tomadas después de 24 h. de digestión, 25°C, pH 2

<u>Exp.</u>	<u>Conc. proteína</u> <u>mg/ml</u>	<u>Enzima:</u> <u>substrato</u>	<u>α-amino</u> <u>N como %</u> <u>de N total</u>	<u>Uniones re-</u> <u>tas/mol</u>
A	3.4	1:50	10.6	100
B	3.4	1:100	4.9	50

modo que en el caso anterior y se obtuvo un resultado de 50 uniones re-
tas. Esta mezcla se corrió a pH 2 en la ultracentrífuga y se obtuvieron
3 picos pequeños, debido a la baja concentración de proteína usada que
difundieron muy rápidamente (fig.39 b). La muestra se volvió a correr
en la ultracentrífuga a pH 5 en la celda de límite sintético (fig.39 c)

Fig. 39 Examen de "r" digerido con pepsina, efectuado en la ultracentrífuga a 56,100 rpm a 20°C. a) Fotografías tomadas a los 11, 19, 27, 35, 43, 59, 67, 75, y 83 min. después de alcanzada la velocidad máxima; pH 8, concentración de proteína 0.6 %. b) Fotografías tomadas a los 1 y 5 min. después de alcanzada la velocidad máxima; pH 2, concentración de proteína 0.6 %. c) Carrera efectuada en celda de límite sintético. Fotografías tomadas a los 1, 9 y 17 min. después de alcanzada la velocidad máxima; pH 5, concentración de proteína 0.6 %.

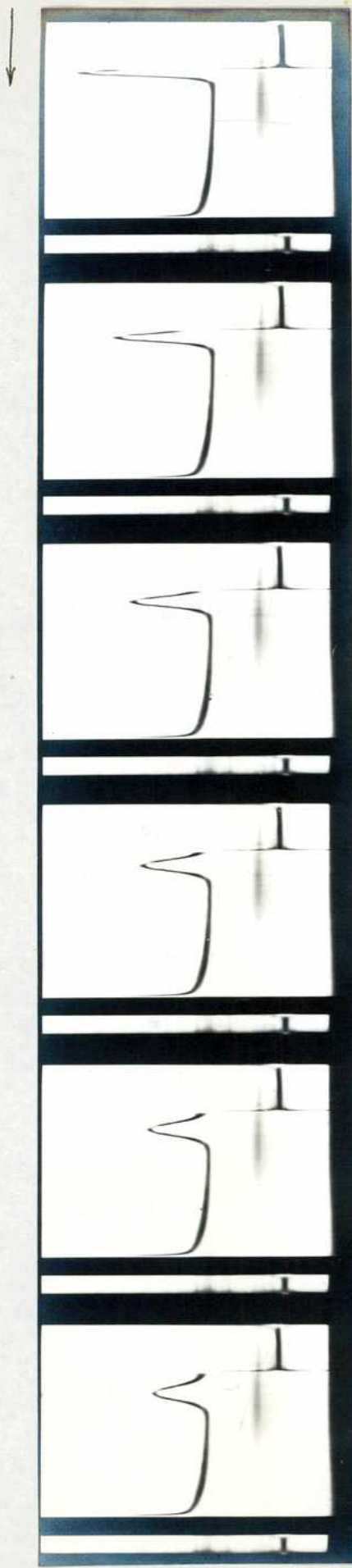


Fig. 39 a

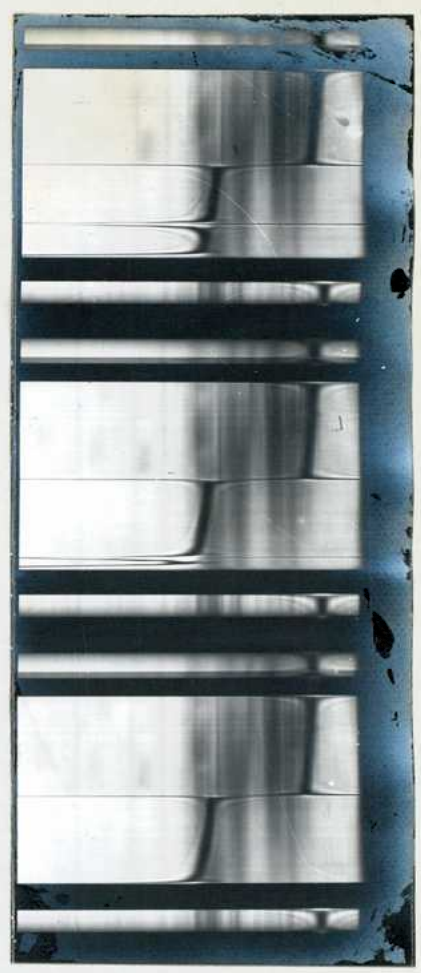


Fig. 39 c

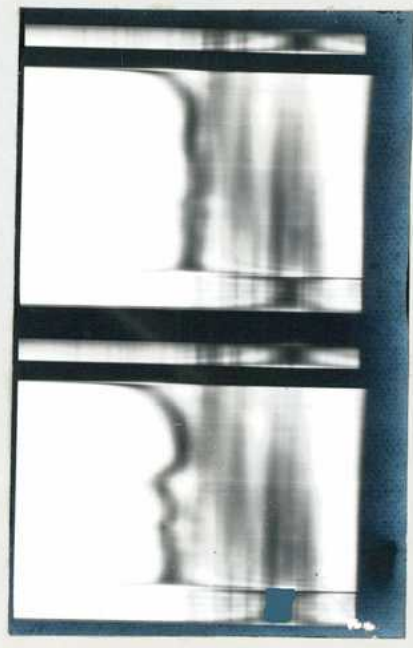


Fig. 39 b

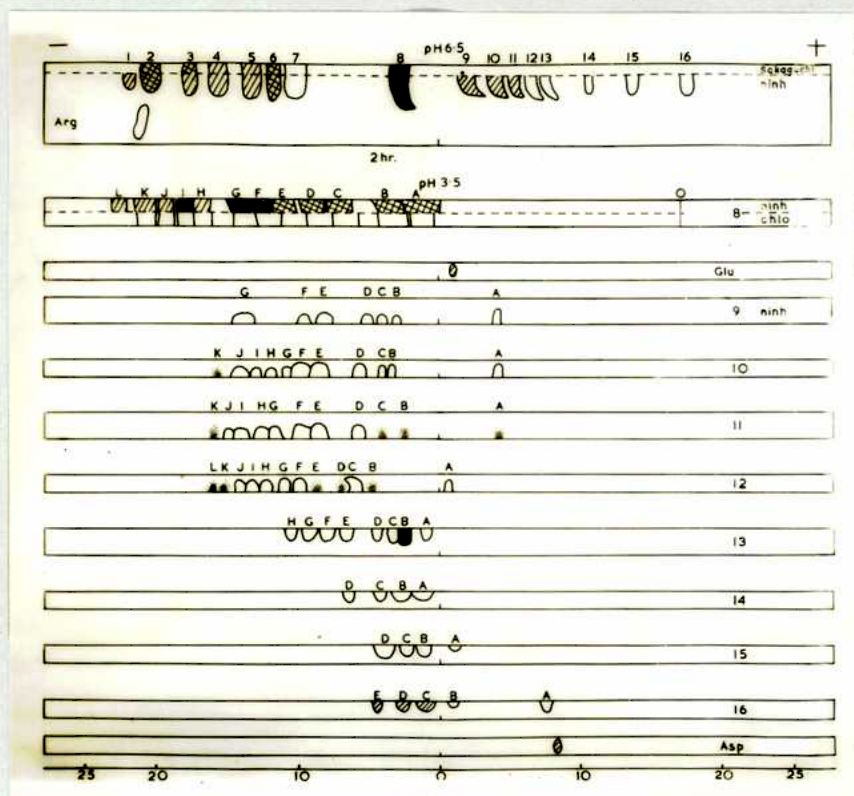
obteniéndose primero un pico que sedimentó muy rápidamente y luego otros dos picos uno de los cuales sedimentó antes de alcanzar la velocidad máxima y el otro alcanzó el fondo de la celda en 16 min. aproximadamente. Este último, es decir el más lento, tenía una constante de sedimentación del orden de $12 \times 10^{-13} \text{S}$.

Los resultados sugieren que a pH 2.0 la pepsina destruye el fragmento. Los péptidos formados serían capaces de reordenarse a pH 8.0 y presentarse a la ultracentrífuga como un componente ligeramente mayor que "1". Sin embargo a pH ácido esa reordenación sería distinta, dando agregados de peso molecular mucho mayor que el original.

Material dializable

El material dializable desalificado, obtenido por el procedimiento descrito en "Métodos" fué examinado por electroforesis sobre papel a alto voltaje bajo tolueno (pH 6.5). La electroforesis se prolongó por 2h. Al pulverizar el papel con anhídrido se observaron 16 bandas. Siete contenían arginina como lo mostró la pulverización con el reactivo de Sakaguchi (ver fig.40). Las bandas 1 y 2 se eluyeron separadamente y se sometieron a electroforesis de alto voltaje bajo las mismas condiciones utilizadas en el experimento anterior. Cuando se cromatografiaron en butanol:acético:agua (4:1:5 v/v), ocuparon las posiciones de lisina y arginina respectivamente. Se eluyeron, se hidrolizaron totalmente con ácido y se examinaron por cromatografía descendente sobre papel en butanol:acético:agua (4:1:5). Nuevamente ocuparon las posiciones de lisina y arginina respectivamente. Esto confirma observaciones ante-

**Fig.40 Ionoforesis del Material Difusible Proveniente Digerido
Tripsico de TM_A de Pinna**



Las ionoforesis se efectuaron a 40 V/cm. La parte superior muestra el diagrama obtenido al correr el material difusible sobre papel en buffer de piridina-acético pH 6.5 durante 2h. y que se coloreó por la reacción de Sakaguchi o ninhidrina según se indica. A continuación se presentan los diagramas obtenidos al correr por ionoforesis a pH 3.5 durante 1/2 h., eluidos de cada una de las bandas obtenidas a pH 6.5. Sobre la recta se indican las distancias, en cm. desde el origen.

Chlo- reacción de la clorhidrina (Rändel-Noppe)

Intensidades decrecientes ■ ▨ ▩ □ ▤

rieres indicativas de que en la hidrólisis tripaica de TN_A de Pinna se obtiene arginina y lisina libre.

La tabla XXII muestra la composición de aminoácidos de las diferentes bandas. Los números son valores arbitrarios que se refieren a las intensidades relativas aproximadas de las manchas sobre los cromatogramas, las que se apreciaron visualmente. Las bandas 3,4,5,6 y 7 se eluyeron, hidrolizaron y cromatografiaron en 2 dimensiones. Todas estas bandas contenían lisina, arginina, ácido glutámico y ácido aspártico. La mayoría de ellas, sin embargo, son probablemente mezclas de péptidos.

La banda 8 contiene péptidos neutros. Fue examinada por electroforesis sobre papel a alto voltaje a pH 3.5. A este pH los grupos ϵ -carboxilos están descargados y todos los péptidos y los aminoácidos neutros a pH 6.5 están positivamente cargados y corren hacia el cátodo. La ninhidrina mostró 12 bandas, 10 de ellas conteniendo arginina según se ve en la tabla XXIX. Una tira del mismo cromatograma fue tomada también por el método de Meindl-Hoppe el que mostraba 11 bandas en lugar de 12. La banda U_L , que daba un débil color con ninhidrina no era revelada por el método del cloro. Se eluyó cada banda con agua y se hidrolizó totalmente con ácido. Los hidrolizados fueron cromatografiados en dos dimensiones según se describe en "Métodos". El ácido glutámico y la lisina estuvieron presentes en todas las bandas. El ácido aspártico y la alanina estuvieron presentes en todas exceptión de una. La serina, arginina y valina estuvieron presentes en todas con excepción de dos.

Las bandas 9,10,11,12,13,14,15 y 16 se eluyeron y una muestra de cada banda se hidrolizó totalmente con ácido identificándose los amino-

ácidos por cromatografía bidimensional sobre papel (tabla XXIX). El resto de la muestra de cada banda se sometió a electroforesis de alto voltaje sobre papel bajo tolueno a pH 3.5. Cada banda dió origen a varias bandas (fig.40) . De estas solo se eluyeron aquellas que eran acídicas a pH 3.5. Se hidrolizaron totalmente con ácido y el hidrolizado se trató con FIKH. Se identificaron los DNP-aminoácidos por cromatografía descendente sobre papel en ftalato:alcohol amílico terciario. La tabla XXIX muestra los resultados. Los péptidos mas acídicos tales como 16_A, corren mas rápido que el ácido glutámico y tienen otros aminoácidos además de ácido glutámico y ácido aspártico en su composición. Johnson y Kahn (1959) sugirieron la presencia de poliaminas en los hidrolizados tripticos parciales de paramiosina de Venus mercenaria. A este respecto es interesante notar que, por ejemplo, el péptido 13_A tiene 10 residuos acídicos por un residuo básico en un total de 17 residuos; el péptido 15_A tiene 3 residuos acídicos en un total de 4. Sin embargo, los autores no dan datos suficientes que permitan decir si alguno de estos péptidos corresponden al "componente de alta velocidad" al cual ellos se refieren.

Es interesante notar que la arginina no solo está presente como aminoácido libre (banda 2) sino que también lo está en grandes cantidades entre los péptidos neutros a pH 6.5 (banda 8) y en cantidades mas pequeñas, según la reacción de Sakaguchi sobre papel entre los péptidos básicos (banda 3,4,5,6 y 7); y también está presente aún en aquellas bandas que son acídicas a pH 6.5 (tabla XXIX). En estas últimas bandas, sin embargo, la cantidad de arginina presente debe ser muy pe-

queña ya que el método de Sakaguchi sobre papel no reveló su presencia que solo fué puesta en evidencia en los hidrolizados totales. Como hemos visto en el capítulo III página 58, el 60 % de la arginina liberada en la digestión trípica se encontró como DNP-arginina. Es sorprendente encontrar una proporción tan elevada de DNP-arginina ya que de acuerdo a la especificidad de la tripsina, la arginina debiera estar presente como residuo C-terminal. La presencia de largas secuencias de poliarginina explicaría esto, suponiendo que la acción de la tripsina sobre la poliarginina fuera similar a la observada sobre la polilisina por Waley y Batsen (1953). Si así fuera debieran encontrarse pequeñas cantidades de arginina libre y cantidades mayores de di- y triarginina. La presencia de di- y triarginina entre los péptidos que son básicos a pH 6.5 no parece improbable. Aunque la arginina está presente entre los péptidos básicos a pH 6.5 también lo está en alta proporción entre los péptidos que son neutros a este pH y su presencia como residuo N-terminal podría resultar de una secuencia del tipo



En el caso del virus del mosaico del tabaco, por ejemplo la tripsina ataca la secuencia Thr.Arg.Arg.Val. en la posición indicada, dejando un péptido que tiene arginina como N-terminal (Anderer y col., 1960).

En resumen, estos resultados dan una idea aproximada del tipo de material dializable. Ya se ha visto en el capítulo III que de la digestión deben esperarse péptidos pequeños, del orden de tri y tetrapéptidos. Los estudios sobre el material dializable confirman esa presunción.

e indican la presencia de un alto número de pequeños péptidos cuya purificación es probablemente difícil.

Capítulo V

ACCIÓN DE LA QUIMOTRIPSINA SOBRE TM_A DE PINNA

Cuando la TM_A de Pinna fué digerida con quimotripsina durante 24 h. bajo las condiciones descriptas en "Métodos", se obtuvo una cantidad considerable de material difusible, quedando un fragmento no dializable "PQ". Este fragmento, así como el tripsico, precipitaban después del agregado de TCA 3 % ; su composición de aminoácidos resultó ser muy similar a la de TM_A y contenía fenilalanina y tirosina.

Velocidad y Extensión de la Acción de la quimotripsina sobre TM_A de Pinna

La quimotripsina actúa sobre TM_A de Pinna más lentamente que la tripsina y también en menor extensión. La reacción llega a la mitad después de 3 h. de haberse agregado la enzima y el contenido de nitrógeno de la fracción soluble en TCA encontrado después de 24 h. de digestión, es de un 30 % de nitrógeno total (tabla XXI). El valor correspondiente en la digestión tripsica es de 50 %.

La tabla XXI presenta los resultados de dos digestiones hechas bajo diferentes condiciones. En el experimento B, en el cual la concentra-

TABLA XXX

Acción de la quimotripsina sobre TM_A de Pinnac (seguida en la fracción soluble en TCA) pH 0.2, 25°C, experimento A

<u>Tiempo de toma</u> <u>de muestras</u>	<u>N como % de</u> <u>N total</u>	<u>α-amino N como</u> <u>% de N total</u>
30 min	6.75	0.21
1 h.	9.55	0.26
2 "	13.60	0.40
3 "	17.12	0.63
4 "	19.60	0.82
6 "	20.00	0.98
8 "	-	1.14
22 "	31.2	1.66
24 "	31.2	1.70

ción de proteína usada fué menor que en A y la relación enzima: sustrato doble, la digestión parece ser más completa. La tabla XXX muestra el curso de la reacción en el experimento A, en función del tiempo seguido por el contenido de nitrógeno y α -amino-nitrógeno en la fracción soluble en TCA. En el experimento B, la digestión fué seguida mediante el consumo de álcali. Como la curva obtenida en el experimento B no parecía llegar a término, se agregó más enzima, llevando la relación enzima:sustrato a 1.2:100 a pesar de lo cual la pendiente de la curva

no cambió (en este experimento, no se burbujeó nitrógeno).

El número de residuos tirosina y fenilalanina calculados a partir de la composición de aminoácidos de TM_A de Pinna (Bailey y Nüegg, 1960) es de 35 por mol. La composición de aminoácidos del fragmento que quedó de la digestión quimotripsina de TM_A de Pinna muestra que el mismo todavía contiene residuos fenilalanina y tirosina. En la digestión quimotripsina prolongada (24h.) de TM_A de Pinna se rompen 53.5 uniones peptídicas por mol (tabla XXXI experimento B). Por lo tanto, parece ser que la enzima ataca a otras uniones además de aquellas en las que intervienen la tirosina y fenilalanina. También en el experimento A en el que solo 29 uniones por mol fueron rotas (según el método de la ninhidrina), el fragmento quimotripsico contenía tirosina y fenilalanina. Con respecto a esto debe tenerse en cuenta que aunque la quimotripsina muestra una marcada preferencia por uniones que contienen aminoácidos aromáticos, también rompe uniones constituidas por grupos carboxilos del triptofano (ausente en la TM_A) metionina y más lentamente arginina, leucina y valina (Dixon y Rebb, 1950; Anderer y col., 1960). Probablemente cuando la relación enzima:substrato es alta, aumentan las rupturas no específicas lo cual explicaría la diferencia entre el experimento A y B en la tabla XXX. En esta tabla se observan también algunos resultados de los contenidos de nitrógeno y α -amino-nitrógeno del digerido dializado en el experimento A. Se puede notar que el nitrógeno no dializable es algo más elevado que el nitrógeno de la fracción insoluble en TCA. Esto se debe probablemente a la contaminación por péptidos de bajo peso molecular los que resultaran difíciles de eliminar mediante

TABLA XXXI

Acción de la Quimotripsina sobre TM_A de Piana y Distribución de Nitrógeno en los Hidrolizados

Las digestiones se llevaron a cabo a pH 8.2 y a 25°C.
Se efectuaron análisis en muestras tomadas después de 24h. de digestión

		<u>Exp. A</u>	<u>Exp. B</u>			
Concentración de proteína en mg/ml		13.6	6.4			
Relación enzima:substrato (por peso)		0.5:100	1:100			
N como % de N total	Digerido tratado con TCA	TCA soluble	31.2	39.5		
		TCA insoluble	65.0	59.0		
	Digerido dializado	Difusible	24.6	-		
		No difusible	71.7	-		
	Total	96.8	96.5	98.3	-	
	α-amino N como % de N total	Digerido tratado con TCA	TCA soluble hidrolizado total	24.6	29.5	
TCA insoluble			48.0	38.2		
Digerido dializado		Difusible	18.2	-		
		No difusible	53.0	-		
Total teórico		65.9	72.6	71.2	63.7	-
Método ninhidrina		29	-			
n ^o de uniones rotas por mol Consumo de álcali			53.5			

diálisis contra agua(Capítulo I, página 25)

Resumiendo, la quimotripsina ataca a la TN_A de Pinna más lentamente de lo que lo hace la tripsina y también en menor grado. Esto era de esperar en vista del menor contenido de residuos aromáticos por mol que el de residuos básicos (31 residuos aromáticos contra 193 residuos básicos).

Productos de la digestión quimotripsina

a) Material no difusible

La purificación de "FV" se hizo de acuerdo a lo descrito en "Métodos". A fin de comprobar si los productos de la digestión quimotripsina inhibía la proteólisis, se estudió el efecto de la quimotripsina sobre el fragmento purificado. Las condiciones de esta digestión (pH y temperatura) fueron las mismas que las usadas en la digestión de la proteína nativa, pero se redujo la concentración de proteína. El "F" fue incubado con la enzima durante 24 h. Se estudió también la acción de la quimotripsina sobre el fragmento previamente calentado en un baño de agua hirviendo durante 30 min. y sobre el fragmento precipitado con TCA 3% (con posterior eliminación del TCA por lavado con agua). En todos los casos el amino-nitrógeno en la fracción soluble en TCA, se determinó en muestras tomadas después de 24 h. de digestión.

La digestión del fragmento, si la hay, es extremadamente lenta y esto es válido no sólo para el fragmento puro sino también para el mismo previamente calentado o tratado con TCA.

En ningún caso la digestión sobrepasó el 2% del fragmento (tabla XXXII)

TABLA XXXII

Acción Ulterior de la Quimotripsina sobre "F₁"

Las digestiones se efectuaron en buffer de borato 0.25 M a pH 8.2 y a una temperatura de 25°C. Los análisis se efectuaron en muestras tomadas después de 24 h. de digestión, pertenecientes a la fracción soluble en TCA.

<u>Tratamiento previo</u> <u>del "F₁"</u>	<u>Concentración de</u> <u>proteína mg/ml</u>	<u>Relación</u> <u>enzima sus-</u> <u>trato (por</u> <u>peso)</u>	<u>-amino N</u> <u>como % de</u> <u>N total en</u> <u>TCA soluble</u>
-	2.8	0.8:100	0.49
30 min. 100°C	2.1	1:100	0.55
3 % TCA	2.3	1: 20	0.98

El α -amino N total después de la hidrólisis es de 63.3 % del N total (Este valor fué calculado de la composición de aminoácidos del fragmento)

Mas aún, después de 24 h. de redigestión de "F₁" queda, en todos los casos, una fracción insoluble en TCA 3 %, la cual, juzgada por el volumen del precipitado, no cambia durante el tratamiento.

La composición de aminoácidos del fragmento quimotripsico fué determinada y calculada por el mismo método utilizado en el caso del fragmento tripsico. La composición de aminoácidos del fragmento quimotripsico es muy similar a la de la proteína nativa, excepto para la metionina,

TABLA XXXIII

Análisis de "Fu" y Comparación con TN_A de Pinnu

	<u>Peso del aminoácido anhidro/100g. de "Fu"</u>	<u>Residuos/10³g. de proteína</u>	
		<u>"Fu"</u>	<u>TN_A de Pinnu</u>
Cys	0.43	3	-
Asp	13.13	114	117
Thr	3.64	36	24
Ser	4.64	53	52
Glu	22.92	177	183
Gly	0.46	8	13
Ala	8.20	113	108
Val	3.21	32	38
Met	0.81	6	16
Ileu	3.56	31	30
Leu	12.91	114	109
Tyr	1.89	11.5	15
Phe	0.79	5	9
Lys	8.74	68	64
His	0.92	7	5
NH ₂ -N	(2.6)	(146)	(116)
ARG	13.78	88	85
	<u>100.03</u>	<u>870.5</u>	<u>867</u>

N% calculado 18.75

Peso promedio
por residuo

115

la que disminuyó a un tercio (tabla XXXIII).

El fragmento quimotripsico se examinó en la ultracentrífuga, calculándose la constante de sedimentación. Se obtuvo un valor de $2.29 \times 10^{-13} S$ para una concentración de proteína de 0.7 %, el cual es más bajo que los valores obtenidos para la TM_A y para el fragmento "F" a dicha concentración. Los valores para estas dos últimas proteínas son 2.60 (Kay, 1958) y $2.41 \times 10^{-13} S$ respectivamente (ver capítulo IV, pag 76). Esto podría significar que el fragmento quimotripsico tiene un peso molecular más bajo que el del fragmento "F" o que su constante de difusión es mayor. Dado que la digestión tripsica de TM_A de Pinna es mayor que la obtenida con quimotripsina, parecería posible que el fragmento quimotripsico tenga un peso molecular comprendido entre el del fragmento y el de la TM_A , pero una configuración similar a TM_A . Más detalles sobre este aspecto se podría obtener estudiando la viscosidad del fragmento quimotripsico.

La tabla XXXIV, presenta algunas características del fragmento quimotripsico.

b) Material difusible

El material difusible fué separado del digerido utilizando el mismo procedimiento seguido con el hidrolizado tripsico. Los péptidos fueron desalificados por el método de Dixon (ver "Métodos") y sometidos a electroforesis sobre papel, a alto voltaje en tolueno a un pH de 6.5 durante hora y media (fig.41). A este pH hay pocas componentes acídicas. Sólo se detectaron 3 bandas cargadas negativamente y ninguna de ellas se movió mas allá del ácido aspártico. Se revelaron además dos bandas neu-

TABLA XXXIV

Características Analíticas del Fragmento Quimotripsico

Los resultados se expresan como % de los residuos totales

Grupos ácidos totales (a)	33.4
Grupos básicos totales (b)	18.7
N amídico (c)	14.4
Carga aniónica neta (a-(b+c))	0.3
Residuos no polares	33.9
Lys/Arg	0.8
Glu/Asp	1.6

El N amídico es calculado del amoníaco derivado de la columna después de la corrección del amoníaco producido en la destrucción de serina y treonina

**Fig.41 Ionoforesis del Material Difusible Proveniente del Digerido
quimotripsico de TM_A de Pisna**



La ionoforesis se efectuó en buffer de piridina-acético pH 6.5 durante 1h a 40 V/cm. Sobre la recta se marcan las distancias, en cm., desde el origen.

Intensidad decreciente de las bandas positivas frente a la ninhidrina. ■ ▨ □

tras y ocho básicas . Una de esas bandas básicas corrió ligeramente mas rápido que la lisina.

Las bandas neutras fueron eluidas juntas y examinadas por electroforesis sobre papel a alto voltaje a pH 3.5. Se obtuvieron 5 bandas que se movían hacia el cátodo.

Los péptidos básicos fueron eluidos juntos y sometidos a electroforesis de alto voltaje sobre papel a pH 9.0. Había 6 bandas que ocupaban una zona neutra; 3 de ellas tenían carga debilmente negativa y las otras 3 debilmente positiva. Una de ellas corrió muy cerca a la lisina. Había también una zona vetada de carga fuertemente negativa.

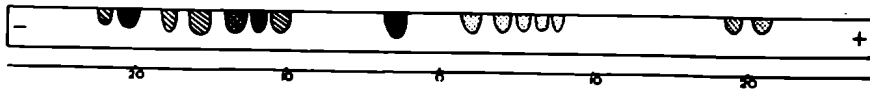
Capítulo VI

DIGESTION TRÍPTICA DE LA TM_A Y TM_B DE PECTEN MAXIMUS

En el capítulo III se describió la velocidad y la extensión de la digestión de la TM_A de Pecten con tripsina, encontrándose un comportamiento similar al observado con TM_A de Pinna. Los productos de la digestión son también muy similares. Después de una digestión de 24 h. de TM_A de Pecten con tripsina, se obtiene un fragmento y además una considerable cantidad de material difusible. Este fragmento se aisló y purificó por el mismo procedimiento descrito para la TM_A de Pinna. El material dializable fué sometido a ionoforesis a pH 6.5. La fig.42 muestra el modelo obtenido que es muy similar al que se muestra en la fig.40 para el dializado de la digestión triptica de Pinna.




El Pecten contiene dos tipos de tripsininas (Hüegg, 1959), según se ha discutido en la Introducción. Pareció interesante comparar la acción de la tripsina en ambas TM_A y TM_B obtenidas de Pecten maximus. Se trataron 15 mg. de TM_A y 38 mg. de TM_B con una centésima parte por peso de tripsina durante dos h. a 30°C, pH 8.2. Se utilizó una alícuota de cada una de las mezclas de la digestión para hacer un mapa de pep-

**Fig. 42 Ionoforesis del Material Difusible Proveniente del Digerido
Trípico de TM_{Δ} de Pecten.**



La ionoforesis se realizó en buffer de piridina-acético pH 6.5 durante 2 h. a 40 V/cm. Sobre la recta se marcan las distancias, en cm, desde el origen.

Intensidad decreciente de las bandas positivas frente a la ninhidrina ■ ■ ▨ □

**Fig.43 Mapa de Péptidos dado por un Digerido Tripsico
de TM_A de Pecten
Intensidades decrecientes (ninhidrina)   **

El mapa de péptidos, en ambos casos, se obtuvo por iono-
forésis a 40 V/cm. en buffer de piridina-acético pH 6.5
durante 1h. y cromatografía descendente en butanolácido
acético: agua, 4:1:5. o indica el punto de aplicación de
la muestra.




**Fig.44 Mapa de Péptidos dado por un Digerido Tripsico
de TM_B de Pecten
Densidades decrecientes (ninhidrina)   **

Fig. 43

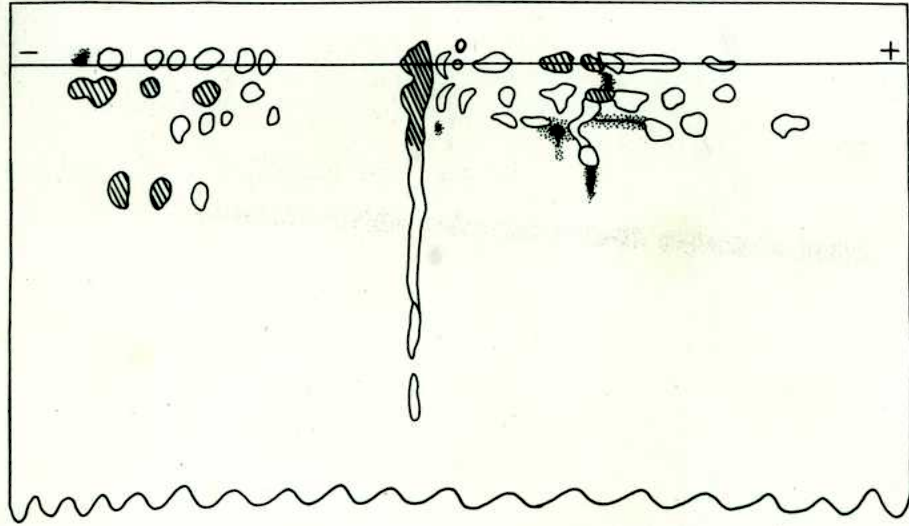
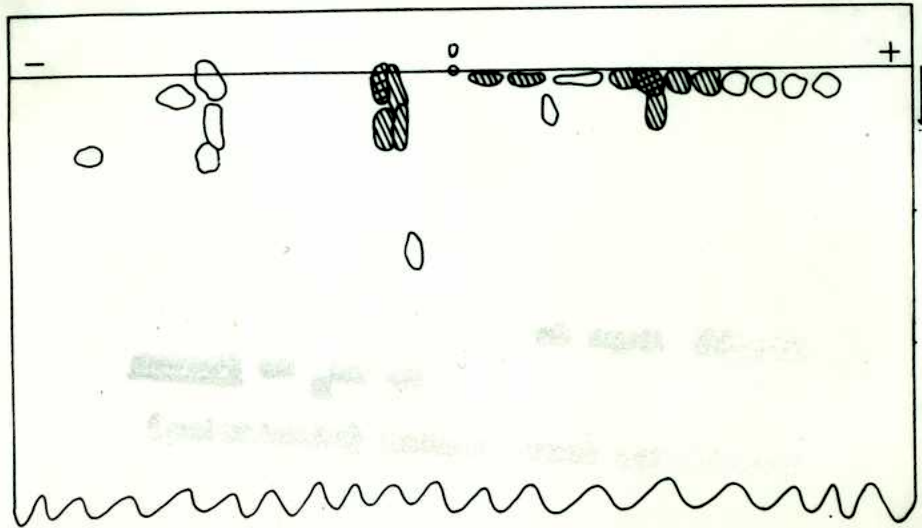


Fig. 44



tidos ("fingerprint") (ver "Métodos"). Se obtuvieron mapas completamente diferentes (fig.43 y 44). Aparte de eso hay una diferencia quizá más significativa: la TM_A deja un fragmento después de haber sido digerida con tripsina, en cambio la TM_B no lo deja. Cuando esta última se trató, con ácido tricloroacético o con acetato de sodio 0.1 N pH 5.4, no se observó precipitación, los productos de la digestión se sometieron a electroforesis sobre papel (en un buffer de veronal, pH 8.4). El azul de bromo fenol no mostró la banda característica del fragmento. Con respecto a esto resulta interesante agregar que la tropomiosina de conejo que parece ser similar a la TM_B (Kominz, Saad y Laki, 1957; Bailey y Hügge, 1960) también es completamente digerida por tripsina (Bailey, comunicación personal).

La digestión tripsica se convierte así en un método que permitiría diferenciar la TM_A de la TM_B .

Digestión Tripsica de Miosina

Se ha visto en el capítulo III pag.47 que un rápido tratamiento de miosina, con tripsina produce dos fragmentos que reúnen entre ellos las propiedades de la molécula de miosina. Estos son la L-meromiosina (de peso molecular 96,000) y la H-meromiosina (de peso molecular 232,000). Esta última puede combinarse con actina y mantiene la actividad ATPasa. Esas fracciones fueron consideradas subunidades de la miosina (Szent-Gyögyi, 1953). Así se calculó un peso molecular mínimo para la miosina

de 420,000, en base a la integración de dicha molécula por L y H-meromiosina en la relación de 2 a 1. Mihalyi y Harrington (1959), sin embargo, en base a un estudio detallado de la digestión trípica, llegaron a la conclusión de que las meromiosinas no eran subunidades intactas de miosina sino que representaban componentes, que eran degradados por ulterior ataque trípico.

En 1962, Laki postula la posibilidad de que los músculos de los vertebrados contengan TM_A no en forma libre sino como parte integral de la molécula de miosina. Ello surgiría del hecho de que por digestión trípica incompleta (40 min.) de miosina de conejo denaturalizada con alcohol y eter (Laki, 1957) se obtiene un fragmento proteico de propiedades semejantes a las de TM_A . Según dicho autor este fragmento es idéntico a la "fracción cristalina de L-meromiosina" caracterizada por Szent-Györgyi y col. (1960). Esa "fracción cristalina" es una fracción de L-meromiosina no denaturalizada por el alcohol. Si esta teoría fuera correcta la digestión trípica prolongada de la miosina debería dejar un fragmento de caracter proteico similar al dejado por la TM_A descrito en el capítulo IV y al que hemos llamado "F".

Se procedió pues a preparar miosina a partir de músculo de conejo siguiendo las indicaciones de Mihalyi (1950). La concentración de proteína fue determinada por el micro método de Kjeldahl adaptado por Chibnall, Hees y Williams (1943) tomando 16.15 % como contenido de nitrógeno (Mihalyi, 1950).

A una solución de miosina de 7.4 mg/ml se le agregó tripsina en la relación de 1:100 en peso y se dejó actuar a 25°C durante 24 h. El cur-

so de la digestión se siguió con el autotitulado obteniéndose 290 uniones rotas por mol, tomando como peso molecular 500,000. Los valores del peso molecular de la miosina dados por la literatura oscilan entre 420,000 y 600,000. Para el peso molecular considerado el número de residuos básicos es de 615 por mol, de acuerdo al análisis de aminoácidos de Kemins y col. (1954). Es decir que no todas las uniones susceptibles fueron rotas por la tripsina. Al agregar a una alícuota, igual volumen de TCA 3% se produjo un precipitado que era soluble en agua ajustada a pH 7.5. Partiendo de una cantidad doble de proteína se realizó un nuevo experimento en las mismas condiciones. Después de 24 h. de digestión se agregó DFP en la proporción molecular de 1 a 1 y se procedió de acuerdo a la técnica seguida para aislar y purificar el fragmento triptico de TN_A de Pinna. En este segundo experimento el número de uniones rotas por mol fue de 406. El digerido se dializó contra agua y el material no dializable se precipitó con acetato de sodio 0.1 N pH 5.4. De los 74 mg. de miosina precipitaron en las condiciones de preparación de "F" 22 mg. de material proteico. Se determinó la solubilidad de este material en sulfato de amonio. Para ello se le agregó una solución neutra saturada de sulfato de amonio encontrándose que la mayor parte del material precipitó entre 14 y 20 % de saturación y cantidades pequeñas lo hicieron entre 20 y 38 % y entre 38 y 50 % (tabla XXXVI). "F" precipita entre 38 y 50 % de saturación y el rendimiento que debiera obtenerse en caso de que una molécula de TN_A fuera parte integrante de una molécula de miosina es del 18 % (en este valor se incluye el cálculo de la pérdida sufrida durante la purificación). El rendimiento

TABLA XXXVI

Rango de precipitación en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ del material proteico
resistente a la digestión trípica de miosina

Los resultados se expresan como % del original (74 mg.)

<u>Fracción precipitada a una</u> <u> saturación de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ de:</u>	<u>Rendimiento</u>
%	%
14-20	4
20-38	<2
18-50	<2
sobresadante 50 %	14

de la fracción que precipitó entre 38 y 50 % está muy por debajo del anotado. Este resultado no concuerda pues con la hipótesis de que la TM_A forma parte integrante de la molécula de miosina por lo menos en la proporción molecular de 1 a 1.

Capítulo VII

DISCUSION

Uno de los objetos de este trabajo ha sido el aislamiento y purificación de treponemiasina a partir de un molusco argentino: Aulacomya magellanica, a fin de compararla con la treponemiasina extraída de otras variedades de moluscos del hemisferio boreal. La treponemiasina extraída pertenece al grupo A. Así lo indica su solubilidad, forma de cristalizar, constante de sedimentación y comportamiento frente a la tripsina. Su viscosidad intrínseca en cambio, no coincide con la alta viscosidad de la TM_A de Pinna o Pecten lo que indicaría un grado de asimetría menor. Según Pedersen (1940) las sustancias con coeficiente de fricción elevado presentan gran variación de la velocidad de sedimentación con la concentración. Si calculamos las pendientes de las rectas obtenidas al representar las constantes de sedimentación en función de la concentración para las TM_A de Pinna (Kay, 1958) y Aulacomya, se obtienen 0.095 y 0.051 respectivamente. Es decir la TM_A de Aulacomya presenta menor variación de la velocidad de sedimentación con la concentración que la TM_A de Pinna siendo por lo tanto su coeficiente de fricción

también menor. El coeficiente de fricción depende de la asimetría e hidratación de las partículas que sedimentan, luego la TM_A de Aulacomya es menos asimétrica que la TM_A de Pinna. Esto concuerda con el dato de viscosidad obtenido.

Llama la atención el peso molecular obtenido por el método de Archibald para la TM_A de Aulacomya. En efecto, el valor de la constante de sedimentación corregida para la viscosidad del agua y concentración cero de proteína de TM_A de Aulacomya coincide con el valor obtenido para la TM_A de Pinna. Si la constante de difusión es la misma o menor en el caso de la proteína extraída de la variedad argentina (no puede ser mayor ya que la partícula es menos asimétrica), debe esperarse que la TM_A de Aulacomya tenga un peso molecular igual o menor que el de dicha proteína extraída de Pinna. Sin embargo el método de Archibald dió un valor de $258,000 \pm 16,000$ que es dos veces el peso molecular de la TM_A de Pinna (131,000 según Kay, 1958). Riddiford y Scheraga (1962) encontraron por el mismo método que para la paramiosina de Venus mercenaria los valores del peso molecular oscilan entre 228,000 y 618,000, aceptando la existencia de agregados. Los valores obtenidos por esos autores son aproximadamente múltiplos integrales de 131,000.

Como resultado de la marcación de la TM_A de choiga con FDNS se obtuvo 0.6 residuos de DNP-alanina por cada 130,000 g. de proteína. Este resultado puede ser debido a una impureza ya que el método es muy sensible y un péptido pequeño que se encuentre impurificando la proteína acusaría un valor alto de DNP-aminoácido. Si esto es correcto el FDNS no acusaría grupo N-terminal que es lo que se observa con TM_A de

Pinna e Pecten. Otra semejanza con la primera lo constituye el hecho de poseer grupos C-terminales básicos. Sin embargo esta es la primera TM_A descrita que presenta una viscosidad tan similar a la de la TM_B . Por todo ello se ha usado como valor más probable del peso molecular de Aulacomya el de 130,000 e sea la mitad del valor obtenido por el método de Archibald.

La digestión trípica de TM_A de Pinna da un fragmento de elevado peso molecular cuya identificación ha sido otro de los objetos de este estudio.

Este fragmento trípico parece ser una proteína bien definida. Lo permite afirmar la reproducibilidad de las muestras obtenidas en diferentes digestiones con respecto a:

- 1.- Análisis de aminoácidos
- 2.- Constante de sedimentación
- 3.- Grupo N-terminal
- 4.- Peso molecular
- 5.- Resistencia a ulterior acción trípica

Las proteólisis se efectuaron durante 24 horas a fin de asegurar una digestión completa ya que la reacción terminaba generalmente después de 6 horas.

El fragmento es diferente de la TM_A a pesar de que sus composiciones de aminoácidos son extraordinariamente similares.

Así, las dos proteínas difieren en las siguientes características:

- 1.- Peso molecular
- 2.- Residuos N-terminales evidenciados por el método del PIRN

- 3.- Valor de la constante de sedimentación extrapolada a concentración cero
- 4.- Viscosidad intrínseca
- 5.- Dependencia de la velocidad de sedimentación con la concentración de proteína
- 6.- Comportamiento frente a la tripsina
- 7.- Solubilidad
- 8.- Cristalización (imposibilidad de cristalización del fragmento)

Más aún, una mezcla de TM_A de Pinna y fragmento tripsínico demostró ser heterogénea al ser examinada en la ultracentrífuga. Resumiendo se puede decir que el fragmento es una proteína que representa aproximadamente la mitad de la molécula de TM_A . Esto es sugerido no solamente por ser su peso molecular (alrededor de 85.000) y la extensión de la proteólisis (ver capítulo III) sino también por su rendimiento (entre 46 y 49 %) que es cercano al teórico (62.7 %, basado en el peso molecular observado).

El fragmento tiene un residuo N-terminal por molécula el que fué identificado como ácido glutámico. Dado que no se encontró otro residuo N-terminal en cantidades significativas, parecería que el fragmento está constituido por una única cadena polipeptídica. Los resultados de C-terminal en cambio, no permiten deducir nada al respecto ya que no se hicieron determinaciones para tiempos cortos y el resultado obtenido pueda deberse al desprendimiento sucesivo de aminoácidos de una

sola cadena.

El fragmento tripeico parece ser una molécula muy asimétrica aunque menos asimétrica que la de TM_A . Esta baja asimetría está indicada por:

1) Su baja viscosidad intrínseca lo que sugiere una disminución en la asimetría molecular o en la hidratación o en ambas. La relación axial se calcula como se describió en el capítulo I. Las relaciones axiales así obtenidas son 71 para la TM_A de Pinna y 27 para su fragmento tripeico. En ambos casos se usó el mismo valor del volumen parcial específico (Kay, 1958) ya que dicho valor no varía mucho de una proteína a otra (Pedersen, 1945).

2) La pequeña dependencia de la velocidad de sedimentación con la concentración de proteína. Esto como se acaba de ver indica un coeficiente de fricción menor. Se calcularon los coeficientes de fricción, usando la siguiente fórmula simplificada (Pedersen, 1940):

$$\frac{f}{f_0} = 1.19 \times 10^{-15} \frac{M^{2/3} (1-\bar{v})}{s^{2/3} \bar{v}^{1/3}}$$

donde f es la constante de fricción molar de la sustancia, f_0 es la constante de fricción molar de una molécula compacta, esférica y no hidratada de la misma masa, M el peso molecular calculado por equilibrio osmótico o sedimentación o sedimentación-difusión, \bar{v} el volumen parcial especí-

fico, ρ la densidad del agua a 20°C, $S_{20,w}^0$ la constante de sedimentación corregida para concentración 0 y viscosidad del agua. Así, para $\bar{v} = 0.73$ y $\rho = 0.9982$, los valores obtenidos de los coeficientes de fricción fueron 3.03 para la proteína original y 2.23 para su fragmento trípico. Las relaciones axiales tomadas de tablas (Svedberg y Pedersen, 1940) correspondientes a los valores calculados de los coeficientes de fricción son 54 para la TM_A y 26 para el fragmento trípico. Se observa que las relaciones axiales de TM_A de Pinna calculadas por el incremento de viscosidad y por el coeficiente de fricción no son exactamente las mismas. La obtenida por el incremento de viscosidad coincide con la calculada por las medidas de dispersión de la luz (Kay, 1958). Por otra parte, los valores de relación axial del fragmento trípico concuerdan muy bien y son alrededor de un tercio de los de la proteína nativa.

Este estudio no permite deducir (ver capítulo IV, pag.72/74) la posición ocupada por el fragmento trípico en la molécula original de TM_A . Pero éste no parece provenir del extremo N-terminal. Cualquiera sea su posición en la molécula original la enzima parece atacar una porción produciendo péptidos pequeños. En algún momento del proceso, puede ocurrir que la porción residual se transforme variando en su configuración original, provocándose el enmascaramiento de las uniones susceptibles.

Locker y Schmitt (1957) hicieron una digestión corta de paramiosina de Venus mercenaria con tripsina y observaron que la digestión au-

mentada el grado de difusión sin notarse un cambio apreciable en la velocidad de sedimentación. Estos autores encontraron una rápida disminución de la viscosidad en los primeros minutos y se obtuvo un valor del 30 % de la viscosidad relativa inicial alrededor de los 15 minutos. Estos autores pensaron que este comportamiento fué idéntico al observado por Macfarlane (1955) al descomponerse la topomiasina de conejo por acción de una enzima de Clostridium oedematians y que fué interpretado por Kekwick (citado por Macfarlane, 1955) como una descomposición general de la molécula. Sin embargo este no parece ser el caso. Comparando sus resultados con los obtenidos en el presente estudio se puede ver notables similitudes las que sugieren la formación de un fragmento similar al descrito aquí. Así, la velocidad de sedimentación del fragmento tríptico obtenido a partir de Pinna no cambió mucho comparada con la de la proteína original, y la constante de difusión aumentó algo. Más aún, el valor de la viscosidad intrínseca del fragmento tríptico fué alrededor del 25 % del de la TM_A (ver capítulo III) comparado con el citado 30 % de la digestión tríptica de la paramiosina de Venus. Locker y Schmitt (1957) también siguieron la digestión en la ultracentrífuga y su estudio sugiere que ocurre un cambio profundo en la proteína entre los 2.5 y 7 minutos de acción tríptica. Esto podría sugerir que algunas de las uniones rotas al principio de la digestión (cinéticamente durante la reacción rápida) son uniones claves que mantienen la molécula de TM_A plegada. Su rotura produce un cambio en algunas de las propiedades de la molécula, tales como la distribución de la carga por ejemplo, y mientras una porción se retrae en una

estructura más plegada, el resto permanece accesible a la acción de la enzima y es ulteriormente atacada. De acuerdo a esta interpretación, la reacción lenta podría atribuirse a la proteólisis de aquella parte de la proteína que es convertida en péptidos pequeños.

Estudiando la conversión de tripsinógeno y quimotripsinógeno en tripsina y quimotripsina respectivamente, Neurath y Dreyer (1955) usaron la teoría de Linderström-Lang y Schellman (citado por Neurath, 1957) para explicar la activación de los zimógenos. Según estos autores, en una cadena polipeptídica helicoidal con uniones H, las uniones peptídicas son resistentes a la acción de enzimas proteolíticas y la ruptura de las uniones H (directamente por agentes denaturalizantes o indirectamente como resultado de la rotura de otras uniones covalentes en la hélice) torna a las uniones peptídicas susceptibles al ataque por enzimas proteolíticas. De acuerdo a esto, ambos zimógenos deben contener regiones susceptibles no dispuestas en forma helicoidal. Esta teoría no puede aplicarse en el caso de TM_A la cual se cree existe "enteramente" en la configuración de α -hélice (Kay, 1958). Más aún, aunque esta teoría puede ser aplicada a la activación del tripsinógeno y quimotripsinógeno puesto que la tripsina y quimotripsina son más plegadas que sus precursores (Rupley y col., 1955; Neurath y Dixon, 1957; Schellman y Schellman, citado por Linderström-Lang y Schellman, 1959), su aplicación no es directa en casos tales como el pepsinógeno (Linderström-Lang y Schellman, 1959) y la TM_A en los que los productos de proteólisis son menos plegados que los originales. En efecto, siendo el contenido de α -hélice de la TM_A de 100%, el fragmento podrá tener un contenido en

α -hélice igual o menor, nunca mayor. Sin embargo, la posibilidad de que la molécula de IM_A tenga un contenido de α -hélice ligeramente menor de 100 %, no puede ser excluida. En este caso y suponiendo pequeñas zonas dispuestas al azar conteniendo uniones susceptibles en una mitad de la molécula, estas uniones se romperían primero produciendo péptidos más pequeños en los cuales el α -hélice ha perdido su estabilidad, y es ulteriormente atacada (reacción lenta). La otra mitad, que es enteramente α -hélice, cambia completamente su estructura secundaria y terciaria de manera tal que oculta o enmascara en su organización, las uniones potencialmente susceptibles. Esto explicaría la diferencia en las velocidades de reacción rápida y lenta de una manera similar a la propuesta por Mihalyi y Harrington (1959) para la cinética de la digestión de la mioglobina. El estudio de la acción de la quimotripsina que parece actuar también sobre una zona de ^{la}proteína, la resistencia del fragmento a otras enzimas proteolíticas y el hecho de que una vez producida la destrucción parcial del fragmento por hidrólisis ácida la tripsina es capaz de atacar las uniones susceptibles, daría cierto soporte a tal interpretación. Sin embargo otros hechos sugieren una interpretación distinta. En efecto: los métodos usados para denaturalizar el fragmento, basados en una destrucción a las uniones hidrógeno no dieron ningún resultado. En cambio la pepsina parece ser efectiva en el ataque.

En el capítulo III se discutió como ciertas secuencias son muy resistentes a la acción de la tripsina, debido a la concentración de cargas negativas próximas al residuo susceptible. Dada la alta proporción de residuos cargados tanto en la IM_A como en "F" es razonable suponer

que sean factores de carga los que provoquen la resistencia a la digestión. La cercanía de grupos negativos podría ser consecuencia no solo de su secuencia sino también de su organización espacial. La pepsina al actuar a un pH muy bajo sería la única efectiva porque ese factor de carga no cuenta. En efecto, en primer lugar por su especificidad, la pepsina ataca preferentemente las uniones amino o carboxilo de los aminoácidos aromáticos, especialmente si vecino al amino grupo de ellos se encuentra un aminoácido ácido. En segundo lugar porque al pH en que actúa dicha enzima, todos los grupos carboxilos de la proteína se descargan. Por supuesto la posibilidad de que diversos factores de resistencia actúen independientemente y el efecto que se observe surja de la suma algebraica de los mismos es obvia. Pero el hecho de que no es la α -hélice un factor tan importante como se pensó, en la resistencia de las proteínas nativas frente a la acción de las enzimas proteolíticas, parece surgir como consecuencia de este estudio.

La aplicación de métodos modernos, permiten determinar la estructura de proteínas que contienen alrededor de 150 residuos (como es el caso de la proteína del mosaico del tabaco). Es difícil decir hasta qué punto sería posible aplicar estas técnicas a proteínas mas complejas. En una molécula de T_A que contiene 1,100 residuos aproximadamente, la dificultad de hacer un estudio de su estructura primaria es muchísimo mayor, no por el simple hecho de que hay 7 veces más residuos que ubicar, sino y especialmente porque el número de péptidos a purificar es

mayer y la posibilidad de péptidos similares (y hasta repetidos) aumenta con el consiguiente aumento en las dificultades de purificación. Sin embargo, el aislamiento y la caracterización del fragmento puede ser un punto de partida, puesto que su peso molecular se ha reducido a la mitad del de la proteína nativa y su rendimiento es de alrededor del 90 %. El próximo paso consistiría en tratar de romperlo en unidades menores por medio de enzimas proteolíticas. Desgraciadamente es necesario previamente quebrar la resistencia del fragmento trípico a la digestión. Los métodos más comunes tales como el calor, la urea, TCA, etc., no provocaron una digestión apreciable. La posibilidad del uso de pepsina en tiempos cortos merece ser tenida en cuenta.

El material difusible parece consistir principalmente de péptidos pequeños pero en la presente etapa de este trabajo no sería de gran ayuda hacer un estudio minucioso de su composición de aminoácidos ya que son demasiado pequeños y resulta muy laborioso purificarlos. No obstante, dado que el fragmento parece formarse durante los primeros 15 minutos de digestión, quizá fuera aconsejable detener la proteólisis a esta altura a fin de obtener péptidos grandes cuyo análisis sería útil efectuar.

RESUMEN

La treponemina A (TM_A) o paramiosina es una molécula extremadamente asimétrica, de forma de bastón cuya estructura predominante es de α -hélice y cuyas propiedades han sido asociadas con la tonicidad del músculo aductor de los lamelibranquios.

La TM_A aislada de Aulacomya magellanica (chelgas recogidas en Puerto Deseado, R. Argentina) cristaliza en forma de agujas muy similares a las de TM_A de Pinna nobilis. Constituye casi un 1 % en peso seco del músculo aductor del molusco, valor algo mayor al que se obtiene para Pecten maximus, pero bastante inferior al de Pinna. Su solubilidad en sulfato de amonio (precipita entre 21 y 34 % de saturación) así como su constante de sedimentación (3.13 a concentración de proteína igual a cero) coinciden con las de TM_A de Pinna y Pecten. Su espectro de absorción presenta un máximo a 276 $m\mu$ con un coeficiente de extinción $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 3.4$ (280 $m\mu$) indicativo de un muy bajo contenido en aminoácidos aromáticos. El peso molecular por el método de Archibald dió un valor de 258,000 \pm 16,000 similar al obtenido por el mismo método para la paramiosina de Venus. Se asigna sin embargo, un peso molecular máximo de 130,000; los valores anotados se atribuyen a la formación de agregados. Posee grupos básicos como C-terminales. Determinaciones de aminoácidos N-terminales por el método de fluorodinitrobenzeno dieron 0.6 moles de dinitrofenil-alanina por cada 130,000 g. de proteína. Por todo ello y por dejar un fragmento al ser digerida por tripsina, la pre-

teína aislada de Aulacomya debe ser clasificada como TM_A con propiedades similares a las de Pinna y Pecten. Sin embargo el valor de su viscosidad intrínseca (0.80) está muy por debajo del valor observado para las TM_A de Pinna y Pecten, aproximándose mucho al de la TM_B de Pecten. La variación de la velocidad de sedimentación con la concentración de proteína (0.051) es también menor que la de la TM_A de Pinna (0.095). Ambos resultados sugieren una menor asimetría e hidratación molecular.

La velocidad y extensión de la acción de la tripsina sobre la TM_A de Pinna nobilis, Pecten maximus y Aulacomya magellanica fué seguida por diferentes métodos a saber, nitrógeno total, contenido de α -amino nitrógeno y arginina en la fracción soluble en ácido tricloroacético, consumo de álcali y residuos N-terminales en la mezcla de digestión. Los resultados obtenidos permiten decir que el número de uniones rotas por la tripsina es aproximadamente la mitad del número de uniones susceptibles presentes en la molécula. Colaboran a sostener esta conclusión los estudios físicos y químicos realizados sobre el fragmento que queda después del tratamiento triptico de la proteína nativa.

La mayor parte de la arginina liberada durante la proteólisis está en la forma de arginina N-terminal e arginina libre desde que cerca de un 80 % de la arginina total liberada por la enzima está presente como dinitrofenil-arginina en la fracción soluble del digerido tratado por fluordinitrobenzene.

La cinética de la proteólisis se estudió por dos métodos diferentes y se observó claramente la existencia de por lo menos dos e posiblemente tres reacciones simultáneas que ocurrían a diferentes vele-

idades. Las constantes de velocidad sugieren que una clase de uniones peptídicas es mucho más susceptible al ataque que otras.

La extensión de la digestión de TM_A de Pecten y Aulacomya con tripsina es muy similar a la de TM_A de Pinna. Una digestión prolongada (24 horas) de TM_A de Pinna, Pecten y Aulacomya deja un fragmento de carácter proteico.

El fragmento de Pinna fué estudiado en detalle. Parece ser un producto bien definido de peso molecular de alrededor de 65,000 cuya composición de aminoácidos es muy similar a la de la proteína nativa. La técnica ^{del} fluorodinitrobenzeno reveló ácido glutámico como residuo N-terminal predominante, acompañado de vestigios de dinitrofenil-serina, dinitrofenil-glicina, dinitrofenil-alanina y dinitrofenil-fenilalanina. La carboxipeptidasa B reveló que contiene 8.6 residuos de lisina e igual número de residuos de arginina en la posición C-terminal. Determinaciones físico-químicas de viscosidad intrínseca y la dependencia de la velocidad de sedimentación con la concentración sugieren que la molécula se ha hecho menos asimétrica. Las propiedades de solubilidad y la carga neta del fragmento tripsico son similares a las de la tropemioina soluble (TM_B). Sin embargo, las dos proteínas difieren en su variación de viscosidad con la fuerza iónica y en su comportamiento frente a la tripsina.

La acción de la tripsina sobre el fragmento tratado bajo diversas condiciones ("denaturalización" por calor, urea, ácido tricloroacético, eliminación de metales, alta fuerza iónica, solventes orgánicos) no producen una digestión apreciable. Lo mismo ocurrió cuando

se trató el fragmento con enzimas tales como quimotripsina y elastasa. La pepsina en cambio, parece destruir el fragmento en péptidos con una gran tendencia a la agregación.

El material difusible al cabo de la digestión prolongada de TM_A consiste en una mezcla de péptidos pequeños y arginina y lisina libres. Estos dos aminoácidos también forman parte de los péptidos neutros, básicos y acídicos.

Se discuten los resultados sobre la base de la estructura secundaria conocida de la TM_A . La acción de la tripsina no sigue un modelo simple. Aparentemente se opera un profundo cambio en la configuración de la molécula durante los primeros 15 minutos de la digestión y la estructura terciaria y la alta concentración de cargas negativas pueden ser causas de la resistencia del nuevo fragmento a la proteólisis.

Cuando se digirió TM_A de Pinna con quimotripsina durante 24 horas, se obtuvo una considerable cantidad de material difusible y quedó un fragmento no dializable. Este fragmento tiene una composición de aminoácidos muy similar a la de la TM_A , conteniendo aún fenilalanina y tirosina. La digestión, si prosigue, es extremadamente lenta.

Se realizó un estudio comparado de la digestiones prolongadas de TM_A , TM_B y miosina:

1) la digestión con tripsina parece ser un método simple para diferenciar TM_A de TM_B porque la primera deja un fragmento proteico mientras que la segunda se digiere completamente.

2) la micina no parece incluir la molécula de TM_A como parte integrante de su estructura, como fuera sugerido por algunos autores.

Calder

Apud

BIBLIOGRAFIA

- Anderer F.A., Uhlig H., Weber E. y Schramm G. (1960). Nature 186, 922.
- Anson M.L. y Mirsky A.F. (1934). J.Gen.Physiol. 17, 399.
- Astbury A.T. y Dickinson S. (1940). Proc.Roy.Soc. B 129, 307.
- " " " , Reed K. y Spark L.C. (1948). Biochem.J. 43, 282.
- Bailey J.L., Moore S. y Stein R.H. (1956). J.Biol.Chem. 221, 143.
- Bailey K. (1937). Biochem.J. 31, 1406.
- " " (1946). Nature 157, 366.
- " " (1948). Biochem.J. 43, 271.
- " " , Gutfreund H. y Ogston A.G. (1948). Biochem.J. 43, 279.
- " " (1951). Biochem.J. 49, 23.
- " " , Bettelheim F.K., Lorand L. y Middlebrook R.K. (1951). Nature 167, 233.
- " " (1956). Pubbl.Stan.Zool.Napoli 29, 96.
- " " (1957). Biochim.Biophys.Acta 24, 612.
- " " (1958). Proteins. Proc.4th.International Congress Biochemistry VIII, pag.119. Edit.per H.Neurath y H.Tuppy. Pergamon Press.
- " " y Rüegg J.C. (1960). Biochim.Biophys.Acta 38, 239.
- Bear R.S. (1944). J.Am.Chem.Soc. 66, 2043.
- " " " y Selby C.C. (1956). J.Biophys.Biochem.Cytol. 2, 55.
- Beaven G.H. y Holiday E.R. (1952). Adv.Prot.Chem. VII, pag.319. Edit.per M.L.Anson, K.Bailey y J.T.Edsall. Academic Press Inc. New York.
- Bergmann A. (1942). Adv.Enzymol. 2, pag.49. Edit.per F.F.Nord y C.H. Worsman. Interscience Publ. Inc. New York.

- Bhattacharya K.R., Datta J. y Roy D.K.(1959). Arch.Biochem.Biophys. 84, 377.
- Blackburn S. y Lowther A.G.(1951). Biochem.J. 48, 126.
- Brand E. y Edsall J.T.(1947). Ann.Rev.Biochem. 16, 224.
- Braunitzer G., Milschmann N., Nadloff V., Hilse K., Liebold B. y Müller R.(1961). Nature 190, 480.
- Butler J.A.V., Dodds E.C., Phillips D.M.P. y Stephen J.M.L.(1948). Biochem. J. 42, 116.
- " J.A.V., Dodds E.C., Phillips D.M.P. y Stephen J.M.L.(1948). Biochem. J. 42, 122.
- Chervenka C.H. y Wilcox P.E.(1956). J.Biol.Chem. 222, 635.
- Chibnall A.C., Nees M.W. y Williams E.F.(1943). Biochem.J. 37, 354.
- " " " , Mangas J.L. y Nees M.W.(1958). Biochem.J. 68, 111.
- Christensen L.K.(1952). Compt.rend.trav.lab.Carlsberg.Sér.chim. 28, 37.
- Cohen C. y Szent-ayörgyi A.G.(1957). J.Am.Chem.Soc. 79, 248.
- Davis E.W. y Neurath H.(1955). J.Biol.Chem. 212, 515.
- Deanuelle P., Revery M. y Bonjour G.(1950). Biochim.Biophys.Acta 5, 116.
- " " (1953). The Proteins I A, pag.87. Edit.per H.Neurath y K. Hailey. Academic Press Inc., New York.
- Dixon H.D.F.(1959). Biochim.Biophys.Acta 34, 251.
- Dixon M. y Webb E.C.(1958). Enzymes pag.269. Longmans, Green & Co. London, New York, Toronto.
- Eliae H.G. Theory and Application of Ultracentrifugal Techniques. pag. 79-4. Beckman Instruments GMBH. Munich 45.
- Elliot G.F. y Northington C.R.(1959). J.Physiol. 149, 32P.

Folk J.E. y Gladner J.A.(1958). J.Biol.Chem. 231, 379.

" " " , Piez K.A., Carroll W.R. y Gladner J.A.(1960). J.Biol.Chem.
235, 2272.

Fox S.W. y Foster J.F.(1957). Introduction to Protein Chemistry pag.218.
Wiley & Sons, Inc. New York.

Fraenkel-Conrat M., Harris J.I. y Levy A.L.(1955). Methods of Biochemical
Analysis 2, pag.359. Edit.por D.Glick. Interscience Publ.Inc.
New York.

Gallop P.M., Seifter S. y Meilman E.(1957). J.Histophys.Biochem.Cytol. 3,
545.

Gerzely G.(1950). Federation Proc. 2, 176.

Geating L.J.(1956). Adv.Prot.Chem. XI, pag.429. Academic Press. New York.

Grassmann W., Mannig K., Endres H. y Niesel A.(1956). Z.Physiol.Chem.
306, 123.

Gustavson K.H.(1956). The Chemistry and Reactivity of Collagen pag.271.
Academic Press Inc. New York.

Hall C.P., Jakus M.A. y Schmitt F.O.(1945). J.Appl.Phys. 16, 459.

Hanoir G.(1951). Biochem.J. 48, 146.

" " (1951). Biochem.J. 50, 140.

Hanson J., Lowy J., Maxley H.E., Bailey K., Kay C.M. y Rugg J.C.(1957).
Nature 180, 1134.

Harris J.I. y Li C.H.(1952). J.Am.Chem.Soc. 74, 2945.

" " " " Roos P.(1956). Nature 178, 90.

" " " " Lerner A.H.(1957). Nature 179, 1346.

Haugaard F.S. y Haugaard N.(1955). Compt.rend.trav.lab.Carlsberg.hér.

- chim. 29, 350.
- Maurowitz P., Tunca M., Schwerin P. y Gökou V.(1945). J.Biol.Chem. 157, 621.
- Mira C.M.W.(1956). J.Biol.Chem. 219, 611.
- " " " " , Moore S. y Stein K.M.(1956). J.Biol.Chem. 219, 623.
- Hodge A.J.(1952). Proc.Nat.Acad.Sci.U.S. 38, 850.
- " " " " , Hightberger J.H., Deffner G.G.J. y Schmitt F.O.(1960). Proc. Nat.Acad.Sci.U.S. 46, 197.
- Mofatec B.H.J.(1960). J.Am.Chem.Soc. 82, 5166.
- Hughes W.L.(1954). The Proteins II B, pag.720. Edit.per H.Neurath y K. Bailey. Academic Press Inc. New York.
- Jacobsen C.F., Léonis J., Linderström-Lang K. y Ottosen M.(1957). Methods of Biochemical Analysis 4, pag.171. Edit.per D.Glick. Interscience Publ., New York, London.
- Jen H.H. y Tsao T.C.(1957). Acta Physiol.Sinica 21, 91.
- " " " " , Yen H.Y. y Niu C.I.(1958). Acta Biochim.Sinica 1, 167.
- Johnson R.R. y Kahn J.S.(1959). Science 130, 1190.
- Kaufman S. y Neurath H.(1949). Arch.Biochem. 21, 437.
- Kay C.H.(1958). Biochim.Biophys.Acta 27, 469.
- " " " " y Bailey K.(1959). Biochim.Biophys.Acta 31, 20.
- " " " " " " (1960). Biochim.Biophys.Acta 40, 149.
- Kamins D.H., Hough A., Symonds P. y Laki K.(1954). Arch.Biochem.Biophys. 50, 148.
- " " D.H., Sand F. y Laki K.(1957). Nature 179, 206.
- " " " " " " " " (1957). Conference on the Chemistry of

Muscular Contraction pag.66. Igaku Shoin Ltd. Tokyo

Kamins D.R., Maruyama K., Levenbook L. y Lewis M.(1962). Biochim.Biophys. Acta 63, 106.

Laki K.(1957). Arch.Biochem.Biophys. 67, 240.

" " (1957). Conference on the Chemistry of Muscular Contraction pag. 77. Igaku Shoin Ltd. Tokyo.

" " , Korvath B. y Klatze I.(1958). Biochim.Biophys.Acta 28, 656.

" " (1962). Nature 193, 269.

Levy A.L. y Chung D.(1953). Anal.Chem. 25, 396.

Li C.H., Eiselius A., Pedersen K.O., Hagdahl L. y Carstensen H.(1951). J.Biol.Chem. 190, 317.

" " " , Geschwind I.I., Cole H.D., Raneke I.D., Harris J.I. y Dixon J.S. (1955). Nature 176, 607.

Linderström-Lang K. y Jacobsen C.F.(1941). Compt.rend.trav.lab.Carlsberg Sér.chim. 24, 1.

" -Lang K. y Ottesen M.(1949). Compt.rend.trav.lab.Carlsberg 26, 403.

" -Lang K.(1950). Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 14, 117. The Biological Laboratory, Cold Spring Harbor, L.I., New York.

" -Lang K.O. y Schellman J.A.(1959). The Enzymes 1, pag.443. Edit.por P.D.Boyer, H.Lardy y K.Myrbäck. Academic Press. New York.

Lineweaver H. y Hoover S.M.(1941). J.Biol.Chem. 137, 325.

Locker R.H.(1954). Biochim.Biophys.Acta 14, 533.

" " " y Schmitt F.O.(1957). J.Biophys.Biochem.Cytol. 3, 889.

- Longworth L.G.(1952). J.An.Chem.Soc. 74, 4155.
- Macfarlane M.G.(1955). Biochem.J. 61, 308.
- Mohl J.W., Uncley J.L. y Simha R.(1940). Science 92, 132.
- Morten R., Schramm G., Grassmann W. y Mannig K.(1952). Z.Physiol.Chem. 289, 173.
- Niehl H.(1951). Monatsh.Chem. 82, 489.
- Nihalyi E.(1950). Enzymologia 14, 224.
- " " y Harrington W.F.(1959). Biochim.Biophys.Acta 36, 447.
- Milstein C.(1960). Nature 187, 387.
- " " y Sanger F.(1961). Biochem.J. 79, 456.
- Moore S. y Stein W.H.(1954). J.Biol.Chem. 211, 893.
- " " " " " " (1954). J.Biol.Chem. 211, 907.
- " " , Spackman D.H. y Stein W.J.(1950). Anal.Chem. 30, 1185.
- Naughton M.A. y Sanger F.(1961). Biochem.J. 78, 136.
- Neurath H., Cooper G.H. y Erickson J.O.(1943). J.Phys.Chem. 46, 203.
- " " y Dreyer H.J.(1955). Discussions Faraday Soc. 20, 32.
- " " " Dixon G.H.(1957). Federation Proc. 16, 791.
- " " (1957). Adv.Prot.Chem. XII, pag.319. Edit.por C.R.Anfinsen, M.L.Anon, K.Bailey y L.T.Edsall. Academic Press Inc. New York.
- Northrop J.H., Kunitz M. y Morrist R.M.(1948). Crystalline Enzymes pag. 73. 2a.edición. Columbia University Press. New York.
- Otlesen H.(1956). Arch.Biochem.Biophys. 65, 70.
- Pedersen K.O.(1940). The Ultracentrifuge por T.Svedberg y K.O.Pedersen, pag.40 y 275. Clarendon Press, Oxford.
- " K.O.(1945). Ultracentrifugal Studies on Serum and Serum Fractions

- pag.151. Almqvist & Wiksells Boktryckeri AB. Uppsala.
- Perry S.V.(1951). Biochem.J. 48, 257.
- " " " (1953). Biochem.J. 55, 114.
- " " " y Corsi A.(1958). Biochem.J. 68, 5.
- " " " (1960). Comparative Biochemistry II, pag. 245. Edit.por M. Florkin y H.S.Mason. Academic Press. New York y London.
- Petermann M.L. y Pappenheimer A.M.(1941). J.Phys.Chem. 45, 1.
- " " " (1942). J.Biol.Chem. 144, 607.
- Porter R.R. y Sanger F.(1948). Biochem.J. 42, 287.
- " " " (1950). Biochem.J. 46, 473.
- " " " (1959). Biochem.J. 72, 119.
- Redfield R.H. y Anfinsen C.B.(1956). J.Biol.Chem. 221, 385.
- Reindel F. y Hoppe K.(1954). Chem.Ber. 87, 1103.
- Riddiford L.M. y Scheraga H.A.(1962). Biochemistry 1, 95.
- Roegg J.C.(1959). Ph.D.Dissertation 231. University of Cambridge, England.
- Rupley J.A., Dreyer F.J. y Neurath H.(1955). Biochim.Biophys.Acta. 10, 162.
- Saad F.M., Kamin D.R. y Laki K.(1959). J.Biol.Chem. 234, 551.
- " " " y " " " (1961). Arch.Biochem.Biophys. 92, 541.
- Sanger F.(1945). Biochem.J. 39, 507.
- " " y Tuppy H.(1951). Biochem.J. 49, 481.
- " " (1952). Adv.Prot.Chem. VII, pag.2. Edit.por M.L.Anson, K.Bailey y J.T.Edsall. Academic Press. New York.
- " " Thompson E.O.P.(1953). Biochem.J. 53, 366.
- " " (1956). Currents in Biochemical Research 934. Edit.por D.F.Green Interscience Publ.Inc. New York.

- Seinshman H.K.(1957). Methods in Enzymology IV, pag.32. Academic Press.
New York.
- " H.K.(1959). Ultracentrifugation in Biochemistry, pag. 239.
Academic Press. New York & London.
- Schmitt F.O., Bear R.S., Hall C.E. y Jakus H.A.(1947). Ann.N.Y.Acad.Sci.
47, 799.
- Sheng P.K. y Tsao T.C.(1954). Acta Physiol.Sinica 19, 203.
- Shepherd R.G., Willson S.D., Howard K.S., Bell P.H., Davies D.S., Davies
S.R., Eigner F.A. y Shakespeare N.E.(1956). J.Am.Chem.Soc. 78,
3067.
- Svedberg T. y Pedersen K.O.(1940). The Ultracentrifuge, pages.35, 41.
Clarendon Press. Oxford.
- Szent-Györgyi A.G.(1953). Arch.Biochem.Biophys. 42, 305.
- " " " " y Cohen C.(1957). Science 126, 697.
- " " " " , Benesch R.k. y Benesch R.(1959). Sulphur in Proteins
pag.291. Academic Press. New York & London.
- Szent-Györgyi A.G., Cohen C. y Philpott D.F.(1960). J.Mol.Biol. 2, 133.
- Tan P.H. y Tsao T.C.(1957). Scientia Sinica 6, 1949.
- Tiselius A., Henschen G.k. y Svensson H.(1958). Biochem.J. 52, 1814.
- Treadwell F.P. y Hall W.T.(1921). Analytical Chemistry I, pag.110. Wiley
& Sons Inc. New York.
- Tsao T.C., Bailey K. y Adair G.S.(1951). Biochem.J. 49, 27.
- " " " , Tan P.H. y Peng C.M.(1956). Scientia Sinica 5, 91.
- Walley S.G. y Watson J.(1953). Biochem.J. 53, 328.
- Weber C.J.(1930). J.Biol.Chem. 86, 217.
- White W.F.(1954). J.Am.Chem.Soc. 76, 4194.