

Tesis de Posgrado

Hormona de crecimiento bovina : Relación entre la estructura y la función

Fontanive de Sanüesa, Angelina V.

1972

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:

Fontanive de Sanüesa, Angelina V.. (1972). Hormona de crecimiento bovina : Relación entre la estructura y la función. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1402_FontanivedeSanuesa.pdf

Cita tipo Chicago:

Fontanive de Sanüesa, Angelina V.. "Hormona de crecimiento bovina : Relación entre la estructura y la función". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1402_FontanivedeSanuesa.pdf

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA
RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA
Y LA FUNCION.

Angelina V. Fontanive de Sanüesa.

1402
ej. 2

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad.

Director: Prof. Dr. Alejandro C. Paladini.

1972

2004 04 01

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, bajo la dirección del Doctor Alejandro C. Paladini, en quien encontré un verdadero maestro. A él mi más profundo agradecimiento por haberme brindado la oportunidad de encaminarme en el campo de la investigación científica y por haber contribuído con su permanente asesoramiento, su apoyo y su crítica, a la realización de este trabajo.

Agradezco

A los Dres. J.M. Dellacha y J.A. Santomé su frecuente colaboración y su valiosa contribución en la discusión de los resultados.

A todos los miembros de la Cátedra de Química Biológica, quienes en todo momento me brindaron su apoyo y estímulo.

A los míos.

A B R E V I A T U R A S

HCB : hormona de crecimiento bovina.

HCH: hormona de crecimiento humana.

HCP : hormona de crecimiento porcina.

ES : error standard.

CM-cisteína: carboximetilcisteína.

TRIS: Tri(hidroximetil)-aminometano.

HCH-R CAM : hormona de crecimiento humana, reducida
y carbamidometilada.

HCH-RCM : hormona de crecimiento humana, reducida
y carboximetilada.

HCB-R CAM : hormona de crecimiento bovina, reducida
y carbamidometilada.

HCB-RCM : hormona de crecimiento bovina, reducida
y carboximetilada.

EDTA : etilen-diamino-tetra-acetato sódico.

Cys: cisteína.

His: histidina.

Ile: isoleucina.

Met: metionina

Ser: serina.

Val: valina.

Ala: alanina

Gly: glicina.

Leu: leucina.
Pro: prolina.
Thr: treonina.
Phe: fenilalanina.
Lys: lisina.
Arg: arginina.
Tyr: tirosina.
Trp: triptofano.
Asp: ácido aspártico.
Asn: asparragina.
Glu: ácido glutámico.
Gln: glutamina.
SDS: dodecilsulfato de sodio.

I N D I C E

I-INTRODUCCION.....	pag.	1
1- Breve revisión bibliográfica sobre la relación entre la estructura y función en distintas proteínas.....	pag.	2
2- Importancia biológica de las somatotrofinas.....	pag.	23
3- Especificidad de especie.....	pag.	26
4- Estado actual del conocimiento acerca de la relación entre la estructura y la actividad biológica de las somatotrofinas.....	pag.	29
5- Significado de este estudio.....	pag.	40
II-MATERIALES Y METODOS.		
Materiales usados.		
Hormona de crecimiento bovina.....	pag.	45
Hormona de crecimiento humana.....	pag.	45
Diálisis analítica a través de membranas tratadas con cloruro de zinc.....	pag.	46
Intercambio T/H.....	pag.	52
Determinación del coeficiente de sedimentación	pag.	55
Filtración cromatográfica a través de sephadex G-100.....	pag.	56

Análisis de aminoácidos.....pag.	56
Determinación de los aminoácidos amino- terminales.....pag.	56
Electroforesis en gel de poliacrilamida....pag.	57
Viscosimetría.....pag.	57
Medida de la actividad biológica.....pag.	57
Espectroscopía ultravioleta diferencial....pag.	59
Medidas de fluorescencia.....pag.	59
Sulfitolisis.....pag.	60
Reducción y carbamidometilación.....pag.	62
Guanidinación de los ϵ -amino grupos de li- sinas.....pag.	63
Tratamiento con anhídrido maleico.....pag.	63
Digestión trípica y mapa peptídico.....pag.	64
Ataque con bromuro de cianógeno.....pag.	65

III-PARTE EXPERIMENTAL

1-Efectos de los distintos tratamientos fisi- coquímicos sobre la conformación y activi- dad biológica de la hormona de crecimiento- bovina.....pag.	66
Liofilización.....pag.	66
Tratamientos alcalinos.....pag.	69
Altas concentraciones de urea y de clorhi- drato de guanidina.....pag.	73
Calor.....pag.	80

2-Efectos de los distintos tratamientos químicos sobre la conformación y actividad biológica de la hormona de crecimiento bovina.....pag.	89
Acetilación.....pag.	99
Guanidinación.....pag.	92
Maleinización.....pag.	95
Polialanilación.....pag.	101
Ruptura de los puentes disulfuro.....pag.	103
Transformación de las uniones S-S en grupos SH, en HCB.....pag.	105
Sulfitólisis de las uniones S-S en HCB y HCH.pag.	111
Actividad biológica de la HCH sulfitolizada.pag.	129
Reducción total de los grupos -SH en HCB y HCH.....pag.	131
Apertura gradual de los puentes S-S en la HCB y su repercusión en la conformación de la molécula.....pag.	141
3-Reducción total de los puentes S-S y su reoxidación.....pag.	143
Recuperación de las propiedades nativas de la molécula.....pag.	143
Estudio fisicoquímico comparativo de las HCB nativa y reoxidada.....pag.	158
Espectro ultravioleta diferencial.....pag.	158
Intercambio de hidrógenos.....pag.	163
Espectro de fluorescencia.....pag.	166
Determinaciones químicas.....pag.	170
IV-CONCLUSIONES.....pag.	172
V-BIBLIOGRAFIA.....pag.	178

I. INTRODUCCION

Un campo muy interesante de la bioquímica moderna es el que reúne los estudios dirigidos a explicar las propiedades físicas, químicas y biológicas de las proteínas en términos de su estructura química. Son realmente notables los avances que se han realizado en proteínas tales como la ribonucleasa, la lisozima, ciertas enzimas proteolíticas, etc, los que en algunos casos han permitido elaborar explicaciones moleculares de los mecanismos de acción.

En la presente tesis hemos intentado realizar un estudio similar a los mencionados, utilizando como modelo a la hormona de crecimiento bovina y en algunos casos a la hormona de crecimiento humana.

1- BREVE REVISION BIBLIOGRAFICA SOBRE LA RELACION
ENTRE ESTRUCTURA Y FUNCION EN DISTINTAS PROTEINAS

RIBONUCLEASA: Esta proteína fue una de las primeras que se utilizó para efectuar estudios sobre la relación estructura/función. Todas las modificaciones químicas que se realizaron tuvieron como objeto definir el centro activo de la enzima. El procedimiento adoptado consistió en someter la proteína a la acción de un reactivo específico de determinado grupo funcional. El estudio posterior de la actividad enzimática y de la transformación química producida permitió establecer las correlaciones que se detallan a continuación.

La reducción completa de la ribonucleasa, realizada por White (1960), determinó la pérdida total de la actividad enzimática y la alteración de la conformación nativa de la proteína, por lo tanto se dedujo que la reducción de los puentes disulfuros influyó en forma directa o indirecta sobre el centro activo de la misma.

Los experimentos de foto-oxidación (Weil y col, 1955), en los cuales se destruyó un residuo de histidina e inactivó la enzima, señalaron la importancia

de este aminoácido para la función biológica. También se observó inactivación luego de la reacción específica de un solo residuo de histidina con ácido bromoacético o iodo acético. Esta última reacción procede en condiciones óptimas a pH 5.5 formándose los derivados carboximetilados de la enzima.

El aislamiento y análisis de los péptidos obtenidos luego de la hidrólisis enzimática de estos dos derivados carboximetilados inactivos, demostró que ellos son: 1- carboximetil histidina-119 ribonucleasa y 3- carboximetil histidina- 12 ribonucleasa (Crestfield y col., 1963).

La acción directa del halogenato sobre el centro activo se dedujo sobre la base de las siguientes evidencias:

- a) El pH óptimo de la reacción fue de 5-6 (a 35°C) coincidente con el pH óptimo de la unión enzima-sustrato (Hammes y col., 1965)
- b) La reacción estuvo enormemente activada en comparación con la reactividad usual de las histidinas (Heinrikson, 1965).

- c) La carboximetilación de las histidinas 119 ó 12, en el rango de pH de 3.7 a 7.0 generó total inactivación.
- d) La especificidad se eliminó al destruir la conformación nativa de la proteína (Stark y col., 1961)
- e) El ácido 3'-citidílico, los iones cúpricos y los aniones divalentes, como sulfato o fosfato, inhibieron totalmente la reacción (Ross y col., 1962)
- f) No se observaron variaciones apreciables en las propiedades físicas o antigénicas de la proteína (Brown, 1963)

El bromo acetato sódico reaccionó con la ribonucleasa en estado cristalino formando los mismos productos que en solución, es decir 1-carboximetil histidina-119 ribonucleasa y 3-carboximetil histidina - 12 ribonucleasa, en relación 60:1, mientras que en solución la proporción es de 15:1. Esta diferencia señaló la presencia preferencial en el cristal de aquella con-

formación proteica en la cual se realiza la reacción sobre histidina 119.

Hirs y col.(1965) demostraron la presencia de lisina 41 en el centro activo de ribonucleasa. Estos autores obtuvieron un derivado mono-dinitrofenilado inactivo tratando la enzima con fluor-dinitro-benceno. Por hidrólisis enzimática de los péptidos obtenidos se pudo identificar al ϵ -amino grupo de la lisina 41 como el portador del grupo dinitrofenilo. Las mismas sustancias anteriormente señaladas como inhibidores de la reacción con el halogenato también impidieron en este caso el bloqueo de la lisina 41. El derivado l-carboximetil histidina 119- ribonucleasa mostró, igual que la enzima nativa, reactividad de lisina 41 hacia el fluor-dinitro benceno (Murdock y col., 1966).

Las propiedades ópticas, antigénicas y los estudios cristalográficos del derivado dinitrofenil-lisina-41 ribonucleasa indicaron que la conformación se había modificado muy poco en relación a la conformación nativa. Este pequeño cambio y la menor basicidad de la lisina 41 pudieron originar el decrecimiento en la capacidad de unión de la enzima al sustrato (Ettinger y col., 1968).

Fruchter y col. (1965,1967) prepararon dímeros de ribonucleasa conteniendo dos centros activos cada uno, formados por la histidina 12 de una de las moléculas y la histidina 119 de la otra. Los compuestos obtenidos presentaron la reactividad usual hacia iodo acetato sódico. Estos hechos descartaron la posible existencia de determinantes rígidos en la estructura del centro activo de los monómeros.

La digestión de la ribonucleasa con pepsina permitió la separación del tetrapéptido Asp-Ala-Ser-Val correspondiente al extremo C-terminal, lo que determinó la pérdida de su actividad enzimática. Esto demostró la participación de alguno de los grupos funcionales involucrados, probablemente del ácido aspartico 121, en la catálisis enzimática, o alternativamente esta porción de la molécula debió ser importante para mantener la conformación del centro activo (Potts y col.,1964).

Estos estudios, juntamente con los hallazgos de protección por parte de polianiones (Crestfield y col. 1963), sugirieron la existencia de un grupo de residuos básicos formando la topografía del centro activo.

Las conclusiones alcanzadas en base a los estudios arriba mencionados se confirmaron por cristalografía

fía de Rayos X, donde se vió que la histidina 119, la histidina 12 y la lisina 41 están ubicadas en el sitio de unión del ácido 5-Iodo-uridílico a la ribonucleasa-S (Wyckoff, 1967).

INSULINA: Sobre esta hormona se realizaron numerosos estudios de la relación entre la estructura y la función, los más importantes de los cuales se describen a continuación.

En 1959 Lee y col. informaron la destrucción de la actividad biológica por iodación de las tirosinas. La ruptura de los puentes disulfuro por reducción u oxidación también inactivó la hormona.

Cuando se dinitrofenilaron menos de 2 amino--grupos de lisinas no hubo pérdida de actividad, pero el bloqueo de 3 grupos amino produjo su caída a cero (Mills, 1953.).

La acción de la carboxipeptidasa eliminó la alanina del extremo C-terminal de la cadena B sin pérdida de actividad, mientras que la separación de la asparagina, perteneciente al extremo C-terminal de la cadena A determinó la pérdida de la misma (Nicol, 1960).

La acción de la leucino- amino peptidasa separó los primeros 6 aminoácidos del extremo N-terminal de la cadena B sin pérdida de actividad (Harris, 1952).

Markus (1964) y Givol (1965) sugirieron la posibilidad de obtener mayor eficiencia en la síntesis de la insulina si ésta se realizara a partir de un precursor de cadena simple, en cuyo caso la estructura primaria del mismo orientaría a las diferentes partes para que se asocien formando los puentes disulfuros correctos.

Las primeras evidencias sobre la veracidad de esta vía de síntesis fueron obtenidas por Steiner y col. (1967) trabajando con microcantidades de material marcado. De esta forma consiguieron aislar un material de peso molecular 10.000 que por hidrólisis tróptica suave adquirió las características de elución de la insulina. De ésta y otras evidencias químicas se dedujo la existencia del precursor biosintético, el cual se convierte en insulina mediante una proteólisis limitada.

Chance y col. (1968) aislaron proinsulina porcina en cantidades preparativas y sobre ella estu-

diaron la secuencia de aminoácidos. La proinsulina purificada tuvo una actividad específica equivalente a 6IU/mg de insulina, medida por ensayos radio-inmunológicos. Luego de una digestión limitada con tripsina la actividad de la proinsulina ascendió a 12 IU/mg. Mediante una proteólisis de 50 minutos se obtuvo: des-alanil-insulina cuya actividad fue de 26IU/mg y su composición en aminoácidos fue la esperada, un dipeptido de composición alanina-arginina, arginina libre y un polipeptido de 31 aminoácidos.

La ubicación del péptido de unión de 33 aminoácidos que se separó de la molécula de proinsulina por digestión trípica se observa en la Figura 1.

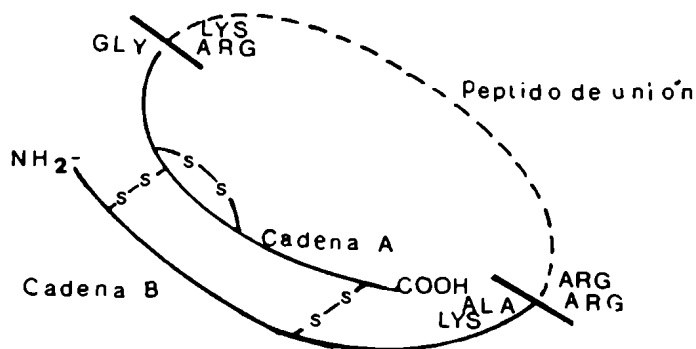


Fig.1: Estructura covalente de proinsulina porcina propuesta por Chance y col. (1968).

Steiner y col. (1968) estudiaron la reoxidación espontánea al aire de las proinsulinas de rata y bovina totalmente reducidas. En cada caso se recuperó la conformación nativa. Este hecho se comorobó por medidas de actividad inmunológica.

ADRENCORTICOTROFINA Y MELANOTROFINA: La adrenocortico

trofina (ACTH) es la hormona que controla el crecimiento y la función de la corteza adrenal. Se trata de un polipeptido de 39 aminoácidos dispuestos en cadena lineal cuyo peso molecular es aproximadamente 4.500. Posee 3 residuos de prolina en las posiciones 12, 19 y 24 que limitan la posibilidad de formar α -hélices en esa región.

Actualmente se conoce la estructura primaria de las corticotrofinas bovina, ovina, porcina y humana; ellas difieren entre sí en los aminoácidos que ocupan las posiciones 25 a 33.

Unicamente se requiere la porción de cadena polipeptídica que incluye los aminoácidos 1 a 24 para lograr la totalidad de la actividad biológica (Cuadro I).

CUADRO I

COMPARACION DE ESTRUCTURAS DE ADRENOCORTICOTROFINAS DE 4 DIFERENTES ESPECIES

ACTH	H- Ser- Tyr- Ser- Met- Glu- His- Phe- Arg- Trp- Gly- Lys- Pro- Val- Gly-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
	Lys- Lys- Arg- Arg- Pro- Val- Lys- Val- Tyr- Pro- (---) Ala- Phe- Pro-Leu-	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
	Glu- Phe -OH	38	39-																	
PORCINA																				
OVINA																				
BOVINA																				
HUMANA																				

NH₂

Asp-Gly-Ala-Glu-Asp-Glu-Leu-Ala-Glu-NH₂
 Ala-Gly-Glu-Asp-Asp-Glu-Ala-Ser-Glu-NH₂
 Asp-Gly-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-Ala-Glu-NH₂
 Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-Glu-Ser-Ala-Glu-

Además de la actividad corticotrófica, a la cual hace referencia su nombre, esta hormona tiene efectos extra adrenales.

Uno de los más caracterizados es su habilidad para provocar la dispersión de melanina en anfibios y reptiles, propiedad que comparte con la melanotrofina (MSH).

El conocimiento de la secuencia de aminoácidos en la molécula de MSH (α -MSH y β -MSH) permitió comprender la razón de esta propiedad en común (Cuadro II).

CUADRO II

RELACION ENTRE LAS ESTRUCTURAS DE LAS α Y β MELANOTROFINAS Y LA ESTRUCTURA PARCIAL DE LA ADRENOCORTICOTROFINA (DIXON Y COL, 1961).

ADRENOCORTICOTROFINA Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 (porcina, ovina, bovina) Lys- Arg-Arg-Pro-
 16 17 18 19

α -MELANOTROFINA

(porcina, ovina, bovina) CH3CO-Ser- Tyr- Ser- Met- Glu- His- Phe- Arg-Trp-Gly-Lys-Pro-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 Val-NH2-
 13

β -MELANOTROFINA
 (Porcina)

Asp-Glu-Gly-Pro-Tyr-Lys-Met-Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly-Ser-Pro-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
 Pro- Lys-Asp-
 16 17 18

El heptapéptido de secuencia: Met-Glu- His- Phe- Arg - Trp - Gly se encontró en la ACTH y en todas las - MSH estudiadas.

Estructuralmente α -MSH difiere del ACTH en que el grupo amino del residuo de serina N-terminal está acetilado y en que el grupo carboxilo terminal del residuo de valina está como amida.

En el caso de β -MSH hay además intercambio de Ser y Lys en dos posiciones.

Esta parcial pero incompleta superposición en las 3 hormonas se reflejó en las diferencias de actividad melanotrófica, (Li y col. (1962)), medidas por ensayos in vitro sobre piel de sapo. A saber: α -MSH poseía $1 \cdot 10^{10}$ unidades por g. , a β -MSH le correspondía 1 a $3 \cdot 10^9$ unidades por g. mientras que el ACTH tenía $3 \cdot 10^7$ unidades por g.

Cuando se N-acetiló la serina N-terminal de la molécula de ACTH su actividad melanotrófica se incrementó considerablemente (Hofman, 1960).

El reemplazo de metionina por ácido amino butírico en la molécula de MSH (Hofman, 1963) determinó

la disminución de su actividad. Sin embargo ésta no se destruyó completamente por lo cual se dedujo que la metionina no es absolutamente esencial para la función biológica.

El calentamiento de extractos pituitarios en solución de hidróxido de sodio produjo un cambio muy marcado en la propiedad melanotrófica de dichos extractos. El estudio de este efecto con las hormonas aisladas y purificadas permitió conocer los siguientes hechos:

- 1) El calentamiento de la ACTH en solución de hidróxido de sodio determinó la potenciación y prolongación de su actividad melanotrófica (Li y col. 1957) mientras que se destruyó su actividad esteroideogénica.
- 2) El mismo tratamiento sobre α y β -MSH determinó la prolongación del efecto melanotrófico pero no su potenciación.

Pickering y Li (1964) no encontraron ningún cambio estructural en la molécula del ACTH luego del tratamiento alcalino que les permitiera justificar el cambio observado.

No obstante se conocen fenómenos de racemización, que tienen lugar en medio alcalino caliente, los que en este caso podrían ser responsables del efecto de prolongación; no así de la potenciación observada en el caso del ACTH.

TRIPSINA Y QUIMOTRIPSINA: La estructura de estas 2

proteínas pancreáticas se conoce totalmente.

Cuando se hizo reaccionar la quimotripsina con di-isopropil-fluorofosfato o con p-nitrofenil acetato, se bloqueó un solo residuo de serina, ubicada en la posición 195, y la enzima quedó inhibida. Este residuo de serina pertenece al péptido de secuencia Gly-Asp-Ser-Gly común a muchas enzimas proteolíticas. Por lo tanto se pensó que este residuo se encontraba en el sitio activo y directamente involucrado en la función catalítica. Esto último, avalado por los experimentos de Cunningham (1965) quién demostró la formación de intermediarios acil-enzima lábiles.

Mediante el uso de un reactivo alquilante específico para el sitio activo de quimotripsina, Lawson y col. (1965) establecieron la presencia de la metionina 192 y la histidina 57 cerca del mismo. La oxidación de esta metionina con peróxido de hidrógeno no

destruyó totalmente la actividad esterásica (Kezdy y col, 1967). Esto implica que este residuo no está involucrado directamente en la función catalítica de la enzima. En cambio, la alquilación de la histidina 57 determinó la inactivación de la misma, este hecho juntamente con otros estudios cinéticos (Bender y col. 1964) señalaron la participación directa de este residuo en el sitio activo.

Blow y col. (1963) propusieron recientemente la intervención del ácido aspártico 102 en la protonización y desprotonización de la histidina 57.

Experimentos de iodación y de diazotación demostraron que la tirosina 146, amino ácido C-terminal de la cadena B de quimotripsina, era el más reactivo y por lo tanto el más expuesto de los 4 residuos de tirosina presentes. (Waxdal y col, 1966).

Experimentos de titulación, acetilación y trabajos cinéticos indicaron que el amino ácido N-terminal isoleucina de la cadena B está cerca del sitio activo (Gauno y col, 1967).

Las conclusiones alcanzadas en los experimentos anteriores por métodos químicos se confirmaron

por análisis cristalográficos con rayos X (Sigler y col, 1968).

Otros estudios de oxidación con N - Bromosuccinimida (Spande y col, 1966) o con peróxido de hidrógeno alcalino en dioxano (Hachimori y col. 1965) señalaron la importancia de los residuos de triptofano en la actividad.

Un grupo de 19 aminoácidos, que incluyen muchos residuos hidrofóbicos y un triptofano, son comunes, con algunas sustituciones menores, a tripsina y a proteasas bacterianas (Smillie y col, 1967). 4 de los 8 triptofanos presentes en la quimotripsina, ubicados en las posiciones 51, 141, 215 y 237 se hallan ubicados en secuencias homólogas en la molécula de tripsina (Walsh y col. 1964)

Estas observaciones sugirieron la importancia de los triptofanos en estas dos enzimas ya sea en la formación de la unión enzima-sustrato (Bender y col 1964) o en la estabilización de una estructura terciaria adecuada (Walsh y col, 1964).

Sin embargo, estudios realizados por cristalografía con rayos X sobre quimotripsina señalaron que no había ningún residuo de triptofano dentro de un rango menor de 10 Å a partir de la serina 195 o la metionina 192. Además se observó que el grupo de 19 aminoácidos, de carácter hidrofóbicos, estaba lejos del sitio activo.

Estos hechos nos alertan sobre los errores que se pueden cometer elaborando conclusiones únicamente sobre la base de resultados obtenidos a partir de modificaciones químicas de las proteínas.

LISOZIMA: Uno o más de los 6 residuos de triptofano que tiene la molécula de lisozima de clara de huevo interviene en su actividad lítica (Hachimori y col, 1964).

Estudios espectrofotométricos de lisozima nativa o de lisozima oxidada con N- bromosuccinimida y complejada con derivados de quitina demostraron la existencia de un triptofano formando parte del sitio de unión del sustrato a la enzima (Hayashi y col, 1963).

Este residuo esta ubicado en la posición

N° 62 perteneciente a la secuencia poco usual Trp 62-Trp63 (Hayashi y col, 1965). Cuando se oxidó la enzima con N- bromosuccinimida, este residuo se transformó en oxindol-alanina y se observó la pérdida de la actividad, mientras que no hubo cambios apreciables en las medidas de dispersión rotatoria óptica (Takahashi y col, 1965).

La iodación a pH 5.5 oxidó selectivamente el triptofano en la posición N° 108 y produjo también la inactivación casi completa de la enzima (Hartdegen y col, 1967).

Sin embargo, Proviero y col (1967a) informaron la conversión de triptofano 108 y del triptofano 111 en N- formilquinurenina sin reducción de la actividad.

Una alternativa posible es que el residuo de N-formil-quinurenil y no el oxindolalanil pueda sustituir al triptofano sin alterar el sitio de unión del sustrato ni las propiedades catalíticas (Witkop, 1968).

Los reactivos alquilantes bifuncionales reaccionaron con los siguientes pares de ϵ -amino grupos de lisinas: 33 y 116, 96 y 97, los cuales seguramente deben hallarse entre sí a una distancia menor que 7 Å .

Un tratamiento a pH 7-9 con iodo acetato determinó la carboximetilación de una histidina y 3 residuos de lisina, observándose un incremento en la actividad lítica de la enzima (Kravdenko y col, 1964).

La fotólisis de la lisozima en ausencia de oxígeno (Ferrini, 1964) produjo inactivación con una velocidad igual a la velocidad de modificación de la histidina.

Un procedimiento de fotooxidación más selectivo (Ferrini y col, 1968) convirtió las metioninas 12 y 105 en sulfóxidos con pérdida del 95% de la actividad. En este caso se produjo un cambio conformacional apreciable en la molécula.

Experimentos de iodación (Wolff y col, 1966) indicaron que solo 2 de las 3 tirosinas existentes eran reactivas.

Con la publicación de las estructuras detalladas de lisozima (Blake y col, 1967 a) y de los complejos lisozima-inhibidor (Johnson y col, 1965) basados en experimentos de difracción con Rayos X, se confirmaron algunas de las conclusiones obtenidas por mé-

todos químicos, mientras que otras quedaron inciertas.

En base a esas medidas se propuso, como hipótesis de trabajo, la participación de los grupos carboxilatos del ácido aspártico 52 y del ácido glutámico 35 en la función catalítica (Vernon, 1967).

Se confirmó la presencia de 3 residuos de triptofano en el sitio de unión del sustrato a la enzima, correspondientes a las posiciones 62, 63 y 108, mientras que la histidina, el triptofano 111 y las 2 metioninas aparecen alejadas de ambos sitios, el de unión y el catalítico.

Tirosina 20 y 23 están relativamente expuestas mientras que tirosina 53 está oculta.

Las conclusiones obtenidas de las experiencias con reactivos bifuncionales fueron difíciles de interpretar en base a este modelo, ya que pares de lisinas que reaccionaron con la misma molécula de reactivo se encontraban a una distancia superior a los 7 Å. Este hecho se explica admitiendo que reactivos eléctricamente cargados puedan producir cambios conformacionales importantes.

2-IMPORTANCIA BIOLÓGICA DE LAS SOMATOTROFINAS:

La existencia de una hormona hipofisaria responsable del crecimiento se conoce desde hace mucho tiempo - Cushing (1912); Evans and Long, (1921); Smith (1930).

Esta hormona tiene un marcado efecto sobre el -- crecimiento visceral y esquelético aunque no se concen-- con precisión todos los cambios metabólicos que acompañan su acción. Sin embargo, la propiedad de estimular la retención de nitrógeno y la movilización de lípidos quedaron perfectamente comprobados.

Korner (1968) demostró que esta hormona estimula la biosíntesis de proteínas regulando la velocidad de -- formación de ácido ribonucleico, incluyendo el ácido ribonucleico mensajero.

Recién en 1945, Li, Evans y Simpson aislaron con alto grado de pureza la hormona de crecimiento bovina y - la caracterizaron como una proteína.

A partir de 1948 se consiguió aislar y purifi-- car homonas de crecimiento de muchas otras especies --

animales, de tal forma que ahora se conoce la naturaleza no solo de la hormona bovina, sino también de las hormonas ovina, porcina, equina, de ballena, de rata, de conejo, de mono y humana. Consideradas en conjunto, estas proteínas presentan analogías y diferencias en sus propiedades químicas y fisicoquímicas, a saber:

- a) Todas las hormonas de crecimiento estudiadas son proteínas de peso molecular cercano a 20.000. Los preparados hormonales para los que se registraron valores mayores (del orden de 40.000) estuvieron probablemente formados por agregados moleculares.
- b) Todas las hormonas tienen composición en aminoácidos muy similar.
- c) Las estructuras primarias de las hormonas humana y bovina, únicas estudiadas en detalle hasta ahora, indican una gran analogía entre ambas moléculas, aunque hay extensos cambios en la secuencia de aminoácidos en determinadas zonas. Los puentes disulfuro ocupan regiones homólogas en ambas.

- d) En todas las hormonas se obtuvo 1 mol de fenilalanina como aminoácido C-terminal por 22.000g. de peso.
- e) Las hormonas estudiadas difieren unas de otras en el punto isoeléctrico, siendo la humana y la de mono las más acídicas.

3- ESPECIFICIDAD DE ESPECIE

Las hormonas de crecimiento presentan especificidad de especie en grado variable. Beck y col (1957) demostraron que los primates responden solamente a la administración de hormonas de primates.

La rata se hace refractaria a la inyección continua de hormonas de primates pero no a la administración de hormona bovina o de cetáceos (Li y col 1959).

Li y col. (1959) demostraron que se puede observar reactividad inmunológica cruzada en el caso de hormonas bovina y ovina entre sí y entre las hormonas humana y de mono, pero este hecho no se presentó entre hormonas de rumiantes y de primates. Dentro de cada grupo se pudo diferenciar la hormona bovina de la ovina y la hormona humana de la de mono por análisis inmunoquímicos cuantitativos.

La hormona de crecimiento del cerdo doméstico y de la ballena gibosa no se pudo incluir en ninguno de los 2 grupos mencionados a nivel químico ni inmunológico.

Otros hechos interesantes que merecen ser destacados en relación con la especificidad de especie son los siguientes:

- 1) Aunque las hormonas de crecimiento de mamíferos son activas en el pez *Fundulus Heteroclitus*, tanto la hormona de merluza o de abadejo como el extracto pituitario de salmón, bacalao o sábalo no son efectivos en ratas. (Wilhelmi, 1955)
- 2) Los extractos pituitarios de anfibios, réptiles y aves son capaces de promover el crecimiento de ratas. Hirsch (1961) encontró que la hormona de aves es la única que produce efectos medibles en pollos.
- 3) Por último, la inhabilidad del cobayo para responder a hormonas purificadas y extractos pituitarios de varias fuentes, incluyendo la suya propia, no se explica hasta el momento. Además se comprobó que este animal continúa su crecimiento luego de la hipofisectomía. (Clayton y col., 1960)

En conclusión se puede decir que la estructura del o de los centros activos, si admitimos la nomenclatura válida en el campo enzimológico, puede ser en una hormona muy diferente a la de otra, aunque la arquitectura molecular general se respete. Sin embargo, una alternativa posible es que los "centros" sean iguales o muy semejantes en todas ellas y la conformación molecular sea diferente, la cual los hace accesibles o no (activos o no). Y desde luego, la verdad puede ser intermedia entre ambas hipótesis.

Las hormonas cuyo comportamiento es diferente en cuanto a su actividad biológica son también inmunológicamente distinguibles. La rata se hace insensible a la hormona de crecimiento humana y de mono, desarrollando anticuerpos contra ellas a los pocos días de la inyección (Li y col. 1959).

De ello se concluyó que las zonas responsables de la especificidad inmunológica son diferentes de las zonas que constituyen el centro activo. Por esta razón se impuso un estudio químico comparativo de las hormonas de crecimiento, y en tal sentido varios laboratorios se han abocado al mismo.

4- ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO ACERCA DE LA RELACION ENTRE LA ESTRUCTURA Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SOMATOTROFINAS.

Ellis y col. (1966) estudiaron el comportamiento en la ultracentrífuga de preparaciones altamente purificadas de hormona bovina, porcina y humana.

Se observó que las tres hormonas tenían un peso molecular de aproximadamente 20.000 a 22.000 en un medio con 5.6 M de clorhidrato de guanidina. En la hormona humana este valor estaba de acuerdo con el encontrado por Li y Starman (1964).

El valor del peso molecular de la hormona bovina coincidió con el obtenido en este laboratorio (Dellach^a y col, 1966).

Reisfeld y col. (1964) estudiaron el peso molecular de la hormona de rata y encontraron un valor cercano a 24.000.

Todas las hormonas de crecimiento estudiadas tuvieron el mismo peso molecular. La generalización de este hecho requiere ampliar las medidas a

hormonas altamente purificadas provenientes de otras especies. Mientras tanto fue interesante comparar la composición en aminoácidos de las ya conocidas. Paladini y col, (1970) reunieron datos propios y de otros laboratorios (Fig. 2) para comparar la composición en aminoácidos de las hormonas.

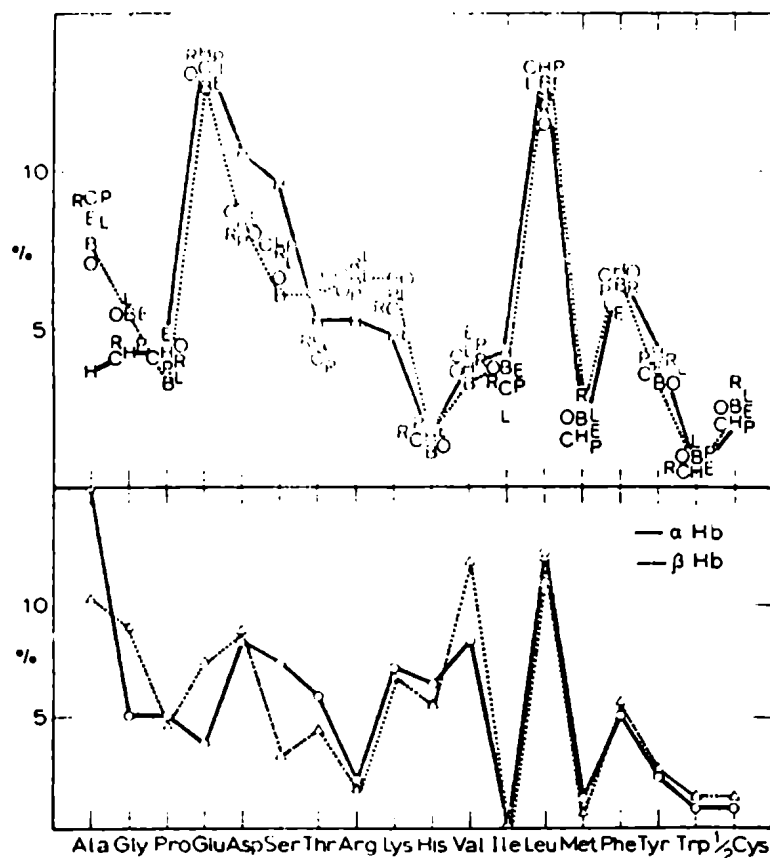


Fig. 2: Comparación de la composición en aminoácidos de las hormonas de crecimiento de 8 mamíferos y de las cadenas α y β de hemoglobina humana.

Humana (H), porcina (P), bovina (B), ovina (O) equina (E), de conejo (L), de rata (R) y de perro (C). En ordenadas se representan los valores de los aminoácidos individuales como porcentajes del número total de residuos en la molécula, mientras que en abscisas se tiene la secuencia de los aminoácidos comenzando con los más hidrofílicos para terminar con aquellos que poseen propiedades más hidrofóbicas.

Se observó que la analogía en la composición de aminoácidos de las hormonas era mayor que la que se encuentra entre las moléculas de 2 proteínas homólogas tales como α y β hemoglobinas.

Todas las hormonas presentaron notables diferencias en sus puntos isoeléctricos. Wilhelmi y Mills (1969) condensaron en un gráfico los valores obtenidos con diversas hormonas (Fig.3). En este gráfico la movilidad (R_f) fue calculada en relación al frente de buffer, luego de realizar la electroforesis a pH 9.5.

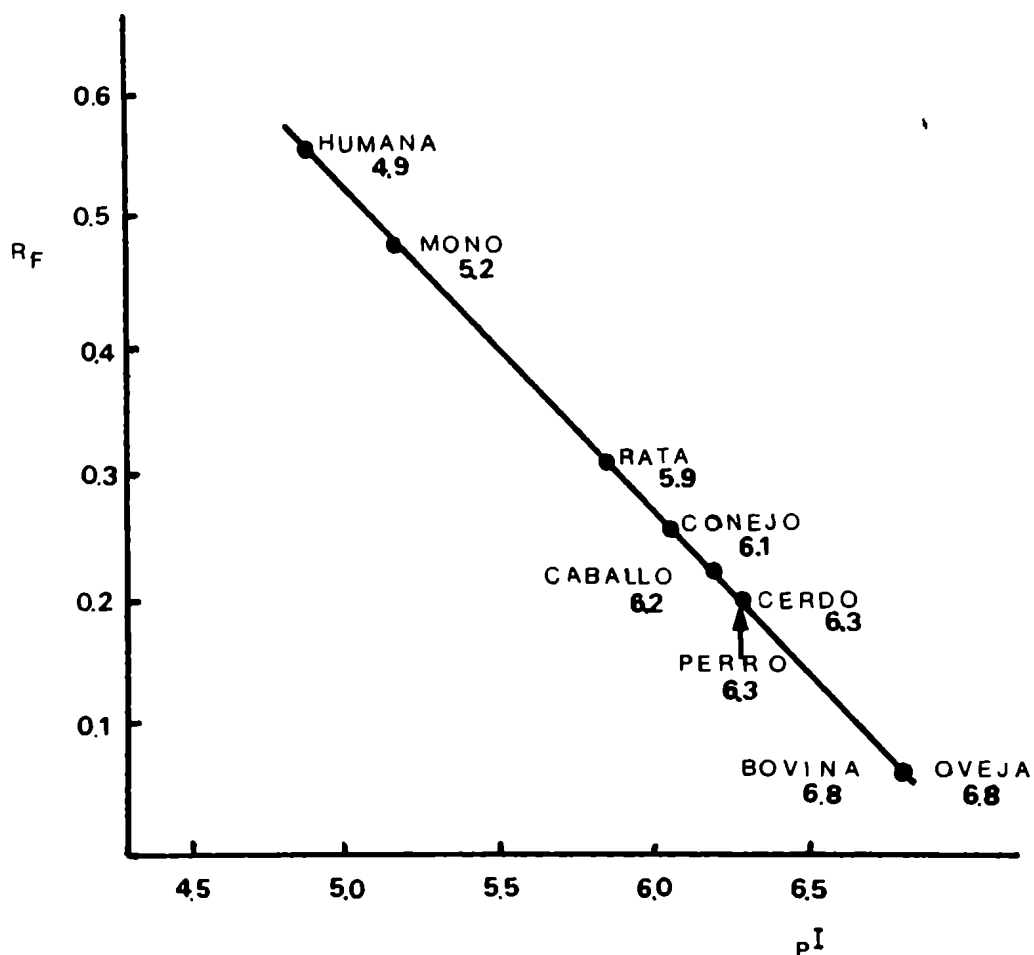


Fig.3: Relación entre la movilidad y el punto isoeléctrico en gel de poliacrilamida de hormonas de crecimiento provenientes de diversas especies.

A medida que se progresó en el estudio de la secuencia de aminoácidos de diversas hormonas se hizo evidente la homología en varias zonas. Una de ellas correspondió al extremo C-terminal como se observa en el siguiente cuadro (Paladini y col, 1970)

CUADRO III

SECUENCIA DE AMINOACIDOS DEL EXTREMO C-TERMINAL EN

VARIAS HORMONAS DE CRECIMIENTO

HUMANA:	Arg-Ile-Val-Gln-Cys-Arg-	Ser-Val-Glu-Gly-Ser-Cys-Gly-Phe-COOH
BOVINA:	Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe-COOH	
OVINA:	Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe-COOH	
PORCINA:	Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Val-Glu-Ser-Ser-Cys-Ala-Phe-COOH	
EQUINA:	Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-Phe-Val-Glu-Ser-Ser-Cys-Ala-Phe-COOH	

A partir de los trabajos de Li y col (1966) se conoció la secuencia completa de aminoácidos de la hormona de crecimiento humana. En nuestro laboratorio se estudió la hormona bovina, de la que se conoce la estructura primaria completa (Santomé y col 1971)(fig.4)

La hidrólisis parcial de la hormona humana (hasta un 40 %) con quimotripsina o pepsina no reduce la actividad (Li, 1964). La hormona de crecimiento bovina no se comporta en la misma forma como lo demostraron Sonenberg y col (1969).

Li y col (1948 a) observaron que, al iodar la hormona bovina, de tal forma que únicamente reaccionaron 2 de las 11 tirosinas presentes (cálculo hecho sobre un peso molecular de 45.000) la actividad se magnificó.

Cuando se aumentó el número de tirosinas iodadas, efectuando la reacción en presencia de urea, la actividad se destruyó.

Reid (1951) estudió la acetilación de la hormona bovina. Este autor demostró que se puede acetilar el α -amino grupo terminal y algunos ϵ -amino grupos de

1 H-Ala-Phe-Pro-Ala-Met-Ser-Leu-Ser-Gly-Leu-Phe-Ala-Asn-Ala-Val-Leu-Arg-Ala-Gln-His-
 10 20
 Leu-Gln-Ala(Thr,Asp)Ala-Leu-His-Phe-Lys-Glu-Phe-Glu-Arg-Thr-Tyr-Ile-Glu-Pro-Gly-
 30 40
 Gln-Arg-Tyr-Ser-Ile-Gln-Asp-Thr-Gln-Val-Ala-Phe-Cys-Phe-Ser-Glu-Thr-Ile-Pro-Ala-
 50 60
 Pro-Thr-Gly-Lys-Asn-Glu-Ala-Gln-Glu-Lys-Ser-Asp-Leu-Glu-Leu-Arg-Ile-Ser-Leu-
 70 80
 Leu-Leu-Ile-Ser-Glu-Trp-Leu(Glx,Pro)Gly-Phe-Leu-Arg-Val-Phe-Thr-Asn-Ser-Leu-Val-
 90 100
 Phe-Gly-Thr-Ser-Asp-Arg-Val-Tyr-Glu-Lys-Asn-Glu-Lys-Lys-Leu-Glu-Glu-Gly-Ile-Leu-
 110 120
 Met-Arg-Glu-Leu-Glu-Asp-Gly-Thr-Pro-Arg-Ala-Gly-Gln-Ile-Leu-Lys-Gln-Thr-Tyr-Asp-
 130 140
 Lys-Phe-Asp-Thr-Asn-Met-Arg-ser-Asn-Asp-Ala-Leu-Leu-Lys-Asn-Tyr-Gly-Leu-Leu-Ser-
 150 160
 Cys-Phe-Arg-Lys-Asn-Leu-His-Thr-Lys-Glu-Thr-Tyr-Leu-Arg-Val-Met-Lys-Cys-Arg-Arg-
 170 180
 Phe-Gly-Glu-Ala-Ser-Cys-Ala-Phe-OH
 188

Fig.4: Secuencia de aminoácidos de la hormona de crecimiento bovina. Los números indican la posición de los residuos de aminoácidos desde el extremo N-terminal.

lisinas, con muy poca pérdida de actividad,-- mientras que, Li y col. (1948b) encontraron una caída total de la misma por acetilación de todos los ϵ -amino grupos de lisinas.

La guanidinación de la hormona a pH 11,2 y a 0° C con O-metil-isourea transforma las lisinas en homoargininas (Geschwind y col, 1957). El ensayo de los productos de reacción indica que no hay pérdida de actividad. En base a estos resultados y los de acetilación parece ser que la basicidad de las lisinas es esencial para mantener la conformación activa.

En una patente Británica (Organon, 1962) se indica un procedimiento de reducción parcial de los puentes disulfuro de la hormona bovina con sulfito sódico que permite obtener un producto activo en humanos. Si bien este resultado no pudo ser confirmado por Mills y Wilhelmi (1968), estos mismos autores observaron que la hormona sulfitolizada mantiene el 100% de actividad en ratas.

También las hormonas porcina y humana se sometieron al mismo tratamiento (Mills y col, 1968). En el caso de la hormona porcina y bovina se demostró que la reducción es selectiva sobre el puente disulfuro cercano al-----

extremo C-terminal de la molécula. Mientras que las hormonas bovina y porcina sulfitolizadas conservan toda su actividad inicial, la hormona humana retiene solo un 25% de la misma.

En base a estos hechos fue sorprendente el resultado obtenido por Dixon y col, (1966), quienes redujeron completamente la hormona humana y carbanidometilaron los sulfidrilo^s libres sin perder la actividad biológica.

Wilhelmi y col. (1969) redujeron totalmente y carbanidometilaron las hormonas bovina y porcina observando inactivación total.

Debido a que se necesitan grandes cantidades de hormona para el tratamiento de los desórdenes humanos que provoca su carencia y dado que las hormonas de origen animal no son activas en humanos, se trató durante mucho tiempo de hallar algún fragmento de la hormona bovina que fuera activo en el hombre. En este campo numerosos intentos resultaron infructuosos.

Recientemente, Sonenberg y col. (1968) logra--

ron aislar un componente de un digerido triptico de hormona de crecimiento bovina que es activo en ratas y también en humanos. Estos autores observaron que a medida que progresa la proteólisis de la hormona con tripsina disminuye su actividad promotora del crecimiento en ratas hipofiso privas (Sonenberg y col. 1965). Cuando la digestión se realiza por el término de 10 minutos, de forma tal que se hidrolizan 2,5 uniones promedio por molécula, es posible aislar un componente, homogéneo en la ultracentrífuga, que presenta las propiedades metabólicas de la hormona de crecimiento humana (Sonenberg y col, 1965) . Administrando este componente a pacientes hipofisoprivos se pudo detectar anticuerpos que reaccionaron inmunológicamente con la hormona humana (Glick, 1966) mientras que no hubo reacción inmunológica cruzada entre las hormonas bovina y humana nativas.

Estos efectos biológicos sumados a la aparición de componentes electroforéticos con movilidades similares a las observadas en preparaciones de hormona humana, sugirieron una similitud estructural entre ésta y el componente aislado del digerido triptico

de 10 minutos, obtenido a partir de la hormona bovina (Sonenberg y col.1968).

Yamasaki y col (1970) analizaron la pureza de este componente empleando columnas de Sephadex G-75 eluidas con ácido acético al 50%.En estas condiciones lograron aislar 2 fracciones de peso molecular 16.000 y 5.000. El análisis químico de las mismas puso en evidencia: a) los 2 puentes disulfuro de la hormona se encuentran en la fracción de mayor peso molecular y b) la fracción de peso molecular 5.000 proviene de la ruptura triptica en 2 argininas situadas dentro de la zona que encierra el puente disulfuro cercano al extremo N-terminal,(fig. 24 y 103).Es interesante señalar que esta fracción tiene actividad biológica significativa, si bien parte de la misma se pierde al disolver el componente en ácido acético 50%.-

5- SIGNIFICADO DE ESTE ESTUDIO

Las hormonas de crecimiento más estudiadas hasta la fecha, fueron la bovina y la humana y de ellas se conoce, entre otras cosas, que la conformación y estado de agregación de sus moléculas es una función de las condiciones del medio en que se encuentran. Como estos cambios afectan su actividad biológica es obvio, que se requiera un conocimiento detallado de las características de sus formas estables en condiciones fisiológicas y también fuera de ellas, así como de la reversibilidad y extensión de los cambios detectables en dichas condiciones, antes de iniciar estudios químicos más profundos.

El estudio comparativo de un cierto número de hormonas de distintas especies desde los puntos de vista indicados puede traer a luz características comunes o diferenciales entre ellas, no evidentes a priori.

Eventualmente, este conocimiento puede permitir ampliar el rango de acción de una determinada hormona a una especie para la cual era inactiva.

Este último logro tendría gran aplicación médica, si la especie receptora en cuestión fuera la humana. Esto parece ser posible a juzgar por ciertos experimentos exitosos realizados con hormonas animales atacadas por enzimas proteolíticas. Antes de encarar el mencionado estudio comparativo hemos considerado conveniente realizar una investigación intensiva de su conformación y de sus propiedades de agregación y para ello hemos elegido primeramente las de origen bovino y humano ya que sus propiedades fisicoquímicas generales y su estructura primaria están mejor estudiadas que en otras -- hormonas.

Cualquier estudio que se realice con una proteína involucra su disolución en diferentes solventes, de pH y composición variables y su permanencia en estas condiciones a distintas temperaturas, por tiempos variables.

Muchos experimentos requieren concentraciones altas de urea, otros someten a la proteína a diálisis, precipitaciones, liofilizaciones, tratamiento con sustancias disociantes (por ejemplo, dodecil-sulfato sódico, clorhidrato de guanidina) etc.

Hemos decidido, por lo tanto, estudiar en primer término la repercusión que tienen los tratamientos físicos mencionados sobre la conformación y actividad biológica de las hormonas y en segunda instancia realizar un estudio análogo después de modificar químicamente la molécula.

Los métodos de evaluación de la magnitud de los cambios producidos, incluyeron:

- Medida de la actividad biológica por aumento del espesor del cartílago tibiano en la rata hipofisopriva.
- Comportamiento en la diálisis analítica a través de membranas calibradas.
- Medida del intercambio tritio-hidrógeno.
- Análisis cuantitativo de aminoácidos.
- Determinación de grupo N-terminales.
- Medidas de viscosidad.
- Medida de la constante de sedimentación.
- Mapas peptídicos.
- Espectroscopia diferencial en el ultravioleta.

- Medida de la fluorescencia.
- Filtración cromatográfica a través de geles.
- Electroforesis en gel de poliacrilamida.

II. MATERIALES Y METODOS

CLORURO DE DIMETILAMINOBENCENOSULFONILO: De Pierce
Chemicals Com-
pany.

BROMURO DE CIANOGENO: De Eastman Organic Chemicals.

N-METIL ISOUREA: De K & K Laboratories, Inc.

ANHIDRIDO MALEICO: De British Drug Houses Ltd.

AGUA TRITIADA: (100 m^C/ml) obtenida de la Comisión de
Energía Atómica.

TRIPSINA-TPCK TRATADA: De Worthington Biochemical Cor-
poration.

SULFITO DE SODIO ANHIDRO: De Mallinckrodt Chemical Works.

SULFITO DE SODIO (³⁵ S) : De New England Nuclear -----
(396 μC/mg.)

HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA: Se preparó por el método de Dellacha y Sonenberg (1964) que consiste en una extracción alcalina de las glándulas pituitarias homogeneizadas y posterior precipitación alcohólica del extracto en frío y a pH 8.5.

La proteína obtenida se purificó mediante su disolución en medio alcalino y reprecipitación con etanol; luego se sometió a una cromatografía en una columna de Sephadex G-100. Por este método se obtuvieron 250 mg. de hormona pura a partir de 1 kg. de glándulas frescas.

HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA: Se preparó por el método de Ross y col. (1963) en el cual las glándulas homogeneizadas se extraen con buffer de fosfato de sodio 0.3M pH 6.2. Las proteínas se precipitan con sulfato

de amonio (50% de saturación) y luego se cromatografían en una columna de Sephadex. El rendimiento fue de 3 mg. de hormona por g. de glándula fresca.

DIALISIS ANALITICA A TRAVES DE MEMBRANAS TRATADAS
CON CLORURO DE ZINC.

En una diálisis ordinaria se puede eliminar fácilmente sales o solutos pequeños, y así separarlos de moléculas de alto peso molecular que en esas condiciones no se dializan.

La porosidad efectiva de las membranas de celofán puede alterarse aumentando o disminuyendo el tamaño del poro (Craig y col, 1961). Para ello se emplean métodos mecánicos o químicos.

Entre los métodos químicos que provocan un aumento del poro, el más usado consiste en tratar la membrana con una solución de cloruro de zinc (64% p/p) a 25°C durante un período de tiempo variable, según la porosidad requerida.

Craig (1960) propuso utilizar la diálisis con fines analíticos pues las membranas de celofán trata-

das tienen una sensibilidad muy grande para detectar cambios de forma y tamaño en las moléculas. El dispositivo de Craig consta de (Fig. 5):

Un saco de celofán tratado A adherido a un collar de vidrio B. Dentro del saco A se encuentra un tubo cerrado C y fuera del mismo el tubo D.

La solución a dializar se distribuye uniformemente entre la membrana de celofán A y el tubo C y se dializa contra el líquido contenido en D.

La relación de volúmenes que debe existir entre la solución a dializar y el contenido de D es de 1/10. Se llama difusado al líquido contenido en D y retentado al que se encuentra dentro del saco de celofán A.

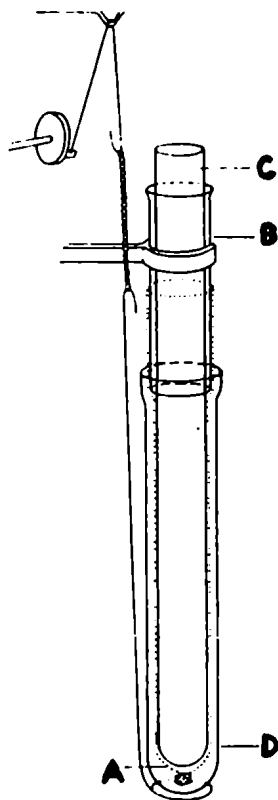


FIG. 5: Dispositivo utilizado por Craig para realizar diálisis analítica.

La diálisis se acelera en esta forma debido en parte al movimiento en sentido vertical que se le imprime al tubo D y por otra a que la solución a dializar se distribuye en una fina capa.

La técnica de trabajo aplicado fue la siguiente:

- 1) Se introduce la solución que contiene la muestra a dializar en el saco de celofán A. Al colocar el tubo C, tal como lo muestra la figura 5, la solución se distribuye ocupando toda la superficie de la membrana de celofán.
- 2) Se mide el volumen adecuado de líquido, se deposita en D y se comienza la diálisis tomando nota del tiempo.
- 3) Se imprime al tubo D un movimiento vertical que agita su contenido acelerando la diálisis.
- 4) Transcurrido un tiempo determinado se detiene el movimiento vertical del tubo D, del cual se retira el difusado y se vuelve a colocar el mismo volumen de líquido puro. Se prosigue la diálisis.

Al final de la experiencia la medida de la concentración de la proteína en el retentato y en los difusatos obtenidos permite conocer su velocidad de difusión a través de la membrana tratada.

En nuestro caso particular la evaluación de las concentraciones de la proteína en el retentato y en los difusatos se realizaron midiendo la absorbancia en 225 nm.

La velocidad de difusión de un soluto ideal a través de la membrana se puede describir por una ecuación análoga a la de la ley de Fick que rige la difusión en soluciones libres.

$$\text{Velocidad de difusión: } - DA \frac{dc}{dx}$$

Donde: D es la constante de Difusión

A es el área seccional de la columna de difusión

$\frac{dc}{dx}$ es el gradiente de concentración.

Si la velocidad de difusión para un determinado soluto y membrana es solo proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana, el proceso responde a una cinética de reacción de 1° orden. En este caso, si se representa el logaritmo de la disminución de la concentración del soluto en el retentato, en función del tiempo se obtiene una recta; (ej. A Figura 6).

La información que se deduce es la siguiente:

- 1) Indica que el soluto se comporta idealmente en el rango de concentraciones estudiadas.
- 2) Señala que el soluto es homogéneo con respecto a tamaño dentro de los límites en que discrimina la membrana.
- 3) El tiempo de escape del 50% del soluto es una constante característica de su tamaño y de la membrana.

Las poblaciones moleculares heterogéneas originan quebraduras en las rectas de escape; ej. B (Fig.6).

Este comportamiento se atribuye a fenómenos de asociación, disociación o a la presencia de impurezas.

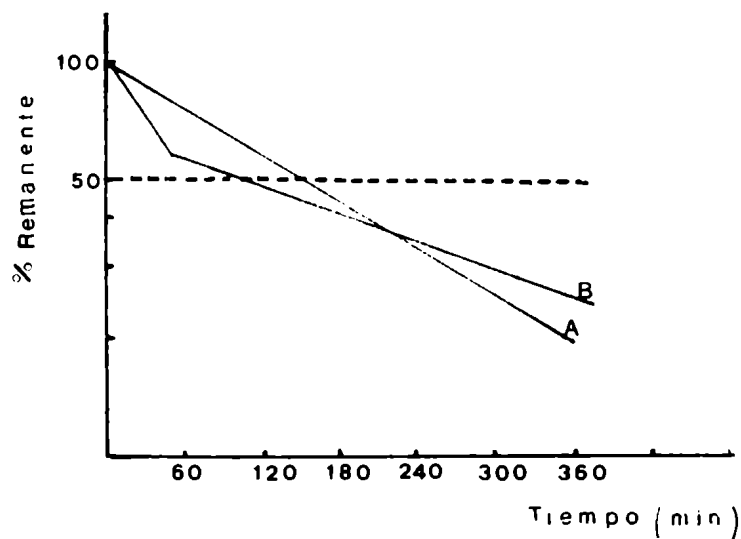


Fig.6: Curvas de difusión a través de membranas.

INTERCAMBIO T/H: Mayor información sobre la estructura 2a y 3a de las proteínas puede obtenerse por medida de la movilidad de los hidrógenos en la molécula. Para ello se empleó un método trazador basado en el uso de agua tritiada (Cambiaso y col, 1970).

La determinación consiste en incubar la proteína con $280 \cdot 10^6$ cuentas por minuto por mililitro de tritio como agua tritiada.

Una vez alcanzado el equilibrio de intercambio el exceso de agua tritiada se elimina por diálisis rápida en contracorriente (Craig y col. 1965) y la muestra se incuba tiempos variables; al final de los cuales se dializa rápidamente.

Sobre la muestra así depurada se mide la concentración de proteína y de tritio. Los resultados se expresaron como número de hidrógenos no intercambiados por molécula, en cada período. El dispositivo utilizado fue el siguiente: (Fig. 7).

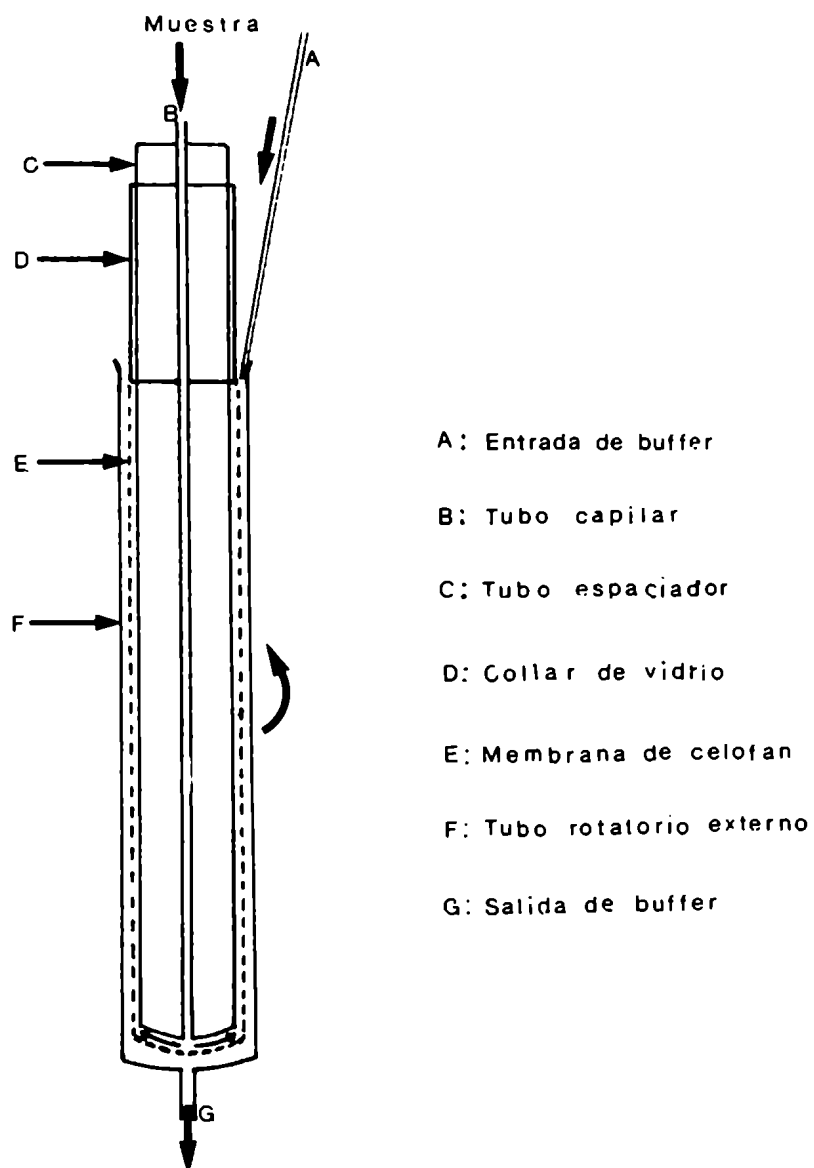


Fig.7: Dispositivo empleado por Cambiaso y col (1970) para la medida del intercambio tritio/hidrógeno.

La muestra a dializar se introduce en el sistema por el tubo capilar (B) impulsada por una--homba mecánica. Al llegar al extremo inferior se distribuye en una fina capa entre el tubo espaciador (C) y la cara interna de la membrana (E) y asciende en la dirección de las flechas (en ese momento se comienza a medir el tiempo del intercambio). Durante toda la experiencia se introduce buffer por (A), que circula entre el tubo rotatorio externo (F) y la cara externa de la membrana (E) en forma descendente y luego sale por (G). De allí el nombre de diálisis en contracorriente. La muestra dializada se recoge en el espacio que queda entre el collar (D) y el tubo espaciador (C).

DETERMINACION DEL COEFICIENTE DE SEDIMENTACION $S_{20,w}^{1\%}$

Las medidas para determinar la velocidad de sedimentación se realizaron en la ultracentrífuga Beckman Spinco modelo E que opera con óptica Schlieren.

Se trabajó a 20°C con una concentración de proteína de 10 mg /ml y a 42.040 rpm empleándose celdas de doble sector.

FILTRACION CROMATOGRAFICA A TRAVES DE SEPHADEX G-100

Con esta técnica se estudió tamaño molecular y homogeneidad de las proteínas. Se trabajó entre 0 y 2° C.

ANALISIS DE AMINOACIDOS: Se realizó en un autoanalizador -- Technicon según el método de González Cadavid y col. (1964).

DETERMINACION DE LOS AMINOACIDOS AMINO-TERMINALES:

Se siguió el método de Gray y Hartley (1963) que -- emplea el cloruro de 1-dimetil-aminonaftaleno-5--- sulfonilo, como reactivo bloqueador del grupo alfa amino. Una vez marcada la proteína, se hidroliza con ácido -- clorhídrico 6M durante 16 horas y el hidrolizado se siembra en placas de poliamida.

Se cromatografian en 2 dimensiones. En la primera -- dimensión se usa un sistema compuesto por ácido fórmico-a -- gua (3:200). La segunda dimensión se cromatografía primero -- con un sistema benceno-ácido acético (90:10) y luego con a -- cetato de etilo-metanol-ácido acético (20:1:1).

ELECTROFORESIS EN GEL POLIACRILAMIDA: Se aplicó este método siguiendo la técnica descripta por Ornstein y Davis (1962).

VISCOSIMETRIA: Las medidas se realizaron a $20 \pm 0.01^\circ \text{C}$ con un viscosímetro Ostwald de 1,2 ml. de capacidad.

MEDIDA DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA:

Ray y col (1941) comprobaron que el ancho del cartílago epifisario de la tibia se reduce --- significativamente luego de la hipofisectomía. Interpretaron este hecho como el resultado de una alteración entre el equilibrio de condrogénesis y el de osteogénesis. Los mismos autores observaron que la administración de hormona de crecimiento a animales hipofisectomizados revierte el efecto y que existe una relación dosis-efecto que hace posible realizar un test cuantitativo de la hormona de crecimiento inyectada.

El método que se empleó en nuestro laboratorio es el estandarizado por Greenspan y col(1949) y consiste en lo siguiente:

Se hipofisectomizan ratas hembras Long Evans de

de 26 a 28 días de vida y se usan 12 a 14 días después de la operación. Se inyecta intraperitonealmente una solución de hormona de crecimiento (entre 10 y 25 μ g. en 0,5 ml de agua por día) durante 4 días.

Al quinto día los animales se sacrifican, se diseca la tibia, y se corta según plano sagital medio.

Las dos mitades se lavan en agua 10 minutos, se sumergen en acetona 6 minutos y nuevamente en agua, luego se colocan en solución de nitrato de plata al 2% durante 2 minutos y se exponen a la luz.

Se ve que las porciones calcificadas del hueso se tiñen de marrón oscuro mientras que el cartílago epifisario no calcificado permanece blanco. El ancho del mismo se mide con un micrometro ocular.

La gran ventaja de este ensayo, sobre el que se basa en el aumento de peso corporal, reside en su rapidez y su mayor sensibilidad. Es posible lograr una respuesta significativa del cartílago administrando 5 μ g. totales de hormona.

ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA DIFERENCIAL:

Se usó un espectrofotometro Beckman D.U. con celdas de cuarzo de 1 cm de paso de luz. Los espectros diferenciales se obtuvieron midiendo la absorción de la solución problema frente a una solución de referencia preparada con hormona nativa.

La absorbancia en 278 nm de estas soluciones se igualaron al comienzo del experimento diluyéndolas convenientemente.

MEDIDAS DE FLUORESCENCIA: Para estas medidas se utilizó un espectrofluorometro automático de precisión equipado con dos monocromadores (Weber y col, 1964). Las muestras que se comparan tienen exactamente la misma densidad óptica a la longitud de onda elegida para la excitación.

Los espectros de fluorescencia presentados fueron corregidos para la sensibilidad del fotomultiplicador.

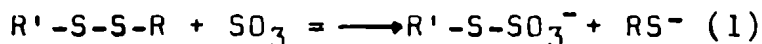
Todos los experimentos se realizaron a 20°C en buffer glicina-clorhídrico 0,1M, pH 3.6, I: 0,005. La resolución de los espectros es de 2 nm (20Å°).

Las areas que cubren las curvas de emisión en función de la longitud de onda, son proporcionales al rendimiento cuántico de fluorescencia, y los datos se expresan en base al valor 0.2 correspondiente al rendimiento cuántico del triptófano. Cuando la muestra se excita a 295 nm la mayor parte de la luz incidente es absorbida por los residuos de triptofano. Si en cambio se excita a 270 nm los residuos de tirosinas absorben casi toda la luz.

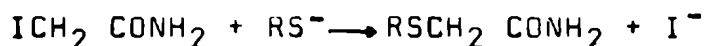
El máximo del espectro de fluorescencia del triptofano está entre 340-350 nm, mientras que el máximo de la tirosina esta entre 305-310 nm.

Agradecemos al Dr. Churchick (Universidad de Knoxville, U.S.A.) la realización de las medidas de fluorescencia descriptas.

SULFITOLISIS: La reacción procede según el siguiente equilibrio:



En presencia de iodoacetamida ocurre:

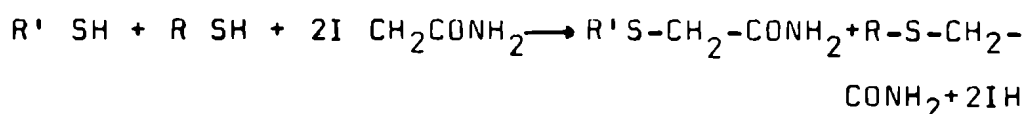
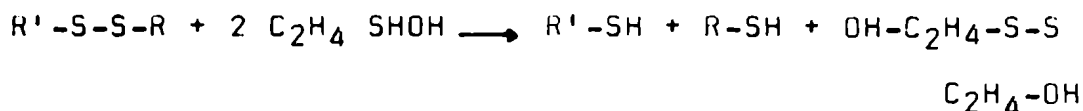


De esta forma el equilibrio de la reacción --
(1) se desplaza hacia la derecha.

Las condiciones experimentales de sulfitolisis de la hormona de crecimiento bovina se mantuvieron esencialmente iguales a las señaladas por Mills y col-- (1965).

La proteína se disuelve en una solución TRIS 0.1M tal que la concentración sea del 1%, se agrega 20-- mg. de iodoacetamida o ácido iodoacético por cada 50 mg. de proteína. Se agrega luego sulfito disódico sólido -- hasta que este reactivo se encuentre en exceso: 850 mo-- les de sulfito por mol de R-S-S-R'. El pH se ajusta a 9.0. Se deja reaccionar 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se baja el pH a 8.3 y se centrifuga para eliminar el precipitado. El sobrenadante se dializa contra agua destilada en frío y se liofiliza.

REDUCCION Y CARBAMIDOMETILACION: La reacción que ocurre es la siguiente:



Se empleó el método de Anfinsen y col (1961)- que consiste en disolver 100mg. de la proteína en 5ml de una solución acuosa 8M urea llevada a pH8.5 con metilamina. Se burbujea N durante 15 minutos y se agrega 0,1 ml. de mercaptoetanol. Se mantiene la reacción durante 6 horas a 23°C. Al cabo de este tiempo se diluye la solución a 2M urea y se agrega iodoacetamida en cantidad tal que sea 10 veces molar sobre el mercaptoetanol. La carbamidometilación se realiza durante 15 minutos en un aparato pH-stat a pH 8.5 que se mantiene constante por el agregado de solución de metilamina al 5%.

En algunas oportunidades y con fines comparativos se redujo y carboximetiló según el método de Crestfield y col (1963) que difiere del anterior en que emplea buffer TRIS pH 8.6-8M urea- 0,2% EDTA (Na)(etilendiamino tetra acetato sódico) y carboximetila con ácido iodoacético.

GUANIDINACION DE LOS ϵ -AMINO GRUPOS DE LISINAS:Se

empleó la técnica descrita por Evans y col (1951), 94 mgr. de O-metil isourea se disuelven en 10ml de buffer carbonato-bicarbonato sódico 0.1M, pH 10,5. En este volúmen se disuelven 200 mg de hormona y se lleva a 14 ml. con el mismo buffer.

Se deja a 0-2°C durante 1 semana, con agitación. Se centrifuga. El sobrenadante se dializa en frío y liofiliza. El rendimiento obtenido fue de 70%.

TRATAMIENTO CON ANHIDRIDO MALEICO:El anhídrido malei-

co tiene la ventaja de ser un reactivo bloqueante reversible de amino grupos de proteínas y péptidos.

El procedimiento que se empleó para maleinizar hormona de crecimiento bovina es similar al utilizado por Butler y col (1967).

La reacción ocurre fácilmente entre pH 8.5-9.5. Se hace reaccionar la proteína (concentración 0.04mM) con 30 mM de anhídrido maleico en buffer carbonato-bicarbonato sódico 0.1M, pH9.0, a 2°C. Se agi-

ta durante 5 minutos y se dializa en frío contra agua destilada. Se liofiliza.

DIGESTION TRIPTICA Y MAPA PEPTIDICO: Las condiciones en que se realizó la digestión tróptica de la hormona se detallan a continuación:

La concentración de la proteína es de 3mg por ml en medio acuoso. Se realiza la experiencia a 30°C en un pH-stat Radiometer donde se mantiene el pH 8.6 constante mediante el agregado de solución de hidróxido de potasio 0.2M.

La tripsina que se emplea ha sido convenientemente tratada con TPCK [L-(1-tosilamido-2-fenil)etil clorometil cetona] para evitar su acción quimotróptica.

Por cada 100 mg de hormona se agrega 1,5 mg de enzima. Este agregado se realiza en dos tiempos: 1 mg al comienzo y 0,5 mg luego de 4 horas de digestión. Se digiere durante 6 horas, luego se centrifuga y liofiliza.

3mg. del digerido tróptico se disuelven en 80 ml de buffer piridina-ácido acético- agua (25:1:225) pH 6.3 y se siembra en una hoja de papel Whatman N° 3.

Se realiza la electroforesis en el mismo buffer de disolución a 3000V durante 70 minutos. Luego se cromatografía en dirección perpendicular a la anterior ----

empleando como solvente piridina-butanol-ácido acético-agua (100:150:30:120) durante 19 horas. Se revela con una solución de ninhidrina al 0,2% en acetona.

A fin de ubicar los péptidos que contienen argininas también se reveló con el reactivo de Sakaguchi.

ATAQUE CON BROMURO DE CIANOGENO: (Fellows y col, 1969) 105

mg de HCB se disuelven en 4,36 ml de ácido fórmico al 85%. A esta solución se agrega 210 mg de bromuro de cianógeno disuelto en 0.94 ml de agua recién bidestilada. Se deja reaccionar 24 horas a 25°C. Luego se diluye con 15 veces su volúmen de agua desionizada y se liofiliza 2 veces.

III. PARTE EXPERIMENTAL

EFFECTOS DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS FISICOQUIMICOS
SOBRE LA CONFORMACION Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA
HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA.

Se estudian, sucesivamente, los efectos de : una--
 liofilización, tratamientos alcalinos, altas concentra-
 ciones de urea y de cloruro de guanidina y calor.

LIOFILIZACION: Las variaciones que se detectan en tres -
 parametros fisicoquímicos de la HCB some-
 tida a una liofilización están indicadas
 en el cuadro IV .

CUADRO IV

VARIACION DE LA VISCOSIDAD INTRINSECA, DEL COMPORTAMIENTO
EN COLUMNAS DE SEPHADEX G-100 Y DEL t_{1/2} EN DIALISIS
ANALITICA, DE LA HCB POR EFECTO DE UNA LIOFILIZACION .

PARAMETRO	HCB NATIVA	HCB LIOFILIZADA
Viscosidad in-- trínseca a 20°.	3,3 ml/g	5,0 ml/g
Vol. de elución a través de Se- phadex G.100 -- (0.9 x 130cm) a 4° C.	76,0 ml	76,5 ml
Diálisis analí- tica: tiempo me- dio de escape a 20° (t 1/2)	180 min.	213 min.

Todos los parámetros se midieron en soluciones de la hormona en buffer glicina-ácido clorhídrico 0,1M, pH3.6, -- I:0,005.

La variación de la viscosidad intrínseca indica una alteración de la forma globular de la proteína nativa por efecto de la liofilización.

La expansión es pequeña si se tiene en cuenta que los valores típicos de η para proteínas completamente desnaturadas son de 2 a 7 veces mayores que los hallados -- aquí (Schachman, 1963). La filtración por gel no detecta el cambio, en las condiciones ensayadas, mientras que la diálisis analítica acusa una ligera expansión de la molécula de acuerdo con lo revelado independientemente por -- la viscosimetría.

La alteración conformacional producida por la liofilización es reversible, como se observa claramente en la Fig. 8; si la proteína liofilizada se analiza por diálisis apenas disuelta, su comportamiento indica expansión de la molécula (Fig.8,b) pero si esta solución se mantiene 12 horas a 1° previamente, su velocidad de escape (Fig. 8,c) es prácticamente coincidente con el de la proteína nativa (Fig.8,a)

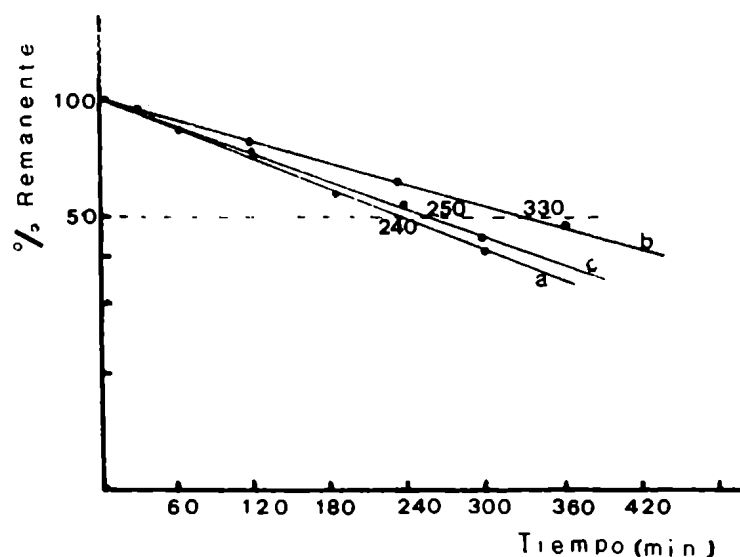


Fig. 8: DIALISIS ANALITICA DE SOLUCIONES EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO 0.1M, pH3.6 de HCB PREVIAMENTE SOMETIDA A DIVERSOS TRATAMIENTOS.

a: Hormona nativa; b: hormona nativa disuelta en buffer glicina-ácido clorhídrico 0.1M, pH3.6, dializada contra agua destilada y liofilizada. La proteína se disuelve nuevamente en el buffer y se analiza inmediatamente; c: idem que b, pero la solución de hormona se mantiene 12 horas a 1° antes del análisis. Se indican los valores $t_{1/2}$ para cada curva.

Los experimentos descriptos sirvieron para establecer la norma de no analizar conformacionalmente soluciones de hormona recientemente liofilizadas.

TRATAMIENTOS ALCALINOS: La HCB en soluciones de pH 's 8.5 a 9.9 se agrega (Li y col, 1953; Free y col, 1966; Faiferman 1967). Sin embargo su actividad biológica no se altera mientras las soluciones se mantengan a baja temperatura. Li y col (1953) hallaron que la HCB mantenida 3 horas a 25° disuelta en hidróxido de sodio 0.1M retiene más del 80% de su actividad biológica. El calentamiento a 60° - durante 90 min. de esta solución inactiva totalmente a la hormona (Faiferman, 1967). La Fig.9 muestra que el -- comportamiento en la diálisis analítica de la HCB des-- pués de estos dos tratamientos es cualitativamente similar e indica la existencia de un 5 a un 20% de hetero-- geneidad en las preparaciones.

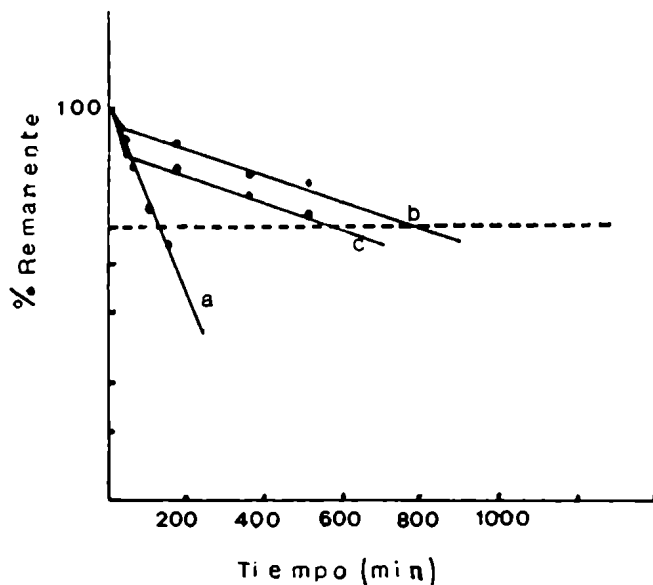


Fig.9: DIALISIS ANALITICA DE SOLUCIONES EN BUFFER GLIC-ACIDO CLORHIDRICO 0.1M, pH3.6 de HCB PREVIAMENTE SOMETIDA A TRATAMIENTOS ALCALINOS.

a: hormona nativa; b: hormona nativa mantenida 3 horas a 25° en 0.1 M hidróxido de sodio, dializada en frío contra agua destilada, liofilizada, disuelta en buffer de pH 3.6 y mantenida 12 horas a 1° antes del análisis; c: hormona nativa mantenida 90 min. a 60° en 0.1M hidróxido de sodio; el resto del tratamiento idem a b).

La baja velocidad de diálisis del componente principal -- en las hormonas tratadas por alcali, no se debe a un fenómeno de agregación pues se comprobó que el mismo tiene un coeficiente de sedimentación a pH3.6, $S_{20,w}^{1\%} = 2.5$, que --- corresponde a una hormona monomérica (Dellacha y col, --- 1966). La explicación más probable para los fenómenos ---

descriptos parece ser la ocurrencia de un desplegamiento de la proteína con pérdida parcial de las estructuras 2a y 3a. La alternativa que destruye totalmente la actividad biológica de la HCB:preparado c (Fig.9), no se traduce en un cambio dramático detectable por diálisis analítica, pues el comportamiento de los preparados c y b --- (Fig.9) es cualitativamente similar. Una interpretación posible es la siguiente: el tratamiento con hidróxido de sodio, 0.1M a temperatura ambiente no modifica el "centro activo" de la hormona aunque desorganiza parcialmente -- el resto de la molécula que aumenta su diámetro efectivo; el tratamiento a 60° no aumenta sustancialmente el diámetro efectivo de la molécula, más allá del alcanzado a 25°, pero destruye el centro activo. Esta hipótesis requiere que el tamaño del centro activo sea relativamente pequeño.

El incremento del desorden molecular de la HCB por tratamientos alcalinos suaves, se muestra en la Fig. 10.

Todos estos preparados retienen la actividad biológica original.

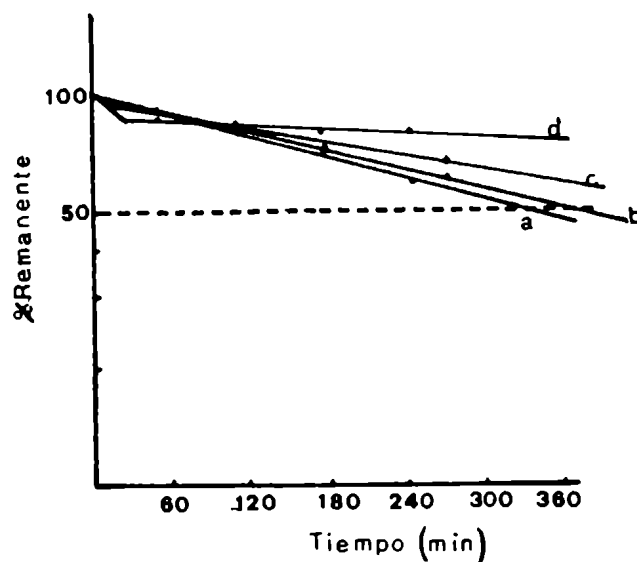


Fig. 10: DIALISIS ANALITICA DE SOLUCIONES EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO 0.1M, pH3.6, DE HCB PREVIAMENTE SOMETIDA A TRATAMIENTOS ALCALINOS.

a: hormona nativa, b: hormona nativa disuelta en buffer glicina hidróxido de sodio, 0.1M, pH9.6 a 1°, dializado inmediatamente contra agua destilada, en frío, liofilizada, disuelta en buffer de pH3.6 y mantenida 12 horas a 1° antes del análisis; c: idem b, pero mantenida 16 hs. a pH9.6 a 1°; d: idem b, pero mantenida 6 horas a pH9.6 a 25°.

El escape lento del preparado d (Fig. 10) no se debe a -- agregación pues su $S_{20,w}^{1\%} = 2.5$ indica una forma monomérica.

En general, la interpretación de estos experimentos

es similar a la ofrecida para los realizados con hidróxido de sodio, 0.1M: la molécula de la HCB se expande - por pérdida de interacciones no-covalentes, proporcionalmente a la intensidad del tratamiento. Es difícil -- cuantificar la magnitud de los cambios moleculares producidos a partir de la variación de la velocidad de --- diálisis pues este es un método demasiado sensible a toda alteración del diámetro efectivo de la molécula. Es - interesante señalar, a este respecto, que la HCB tiene-- un contenido relativamente alto de α -hélice (Edelhoch y col, 1966; Sonenberg y col, 1971) y que esta estructura-- no se pierde por efectos de concentraciones altas de urea que sin embargo, modifican mucho la velocidad de diálisis de la HCB (Fig.11). Por lo tanto, es probable que el alcali, en condiciones suaves, expanda la molécula de la HCB sin alteración de su estructura 2a. Una acción más enérgica - del alcali afectaría también a ésta, con pérdida de la -- actividad biológica.

ALTAS CONCENTRACIONES DE UREA Y DE CLORURO DE GUANIDINA:

La Fig. 11 muestra la variación de la velocidad de--- diálisis de la HCB por efecto de concentraciones crecientes de urea. Se comprueba un aumento gradual del diámetro efectivo de la molécula en función de la concen--

tración de urea en el solvente. En cada caso la población de moléculas es monodispersa, dentro de los límites del experimento.

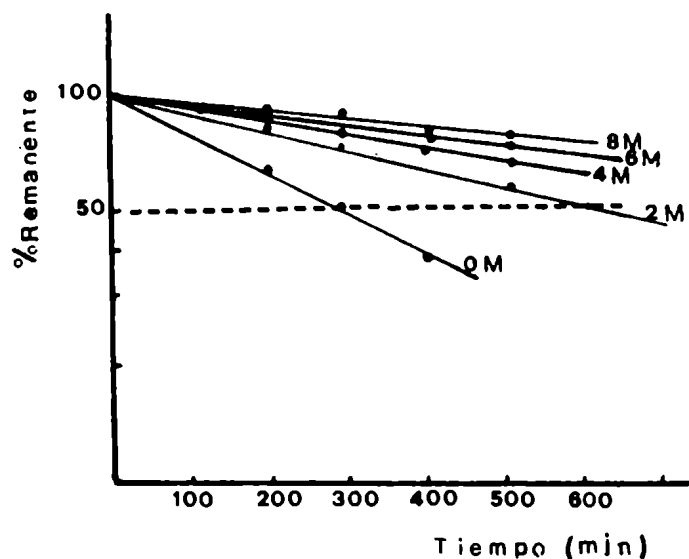


Fig. 11: DIALISIS ANALITICA DE HCB EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH 3.6 EN PRESENCIA DE CONCENTRACIONES CRECIENTES DE UREA, CONTRA BUFFER DE --- IGUAL COMPOSICION EN CADA CASO. TEMPERATURA: 25°.

La expansión producida en la molécula de la HCB por la -- urea es reversible en las siguientes condiciones: la HCB-- se mantiene 5 horas disuelta en buffer glicina-hidróxido de sodio, 0.1M, pH 9.6, 8M urea a 25°, luego se dializa contra agua destilada y liofiliza. El sólido se disuelve en ----

buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH 3.6, se deja 12 horas a 1° y se somete a diálisis analítica y ensayo biológico.

Ambos parámetros fueron idénticos a los obtenidos simultáneamente con HCB nativa, lo cual es interpretado como readquisición de la estructura y diámetro efectivo iniciales, por la HCB expandida por la urea.

Es interesante señalar aquí el diferente comportamiento de la HCB frente a un tratamiento de 5-6 horas a pH 9.6 y 25° según esté o no presente en el medio una concentración 8M urea (Experimento recién descrito y caso d), Fig. 10. En ambos casos la actividad biológica no es afectada pero solo readquiere su diámetro efectivo original la hormona que fue incubada con urea. Esto puede deberse a que la reversión del desplegado está favorecida por la eliminación gradual de la urea durante la diálisis.

En el caso del tratamiento alcalino en ausencia de urea la diálisis cambia muy bruscamente el pH y la proteína se reordena parcialmente o lo hace de una manera distinta a la nativa. Tanford (1970) señala que una concentración 5M de clorhidrato de guanidina desordena la conformación nativa de las proteínas globulares lleván--

dolas al estado de ovrillo estadístico. La fig.12 muestra el efecto de una concentración 6M de clorhidrato de guanidina sobre la velocidad de diálisis de la HCB, a pH3.6. Como término de comparación se muestra la recta de escape obtenida al mismo pH, en presencia de 8M urea. Es evidente que el

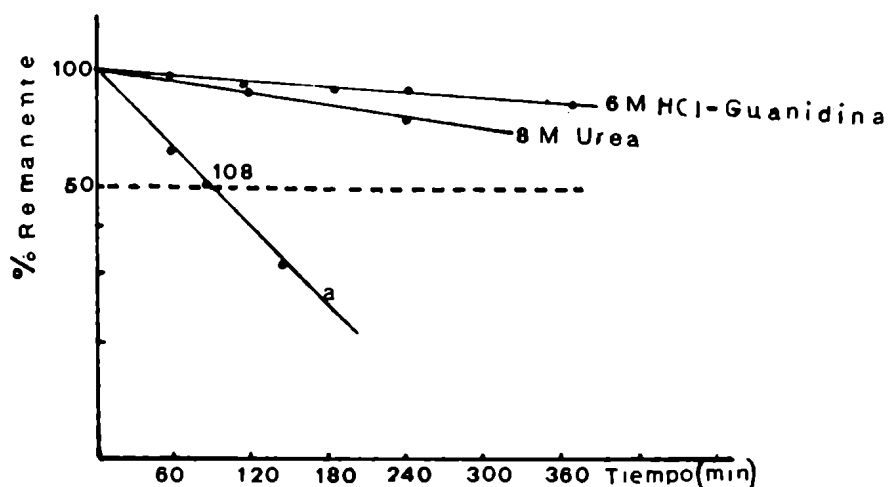


Fig.12: DIALISIS ANALITICA DE HCB EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH3.6 EN PRESENCIA DE 6M CLORHIDRATO DE GUANIDINA Y 8M UREA CONTRA BUFFER DE IGUAL COMPOSICION, EN CADA CASO. TEMPERATURA 25°.

a: hormona nativa disuelta en buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6 dializada contra el mismo buffer.

desplegamiento producido por 6M clorhidrato de guanidina es más intenso que el producido por 8M urea, lo cual se pone de manifiesto por la imposibilidad de revertir el--

proceso utilizando las condiciones que permiten lograrlo cuando el agente desnaturante es la urea (Fig.13)

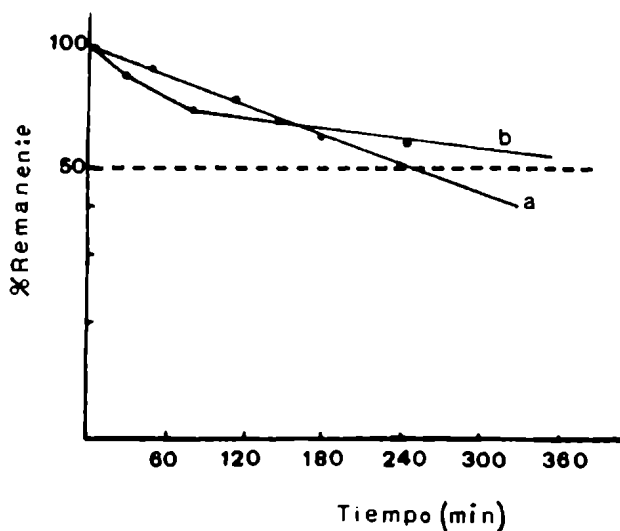


FIG.13: DIALISIS ANALITICA EN BUFFER
GLICINA-HCl. 0.1M, pH3.6, DE HCB
TRATADA POR 6M CLORHIDRATO DE
GUANIDINA.

a: hormona nativa (control); b: hormona disuelta en buffer de pH3.6, hecho 6M clorhidrato de guanidina; luego de 3 horas a 25° se dializa, en frio, contra agua destilada y se liofiliza. La proteína se disuelve en el buffer de pH3.6 y luego de 12 horas a 1° se analiza.

La hormona sometida a 6M clorhidrato de guanidina, a 25° da un escape quebrado que indica polidispersión y la velocidad de escape del componente principal corresponde a la de una molécula desordenada.

Resulta evidente que la eliminación del agente desnaturante a pH3.6 no es suficiente para permitir el plegado propio de la proteína nativa.

Las proteínas, en general, parecen adoptar su conformación nativa inmediatamente después que la síntesis de la cadena polipeptídica está completa. Esto es, la proteína pasa de un estado de desorden muy grande a su ordenamiento total propio, en todos sus niveles, bajo la influencia directriz de su particular estructura primaria. Teniendo en cuenta que la HCB bajo la influencia del clorhidrato de guanidina se halla en un estado parecido al de una proteína recién sintetizada pensamos en eliminar el agente desnaturante a un pH fisiológico. El experimento se realizó de la siguiente manera: la HCB se disolvió en clorhidrato de guanidina 6M, ajustado a pH7.5 y se mantuvo la solución 4 horas a 25°; se dializó luego, en frío, contra agua cuyo pH se mantuvo constantemente a 7.5 y se liofilizó. El comportamiento en la diálisis analítica de esta proteína se investigó a pH3.6

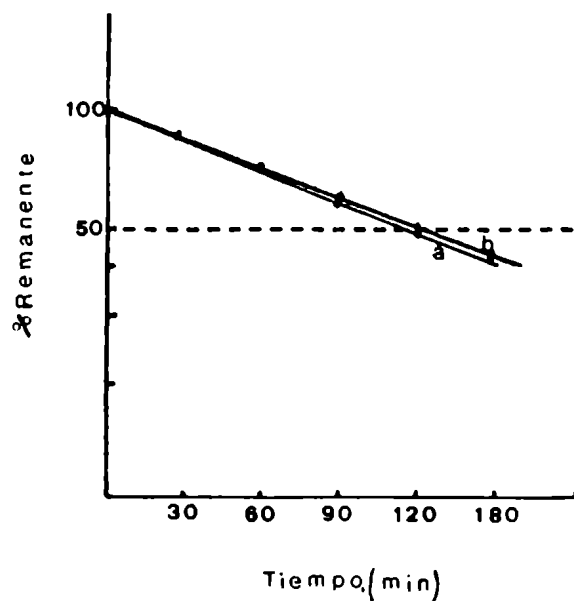


Fig.14: DIALISIS ANALITICA EN BUFFER GLI-CINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH3.6 DE HCB TRATADA POR 6M CLORHIDRATO DE GUANIDINA A pH7.5.

a: hormona nativa (control); b: hormona disuelta en clorhidrato de guanidina 6M, pH7.5, mantenida 4 horas a 25°, dializada en frio, contra agua a pH7.5, liofilizada y disuelta en el buffer de pH3.6. El análisis se realizó después de mantener 12 horas a 1° esta solución.

Después de los resultados experimentales registrados en la Fig. 14 es obvio que la HCB desnaturalizada por 6M -- clorhidrato de guanidina recuperó su conformación original al eliminarse el agente desnaturalizante a pH7.5.

CALOR: La HCB sólida y seca, en presencia de pentóxido de fósforo, resiste sin alteración un calentamiento a 100° durante 30 minutos. Su $t_{1/2}$ en diálisis analítica coincide con el de la hormona nativa. El efecto del calor sobre la HCB en solución se estudió calentando la hormona disuelta en buffer glicina-HCl, 0.1M, pH 3.6, durante 1 hora a distintas temperaturas. Antes de su análisis por diálisis todas las muestras se mantuvieron 12 horas a 1°. Los resultados reunidos en la Fig.-- 15 (a y b) indican que la molécula de la hormona no modifica permanentemente su diámetro efectivo por calentamiento de 1 hora entre 20° y 40°; el cambio registrado a 50° es pequeño pero a 60°, y con más intensidad a 70°, el cambio es importante.

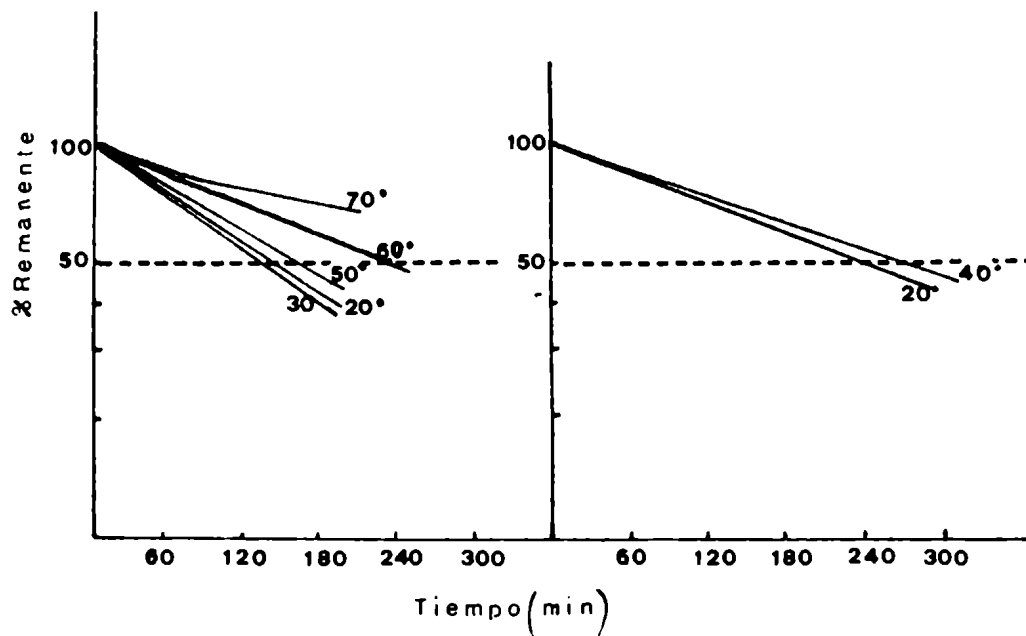


Fig.15: DIALISIS ANALITICA A 20° DE HCB DI-
SUELTA EN BUFFER GLICINA-ACIDO
CLORHIDRICO, 0.1M pH3.6 y CALENTA-
DO PREVIAMENTE 1 HORA A LAS TEMPE--
RATURAS INDICADAS.

Cada muestra se mantuvo 12 horas a
 1° antes de su análisis.

El mecanismo de la diálisis, en condiciones ideales, es asimilable a un proceso de difusión libre y en el caso de solutos cuyas moléculas tienen un radio mucho mayor-- que las del solvente y están en soluciones diluídas es-- posible aplicar la ley de Stokes-Einstein (Gosting,----- 1956)

$$D = \frac{RT}{N_0 \bar{v} \eta_r}$$

donde, D= Coeficiente de difusión.
 R= Constante de los gases.
 T= Temperatura absoluta.
 N= N° de Avogadro
 η = Viscosidad del solvente.
 r= Radio del soluto que difunde.

Esta ley puede simplificarse así:

$$D = K \frac{T}{\eta}$$

o sea, el coeficiente de difusión de una macromolécula en solución diluida es directamente proporcional a la temperatura absoluta e inversamente proporcional a la viscosidad del solvente, si su radio no se modifica.

Es posible, por lo tanto, calcular los valores teóricos para la razón de los coeficientes de difusión de la HCB a dos temperaturas diferentes y compararlos con los valores experimentales obtenidos efectuando el cociente de los $t_{1/2}$ de diálisis entre esas dos mismas temperaturas, teniendo en cuenta que el $t_{1/2}$ es inversamente proporcional a D. Las analogías o discrepancias existentes son interpretables en términos de constancia o modificación, respectivamente, del radio de la molécula por efecto del calentamiento.

El experimento se realizó calentando la HCB disuelta en buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M , pH3.6, 1:0,005, durante 1 hora a la temperatura deseada y luego efectuando la diálisis analítica a la misma temperatura. El cuadro V reúne los valores de $t_{1/2}$ obtenidos.

CUADRO V

VALORES DE $t_{1/2}$ OBTENIDAS CON LA HCB DISUELTA EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH3.6 A DISTINTAS TEMPERATURAS.

La solución se calentó previamente, 1 hora a cada temperatura.

t (°C)	$t_{1/2}$ (min)
20	800
30	564
40	402
50	387
60	348
70	258

En la Fig. 16 están representados los valores teóricos $(t_{1/2} + 10)/D_t$ calculados con la Ley de Stokes y Einstein utilizando los valores de la viscosidad del agua, lo cual no introduce un error apreciable en los resultados, y los valores experimentales correspondientes, calculados con los $t_{1/2}$ de la diálisis analítica.

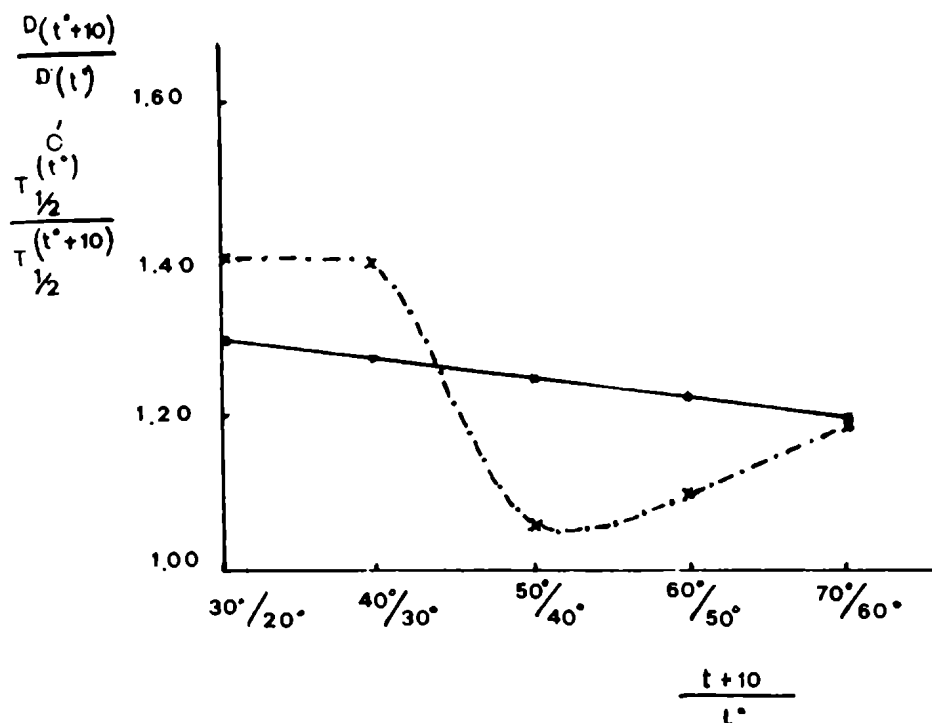


Fig.16: VARIACION DE LAS RAZONES TEORICAS (LEY STOKES-EINSTEIN); Y DE LA RAZON EXPERIMENTAL (DIALISIS ANALITICA); EN EL INTERVALO DE TEMPERATURAS 20°-70°.

El acuerdo entre ambos conjuntos de valores es razonablemente bueno y resulta claro que entre 40° y 50° ocurre un cambio importante en la conformación de la HCB que aumenta explosivamente el radio de su molécula. Este cambio es reversible como lo muestra la figura 15 que indica también la ocurrencia de cambios irreversibles entre 50° y 70°, éstos, de acuerdo con los valores de la Fig. 16 son de magnitud muy inferior al registrado inicialmente.

Los cambios permanentes en la molécula de HCB después-- de su calentamiento a 60° se estudiaron también por medida del intercambio tritio/hidrógeno (Cambiaso y col.,- 1970) y por espectroscopía ultravioleta diferencial.

El experimento de intercambio se realizó sobre tres muestras de HCB todas ellas disueltas en el buffer gli-- cina-HCL de pH3.6: una de ellas, sin ningún tratamiento, se utilizó como control, las otras se calentaron 1 hora a 40° y 60°, respectivamente. A las tres muestras se -- les agregó 280×10^6 cpm de agua tritiada y se mantu--- vieron 24 horas a 4°. Al cabo de este período se determi-- nó el número de hidrógenos no intercambiados, en función del tiempo, en cada una. Los resultados están represen-- tados en la figura 17.

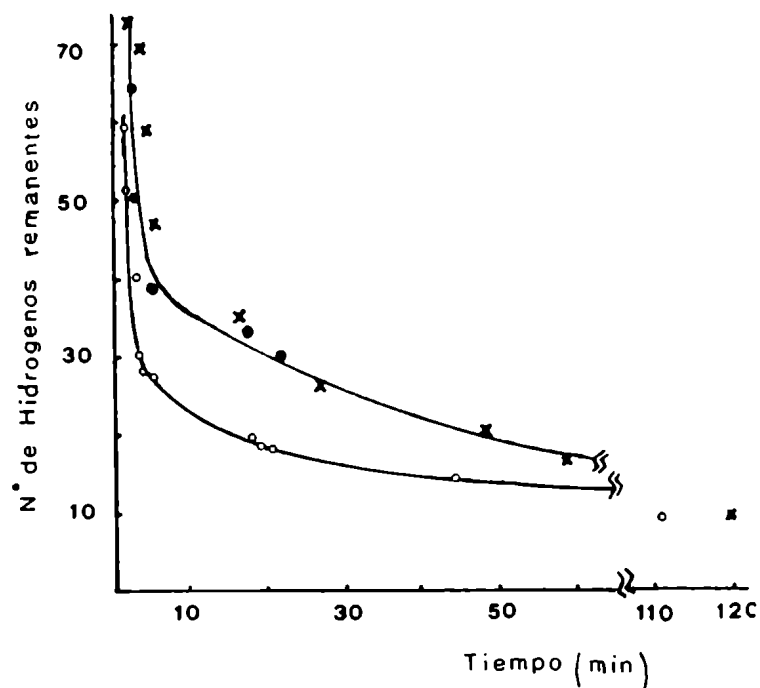


Fig.17: CURVAS DE INTERCAMBIO DE HIDROGENO HACIA AFUERA, OBTENIDA CON SOLUCIONES DE HCB EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH3.6, SOMETIDAS PREVIAMENTE A DIVERSOS TRATAMIENTOS.

● ; hormona nativa; x: hormona calentada 1 hora a 40°; o : hormona calentada 1 hora a 60°.

El intercambio de hidrógenos confirma lo hallado por --- diálisis analítica (Fig.15); los cambios que ocurren en la HCB por calentamiento de 1 hora a 40° son totalmente reversibles a baja temperatura de modo que la curva de--- intercambio que se obtiene no se diferencia de la que--- produce la hormona nativa. En cambio la hormona calentada a 60° es mucho más permeable al solvente y las poblaciones de hidrógenos rápidos aumentan, en parte al menos,

a expensas de los de velocidad media. El N° de hidrógenos lentos no se modifica sustancialmente indicando la existencia de un núcleo compacto en la molécula que no se abre a 60°.

La espectroscopía ultravioleta diferencial se realizó con la hormona calentada a 40° ó 60°, en las condiciones descritas antes, y luego mantenida 12 horas a 1° -- antes de ser examinados. La solución de referencia se preparó con HCB mantenida 1 hora a 20° y 12 horas a 1°.

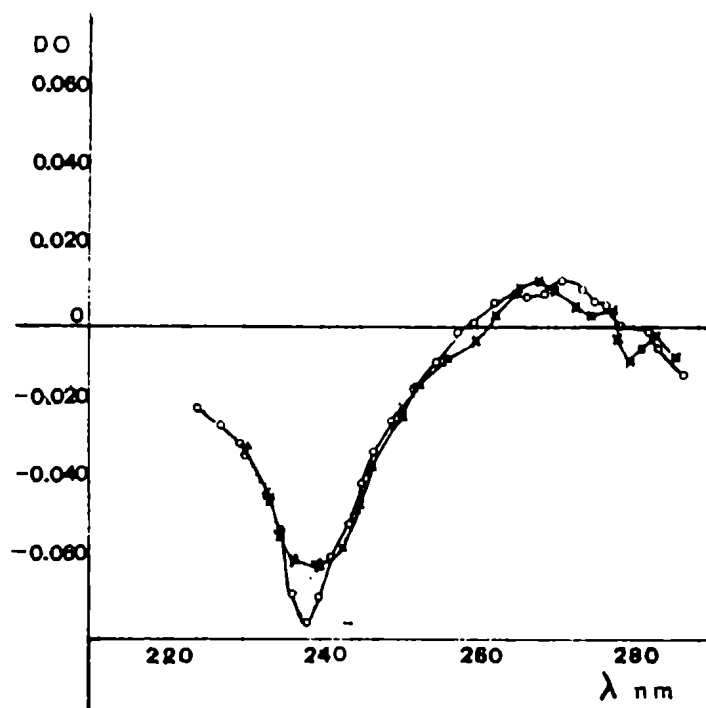


Fig. 18: ESPECTROS DIFERENCIALES DE HCB
CALENTADA 1 HORA A 40° ó 60° -
CONTRA HORMONA NATIVA.

Solvente: buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6 ●: hormona calentada a 40°; x: hormona calentada a 60°. Todas las soluciones se mantuvieron 12 horas a 1° antes de ser examinadas.

Como puede observarse en la figura 18 no se detectaron-- diferencias significativas en los espectros de la proteí-- na calentada, entre 260 nm y 290 nm, lo cual indica que-- los cambios producidos no afectan el entorno de las ti-- rosinas o el triptofano existentes en la molécula. La -- sensibilidad del método se discute en la pag.159.

EFFECTOS DE LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS QUIMICOS SOBRE LA
CONFORMACION Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA HORMONA DE CRE-
CIMIENTO BOVINA (HCB).

Los tratamientos químicos cuyo efecto se estudió --- pueden agruparse en dos secciones: aquellos que afectan-- principalmente a los grupos amino e hidroxilo libres en-- la proteína y aquellos que involucran ruptura de puentes disulfuro. Entre los primeros se ha ensayado: acetilación, guanidínación, maleinización y polialanilación. En cuanto a los puentes disulfuro, estos se han reducido y carboxi-- metilado o carboamidometilado y finalmente, sulfitolizado.

ACETILACION: La HCB tratada con ácido acético glacial, a-- 70°, durante 23 minutos o bien con ácido acé-- tico 2M, 12 hs. a 25°, retiene el 80% de su - actividad biológica (Ellis y col, 1956). El comportamien-- to en la diálisis analítica de la hormona tratada en ambas condiciones se muestra en la fig. 19. En los dos casos el proceso se detiene por diálisis en frío, contra agua des-- tilada y liofilización.

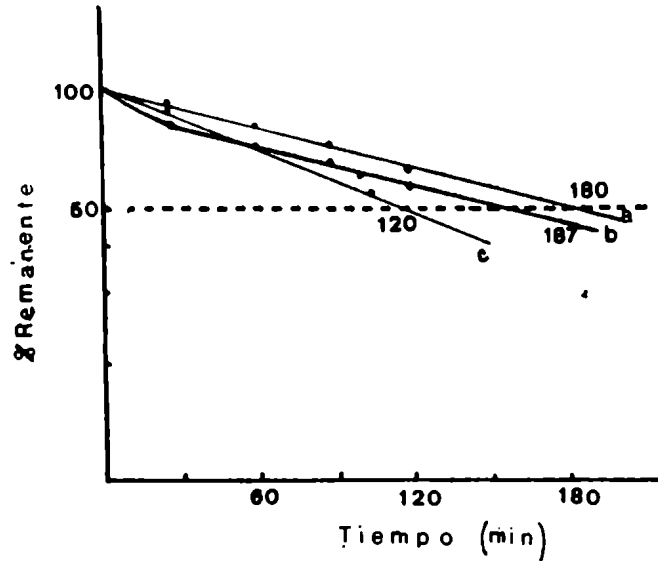


Fig.19: DIALISIS ANALITICA DE SOLUCIONES EN BUFFER GLICINA-ACIDO CLORHIDRICO, 0.1M, pH3.6 DE HCB TRATADA POR ACIDO ACETICO.

a: hormona nativa; b: hormona disuelta en ácido acético glacial y mantenida 23 min. a 70°, dializada en frío contra agua destilada, liofilizada, disuelta en buffer de pH 3.6 y mantenida 12Hs. a 1° antes del análisis; c: hormona disuelta en ácido acético 2M y mantenida 12Hs. a 25° luego tratada como la muestra b. Los números indican los $t_{1/2}$ respectivos.

El ácido acético glacial a 70° provoca aproximadamente un 10% de heterogeneidad en la HCB pero las características nativas de la molécula no se alteran mucho. El tratamiento con ácido 2M origina un material homogéneo con moléculas de menor diámetro efectivo que los de la hormona na--

tiva.

La acetilación de la HCB con anhídrido acético a 43° durante 5-6 minutos origina un inhibidor de la acción de la hormona nativa (Oikawa y col, 1967). Este producto, una vez dializado debió estudiarse a pH 9.4 pues no se disuelve en medio ácido. La figura 20 muestra el resultado de este experimento.

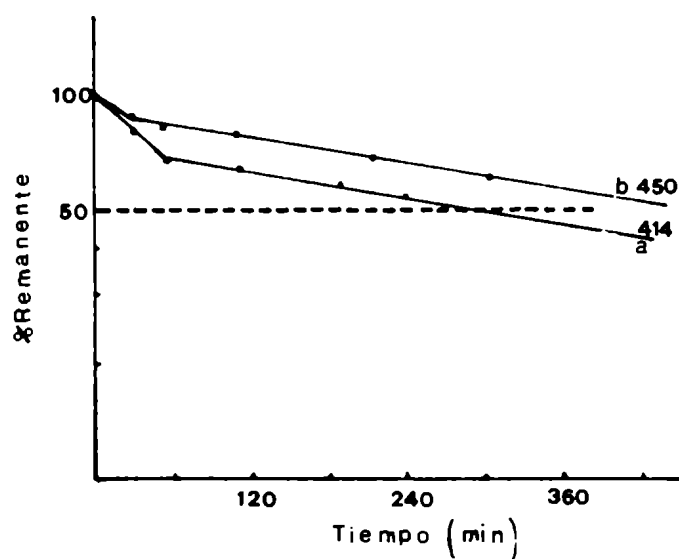


Fig.20: DIALISIS ANALITICA DE SOLUCIONES EN BUFFER CARBONATO DE SODIO-BI-CARBONATO DE SODIO 0.1M, pH9.4 DE HCB TRATADA POR ANHIDRIDO ACETICO.

a: hormona nativa; b: hormona tratada con anhídrido acético 5 min. a 43°, dializada en frío contra agua destilada, liofilizada y disuelta en buffer de pH 9.4. Los números indican los $t_{1/2}$ correspondientes.

Ya se indicó que la hormona nativa se agrega entre --- pH 8,5 y 9,5 y en concentraciones superiores a 1 mg /ml, lo cual da origen a gráficos de escape con líneas quebradas - tal como se observa en la fig. 20; a pesar de esta dificultad resulta evidente que la conformación del componente --- principal en la hormona acetilada es tal que su diámetro -- efectivo no se diferencia significativamente del de la hormona nativa. Las características biológicas de este mate--- rial indican, sin embargo, una alteración selectiva del cen- tro activo.

GUANIDINACION: La O-metil isourea reacciona, en medio alcali- lino, con ϵ -amino grupos de las lisinas que - están accesibles en las proteínas, transfor- mándolas en grupos guanidinos. Los residuos de lisinas se - transforman, por consiguiente en residuos de homoargininas. La carga neta de la proteína no cambia pero el pK de los- grupos guanidinos es mayor que el de los ϵ - amino que reem- plazaron.

La reacción se concluye como se indica en Materiales y Mé- todos. El análisis de aminoácidos de este material (Cuadro VI) muestra que han reaccionado 8 de los 12 residuos de li- sina presentes en la HCB.

CUADRO VICOMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA HCB GUANIDINADA

AMINOACIDOS	HCB GUANIDINADA RESIDUOS/20.800g	HCB NATIVA RESIDUOS/20.800g
Lisina	4,3	12,1
Histidina	2,9	3,0
Arginina	11,8	12,2
Homoarginina	7,3	0
Acido aspartico	15,1	15,0
Treonina	10,5	10,9
Serina	10,7	11,4
Acido glutámico	23,0	23,0
Prolina	6,8	5,8
Glicina	9,2	9,9
Alanina	12,8	13,8
Metionina	2,8	4,4
Valina	5,5	6,3
Metionina	3,2	3,7
Isoleucina	4,6	6,8
Leucina	20,0	23,9
Tirosina	5,2	6,1
Fenilalanina	11,5	11,5

Las propiedades fisicoquímicas y biológicas de este material son muy similares a las de la hormona nativa (Cuadro VII).

CUADRO VII

COMPARACION DE ALGUNOS PARAMETROS FISICOQUIMICOS Y BIOLOGICOS EN LA HCB NATIVA Y GUANIDINADA

PARAMETRO	HCB NATIVA	HCB GUANIDINADA
Diálisis analítica, pH3.6 (t 1/2) +	165 min. (escape recto)	186 min. (escape recto)
Diálisis analítica, pH9.7 (t 1/2) ++	280 min. (escape quebrado)	345 min. (escape quebrado)
1% S (pH9.7) w, 20	3.2	3.4
Actividad biológica. (crecimiento de la tibia) dosis total 100 µg.	100%	100%

+ Buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M , pH3.6

++ Buffer glicina- hidróxido de sodio, 0.1M, pH9.7

Cuando la hormona guanidinada se trata por 8M -- urea a pH8.5 durante 6 horas a 23°, la eliminación de la urea no es suficiente para que la molécula de la proteína modificada recupere su conformación original. Esto se detecta por un escape quebrado en la diálisis analítica a pH 3.6 y por la recuperación de solo el 75% de la actividad biológica.

La guanidination de la HCB en presencia de 10M urea -- conduce a transformar 11 de las 12 lisinas en homoargininas pero se insolubiliza más del 50% de la proteína.

MALEINIZACION: El bloqueo de los grupos ϵ -amino de las lisinas se realiza con anhídrido maleico a pH alcalino y baja temperatura tal como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. La HCB maleinizada es soluble en pH neutro o alcalino y su agregación está impedida por las cargas negativas introducidas, que se repelen electrostáticamente. La -- unión maleil-amino grupo es muy estable por encima de -- pH6 pero se hidroliza con relativa facilidad por debajo de pH5. La vida media de la ϵ -maleil-lisina es de 11 horas a pH 3.5 y 37° (Butler y col, 1967).

Para determinar el número de lisinas bloqueadas por el reactivo se tuvo en cuenta que el ácido maleico puede medirse por su absorbancia en 225 nm;

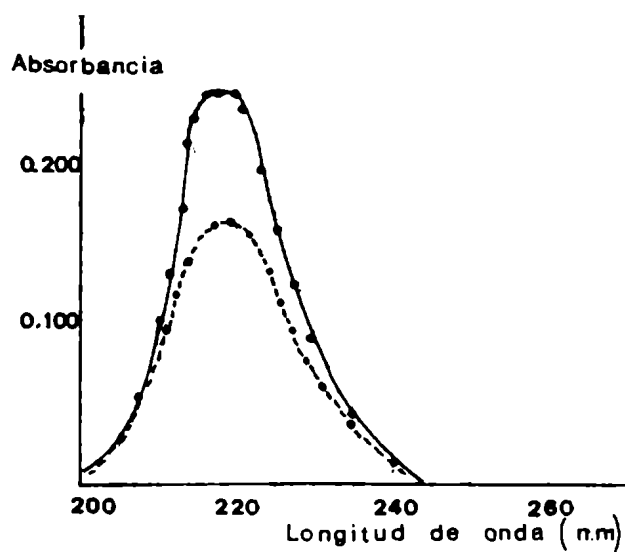


Fig. 21: ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL ACIDO MALEICO PATRÓN: _____
Efusado de la diálisis de maleil HCB contra agua a pH 3.6 luego de su incubación al mismo pH durante 60 horas a 37°C:-----

aquel parámetro es directamente proporcional a la concentración de la solución (Fig.22).

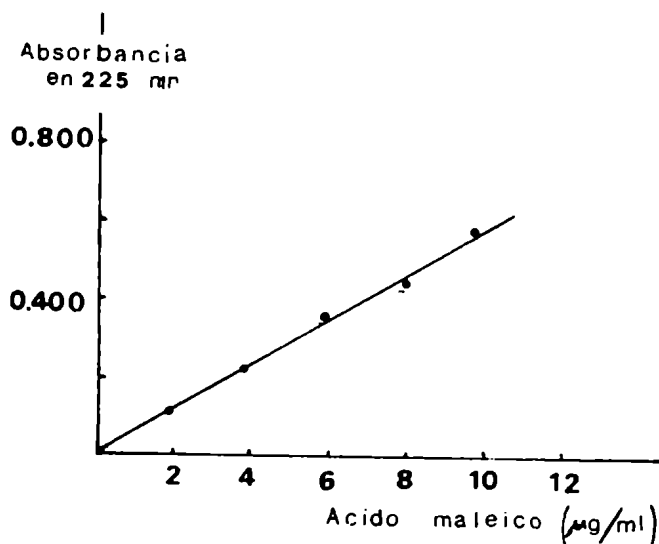


Fig. 22: VARIACION DE LA ABSORBANCIA DEL ACIDO MALEICO EN 225 nm CON SU CONCENTRACION EN LA SOLUCION.

La medida del número de lisinas bloqueadas por mol de -- hormona se realizó disolviendo 0.070 μ moles de maleil-- hormona en agua acidificada con HCL hasta pH 3.6 y man-- teniendo esta solución 60 horas a 37°.

En estas condiciones más del 90% de los grupos ma-- leilos quedan libres como ácido maleico que es posible -- separar de la hormona por diálisis analítica. La suma de las absorciones en 225 nm en los efusatos (ver Fig. 21) - permitió calcular que se habían liberado 0,73 μ moles de-- ácido maleico o sea 10,5 μ moles de ácido maleico por mol

de hormona. Esto indica que aproximadamente 10 u 11 --- grupos ϵ -amino de lisinas, sobre un total de 12, han--- reaccionado; desconocemos si hubo reacción sobre el grupo α -amino terminal. El comportamiento en la diálisis analítica de la maleil hormona puede verse en la Fig. 23. La hormona nativa

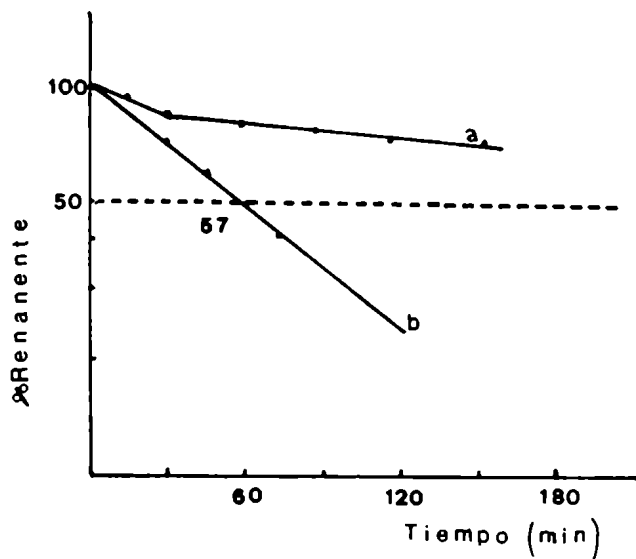


Fig.23; DIALISIS ANALITICA DE MALEIL-HCB
DISUELTA EN BUFFER FOSFATO 0.1M;
CLORURO DE SODIO 0.15M, pH 7.5.
 a; hormona nativa; b; maleil-hormona. El número indica el tiempo ($t_{1/2}$).

tiene escape quebrado habitual para las diálisis efectuadas a pH neutros o alcalinos e indica la existencia de -- moléculas agregadas. La maleil-hormona, en cambio, tiene un escape lineal propio de una proteína homogénea,-----

muy probablemente monomérica. Esta hipótesis se confirma por medidas del coeficiente de sedimentación: la hormona nativa, en el buffer de pH7.5 tiene un $S_{w,20}^{1\%} = 2,85$ característico para una proteína agregada (Faiferman y -- col, 1966), la maleil- hormona en iguales condiciones, -- tiene un $S_{w,20}^{1\%} = 1,7$ que indica un monómero.

Cuando la maleil-hormona se hidroliza a pH3.6 du--- rante 60 horas a 37°, las medidas de diálisis analítica-- revelan que el 90% de la hormona involucrada se comporta-- como la hormona nativa.

El ensayo biológico de la maleil-hormona (Cuadro--- VIII) revela que ésta posee aproximadamente el 30% de - la actividad de la hormona nativa.

CUADRO VIII
ENSAYO BIOLÓGICO DE LA MALEIL-HORMONA POR EL
METODO DEL CRECIMIENTO DE LA TIBIA

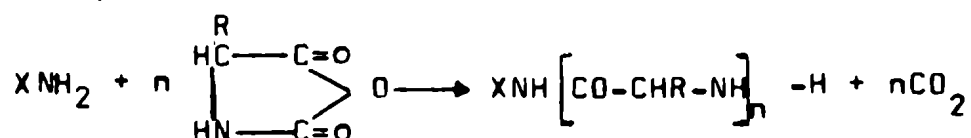
MUESTRA	DOSIS TOT. RATA (ug)	N° DE ANIMALES	ESPESOR DEL CARTILAGO ($\mu \pm$ ES) ^a	ACTIVIDAD RELATIVA %
solución fisiológica.	—	4	125 \pm 10	
HC8 nativa	50	4	189 \pm 7	100%
" "	150	4	286 \pm 6	100%
" "	200	4	298 \pm 16	100%
Maleil-HCB	150	4	180 \pm 18	30%

^aEspesor como promedio \pm ES del promedio.

Este hecho puede vincularse con la acción intensa -- del anhídrido maleico que reacciona practicamente con la totalidad de las lisinas existentes en la molécula. La proteína resultante se comporta en forma muy diferente a la hormona nativa: su constante de sedimentación y su velocidad de escape a través de membranas indican que su diámetro efectivo es menor que el de la nativa. Es probable que su menor actividad biológica se deba a que el centro activo de la hormona ve dificultada su interacción con sus receptores celulares debido a la condición compac-----

ta que ha adquirido la molécula y a la existencia de lisinas sustituidas en él.

POLIALANILACION: Los N-carboxianhídridos de α -amino ácidos son capaces de reaccionar, en condiciones muy suaves (0° y pH neutro), con los α ó ϵ -amino grupos libres en las proteínas, de acuerdo con la siguiente ecuación (Becker y col, 1953; Sela y col, 1967)



Cada grupo amino que reacciona adquiere una cadena, más o menos larga, de un homopolímero del aminoácido cuyo anhídrido se utilizó.

En general estos derivados conservan la actividad biológica de la proteína original (Katchalski y col, 1964) lo cual se debe probablemente, a que en las condiciones suaves que predominan durante la reacción solo participan en ella los grupos expuestos en la proteína cuya carga positiva se mantiene pues es reemplazada por la de la cadena que se origina.

Gracias a la colaboración del Dr. M. Sela pudimos

preparar una muestra de HCB polialanilada en las condiciones descritas y su análisis indicó que poseía 47 residuos de alanina agregados a la molécula. La repetición del análisis de amino ácidos luego de un tratamiento con ácido nitroso, que destruye las alaninas terminales, rebajó aquel número a 35. Teniendo en cuenta que existen 12 lisinas en la molécula, este resultado demuestra que todas ellas son accesibles al reactivo. Si admitimos una distribución uniforme de las alaninas, corresponden 3-4 alaninas por residuo de lisina. Suponemos que el grupo α -amino terminal no ha reaccionado.

El comportamiento en la diálisis analítica de este derivado de la HCB fue idéntico al de la hormona nativa (buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6), lo cual es singular si aceptamos que por lo menos 8 de las 12 cadenas de poli-alanina están en la superficie de la molécula. La única explicación es admitir que existan interacciones hidrofóbicas entre las nuevas cadenas polipeptídicas y el resto de la molécula que las pliegan hacia el interior de la misma y por lo tanto no se modifica el diámetro efectivo del conjunto.

La actividad biológica en el ensayo del crecimiento del cartílago tibiano, fue de solo el 35% de la actividad de la hormona nativa. Comparando este resultado -----

con los obtenidos con la hormona guanidinada que indicaron 100% de actividad con 8 lisinas reaccionantes, es posible explicar la disminución de actividad en la hormona alanilada por la alteración de las lisinas internas de la molécula que parecen estar vinculadas, directa o indirectamente con el centro activo de la hormona. Es de hacer notar que en la HCB con 11 lisinas maleinizadas, la actividad biológica es del mismo orden que en la hormona alanilada.

RUPTURA DE LOS PUENTES DISULFURO: Estas uniones consolidan la estructura terciaria de las proteínas formando puentes inter-cadenas, como ocurre en la insulina, o intracadenas como en la ribonucleasa. Estos puentes son particularmente importantes en las proteínas insolubles del tipo de la keratina cuyas propiedades estructurales dependen fundamentalmente de que permanezcan intactos.

La ruptura de todos los puentes -S-S existentes acarrea, muy a menudo, la pérdida de la actividad biológica de proteínas enzimáticas. Tal es el caso de la lisozima, pepsina, tripsina y ribonucleasa, entre otros. Sin embargo se puede reducir la mitad de las cistinas en la --

tripsina y una en la pepsina, sin que se registre pérdida de actividad enzimática.

Las medidas físico químicas realizadas sobre las proteínas reducidas indican que éstas tienen una conformación más abierta que en el estado nativo, pero la validez general de esta conclusión está cuestionada por los resultados obtenidos con la hormona de crecimiento humana (Sewley y col, 1969) como veremos más adelante. En las HCB y HCH uno de los puentes disulfuro se encuentra ubicado en el extremo C-terminal de la molécula y el anillo que origina está formado por solo 7 y 6 aminoácidos, respectivamente (Fig. 4, pag.35).

El segundo puente disulfuro une cisteínas separadas entre sí por, aproximadamente, 107 (HCB) y 110 (HCH) aminoácidos.

TRANSFORMACION DE LAS UNIONES S-S EN GRUPOS -SH, EN LA

HCB: Esta reducción se llevó a cabo en las condiciones utilizadas por Anfinsen y col (1961) para realizar la misma reacción con la ribonucleasa.

5mg. de hormona se disuelve en 8M urea (1mg/ml), se ajusta el pH al valor 8.5 con solución al 5% de metilamina, se agregan 5 μ l de mercaptoetanol y se deja la solución 6 horas a 25° en una atmósfera de N₂. La cantidad de reductor empleada representa un exceso molar 130 veces sobre el contenido de disulfuros de la hormona. Para determinar la extensión de la ruptura de los puentes disulfuros se procede de la siguiente forma: una alícuota de la mezcla de reacción se diluye con agua hasta una concentración 2M urea, se agrega iodoacetamida sólida (10 moles por mol de mercaptoetanol) y se incuba 15 min. a 25°. Los SH libres se bloquean como derivados carbonamido metilados y esta unión es estable a la hidrólisis ácida, por lo tanto luego de dializar la solución y recuperar la proteína modificada por liofilización, se la hidroliza con ácido clorhídrico 6M y se mide la cantidad

de carboximetil cisteína que se libera. En las condiciones descritas la cantidad hallada fue de 3.82 moles por mol de proteína, lo cual indica, prácticamente, 100% de reducción de los 2 puentes -S-S existentes en la molécula. Sin embargo cuando se pretende aislar la hormona reducida por acidificación a pH3.5 de la mezcla de reacción

original y diálisis en frío al mismo pH se comprueba que ha ocurrido un 90% de reoxidación. El análisis se -- realiza por reacción con iodoacetamida e hidrólisis ácida, tal como se describió antes.

Esta hormona reoxidada es soluble en buffer glicina ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6 pero tiene un coeficiente de sedimentación elevado; $S_{20,w}^{1\%} = 3.2$, comparado con el de la hormona nativa, $S_{20,w}^{1\%} = 2.3$. En diálisis analítica su escape es quebrado y 90% del material difunde mucho-- más lentamente que la hormona nativa, (Fig. 25). Es indudable que la reoxidación espontánea de la

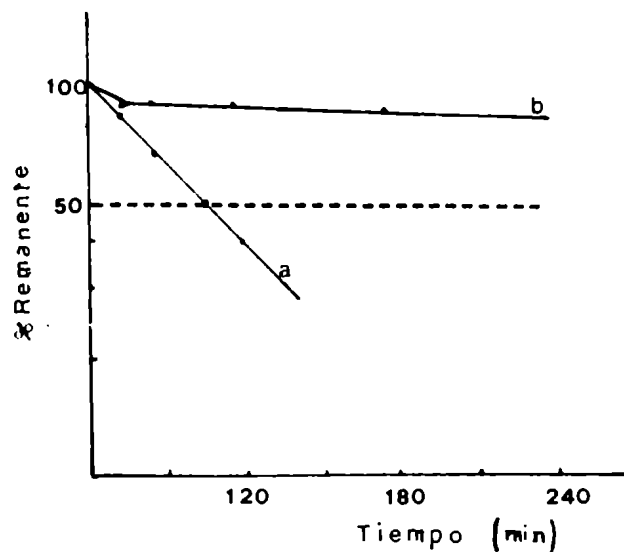


Fig. 24: DIALISIS ANALITICA DE HCB REDUCIDA Y REOXIDADA POR DIALISIS DIRECTA.

Buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6.

a: HCB nativa; b: HCB reoxidada.

hormona reducida, durante la eliminación de la urea por diálisis a pH ácido se produce en forma incorrecta dando lugar, probablemente, a la producción de agregados intermoleculares.

Para evitar la reoxidación, en otro experimento análogo al descrito, se eliminó la urea, a pH3.6, por diálisis en contracorriente utilizando agua ácida con 1 μ l/ml de mercaptoetanol como líquido de diálisis. El análisis de los -SH dió 3.5 moles de carboxi-metil-cisteína y 0,6 moles de 1/2 cistina, por mol de hormona, lo

cual indica que el 90% de la hormona esta reducida.

Este material es insoluble en el buffer de pH3.6 y es menester una concentración 8M de urea para solubilizarlo.

El cuadro IX reúne los valores de la viscosidad intrínseca de la HCB reducida, en presencia de 8M urea, de la HCB nativa en las mismas condiciones, y de la HCB nativa en ausencia de urea.

CUADRO IX

VISCOSIDAD DE LA HCB NATIVA Y REDUCIDA

Todas las medidas fueron hechas en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6, con los agregados que se indican.

HORMONA	η (ml/g)	AGREGADOS AL SOLVENTE
HCB, nativa	3,3	-----
HCB, nativa	7,5	8M urea
HCB, reducida	25	8M urea, 1 μ /ml mercaptoetanol

Comparando estos valores entre sí se ve claramente la -- desorganización de la molécula reducida por efecto de 8M urea, lo que señala el papel estabilizador de los puentes

S-S en esta molécula. Además teniendo en cuenta que solo uno de los dos puentes es interno se pone de manifiesto la localización verdaderamente crucial del mismo para mantener la estructura 3a. de la hormona.

El único estudio similar a éste que registra la literatura es el realizado por Bewley y col. (1969) con HCH reducida con ditiotreitól en ausencia de agentes desnaturalizantes y bloqueada con iodoacetamida y cuya estructura estudian por medidas de dicroísmo circular. Esta investigación demostró que la estructura secundaria de la HCH era invariante en sus dos formas nativa y reducida. Ambas especies contienen una cantidad significativamente elevada de α -hélice (55%). Los estudios ópticos realizados en la zona del espectro donde absorben las cadenas laterales mostraron algunos cambios cuantitativos pero cualitativamente fueron muy similares.

En conclusión, ambas formas de la HCH parecen tener igual conformación de lo cual se deduce que el ditiotreitól reduce los puentes -S-S sin que ello produzca un desordenamiento de la molécula. Esta conclusión está apoyada por la gran facilidad de reoxidación al aire de los grupos -SH con restablecimiento de las condiciones nativas de la molécula, evidenciables, entre otras formas,

por la actividad biológica inalterada del producto.

Se hicieron dos experimentos para explorar la posibilidad de que, en ciertas condiciones, la molécula de la HCB reducida y desordenada por la urea 8M, pueda recuperar su conformación nativa sin reoxidarse.

En el primero de ellos la hormona reducida, al final del tratamiento en 8M urea y mercaptoetanol, se dializa, contra soluciones progresivamente más diluídas de urea, con la presencia constante en el medio de 1 μ l/ml de mercaptoetanol. Se usaron soluciones de urea de concentración 6,5;4,3;5 y 2M, sucesivamente. La diálisis contra cada una de estas soluciones se mantuvo 20 minutos. Finalmente se dializó 3 veces, durante 20 minutos, contra agua destilada y se liofilizó.

La proteína liofilizada se intentó disolver en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH 3.6 con el agregado de 1 μ l/ml de mercaptoetanol pero sin resultado. Esta insolubilidad se aceptó como índice de la no adquisición de la conformación nativa por la hormona reducida aunque no se controló el grado de reoxidación que tuvo lugar durante el proceso.

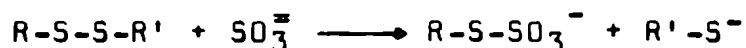
El segundo experimento se llevó a cabo de forma aná-

loqa a la descripta para el primero pero las soluciones de urea progresivamente diluídas se hicieron en buffer -- 0.1M , carbonato sódico- bicarbonato sódico, pH9.2. Con -- excepción de la de concentración 2M que fue hecha en agua.

La última diálisis fue realizada contra buffer 0.1M ácido clorhídrico, pH3.6. La hormona reducida se mantiene en solución mientras existe en el medio una concentración aproximadamente 2M urea, luego precipita totalmente. La-- información que se extrae de este experimento es similar-- a la obtenida en el primero.

SULFITOLISIS: de las uniones S-S en las hormonas de creci-- miento bovina y humana.

El sulfito de sodio reacciona con los puentes S-S, en la proteínas, originando un residuo de cisteína y uno de-- sulfocisteína:



La reacción puede desplazarse totalmente hacia la de-- recha si el sulfhidrilo que se origina se carboximetila o carbamidometila.

Mills y Wilhelmi (1965,1968) hallaron que en las hormo-- nas humana, porcina y bovina sulfitolizadas a pH 9.5 y en-- presencia de un gran exceso de sulfito de sodio, se han a--

tacado el 50% de las uniones S-S existentes. Con las --
hormonas bovina y porcina estos mismos autores han obte--
nido alguna evidencia experimental (ataque por carboxi--
peptidasa, técnica de la diagonal) que señala al puente
C-terminal como reaccionante preferencial con el sulfi--
to sódico. La actividad biológica de las hormonas bovina
y porcina sulfitolizadas se mantiene intacta; no ocurre
lo mismo con la humana cuyo derivado sulfitolizado con--
serva entre el 20 y el 50% de la actividad de crecimien--
to original. Es de señalar, sin embargo, que la hormona
humana conserva intacta su actividad prolactínica des---
pués de reaccionar con el sulfito. Nosotros hemos estu--
diado la sulfitolisis de la HCB utilizando diversas con--
diciones experimentales: las originales de Mills y Wil--
helmi (1968) (Ver Materiales y Métodos) y estas mismas--
condiciones, en presencia de agentes desnaturalizantes--
(Cuadro X). Los datos obtenidos confirman los resulta--
dos de Mills y Wilhelmi pero además indican que en -----
presencia de 8M urea o 1% de dodecilsulfato sódico la --
sulfitolisis afecta los dos puentes S-S en la molécula.

CUADRO X

COMPOSICION EN AMINOACIDOS DE LA HCB SULFITOLIZADA EN --
AUSENCIA Y EN PRESENCIA DE AGENTES DESNATURALIZANTES.

Aminoácidos	Composición en aminoácidos de la HCB sulfitolizada (residuos/----- 20.800 g)			HCB nativa
	sin agregados	en presencia de 8M-urea	en presencia de 1% SDS	
CM-cisteína	1.2	1.9	2.1	4.0 ⁺
Glicina	9.3	9.0	9.5	9.9
Valina	5.3	5.2	6.3	6.3
Metionina	-	3.5	3.5	4.0
Tirosina	5.2	6.0	6.0	6.1
Fenilalanina	10.8	11.5	11.5	11.5

⁺ Cisteína.

La HCB con el 50% de los puentes S-S sulfitolizados es soluble en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH-- 3.6 pero cuando ha reaccionado el 100% solo se disuelve en urea o en solución al 0,2% de SDS. La HCB parcialmen-- te sulfitolizada tiene un escape lineal en la diálisis --

analítica realizada a pH3.6 y su vida media, $t_{1/2}$ = 230--min, es solo ligeramente superior a la de la HCB nativa en igualdad de condiciones: $t_{1/2}$ = 180 min.

Hemos confirmado que su actividad biológica es igual a la de la hormona nativa (Cuadro XI)

CUADRO XI

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA HCB CON EL 50% DE LOS PUENTES S-S SULFITOLIZADOS EN EL ENSAYO DE CRECIMIENTO DEL CARTILAGO TIBIANO EN LA RATA.

MUESTRA	N° de animales	Dosis total μ g	Espesor del cartílago μ ES
Solución fisiológica	5	—	130 \pm 12
HCB Nativa	5	100	244 \pm 15
HCB Sulfitolizada	5	100	264 \pm 5

Los datos que figuran en el Cuadro X indican la presencia de aproximadamente 1 mol de carboximetilcisteína por mol de hormona sulfitolizada en ausencia de agentes desnaturizantes lo que sugiere que un puente está

más accesible al reactivo que el otro, en las condiciones de la reacción.

Los estudios realizados por fragmentación de la HCB con bromuro de cianógeno (Fellows, 1969; Peña y col, -- 1970) han permitido elaborar un método para separar por filtración en gel a los péptidos que contienen ambos -- puentes S-S.

Esta técnica combinada con el uso de sulfito marcado con ³⁵S permite estudiar la localización del puente que se sulfitoliza en cada condición experimental.

Los péptidos obtenibles por reacción de la HCB con bromuro de cianógeno están indicados en la Fig. 25 y en la Fig. 26 se muestra su separación por cromatografía en Sephadex G-25

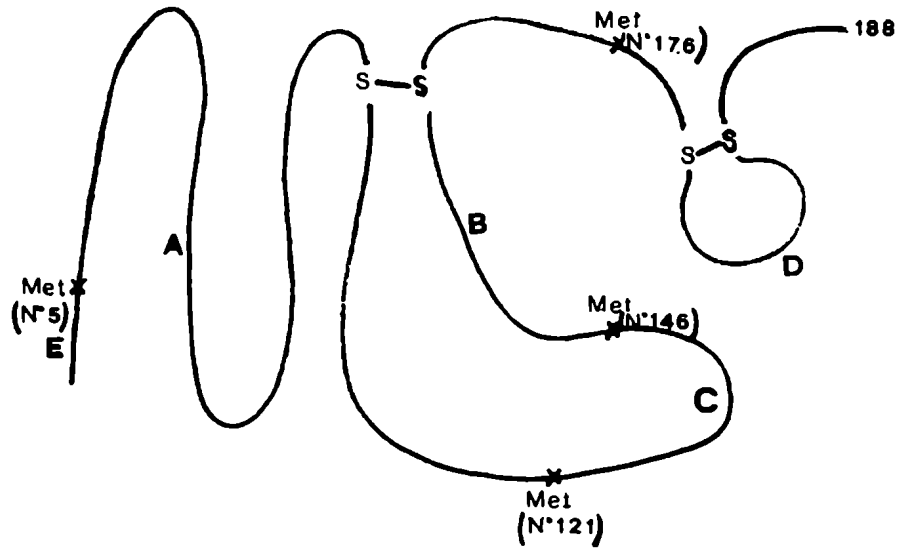


Fig. 25 : Péptidos que se originan de la HCB por reacción de sus metioninas con bromuro de cianógeno.

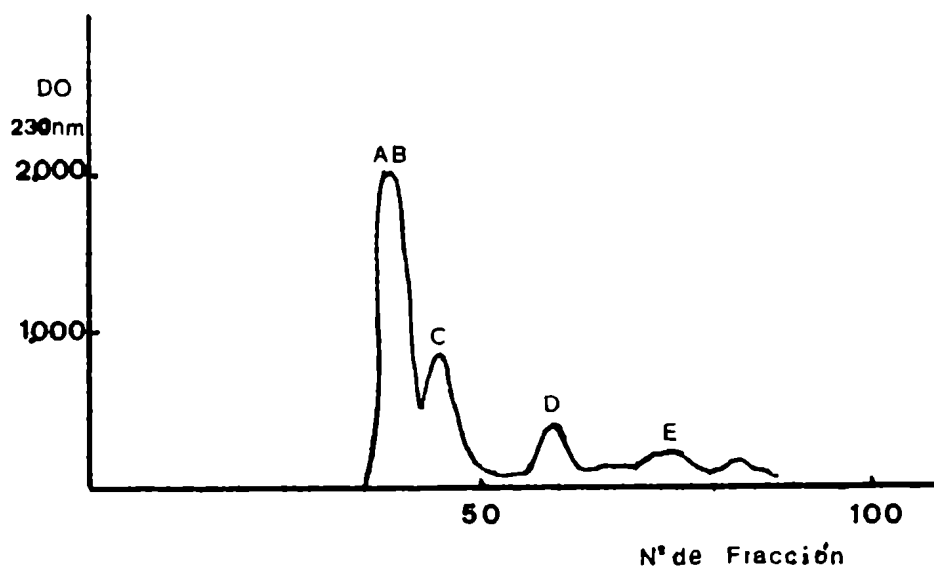


Fig.26 : Separación cromatográfica de los péptidos obtenidos por reacción de la HCB con bromuro de cianógeno. Columna de Sephadex G-25 de 1.5 cm x 140 cm; eluyente: ácido acético 1M. Flujo: 5 ml/hora. Volúmen de cada fracción: 1 ml.

Los péptidos A y B se eluyen juntos, seguramente -- por estar ligados por uniones no covalentes, aún después de reducción y carbamidometilación, sin embargo el péptido D, que contiene el puente S-S cercano al extremo--- C-terminal de la molécula, se eluye bien separado de aquellos.

Como un paso previo a la utilización de sulfito de sodio marcado se estudió el progreso de la reacción en función de la concentración de sulfito en el medio. El Cuadro XII reúne los resultados obtenidos.

CUADRO XII
GRADO DE SULFITOLISIS DE LA HCB EN DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Medio	Conc. de HCB (M)	Conc. final de ICH ₂ CONH ₂ (M) [†]	Conc. de Na ₂ SO ₃ (M)	Relación Na ₂ SO ₃ / HCB	Tiempo (min.)	CM- cisteína ^{††} HCB
	1.5 x 10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻²	0.24x10 ⁻²	16	300	0.54
Temp:	1.5 x 10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻²	0.48x10 ⁻²	32	300	0,72
ambiente	1.5 x 10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻²	0.97x10 ⁻²	65	300	0.90
0.1M TRIS	1.5 x 10 ⁻⁴	0.97x10 ⁻²	1,9 x10 ⁻²	127	300	0,96
pH9.5 ^{†††}	5.0 x 10 ⁻⁴	2.16x10 ⁻²	85 x10 ⁻²	1.700	45	0,82

+ La iodoacetamida se recristaliza cada vez que se utiliza. Se agrega 1/4 de la cantidad señalada inmediatamente antes del Na₂SO₃; el resto se añade en 3 fracciones iguales a las 1, 2 y 3 horas de reacción.

++ Valores no corregidos por pérdidas en la hidrólisis.

+++ El buffer se prepara con agua recientemente hervida y luego sometida a una corriente de N₂ durante 10 minutos. Durante la reacción se mantiene la corriente de N₂.

Tomando en consideración los resultados obtenidos-- se eligió la relación $\text{Na}_2 \text{SO}_3/\text{HCB} = 65$ para estudiar el progreso de la reacción en función del tiempo (Cuadro XIII)

CUADRO XIII

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE REACCION SOBRE EL GRADO DE SULFITOLISIS DE LA HCB

Condiciones: pH9.5 ; TRIS 0.1M; Temp: ambiente;
 $\text{Na}_2 \text{SO}_3/\text{HCB} = 65$

Tiempo horas	Relación molar: CM-cisteína/HCB
1	0.15
2	0.21
3	0.47
4	0.72
5	0.90

Del estudio del Cuadro XIII , resulta obvio que la --sulfitolisis no se ha completado en 5 horas; en las condiciones del experimento se requieren, probablemente, 7 a 8 horas para eso. No está excluido, sin embargo, que-- el valor final de CM- cisteína sea mayor que 1.0 lo cual

haría que el tiempo necesario para alcanzarlo sea aún -- mayor que el calculado.

La reacción empleando sulfito de sodio radioactivo se efectuó de la siguientes forma: 50 mg de HCB se disolvieron en 16 ml de 0.1M TRIS, pH9.5 (conc. de proteína: 1.5×10^{-4} M). Se agregó iodoacetamida hasta obtener -- una concentración 0.25×10^{-2} M y a continuación sulfito de sodio radioactivo hasta una concentración final ---- 10^{-3} M. Luego de 1 ó 2 minutos se agregó sulfito de sodio frío hasta una concentración final 10^{-2} M. A los -- 60, 120 y 180 minutos se agregaron cantidades iguales a la primera de iodoacetamida. Al término de las 5 horas-- se dializó exhaustivamente la mezcla de incubación y se liofilizó el producto. La HCB sulfitolizada se hizo ---- reaccionar con bromuro de cianógeno en la forma ya des-- cripta y los péptidos resultantes se separaron cromato-- gráficamente. El análisis del eluato de la columna de -- Sephadex G-25, realizado por medida de la radioactividad y de la absorbancia en 230 nm, se muestra en la Fig. 27 . La proporción de carboximetilcisteína en los péptidos -- AB y D, obtenida por análisis de aminoácidos sobre sus-- hidrolizados, figura en la tabla XIV (Exp.N°1). Este -- Cuadro incluye, además, la variación de la relación molar

CM-cisteína/ péptido en distintas condiciones experimentales.

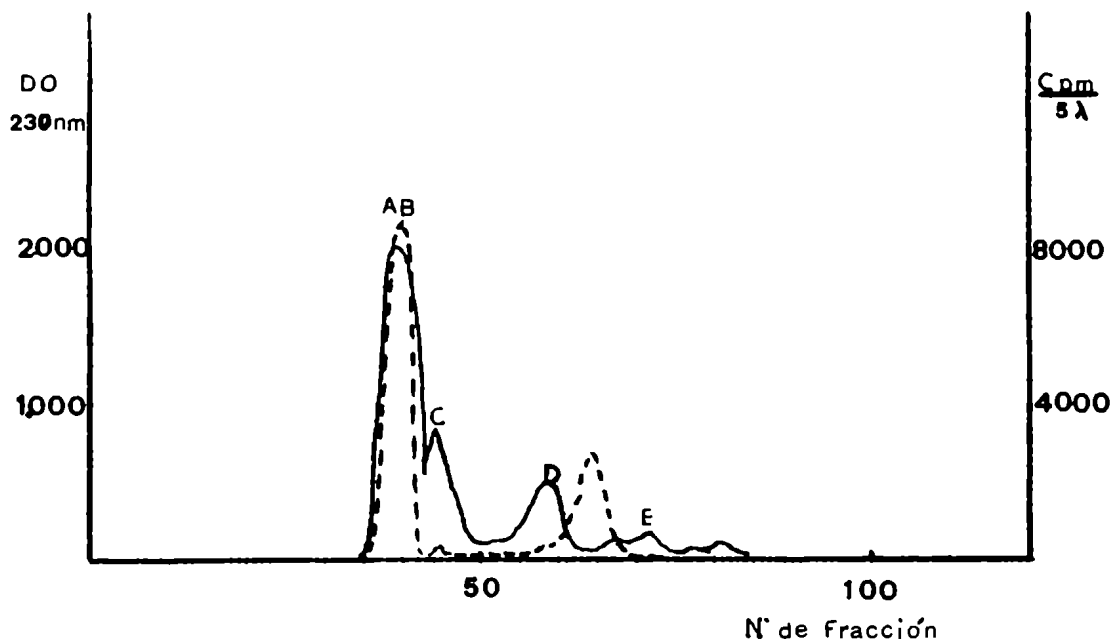


Fig.27: Gráfico de elución de los péptidos provenientes de un ataque con bromuro de cianógeno de la HCB sulfito-lizada (Expts: 1,2 ó 3,TablaXIV), filtrados a través de una columna de Sephadex G-25 de 140 cm x 1,5 cm. Eluyente: ácido acético 1M. Flujo: 5 ml/hora.
Absorbancia: en 230 nm
radioactividad en cm/5 μ l:-----
Volúmen de cada fracción: 1 ml.

TABLA XIV
SULFITOLISIS DE LA HCB EN DISTINTAS CONDICIONES EXPERIMENTALES.

Exp. N°	HCB (M)	Na ₂ SO ₃ (M)	Relac. molar Na ₂ SO ₃ /HCB	Tiempo (min)	pH	Relacion molar	
						CM-cisteína/Péptido R _B	CM-cisteína/Péptido D
1	1.5 x 10 ⁻⁴	0.98 x 10 ⁻²	65	300	9.5	0,28	0,61
2	0,5 x 10 ⁻⁴	0.33 x 10 ⁻²	65	300	9.5	0,50	0
3	5.0 x 10 ⁻⁴	85 x 10 ⁻²	1.700	45	9.5	0	0,67
4 ⁺	5.0 x 10 ⁻⁴	3.3 x 10 ⁻²	65	300	9.5	0,25	1,1

⁺ Antes de agregar el sulfito de sodio se incorporó Na₂ SO₄ hasta una concentración 52 x 10⁻² M

La misma distribución de radioactividad que muestra la Fig. 27 se obtuvo en los experimentos 2 y 3 de la Tabla XIV lo cual es razonable pues antes de incorporar el total del sulfito frío las condiciones de reacción son -- comparables. En el experimento 4 el sulfito radioactivo se incorporó luego de agregar sulfato de sodio hasta lograr una concentración 52×10^{-2} M. En estas condiciones la distribución de la radioactividad fue la indicada en la Fig. 28. Resulta claro que ambos puentes se marcan

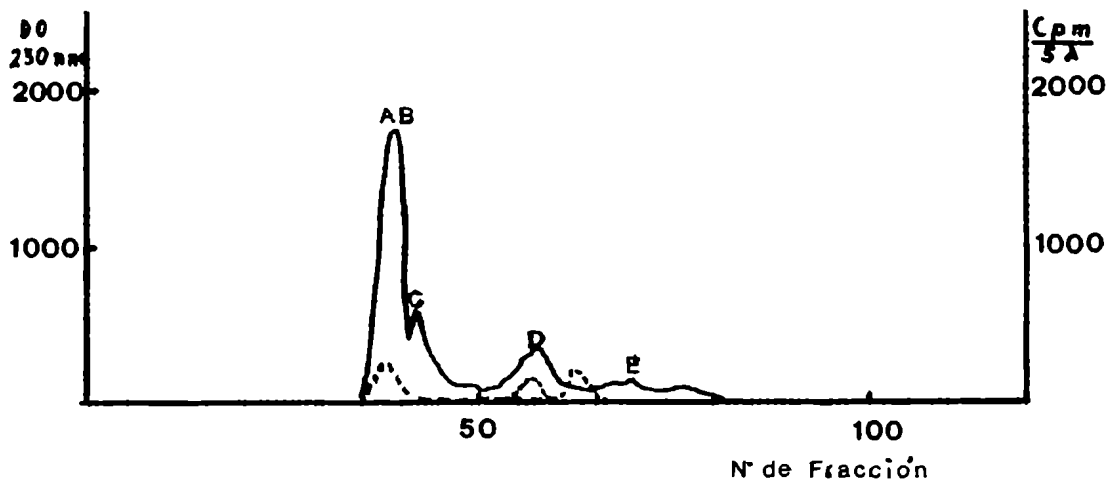


Fig.28: Gráfico de elución de los péptidos provenientes de un ataque con bromuro de cianógeno de la HCB sulfitolizada, (Exot. 4, Tabla XIV), filtrados a través de una columna de Sephadex G-25 de 140 cm x 1,5 cm. Eluyente: ácido acético 1M. Flujo: 5ml/hora. Absorbancia en 230 nm; radioactividad en cpm/5 μ l:----- Volúmen de cada fracción: 1 ml.

en forma parecida y no muy intensamente. Del conjunto de datos discutidos se puede concluir que en la HCB a pH 9-9.5 y en un medio de baja fuerza iónica (Exp. 1,2 y3) el sulfito en bajas concentraciones ataca preferentemente al puente disulfuro que une los péptidos A,B. Cuando la fuerza iónica es alta (la correspondiente a 85×10^{-2} M sulfito de sodio ó 52×10^{-2} M sulfato de sodio) la radioactividad aparece en ambos puentes (Fig. 28) en pequeña proporción; en estos dos casos cuando se incorpora la cantidad total de sulfito de sodio frío la reacción ocurre preferentemente en el puente C-terminal (Péptido D) (Tabla XIV exp. 3 y 4).

Los datos obtenidos hasta ahora pueden agruparse en una nueva tabla (Tabla XV) que pone de relieve la variación de radioactividad de cada puente según las condiciones del medio.

TABLA XV

SULFITOLISIS DE LA HCB EN DISTINTAS CONDICIONES
EXPERIMENTALES.

Tiempo de reacción (min)	Concentración de Na_2SO_3 (M)	CM-cisteína/mol de péptido	
		AB	D
1	10^{-3} †	marca intensa.	
300	$0,3 \times 10^{-2}$	0,5	0
300	$1,0 \times 10^{-2}$	0,28	0,61
45	$85,0 \times 10^{-2}$	0	0,67
300	52×10^{-2} de Na_2SO_4 + 3×10^{-2} de Na_2SO_3	0,25	1.1

† En este experimento se usó $^{35}\text{Na}_2\text{SO}_3$ en cantidad trazadora.

En forma análoga a la descrita se ha estudiado la

accesibilidad de los puentes S-S en la HCH al ataque con sulfito; los resultados figuran en la Tabla XVI

TABLA XVI
GRADO DE SULFITOLISIS DE LA HCH EN DISTINTAS

CONDICIONES EXPERIMENTALES*

Medio	Concent. de HCH (M)	Concent. final de $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$ (M)	Concent. de Na_2SO_3 (M)	Relación $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{HCH}$	Tiempo (min)	CM-cisteína/HCH
Temp:	1.5×10^{-4}	0.97×10^{-2}	0.24×10^{-2}	16	300	0.24
	1.5×10^{-4}	0.97×10^{-2}	0.48×10^{-2}	32	300	0.43
ambiente	1.5×10^{-4}	0.97×10^{-2}	0.97×10^{-2}	65	180	0.98
					300	1.10
pH 9.5	1.5×10^{-4}	0.97×10^{-2}	1.9×10^{-2}	127	300	1.0

* Ver detalle de las condiciones experimentales en Tabla XII

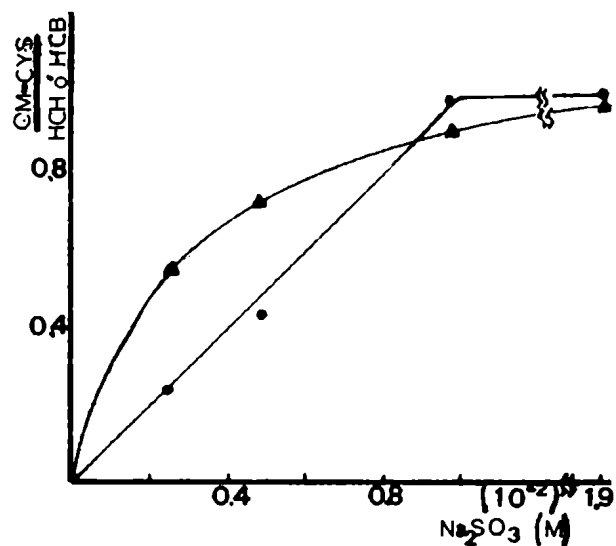


Fig.29: Progreso de la sulfitolisis de las HCB y HCH en función de la concentración de sulfito de sodio en el medio (Datos tomados de las tablas XII y XVI)

El estudio de la Fig. 29 indica que el proceso de sulfitolisis ocurre de manera diferente en cada hormona. En la de origen humano el proceso es directamente proporcional a la concentración de sulfito y se detiene cuando el equivalente a 1 puente disulfuro ha reaccionado. Esto es interpretable en términos de la apertura total de un puente determinado en la molécula. El otro sería inaccesible al reactivo.

En la hormona bovina el proceso es complejo y depende, además de la concentración de sulfito, por lo menos de otro factor que podría ser de origen conformacional. Es --

difícil establecer cual es el máximo de CM-cisteína producido en estas condiciones, siendo probable un valor superior a 1.

De acuerdo con todos los datos presentados, en la HCB se sulfitolizaría primero el puente AB pero a medida que aumenta la concentración de sulfito la molécula experimenta un cambio conformacional que expone progresivamente el puente D y por lo tanto se sulfitoliza. A su vez el puente AB se haría menos reactivo en la nueva conformación de la molécula. El resultado final depende de un balance de estas condiciones.

Actividad biológica de la HCH sulfitolizada:

La HCH fue sulfitolizada en la forma habitual (Relación molar $\text{Na}_2\text{SO}_3/\text{HCH} = 1700$; ver Materiales y Métodos) pero el bloqueo de los SH se realizó con ácido iodoacético, en un caso, y con iodoacetamida, en el otro. La actividad biológica de los productos resultantes se midió por aplicación del ensayo de crecimiento del cartílago tibiano en la rata (Tabla XVII).

TABLA XVII

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA HCH SULFITOLIZADA MEDIDA POR EL
CRECIMIENTO DEL CARTILAGO TIBIANO EN LA RATA.

Preparación	N° de animales	Dosis total μg	Espesor del cartílago μES	Activ. relativa %
Solución fisiológica.	4	—	107.2 ⁺ _{2.1}	0
HCH nativa	5	100	160.0 ⁺ _{4.7}	100
HCH sulfitolizada en presencia de ICH_2COOH	5	100	156.4 ⁺ _{4.1}	100
HCH sulfitolizada en presencia de $\text{ICH}_2\text{CONH}_2$	5	100	173.3 ⁺ _{6.1}	100

Los datos de la Tabla XVII indican que la actividad biológica de la HCH sulfitolizada permanece inalterada. Estos resultados no están de acuerdo con los publicados por Mills y Wilhelmi (1968) quienes hallaron, usando el ensayo del crecimiento de la rata, que la HCH sulfitolizada pierde entre el 20 y el 50% de su actividad original.

Esta discrepancia solo puede atribuirse, por el momento, a los diferentes métodos de ensayo biológico utilizados.

REDUCCION TOTAL DE LOS PUENTES S-S EN LAS HCB Y HCH

Para lograr la reducción completa de los dos puentes disulfuro en la HCB usando mercaptoetanol es necesario practicar la reacción en presencia de una concentración de urea igual o superior a 4M (Tabla XVIII)

TABLA XVIII

REDUCCION DE LA HCB POR MERCAPTOETANOL EN PRESENCIA DE -
CONCENTRACIONES CRECIENTES DE UREA.

La reacción se realizó de acuerdo a lo explicado en Materiales y Métodos. La intensidad de la reducción se mide por la proporción de carboximetilcisteína obtenida por hidrólisis ácida de la hormona tratada.

Urea M	CM cisteína (moles/mol de HCB)	Solubilidad de la HCB tratada en buffer 0.1M glicina -ácido clorhídrico, pH3.6
0	1.6	soluble
1	1.8	"
2	1.9	poco soluble
3	3.5	insoluble
4	4.2	"
6	3.8	"
8	4.0	"

Nosotros hemos logrado reducir el 40% de los puentes S-S de la HCH usando mercaptoetanol en ausencia de urea; en las mismas condiciones pero empleando como reductor -- ditiotreititol, Bewley y Li (1970), reducen los 2 puentes--

disulfuro de la molécula. La hormona reducida mantiene las características propias de la hormona nativa. Empleando las mismas condiciones de reducción que Bewley y Li (1970) (ver Materiales y Métodos) la HCB solo da origen a 2.6 moles de carboximetilcisteína por mol; este valor solo se incrementa hasta 3, 2 moles luego de 5 horas de reacción. Es esta una nueva prueba de la naturaleza más compacta (Cambiaso y col., 1971) de la molécula de la -- HCB comparada con la humana.

Los datos existentes en la literatura respecto a la influencia de la reducción total de las hormonas de crecimiento humana y bovina sobre su actividad biológica son contradictorios: Mills y Wilhelmi (1965) reducen y carboximetilan las HCB y HCH por el método de Crestfield (ver cap. Materiales y Métodos) y hallan que ambas proteínas se inactivan por el tratamiento, en cambio, Dixon y Li (1966) reducen y carboamidometilan a la HCH por el método de Anfinsen (ver Materiales y Métodos) y recuperan intacta la actividad biológica inicial.

Los diferentes resultados mencionados pueden deberse a varias causas pues las condiciones a que se somete a la proteína para su reducción son ligeramente distintas en cada caso. Las diferencias más notables son las señaladas en el Cuadro XIX .

CUADRO XIX
COMPARACION DE LOS METODOS DE ANFINSEN (1961) Y DE CREST-
FIELD (1963) PARA LA REDUCCION DE
PROTEINAS.

Etapa	Anfinsen	Crestfield
<u>Reducción:</u>		
solvente	8M urea en H ₂ O	8M urea en TRIS- Edta 0.2%.
pH	8.5(metilamina)	8.5
duración	6 horas	4 horas
<u>Bloqueo-SH</u>	iodoacetamida en 2M urea	iodoacetato de so-- dio en 8M urea.
<u>Desalificación:</u>	Filtración por: SephadexG-50 Eluyente:hidróxi- do de amonio 0.005M	Filtración por Seph. G-75 Eluyente:ácido acé- tico 50%

Para tratar de hallar la razón de la discrepancia men--
cionada se preparó en primer término, HCH reducida por -
cada uno de los dos métodos y se determinó su actividad-
biológica (Cuadro XX). Es de hacer notar que la proteína
reducida y carbamidometilada (Anfinsen) es totalmente --

soluble en agua a pH 9.2 mientras que la preparación carboximetilada (Crestfield) es difícilmente soluble en esas condiciones.

CUADRO XX

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA HCH REDUCIDA Y BLOQUEADA POR --
LOS METODOS DE ANFENSEN (1961) O CRESTFIELD (1963) MEDIDA
POR EL CRECIMIENTO DEL CARTILAGO TIBIANO EN LA RATA.

Muestra	N° ratas	Dosis total (μg)	Espesor del cartílago μ_{\pm} ES	Act. relativa.
Solución fisiológica	3	0	146 ⁺ ₋ 15	
HCH nativa	6	50	206 ⁺ ₋ 5	100
HCH nativa	5	100	225 ⁺ ₋ 12	100
HCH-RCAM (Anfinsen)	5	100	218 ⁺ ₋ 11	85
HCH-RCM (Crestfield)	7	100	166 ⁺ ₋ 15	11

Los resultados de este experimento confirman lo hallado por Mills y Wilhelmi (1965) y Dixon y Li (1966), -- aunque se comprueba una cierta actividad biológica remanente en la hormona reducida y carboximetilada.

A continuación se preparó HCH-RCM por el método de Anfinsen pero utilizando iodoacetato de sodio para bloquear la hormona reducida. El primer efecto detectado, debido a este cambio, fue la precipitación de aproximadamente el 50% de la proteína en esta etapa. Se eliminó este material por centrifugación y se continuó el experimento con la proteína en solución. El análisis de aminoácidos indicó reducción y carboximetilación completa pero la cromatografía en Sephadex G-100 (Fig. 30, B) señaló la existencia de una proteína fuertemente agregada y heterogénea. El resultado

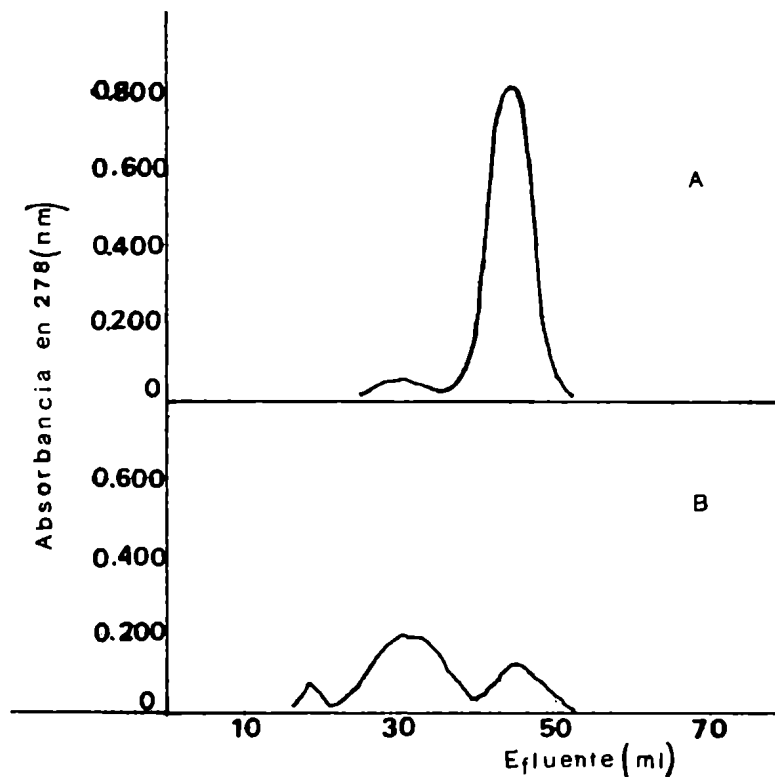


Fig. 3a: Cromatografía en columna de Sephadex G-100 (60 x 1 cm) de HCH-RCM. Eluída con bicarbonato de amonio, 0.01M pH 7.5. Flujo 10ml/hora. Volúmen de cada tubo 1.6ml. Lectura directa en 278 nm.
 A: HCH-RCAM
 B: HCH-RCM

del ensayo biológico de este material (Cuadro XI) certificó su carencia de actividad.

CUADRO XXIENSAYO BIOLÓGICO DE HCH-RCM POR EL MÉTODO DE CRECIMIENTO
DEL CARTILAGO TIBIANO EN LA RATA.

MUESTRA	N° de Ratas	Dosis total (µg)	Espesor del cartilago. $\mu \pm ES$	Actividad relativa %
Sol. Fisiológica.	3	0	125 ⁺ ₉	--
HCH nativa	6	40	200 ⁺ ₃	100
HCH nativa	7	80	217 ⁺ ₄	100
HCH-RCM	7	80	118 ⁺ ₅	0

Se realizó, además, el siguiente control: la HCH fue sometida al procedimiento de Anfinsen, modificado por el reemplazo de la iodoacetamida por iodoacetato de sodio, en ausencia de mercaptoetanol. De esta manera se pretendió detectar una posible acción del iodoacetato en otros puntos de la molécula distintos de los puentes S-S. Se observó que la proteína no precipita por agregado del --- reactivo bloqueante y que el material recuperado retiene el total de la actividad biológica original (Cuadro XXI).

CUADRO X X II

ENSAYO BIOLÓGICO POR EL MÉTODO DEL CRECIMIENTO DEL CARTI-
LAGO TIBIANO EN LA RATA DE HCH TRATADA POR IODOACETATO--
SIGUIENDO EL PROCEDIMIENTO DE ANFINSEN, EN AUSENCIA DEL--
REDUCTOR.

Muestra	N° de ratas	Dosis total (µg)	Espesor del cartilago. (µ ± ES)	Actividad relativa %
Sol. fisiológica.	6	0	120 ⁺ ₋ 5	--
HCH nativa	7	40	170 ⁺ ₋ 8	100
HCH "	7	70	186 ⁺ ₋ 6	100
HCH tratada	7	70	184 ⁺ ₋ 4	100

De los experimentos relatados se concluye que la razón de la pérdida de actividad biológica de la HCH tratada según el método de Crestfield radica en el uso del --- iodoacetato como agente bloqueante de los-SH.

La presencia de grupos con carga negativa en las cisteí--nas altera la estabilidad de la proteína que se agrega e insolubiliza. El comportamiento de la HCB en la reducción total y bloqueo con iodoacetamida por el método de Anfin-

sen (1961) difiere significativamente del descrito para la HCH. La HCB-RCAM (3.82 residuos de CM-cisteína/mol de hormona por análisis de aminoácidos), es insoluble en--- agua, desde pH3.6 hasta 10.0; solo se disuelve en 8M --- urea o en 0.2% dodecilsulfato sódico.

La velocidad de sedimentación de este material disuelto en buffer 0.1 M glicina-hidróxido de sodio, 0,2% dodecilsulfato sódico, pH 9.4 es inferior a la de la HCB nativa: los $S_{20,w}^{1\%}$ son: 2.18 y 2.56, respectivamente.

La actividad biológica de la HCB-RCAM es baja (Cuadro -- XXIII).

CUADRO XXIIIENSAYO BIOLÓGICO DE LA HCB-RCAM POR EL METODO DEL CRECIMIENTO DEL CARTILAGO TIBIANO EN LA RATA.

Muestra	N° ratas	Dosis total (µg)	Espesor del cartilago (µ ± ES)	Actividad relativa %
Sol. fisiológica	6	0	103 ⁺ ₋ 8	0
HCB nativa	6	40	133 ⁺ ₋ 5	100
HCB "	7	70	145 ⁺ ₋ 4	100
HCB "	7	100	196 ⁺ ₋ 11	100
HCB-RCAM	6	100	122 ⁺ ₋ 8	34

lo cual constituye otra diferencia significativa con la HCB-RCAM cuya actividad biológica es igual a la de la -- hormona nativa.

Apertura gradual de los puentes S-S en la HCB y su repercusión en la conformación de la molécula:

La HCB totalmente reducida y carbamidometilada es-- insoluble, de modo que para poder realizar el estudio e-- nunciado en el título se recurrió a trabajar con el de--

rivado maleinizado de la hormona, el cual es soluble.

La apertura del 50% de los puentes S-S se realizó por sulfitolisis de la manera ya descrita. Este derivado, a su vez, fué sometido al procedimiento de Anfinsen, para lograr su reducción total.

La Fig. 31 muestra el comportamiento de estos compuestos en la diálisis analítica. Se advierte claramente la expansión gradual de la molécula por efecto de la ruptura progresiva de los puentes S-S.

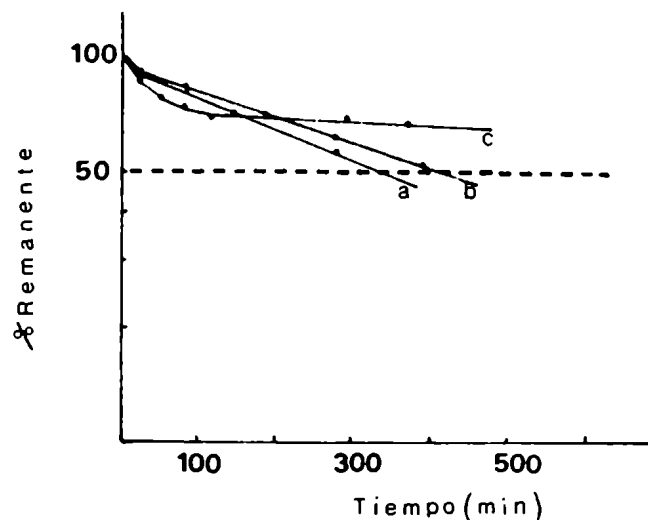


Fig. 31: Comportamiento en la diálisis analítica de HCB maleinizada (a), idem sulfitolizada (b) y finalmente, este último derivado sometido al método de Anfinsen de reducción total.

REDUCCION TOTAL DE LOS PUENTES -S-S Y SU REOXIDACION:

Recuperación de las propiedades nativas de la molécula.

El mecanismo de síntesis de las proteínas indica -- que la cistina no se incorpora como tal en la cadena polipeptídica: no existe un triplete de bases que codifi-- que este aminoácido. La cisteína, en cambio, se compor-- ta como cualquier otro aminoácido y aparece en la secuen-- cia cuando así lo establece la estructura del RNA mensa-- jero correspondiente. La cistina, o los puentes S-S se-- originan a posteriori de la síntesis de la cadena poli-- pentídica.

El problema que significa la formación de los puen-- tes S-S está ligado al del establecimiento de las es-- tructuras 2a. y 3a. en las proteínas. Los trabajos de -- White (1960), Anfinsen (1961), Kolthoff(1960), Goldber-- ger y Epstein (1963), Dixon y Wardlaw (1960), etc. han - permitido establecer en base firme la teoría según la - cual la secuencia particular de aminoácidos es la que - condiciona la configuración termodinámicamente más esta-- ble que adoptará la proteína nativa. Esta configuración se consolida por la formación de puentes S-S entre cis-

teínas espacialmente próximas. De esto resulta que los puentes S-S son una consecuencia y no una causa en el origen de la conformación nativa.

Los experimentos mencionados antes consistieron en la reducción química de los puentes S-S en la proteína y su oxidación posterior al aire. En el caso de la ribonucleasa (Anfinsen y col, 1961) la reducción en 8M urea, desorganiza e inactiva a la enzima pero la reoxidación restablece, con alto rendimiento, la actividad enzimática y la conformación nativa.

En la seroalbúmina fue posible reducir hasta 17 puentes S-S y luego restablecer las condiciones nativas por reoxidación en solución diluida.

Este tipo de experimentos ha podido hacerse también con otras proteínas tales como pepsinógeno (Frattali y col, 1963), taka-amilasa A (Isemura y col, 1963), γ -globulina (Freedman y col, 1966) lisozima (Goldberger y col, 1963), tripsina (Epstein y col, 1962), enterotoxina B (Wood y col, 1966) inhibidor triptico de soja (Steiner y col, 1965) etc.

Dixon y col (1960) separaron las cadenas A y B de insulina por sulfitólisis en presencia de un agente oxidante. Las cadenas, obtenidas como S-sulfonatos, se convierten en sus formas reducidas por tratamiento con -----

un reactivo tiol. Finalmente regeneran la insulina nativa por oxidación al aire de las cadenas reducidas. Sin embargo el rendimiento observado fue de aproximadamente 1 a 2% del valor teórico.

A raíz de estos trabajos se pensó que la estructura nativa de la insulina se debe a que ella se origina a partir de un precursor de cadena simple similar al descrito en el caso de la quimotripsina.

Recientemente Steiner y col (1967) hallaron dicho precursor.

Sin embargo Katsoyannis y col (1966) lograron reoxidar las cadenas separadas de insulina con alto rendimiento de hormona nativa. Estos autores sugieren que las 2 cadenas contienen, en ellas mismas, la suficiente información para dirigir correctamente la formación de los puentes S-S. Resultó entonces interesante reexaminar el problema de la estabilidad de otra proteína derivada de un precursor de cadena simple, la ribonucleasa-S. Kato y col (1969) demostraron que la reactivación de la ribonucleasa-S (proteína) es dependiente de la presencia de ribonucleasa -S (péptido).

Taniuchi y col (1969) demostraron que la nucleasa esta--
filococcica, proteina desprovista de puentes S-S o de -
grupos -SH, también requiere la secuencia completa de aa
para lograr la conformación nativa.

Nosotros hemos estudiado diversas condiciones en --
las que es posible reoxidar a la HCB reducida y hemos in-
vestigado en que medida esta proteina recupera sus condi-
ciones nativas.

Ya hemos descripto (pag.110) que la HCB reducida en pre--
sencia de 8M urea no recupera su conformación nativa si-
se elimina progresivamente la urea, en presencia de mer-
captoetanol, a pH3.6 ó 9.2.

Analogamente, si se reoxida la HCB reducida por el méto-
do de Anfinsen, dializando la solución directamente con-
tra buffer 0.1M carbonato-bicarbonato sódico, pH9.2, se-
obtiene un material que una vez liofilizado y disuelto -
en el buffer glicina-HCl de pH3.6 tiene un escape muy --
diferente al de la hormona nativa (Fig. 32). Su análisis de
amino ácidos indica que, solo se ha

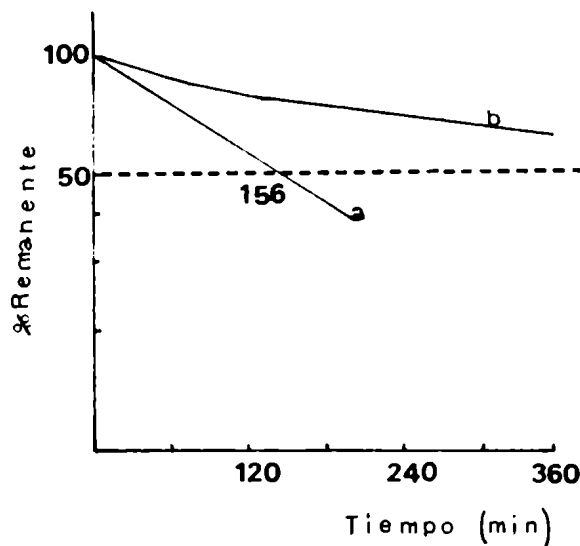


Fig.32: DIALISIS ANALITICA DE LA HCB REDUCIDA Y REOXIDADA POR DIALISIS DIRECTA A pH 9.2.

a: HCB nativa; b: HCB reducida y reoxidada; solvente: buffer 0.1M glicina ácido clorhídrico pH 3.6

reoxidado el 75% de la proteína (Cuadro XXIV). La determinación cuantitativa de aminoácidos se realiza después de someter la proteína obtenida a la acción de la iodoacetamida, según el método de carbamidometilación de Anfinsen (Ver Materiales y Métodos) en ausencia de mercaptoetanol, en cuyo caso la carbamidometilcisteína obtenida de cuenta del contenido de grupos -SH presentes.

CUADRO XXIV

ANALISIS DE AMINOACIDOS DE LA HCB REOXIDADA POR DIALISIS DIRECTA A pH9.2, POR DIA
LISIS EN PRESENCIA DE UREA 8M O POR DIALISIS CON ELIMINACION GRADUAL DE LA UREA.

AMINOACIDOS	HCB reoxidada por dialisis directa; residuos/20.800g.	HCB reoxidada en presencia de 8M urea; residuos / ---- 20.800g.	HCB reoxidada con eliminación gradual -- de la urea; resi- duos/20.800g.
Lisina	12,4	12,0	12,8
Arginina	11,8	11,5	11,2
Carboximetilcisteina	1,1	trazas	0
Acido aspártico	16,0	15,3	15,8
Treonina	10,9	9,9	-
Alanina	14,0	14,1	14,5
Valina	6,1	6,3	6,0
Leucina	23,0	22,5	22,4
Tirosina	5,3	5,0	6,0
Fenilalanina	11,5	11,5	11,5

Para ver como influye la urea en la reoxidación correcta de los puentes S-S se llevó a cabo la oxidación por una diálisis de 4 horas contra el buffer 0.1M carbonato-bicarbonato sódico, 8M urea, pH 9.2; luego se eliminó rápidamente la urea por una diálisis en contracorriente contra agua alcalinizada con amoníaco. El material liofilizado está totalmente oxidado (Cuadro XXIV) pero su comportamiento en la diálisis analítica indica una conformación no nativa (Fig.33), que puede originarse en la formación de puentes S-S no correctos.

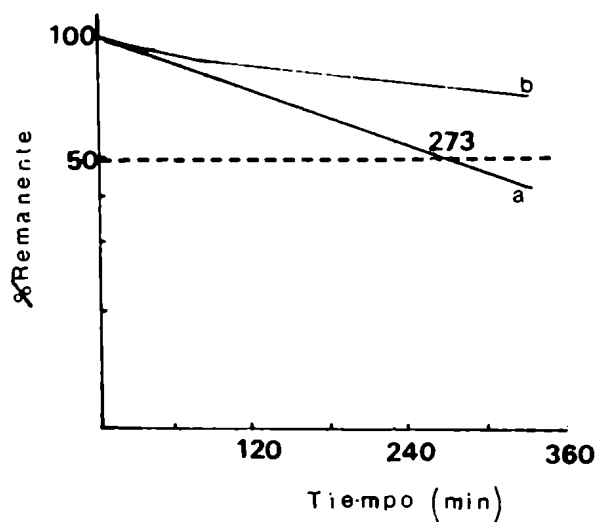


Fig.33: DIALISIS ANALITICA DE LA HCB REDUCIDA Y REOXIDADA EN PRESENCIA DE 8M UREA a pH9.2
a: HCB nativa; b: HCB reoxidada;
solvente: buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6.

Queda demostrado que tanto la presencia de urea cuanto su eliminación rápida no conducen al restablecimiento de la conformación nativa. Se probó, entonces, eliminar gradualmente la urea de acuerdo con el siguiente programa de diálisis contra buffer 0.1M carbonato-bicarbonato sódico, pH9.2, cuya concentración de urea disminuye progresivamente:

-6M urea,	30 min	de diálisis,	2 cambios	del efusato.		
-5M urea,	" "	" "	" "	" "		
-4M	" "	" "	" "	" "		
-3.5M	" 60	" "	" "	" "	4	"
-2 M	" "	" "	" "	" "	"	"
-1 M	" 30	" "	" "	" "	2	"

se continuó por una diálisis en frío contra agua destilada y se liofilizó la proteína. La concentración de HCB en la solución durante la reoxidación fue de 1mg/ml, aproximadamente.

Este tratamiento insolubiliza parte de la proteína, previamente reducida o no, de modo que es preciso estudiar separadamente las propiedades de la fracción soluble y las de la fracción insoluble.

La proteína soluble está completamente reoxidada (Cuadro XXIV) y su comportamiento en la diálisis analítica (Fig. 34) así como en el ensayo biológico (Cuadro XXV) es idéntico al de la hormona nativa.

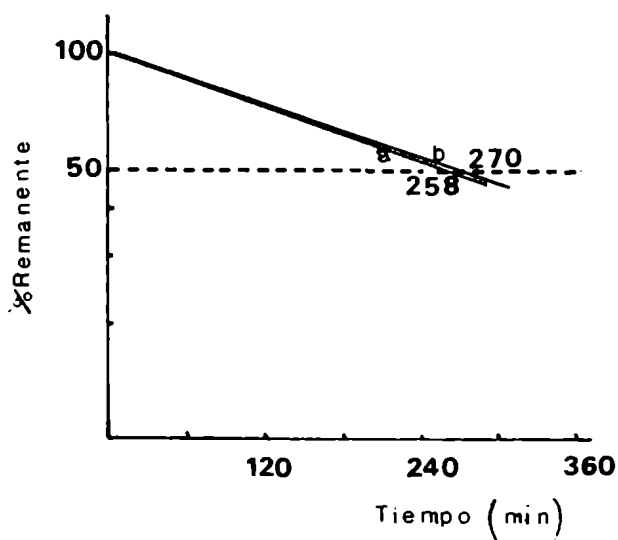


Fig. 34 DIALISIS ANALITICA DE LA HCB REOXIDADA CON ELIMINACION GRADUAL DE LA UREA A pH9.2 (fracción soluble)
 a: HCB nativa o tratada como la reoxidada pero en ausencia de mercaptoetanol. b: HCB reoxidada; solvente: buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6

CUADRO XXV

ENSAYO BIOLÓGICO DE LA HCB REOXIDADA CON ELIMINACION
GRADUAL DE LA UREA A PH 9.2 (FRACCIÓN SOLUBLE).

MUESTRA	DOSIS TOTAL (μ g)	N° DE RATAS	ESPEJOR DEL CAR TILAGO (μ) ⁺⁺	ACTIVIDAD RE- LATIVA %
Sol. Fisiol.	-----	4	125 ⁺ - 10	-----
HCB Tratada ⁺	10	4	184 ⁺ - 12	100
"	20	3	263 ⁺ - 18	100
HCB reoxidada	14	4	257 ⁺ - 20	100

+HCB Tratada como la reoxidada pero en ausencia de mercaptotanol (fracción soluble).

++ Espesor como promedio ⁺ - ES del promedio.

De acuerdo con estos datos la fracción soluble de la -- HCB reoxidada representa la hormona nativa, con puentes S-S correctos, obtenida en el proceso. En una proteína con 2 puentes S-S totalmente reducidos es posible esperar un 33% de reoxidación correcta al azar, o sea, sin una intervención orientadora atribuible a la estructura primaria de la proteína. Los valores incluidos en el cuadro XXVI señalan que la proporción de hormona reoxidada correctamente, aceptando como tal a la hormona soluble en el buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6, es muy superior a aquel valor.

CUADRO XXVI

PROPORCION DE HCB SOLUBLE EN BUFFER 0.1M GLICINA-ACIDO-
CLORHIDRICO, pH3.6 OBTENIDA EN LOS EXPERIMENTOS DE REC-
XIDACION.

Experimento N°	Hormona soluble ,en % de la hormona nativa inicial a partir de:		
	HCB tratada sin mercaptoetanol.	HCB reducida y reoxidada.	Rendimiento de la reoxidación %
1	78	66	85
2	58	58	100
3	64	55	86
4	87	75	86

La hormona reoxidada insoluble en el buffer de pH3.6 solo se disuelve en presencia de 8M urea ó 0,5% de dodecil sulfato sódico, por lo que parece razonable atribuir sus propiedades físicas a fenómenos de agregación y no a la formación de puentes S-S intermoleculares. Por otra parte esta interpretación está apoyada por varios hechos experimentales:

- La hormona nativa sometida al mismo tratamiento origina también un material insoluble.
- La hormona reoxidada insoluble tiene un $S_{20,w}^{1\%} = 2.1$, disuelta en buffer 0.1M glicina-hidróxido de sodio pH9.2, 0,5% dodecil sulfato sódico.

Comparando este valor con el correspondiente a la HCB

nativa en igualdad de condiciones que es $S_{20,w}^{1\%} = 1,6$ puede pensarse en la formación de agregados onliméricos o puentes S-S intermoleculares. Esta última interpretación parece poco probable pues la reducción de este material y su reoxidación en condiciones adecuadas, no permite obtener una cantidad significativa de hormona nativa. La insolubilidad de la hormona agregada parece deberse a cambios irreversibles que ocurren en la molécula durante la reoxidación. Es interesante señalar que tanto este material insoluble cuanto aquel que se obtiene por reoxidación con eliminación rápida de la urea (Fig. 32, pag 147), retienen una proporción significativa de actividad biológica (Cuadro XXVII) Este hecho puede vincularse a otros similares que indican la poca relevancia de los puentes S-S intactos en la actividad biológica (pag. 39) así como la poca influencia del estado fuertemente agregado de la HCB en las soluciones que se inyectan a los animales aun cuando en este último caso no puede descartarse una eventual disociación in vivo.

En los experimentos realizados por Hecht y col (1971) se observó que la HCB unida a partículas de Sepharosa de 40 a 190 μ de diámetro mantiene su acción lipolítica sobre preparados de células grasas (rango de diámetro: 50

a 100 μ). Teniendo en cuenta la magnitud de las partículas de Sepharosa, a las cuales la hormona se une covalentemente por lo menos en un punto, es factible suponer que la zona de la molécula que interactúa con los receptores celulares específicos es menor que el área total.

CUADRO XXVII

ENSAYO BIOLÓGICO DE LA HCB REOXIDADA

- a) con eliminación rápida de urea a pH 9.2 y
 b) fracción insoluble a pH 3.6 de la reoxidada con eliminación gradual de urea.

MUESTRA	DOSIS TOTAL (μ)	N° DE RATAS	ESPESOR DEL CAP TILAGO ($\mu \pm$ ES) [†]	ACTIVIDAD RELA TIVA %.
Sol. Fisiol.	-	4	125 [†] 10	-
HCB	20	4	139 [†] 16	100
"	40	3	183 [†] 15	100
"	60	5	239 [†] 16	100
HCB reoxidada (a)	60	5	148 [†] 13	35
HCB reoxidada (b)	60	4	194 [†] 12	58

[†] Espesor como promedio \pm ES del promedio.

ESTUDIO FISICOQUIMICO COMPARATIVO DE LAS HCB NATIVA Y
REOXIDADA.

Ya hemos señalado que la HCB nativa y la reoxidada no difieren en cuanto a su comportamiento biológico, solubilidad y diálisis analítica. A continuación vamos a describir una serie de medidas fisicoquímicas que confirman y extienden aquella similitud.

ESPECTRO ULTRAVIOLETA DIFERENCIAL: Las alteraciones conformacionales que experimenta una proteína se traducen, en determinadas circunstancias, por modificaciones en su espectro de absorción. Ello ocurre cuando cambia el entorno de la unión peptídica que absorbe normalmente entre 225 y 230 nm y es el efecto más fácilmente detectable; y cuando se altera el entorno de grupos cromóforos tales como los del triptofano, la tirosina, la cisteína y la cistina. En estos casos las alteraciones espectrales se detectan entre 245 y 290 nm. La forma más sensible para detectar estos cambios consiste en realizar espectros diferenciales: una solución de la proteína nativa se utiliza como blanco, contra el cual se lee la absorbancia de la solución de la proteína mo--

dificada. Se utiliza el mismo solvente y concentraciones idénticas de proteína en ambas soluciones. En nuestro caso utilizamos el buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6 y la concentración de 1 mg/ml de proteína; en todos los casos. Antes de comenzar las lecturas se igualan las absorbancias en 278nm de ambas soluciones, por dilución apropiada.

La sensibilidad del método puede estimarse por los resultados que se muestran en la Fig. 35 donde se detecta el cambio conformacional producido por una incubación de 24 horas a 25° de la HCB.

Este tratamiento no es detectable por diálisis analítica y no afecta la actividad biológica de la hormona (-- Dellacha y col, 1968).

La Fig. 36, análogamente, indica el cambio que experimenta la HCB sometida al tratamiento de Anfinsen, excluyendo el ~~metanol~~ etanol, y luego a la diálisis contra soluciones progresivamente diluídas de urea.

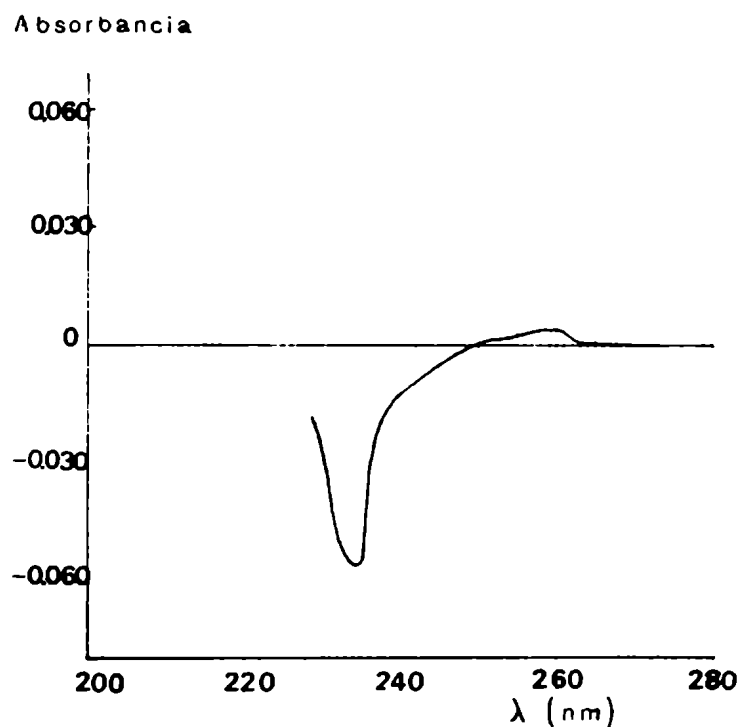


Fig. 35: Espectro diferencial de HCB disuelta en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6 y la solución mantenida 24 horas a 25°. Solución de referencia: la misma, mantenida 24 horas a 0°.

Los datos reunidos en la Fig. 35 y 36 señalan cambios -- relativamente pequeños en la conformación nativa de la HCB que afectan a la unión peptídica, en general, y probablemente al entorno de las cistinas. Seguramente se halla afectada también la absorbancia de las tirosinas-- y el triptofano pero esto no es detectable por la técnica experimental aplicada.

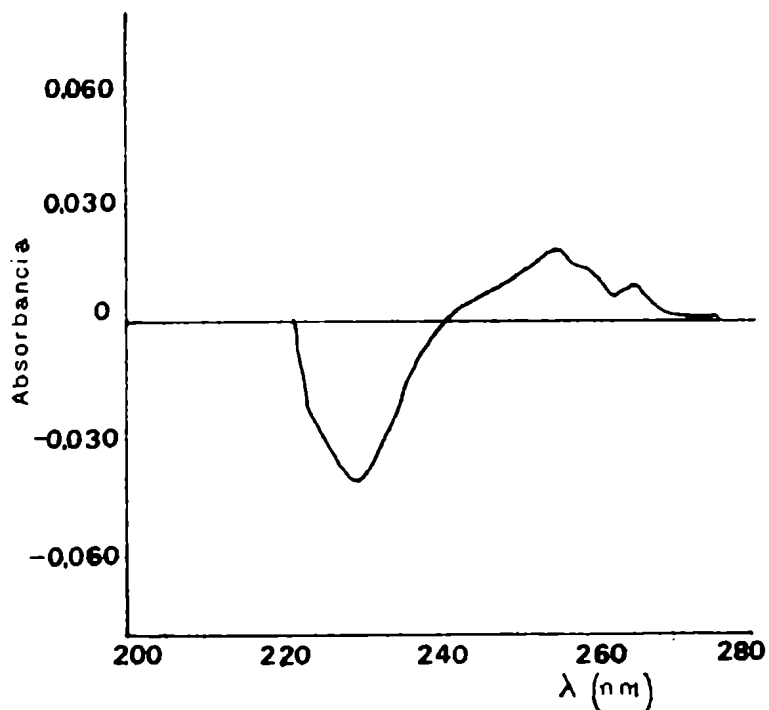


Fig. 36: Espectro diferencial de HCB tratada por el procedimiento de Anfinsen, sin mercaptoetanol y renaturalizada. Referencia: HCB nativa. Solvente: Buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6.

En la figura 37 se registran los espectros diferenciales de la HCB reoxidada y su variación en función del tiempo transcurrido desde el momento de disolución de la proteína en el buffer de pH3.6. Como proteína de referencia se utilizó la HCB sometida al mismo tratamiento de reducción y reoxidación, pero en ausencia de mercaptoetanol.

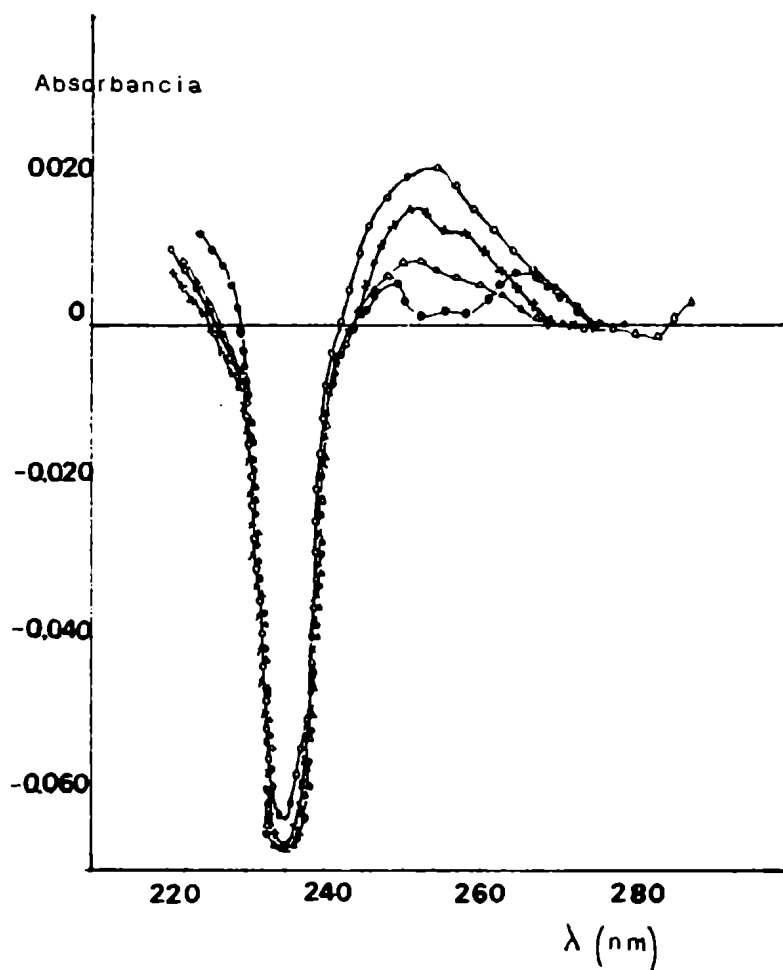


Fig.37: Espectros diferenciales de la HCB re-oxidada. La solución de referencia se preparó con hormona no reducida pero tratada en idénticas condiciones. Solvente: buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6. Determinaciones efectuadas a los siguientes tiempos después de disolución de la proteína en el buffer ($t=0-2^\circ$); 2 horas : $\circ-\circ$; 6 horas: $\times-\times$; 24 horas: $\triangle-\triangle$; 48 horas $\bullet-\bullet$

Aunque se comprueban cambios en la zona de la unión peptídica y en la de la cistina las mismas son cuali y cuantitativamente similares a los registrados en la Fig. 35 y 36 y corresponden a alteraciones relativamente menores de la conformación nativa.

INTERCAMBIO DE HIDROGENOS: La Fig. 38 muestra las curvas de intercambio hacia afuera de las hormonas nativa y reoxidada. Es evidente que el N° de hidrógenos rápidos es mayor en la hormona reoxidada lo cual indica una estructura más abierta, pero el cambio no afectó a los hidrógenos lentos, presumiblemente alojados en el núcleo de la molécula. Es probable, por lo tanto, que el cambio registrado se halle ubicado en la zona externa o superficial de la molécula.

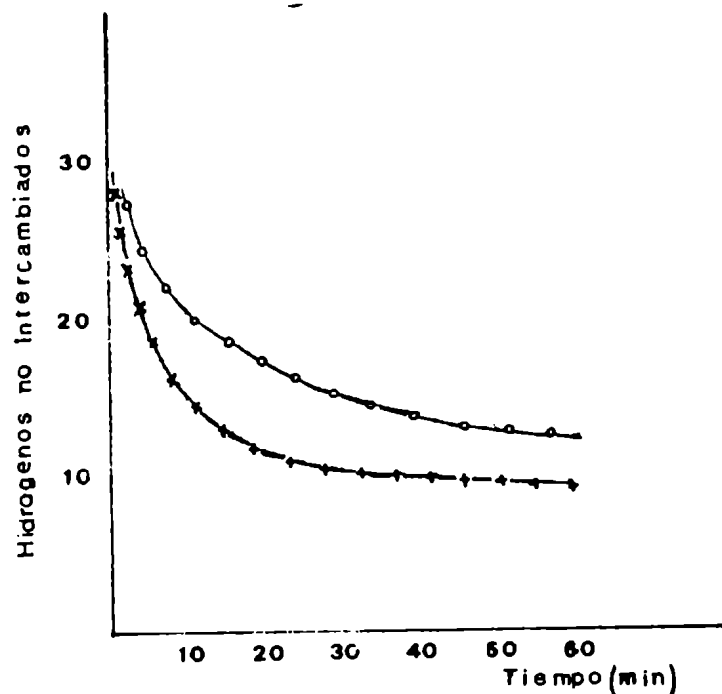


Fig. 38: Curvas de intercambio hacia afuera de las hormonas de crecimiento bovina nativa (o-o) y reoxidada (x-x). solvente: buffer glicina-ácido clorhídrico, 0.1M, pH3.6.

En el cuadro XXVIII se reúnen los datos obtenidos por diálisis analítica, medidas de viscosidad, coeficiente de sedimentación y volumen de elución en columnas de Sephadex G-100. De todos estos parámetros solo la diálisis detecta cambios ligeros de conformación, de magnitud similar a hallados por espectroscopia diferencial. La movilidad electroforética en un gel de poliacrilamida (Fig. 39) no cambia por la reducción y reoxidación.

CUADRO XXVIII

MEDIDAS FISICOQUIMICAS COMPARATIVAS OBTENIDAS CON HCB -
NATIVA, REOXIDADA Y NO REDUCIDA PERO TRATADA EN IDENTI--
CAS CONDICIONES A LA REOXIDADA. SOLVENTE: 0.1M GLICINA -
ACIDO CLORHIDRICO pH 3.6. TEMPERATURA : 20°.

MEDIDA	HCB		
	NATIVA	TRATADA	REOXIDADA
Diálisis ana- lítica. t 1/2 (min)	273	270	280
Viscosidad in- trínseca. (ml/g)	3.3	3.3	3.2
Cromatografía en Sephadex G- 100. Vol. elución (ml)	28	-	28
Coefficiente de sedimentación. (S _w ^{1%} , 20)	2.3	-	2.3

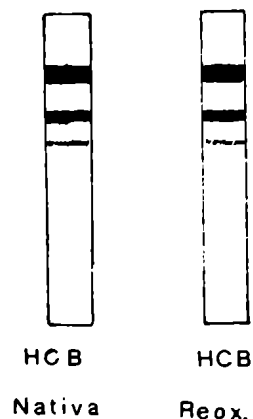


Fig. 39: Electroforesis en gel de poliacrilamida de HCB nativa y reoxidada, pH 8.6; a 20° (Ornstein y col 1962).

ESPECTRO DE FLUORESCENCIA: La Fig. 40 muestra el espectro de fluorescencia de la HCB nativa y de la reoxidada, disueltas en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH 3.6. Ambas muestras se excitan con luz de 270nm. La respuesta de --- ambas proteínas es muy similar: la posición de los máximos de emisión coincide y el rendimiento cuántico es el mismo: 0.040 y 0.038, respectivamente.

Cuando el mismo experimento se repite utilizando luz -- excitadora de 280nm y 295 nm (Fig. 41), los máximos del espectro no varían su posición con respecto a los obtenidos excitando con luz de 270nm. Esto indica que la ---

fluorescencia que se mide proviene en su totalidad del triptofano. El máximo de emisión de este aminoácido se halla en 350 nm cuando está libre mientras que en el seno de la proteína se corre a 327 nm lo cual indica su ubicación en un entorno no polar.

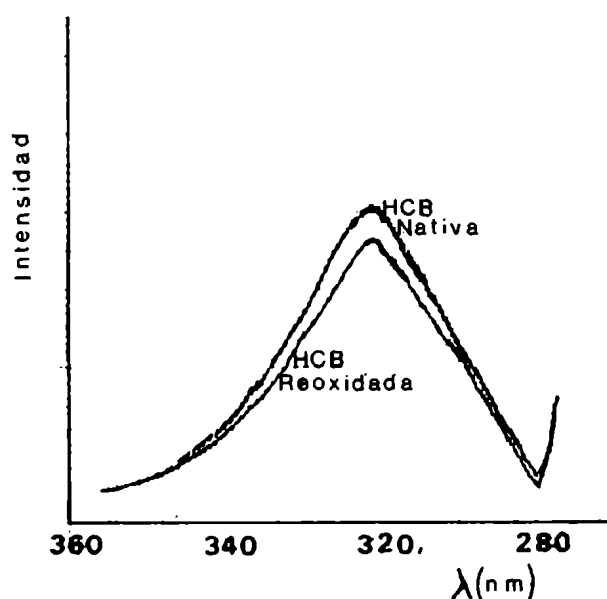


Fig.40: Espectros de fluorescencia de HCB nativa y reoxidada excitadas con luz de 270 nm. Solvente: buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6.

Otra indicación de la similitud conformacional existente entre las HCB nativa y reoxidada es provista por los experimentos realizados a pH2.4, en los que se calculó que el rendimiento cuántico de ambas proteínas fue de 0.12 y 0.11, respectivamente. Esta coincidencia señala

que el cambio conformacional, que es sabido que ocurre en la hormona nativa en este pH (Dellacha y col, 1968), también ocurre en la reoxidada y tiene las mismas características.

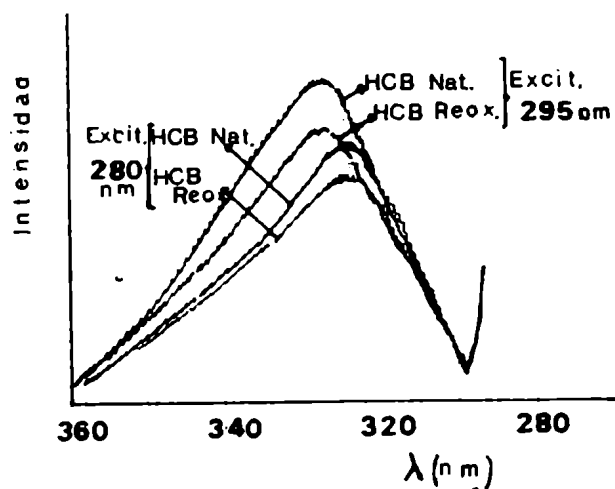


Fig. 4: Espectros de fluorescencia de HCB nativa y reoxidada excitada con luz de 280 y 295 nm. Solvente: buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico pH 3.6

En la Fig. 42 se muestran los espectros de emisión de la HCB reoxidada y de la HCB reducida y carboximetilada. El rendimiento cuántico observado fue 0.038 y 0.066, --- respectivamente.

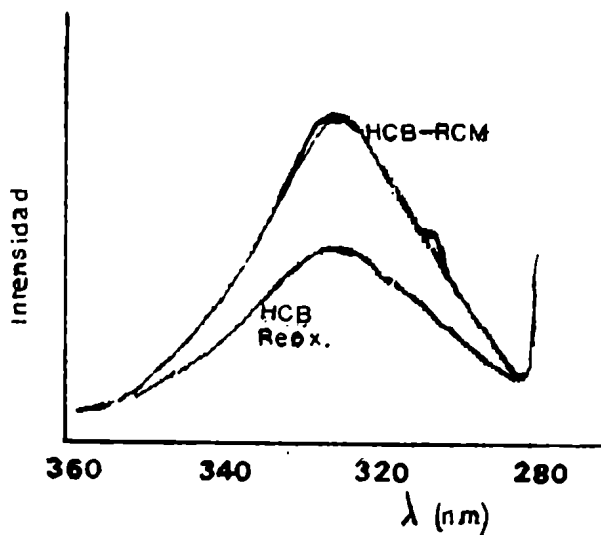


Fig.42 Espectros de fluorescencia de la HCB reoxidada y de la HCB-RCM disueltos en buffer 0.1M glicina-ácido clorhídrico, pH3.6.

Además se registra un corrimiento de 3nm del máximo en el espectro de la HCB-RCM y la aparición de un "hombro" en 305 nm. De estos datos se deduce que la reducción y carboximetilación desorganiza la conformación nativa --- substancialmente más que la reoxidación. Una apreciación de la magnitud de los cambios registrados puede tenerse comparándolos con los observados en la HCB disuelta en 5M clorhidrato de guanidina, a pH2.4. En estas condiciones (Fig.43) el máximo de triptofano se halla en 350nm, correspondiente al cromoforo en un medio polar y se nota un pequeño máximo en 308 nm que señala la contribución de las tirosinas. Es esta una situación extrema en la -

que la proteína muy probablemente adopta la forma de un ovillo estadístico.

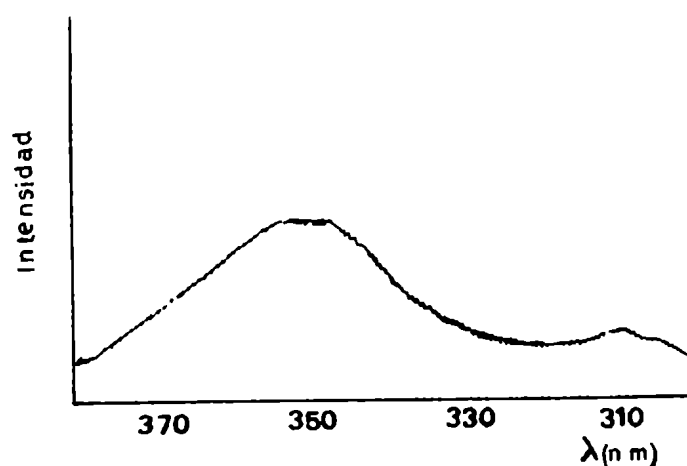


Fig.43: Espectro de fluorescencia de la HCB disuelta en 5M clorhidrato de guanidina, pH2.4.

DETERMINACIONES QUIMICAS: Ya hemos señalado (pag.148) que - por análisis de aminoácidos se observa una identidad total entre las HCB "tratada" y reoxidada, así como se comprueba que la reoxidación es completa.

Los aminoácidos N-terminales en la hormona reoxidada son los habituales Ala y Phe.

Los resultados de la aplicación de la técnica del fingerprinting a las hormonas nativa, reoxidada y reoxidada con eliminación rápida de la urea (Fig. 44), indican ---

una casi identidad entre las dos primeras, en cambio la tercera da origen a 4 péptidos nuevos que solo pueden atribuirse a un ataque diferencial de la tripsina debido a una conformación diferente ó a la existencia de puentes S-S incorrectos.

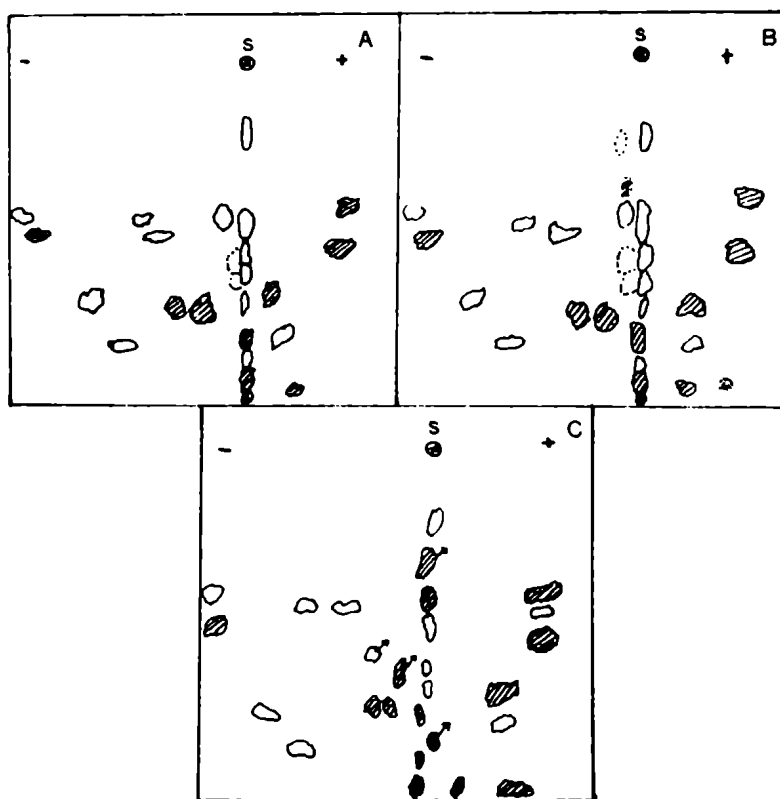


Fig. 44: Fingerprintings obtenidos con HCB nativa (A), reoxidada (B) y reoxidada con eliminación rápida de la urea (C).
 ▨ péptidos que reaccionaron con el reactivo de argininas (Sakaguchi)
 ↗ péptidos que se obtuvieron solo en el caso C.

IV CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) La modificación de la conformación nativa por efecto de la liofilización es revertida por incubación a pH 3.6 durante 12 horas a 0°C.
- 2) No hay correlación entre la modificación conformacional, evidenciada por diálisis analítica, y la alteración de la función biológica cuando se somete la hormona a -- diferentes tratamientos alcalinos. Estos cambios no son reversibles. Sin embargo la situación es diferente cuando el tratamiento con alcali se realiza en presencia de una solución 8M de urea. En este caso el cambio es totalmente reversible.
- 3) Concentraciones crecientes de urea en solución de pH 3.6 ó 8.5 desorganizan progresivamente la molécula. Este efecto es revertido por diálisis.
- 4) Una solución 6M de clorhidrato de guanidina tiene un efecto mayor como desnaturalizante que una solución 8M de urea. Se observa que es posible revertir por diálisis el efecto de la solución 6M de clorhidrato de guanidina solo en el caso de que el tratamiento se realice en un medio de pH 7 a 7.5. Cuando se trata la hormona a pH 3.6 ó 8.5

con este desnaturalizante no se recupera la conformación nativa luego de una diálisis total.

5) El calentamiento de la hormona en solución de pH 3.6 durante 1 hora entre 20 y 40° no afecta la conformación nativa. Por encima de 40°C se producen cambios irreversibles.

6) La acetilación no modifica apreciablemente el diámetro de la molécula de la hormona bovina, medida por diálisis analítica; sin embargo la incidencia de este cambio en su función biológica puede ser muy importante.

7) La guanidinación de la HCB, en condiciones controladas, transforma 8 lisinas en homoargininas, no modifica la actividad biológica original y tampoco afecta sensiblemente sus parámetros fisicoquímicos.

8) La maleinización de aproximadamente la totalidad de las lisinas presentes en la HCB reduce la actividad biológica a un 35% de la original y modifica la conformación nativa de la proteína.

9) La polialanilación de la hormona bovina modifica aproximadamente 11 lisinas y también en este caso se destruye el 70% de la actividad biológica.

10) La hormona bovina totalmente reducida es soluble solo en presencia de un desnaturalizante y se mantiene estable por el agregado de mercaptoetanol. Las medidas de la viscosidad de estas soluciones ponen de manifiesto una alta desorganización, muy superior a la que se observa con la hormona nativa sometida al mismo desnaturalizante.

11) La sulfitolisis de la HCB origina una molécula totalmente activa y con mínima alteración conformacional. En las condiciones empleadas en la sulfitolisis (Na_2SO_3 en exceso 1700 molar sobre la proteína) se comprueba un ataque preferencial sobre el puente disulfuro del extremo C-terminal de la molécula. Sin embargo, experimentos realizados con $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_3$, utilizado en concentraciones trazadoras, indican que la hormona nativa disuelta en solución 0.1M TRIS tiene un puente disulfuro, el cercano al extremo N-terminal, más expuesto al ataque del reactivo.

12) La reducción total y bloqueo de los 2 puentes disulfuro de la HCB se logra solo cuando está presente en el medio una concentración 4M de urea, obteniéndose un material inactivo biológicamente e insoluble en ausencia del desnaturalizante. En el caso de la HCH la situación es -

diferente y se comprueba que la hormona totalmente reducida y bloqueada con iodoacetamida aunque no con ácido iodoacético, es soluble y retiene la totalidad de su actividad original.

También se consigue la reducción total de la HCH con di-tiotreitol en ausencia de un desnaturalizante.

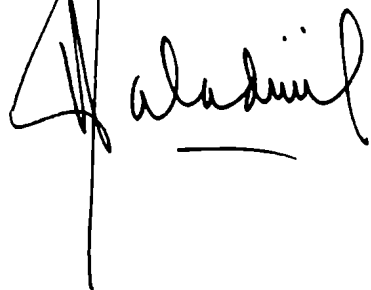
13) Por reducción total de la HCB maleinizada se obtiene un material soluble a pH alcalino, cuyo estudio y comparación con hormona maleinizada y con hormona maleinizada y reducida en un solo puente indica claramente la progresiva apertura que sufre la molécula al reducirse los dos puentes disulfuros.

14) La recuperación en proporción estadísticamente significativa de la conformación nativa de la HCB a partir de un estado de gran desorganización, tal como el que causa una solución 8M de urea sobre la hormona reducida, nos permite postular la existencia de fuerzas no covalentes, vinculadas a una determinada estructura primaria, capaces de orientar la formación correcta de las estructuras 2° y 3°.

La similitud estructural entre las hormonas nativa y reoxidada se verifica por estudios fisicoquímicos y químicos.

Se observan pequeñas discrepancias en los espectros ultravioleta diferenciales, pero de un orden de magnitud similar a las que aparece cuando se somete a la hormona bovina nativa a tratamientos similares.

Las diferencias que se observan en las medidas de intercambio de hidrógenos se atribuyen a pequeñas alteraciones en la molécula.

A. Aladino

V BIBLIOSRAFIA

- Anfinsen, C.B. y Haber, E. (1961). J. Biol. Chem. 236, 1361.
- Beck, J.C., Mc.Garry, E.E., Dyrenfurth, I. y Venning, E.H. (1957). Science, 125, 884.
- Becker, R.R. y Stahmann, M.A. (1953). J. Biol. Chem. 204, 745.
- Bender, M.L., Kézdy, F.J. y Gunter, C.R. (1964) J. Am. Chem. Soc. 86, 3714.
- Bewley, T.A., Brovetto-Cruz, J. y Li, C.H. (1969) Biochemistry, 8, 4701.
- Bewley, T.A. y Li, C.H. (1970). Arch. Biochem. Biophys., 138, 338.
- Blake, C.C.F., Mair, G.A., North, A.C.T., Phillips, D.C. y Sarma, U.R. (1967). Proc. Roy. Soc. (London) 8 167, 365.
- Blow, D.M., Birktoft, J.J. y Hartley, B.S. (1969) Nature , 221, 337.
- Brown, R.K. (1963) Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 754.
- Butler, P.J.S., Harris, J.I. y Hartley, B.S. (1967) Biochem J. 103, 78P.
- Cambiaso, C.L., Retegui, L.A., Santome, J.A., Dellacha, J. M. y Paladini, A.C. (1970). Biochim. Biophys. Acta 221, 290.
- Chance, R.E., Ellis, R.M. y Bromer, W.W. (1968) Science-- 161, 165.
- Clayton, B.E. y Worden, J.M. (1960) J. Endocrinol. 20, -- 36.
- Craig, L.C., Alexander, P. y Block, R.J. (1960). A Laboratory Manual of Analytical Methods of Protein Chemistry, Vol. 1, Pergamon Press, New York, p 104.
- Craig, L.C. y Konigsberg, W.J. (1961). J. Phys. Chem. 65, - 166.

- Craig, L.C. y Stewart, K. (1965). *Biochemistry* 4, 2512.
- Crestfield, A.M., Moore, S. y Stein, W.H. (1963). *J. Biol. Chem.* 238, 622.
- Crestfield, A.M., Stein, W.H. y Moore, S. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 2413, 2421.
- Cunningham, L. (1965). *Comprehensive Biochemistry* (M. Florin y E.H. Stotz, eds) Vol. 16, Chapt. 3 Elsevier, Amsterdam y New York.
- Cushing, H. (1912). *The Pituitary Body and its Disorders. Clinical States produced by Disorders of the Hypophysis. Cerebri.* J.B. Lippincott Co. Philadelphia.
- Dellacha, J.M., Enero, M.A. y Faiferman, I (1966) *Experientia*, 22, 16.
- Dellacha, J.M., Enero, M.A. y Paladini, A.C. (1968) --- *Biochim. Biophys Acta.* 168, 99.
- Dellacha, J.M. y Sonenberg, M. (1964). *J. Biol. Chem.* 239 -- 1515.
- Dixon, G.H. y Wardlaw, A.C. (1960). *Nature*, 188, 721.
- Dixon, J.S. y Li, C.H. (1961). *Gen. comp. Endocrinol* 1, 161.
- Dixon, J.S. y Li, C.H. (1966) *Science*, 154. 785.
- Edelhoeh, H., Condliffe, P.G., Lippoldt, R.E. y Burger, H.G. (1966). *J. Biol. Chem.* 241, 5205.
- Ellis, G.J., Marler, E., Chen, H.C. y Wilhelmi, A.E. (1966) *Federation Proc.* 25, 348.
- Ellis, S., Grindeland, R.E., Nuenke, J.M. y Callahan, P.X. (1968). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 328.
- Ellis, S., Noda, G. y Simpson, M.E. (1956) *J. Biol. Chem.* 218, 115.

- Epstein, C.J. y Anfinsen, C.B. (1962). J. Biol. Chem. 237, 2175.
- Ettinger, M.J. y Hirs, C.H.W. (1968). Biochemistry, 7, 3374.
- Evans, H.M. y Long, J.A. (1921) Anat. Rec. 21, 61.
- Evans, R.L. y Saroff, H.A. (1951). J. Biol. Chem. 228, 295.
- Faiferman, I (1967) Tesis del Departamento de Química Biológica. Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.
- Faiferman, I, Burachik, M. y Dellacha, J.M. (1966) VII-- Congreso de la Asociación Latinoamericana de Ciencias Fisiológicas, Mar del Plata, Argentina (Acta Physiol. Latinoam. XVI Suppl. 1, 48.
- Fellows, R. Jr. y Rogol, A.D. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1567.
- Ferrini, V. (1964) Arch. Biochem. Biophys, 107, 126.
- Frattali, V., Steiner, R.F., Millar, D.B.S. y Edelhoch, H (1963). Nature, 199, 1186
- Free, C.A. y Sonenberg, M. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5076.
- Freedman, M.H. y Sela, M (1966). J. Biol. Chem. 241, 2383
- Fruchter, R.G. y Crestfield, A.M. (1965). J. Biol. Chem. 240, 3868
- Fruchter, R.G. y Crestfield, A.M. (1967). J. Biol. Chem. 242, 3279.
- Ganno, S., Hatano, H., Dar, K. y Hess, G.P. (1967) Proc. 7th Intern. Congr. Biochem, Tokyo. Pt. IV, p.803 (Abstr.)
- Geschwind, I.I. y Li, C.H. (1957). Biochim, Biophys.-- Acta, 25, 171.
- Givol, D., De Lorenzo, F., Goldberger, R.F. y Anfinsen, C.B. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. V.S. 53, 673.

- Slick, S. (1966) J. Clin. Endocr. 26, 374.
- Goldberger, R. F. y Epstein, C. J. (1963). J. Biol. Chem. 238: 2988.
- Gonzalez Cadavid, N. y Paladini, A. C. (1964) Analytical Biochemistry, 9, 170.
- Gosting, L. J. (1956). Advances in Protein Chemistry, Vol. XI, 430.
- Gray, W. R. y Hartley B. S. (1963) Biochem. J. 89, 59 p.
- Greenspan, F. S., Li, C. H., Simpson, M. E. y Evans, H. W. (1949) Endocrinology 45, 455.
- Hachimori, Y., Horinishi, H., Kurihara, K. y Shibata, K. --- (1964) Biochim. Biophys. Acta 93, 346.
- Hachimori, Y., Kurihara, K., Horinishi, H., Matushima, A. y Shibata, K. (1965). Biochim. Biophys. Acta 105, 167.
- Hammes, G. G. y Schummel, P. R. (1965). J. Am. Chem. Soc. 87, 4665.
- Harris, J. I. y Li, C. H. (1952) J. Am. Chem. Soc. 74, 2945.
- Hartdegen, F. J. y Rupley, J. A. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89, 1743.
- Hayashi, K., Imoto, T. y Funatsu, M. (1963) J. Biochem. --- (Tokyo) 55, 381.
- Hayashi, K., Imoto, T., Funatsu, S. y Funatsu, M. (1965) J. Biochem. (Tokyo) 58, 227.
- Hecht, J. P., Dellacha, J. M., Santome, J. A., Paladini, A. C., Sela, M. y Hurwitz, E. (1971) FEBS Letters (en prensa).
- Henrikson, R. L., Stein, N. H., Crestfield, A. M. y Moore, S. (1965) J. Biol. Chem. 240, 2921.
- Hirs, C. H. W. (1956). J. Biol. Chem 219, 611.
- Hirs, C. H. W., Halmann, M. y Kycia, J. H. (1965) Arch. Biochem. Biophys. III, 209.

- Hirsch, L.J. (1961) Diss. Abst. 22, N°5, 1688.
- Hofmann, K. (1960) Brookhaven Symposium in Biology 13, 184.
- Hofmann, K., Wells, R.D., Yajima, H. y Rosenthaler, J. (1963) y Am. Chem. Soc. 85, 1546.
- Isemura, T., Takagi, T. Maeda, V. y Yutani, K. (1963). J. Biochem. 53, 155.
- Johnson, L.N. y Phillips, D.C. (1965) Nature, 206, 761.
- Jori, G. Galiazzo, G. Marzotto, A. y Scoffone, E. (1968) J. Biol. Chem. 243, 4272.
- Katchalski, F., Sela M., Silman, H.I. y Berger, A. (1964) The Proteins (H. Neurath, ed), Vol. 2. p. 405. Academic - Press, New York.
- Kato, I. y Anfinsen, C.B. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1004.
- Katsoyannis, P.G. y Tometsko, A. (1966). Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55, 1554.
- Kezdy, F.J., Feder, J. y Bender, M.L. (1967) J. Am. Chem. Soc. 89, 1009.
- Kolthoff, I.M. Anastasi, A. y Tan, B.H. (1960) J. Am. Chem. Soc. 82, 4147.
- Korner, A. (1968) Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 408.
- Kravchenko, N.A., Kleopina, G.V. y Kaverzneva, E.D. (1964) Biochim. Biophys. Acta. 92, 412.
- Lawson, W.B. y Schramm, H.J. (1965) J. Biochemistry, 4, 377.
- Lee, M.D. (1959) Fed. Proc. 18, 271.
- Li, C.H. (1957) Advanc. Protein Chem. 12, 269.
- Li, C.H. (1962) Survey of Biological Progress, Vol. 4,

- p.93. Academic Press, New York.
- Li, C.H. (1964) Proc. 2nd. International Congress of Endocrinology, London 1192.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1944). Science, 99, 183.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1948 a) "The Hormones" (G. Pincus y K.V. Thimann, eds) Vol I, p. 631. Acad. Press, New York.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1948 b) Recent Prog. Hormone Research 3, 3.
- Li, C.H., Liu, W.K. y Dixon, J.S. (1966) J. Am. Chem. Soc. 88, 2050.
- Li, C.H. y Papcoff, H. (1953) J. Biol. Chem. 204, 391.
- Li, C.H. Papcoff, H. y Jordan, C.W. Jr (1959) Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 100, N° 1, 44.
- Li, C.H. y Pedersen, K.O. (1953). J. Biol. Chem. 201, 595.
- Li, C.H. y Starman, B. (1964) Biochim. Biophys. Acta - 86, 175.
- Markus, G.J. (1964) J. Biol. Chem. 239, 4163.
- Mills, G.L. (1953) Biochem. J. 53, 37.
- Mills, J.B. y Wilhelmi, A.E. (1965) Endocrinology, 76, 522.
- Mills, J.B. y Wilhelmi, A.E. (1968). Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 343.
- Murdock, A.L. Grist, K.L. y Hirs, C.H.W. (1966) Arch. --- Biochem. Biophys. 144, 375.
- Nicol, D.S.H.W. (1960) Biochem. J. 75, 395.
- Oikawa, A. Dellacha, J.M. y Sonenberg, M. (1967). Biochem. J. 104, 947.

- p.93. Academic Press, New York.
- Li, C.H. (1964) Proc. 2nd. International Congress of Endocrinology, London 1192.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1944). Science, 99, 183.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1948 a) "The Hormones" (G. Pincus y K.V. Thimann, eds) Vol I, p. 631. Acad. Press, New York.
- Li, C.H. y Evans, H.M. (1948 b) Recent Prog. Hormone Research 3, 3.
- Li, C.H., Liu, W.K. y Dixon, J.S. (1966) J. Am. Chem. Soc. 88, 2050.
- Li, C.H. y Papcoff, H. (1953) J. Biol. Chem. 204, 391.
- Li, C.H. Papcoff, H. y Jordan, C.W. Jr (1959) Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 100, N° 1, 44.
- Li, C.H. y Pedersen, K.O. (1953). J. Biol. Chem. 201, 595.
- Li, C.H. y Starman, B. (1964) Biochim. Biophys. Acta - 86, 175.
- Markus, G.J. (1964) J. Biol. Chem. 239, 4163.
- Mills, G.L. (1953) Biochem. J. 53, 37.
- Mills, J.B. y Wilhelmi, A.E. (1965) Endocrinology, 76, 522.
- Mills, J.B. y Wilhelmi, A.E. (1968). Ann. N.Y. Acad. Sci. 148, 343.
- Murdock, A.L. Grist, K.L. y Hirs, C.H.W. (1966) Arch. --- Biochem. Biophys. 144, 375.
- Nicol, D.S.H.W. (1960) Biochem. J. 75, 395.
- Oikawa, A. Dellacha, J.M. y Sonenberg, M. (1967). Biochem. J. 104, 947.

- Organon Laboratories Limited (1962) British patent. N° 908,743.
- Ornstein, L. y Davis, B.J. (1962) Disc. Electrophoresis, preprint distributed by Distillation Products Industries, Rochester, N.Y.
- Paladini, A.C., Dellacha, J.M. y Santomé, J.A. (1970) -- Miami Winter Symposia 1, 270. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.
- Pickering, B.T. y Li, C.H. (1964) Arch. Biochem. Biophys. 104, 119.
- Potts, J.T. Jr. Young, D.M., Anfinsen, C.B. y Sandoval, A. (1964) J. Biol. Chem. 239, 3781
- Previero, A., Coletti-Previero, M.A. y Jolles, P. (1967). J. Mol. Biol. 24, 261.
- Ray, R.D., Evans, H.M. y Becks, H. (1941) Amer. J. Path. -- 17, 509.
- Reid, E. (1951). Nature, 168, 878.
- Reisfeld, R.A., Muccilli, A.S., Williams, D.E. y Steelman, S.L. (1964) Nature (Lond) 201. 821.
- Ross, P., Felvold, H.R. y Gemzell, C.A. (1963) Biochim. Biophys. Acta 74, 525.
- Ross, C.A., Mathias, A.P. y Rabin, B.R. (1962) Biochem. J. 85, 145.
- Santome, J.A., Dellacha, J.M., Paladini, Wolfenstein, C.E. M., Peña, C., Poskus, E., Daurat, S., Sesé, Z.M., Sangüesa, V.F. y Biscoglio, M. (1969) Atlas of Protein Sequence and Structure, 4, D 159.
- Santome, J.A., Wolfenstein, C.E.M., Biscoglio, M. y Paladini, A.C. (1966). Arch. Biochem. Biophys. 116, 19.
- Schachman, H.K. (1963) Cold Spring Harbor Laboratory of Quantitative Biology, Vol. XXVIII, 409.

- Sela, M. y Arnon, R. (1967) *Methods Enzymol.* 11, 580.
- Sigler, P.B., Blow, D.M. Matthews, B.W. y Henderson, R. (1968). *J. Mol. Biol.* 35, 143.
- Smillie, L.B. y Whitaker, D.R. (1967). *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3351.
- Smith, P.E. (1930) *Amer. J. Anat.* 45, 205.
- Sonenberg, M. y Beychok, S. (1971) *Biochim. Biophys Acta* (en prensa).
- Sonenberg, M. Dellacha, J.M., Free, C.A. y Nadler, A.C. --- (1969) *J. Endocr.* 44, 255.
- Sonenberg, M., Free, C.A., Dellacha, J.M. y Nadler, A.C. (1965) VI th. Pan American Congress of Endocrinology N° 200. *Excerpta Medica International Congress Series.* 99.
- Sonenberg, M., Kikutani, M. Free, C.A., Allen, C. y Dellacha, J.M. (1968) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 148, 532.
- Spande, T.F., Green, N.M. y Witkop, B. (1966) *Biochemistry*, 5, 1926.
- Stark, G.R., Stein, W.H. y Moore, S. (1961) *J. Biol. Chem.* 236, 436.
- Steiner, D.F. y Clark, J.I. (1968) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 60, 622.
- Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. y Aten, B. (1967) *Science*, 157, 697.
- Steiner, D.F. y Cyer, P.E. (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 57, 473.
- Steiner, R.F., De Lorenzo, F. y Anfinsen, C.B. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 4648.
- Takahashi, T. Hamaguchi, K., Hayashi, K., Imoto, T. y Funatsu, M. (1965) *J. Biochem (Tokyo)* 58, 385.

- Tanford (1970) Advances in Protein Chemistry 24,43.
- Taniuchi, H. y Anfinsen, C.B. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3864.
- Tashjian, A.H. Jr., Levine, L. y Wilhelmi, A.E. (1965) Endocrinology 77, 1023.
- Vernon, C.A. (1967). Proc. Roy. Soc. (London) B 167, 389.
- Walsh, K.A. y Neurath, H. (1964) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 52, 884.
- Waxdal, M.J. y Wilcox, P.E. (1966) Federation Proc. 25, 589.
- Weber, S. y Young, L. (1964) J. Biol. Chem. 239, 1415.
- Weil, L. y Seibles, T.S. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 54, 368.
- Wilhelmi, A.E., Comunicación Personal.
- Wilhelmi, A.E. (1955) In The Hypophyseal Growth Hormone, Nature and Actions, p.55. Eds. R.W. Smith, Jr. O.H. Saebler y C.N.H. Long, Blakinston y Mc Graw-Hill, New York.
- White, F. (1960) J. Biol. Chem. 235, 383.
- Wolff, J. y Covelli, I. (1966) Biochemistry 5, 867.
- Wood, J.M., Wolin, M.J. y Wolfe, R.S. (1966) Biochemistry 5, 2381.
- Wyckoff, H.W., Hardman, K.D., Allewell, N.M., Inagami, T., Johnson, L.N. y Richards, F.M. (1967) J. Biol. Chem. 242, 3984.
- Yamasaki, N., Kikutani, N. y Sonenberg, M. (1970) Biochemistry, 9, 1107.

Agela Hartung

Aladmir