

Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias
Universidad de Barcelona

Acción del dodecilsulfato sobre la tripsina y la α -quimotripsina: II. Caracterización de combinaciones solubles

por

S. Gubert, J. Bozal y F. Calvet

(Recibido para publicar el 9 de enero de 1965)

El conocimiento detallado de las interacciones entre detergentes y proteínas puede tener valiosa utilidad en el esclarecimiento de las estructuras secundaria y terciaria de las macromoléculas protéicas, que son, precisamente, las responsables de la actividad bioquímica y de la especificidad biológica de las mismas. A dicho esclarecimiento contribuyen también ciertas técnicas basadas en la formación de complejos entre proteínas y sustancias de bajo peso molecular de estructura conocida (7) (20), que encuentran amplia aplicación en el campo de la Inmunoquímica.

En un trabajo anterior (5) estudiamos la acción precipitante ejercida por el dodecilsulfato sódico (SDS) sobre los enzimas tripsina y α -quimotripsina, logrando el aislamiento y purificación de sendas combinaciones definidas Tripsina-DS y α -Quimotripsina-DS, que contienen unos 20 y 18 mols de ion DS^- por mol de proteína, respectivamente; paralelamente se investigó la acción inhibidora ejercida por el SDS sobre la proteólisis

de la caseína catalizada por cada uno de dichos enzimas.

La formación de dichas combinaciones definidas (5) no explica, por sí sola, las acciones inhibidoras ejercidas por el SDS, sobre las actividades enzimáticas tripticas y α -quimotripticas; pero la producción de tales compuestos corre parejas con los observados por LUNDGREN (11) con la ovoalbúmina, y por PUTNAM y NEURATH (17) con la seroalbúmina: en ambos trabajos se postula la unión de cantidades discretas de los iones del detergente con la molécula proteica.

En la actualidad se admite, según LEONARD y FOSTER (9), que la interacción del SDS y la seroalbúmina responde a un mecanismo, por etapas, que entraña la formación sucesiva de compuestos con cantidades crecientes de ion DS^- . Este proceso sería responsable de la desnaturalización progresiva de la molécula proteica, como se pone de manifiesto, por ejemplo, por la aparición de grupos $-SH$ libres, después del tratamiento de la ovoalbúmina con Dupo-

nol (1, 2, 13); y es también significativa la estrecha coincidencia existente entre los espectros de la ovoalbúmina desnaturalizada por el calor y la recuperada después de su tratamiento por alquilbenceno sulfonatos (14). Estos hechos experimentales confirman las primitivas teorías de WU (21) y de PAULING (15) en las que se admite que la desnaturalización es consecuencia de una distensión de las cadenas polipeptídicas, que provoca una desorganización de la original estructura proteica, ideas que parecen confirmarse con los trabajos de FOSTER y AOKI (4).

En el presente trabajo se continúa el estudio de las interacciones entre el SDS y los enzimas tripsina y α -quimotripsina, proteínas que, debido a su sensibilidad característica, muestran claramente cualquier alteración inducida en su estructura.

Hemos podido comprobar la formación de diversas combinaciones solubles DS-Proteína, de composición más o menos definida, que se producen al disolverse en exceso de SDS las combinaciones estequiométricas insolubles; operando a pH superiores al del punto isoeléctrico de los enzimas, no se observa precipitación alguna por adición de SDS a las disoluciones proteicas, porque hay formación directa de las combinaciones solubles. La caracterización de estas combinaciones solubles DS-Proteína se ha llevado a cabo por determinación de los incrementos de viscosidad de las disoluciones y mediante estudios electroforéticos. La formación de tales combinaciones, en las que la molécula enzimática ha sufrido sensibles alteraciones estructurales, y en las que los centros activos de los enzimas se hallan más o menos bloqueados, explicaría las acciones inhibitoras ejercidas por el ion DS^- sobre ambos enzimas proteolíticos. Se ha podido comprobar también la influencia del pH , de la concentración salina del medio y del tiempo de contacto entre el SDS y la proteína,

sobre la estabilidad y la formación de dichas combinaciones solubles y, por consiguiente, sobre las actividades proteolíticas de la tripsina y de la α -quimotripsina. Por otra parte, se ha conseguido la recuperación cuantitativa de las proteínas de este tipo de combinaciones, mediante separación cromatográfica del ion DS^- , y también por su precipitación con Ba^{++} ; se ha comprobado que la fracción proteica recuperada, que mantiene su actividad enzimática, depende cuantitativamente de cual haya sido el tiempo de contacto entre la proteína y el SDS, así como de la relación ponderal SDS/Proteína.

Material y métodos

Los enzimas empleados fueron tripsina y α -quimotripsina (ambos suministrados generosamente por Laboratorios PEVYA, Barcelona), recristalizados, dializados, y liofilizados, cuyos factores específicos de densidad óptica a $280\text{ m}\mu$ eran igual a 0,680 y 0,500 respectivamente. Sus disoluciones se preparan como se ha descrito en el Trabajo anterior (5).

Se empleó caseína como sustrato, obtenida por nosotros según DUNN (3): sus disoluciones se prepararon según (5).

El dodecilsulfato sódico empleado se recristalizó tres veces en alcohol; se prepararon disoluciones del mismo en tampón fosfatos sódicos de pH y molaridad variables (la escasa solubilidad del dodecilsulfato potásico (18) no permite el empleo de un tampón que contenga sales potásicas).

La determinación del contenido en proteína de las disoluciones se llevó a cabo por el método espectrofotométrico de KUNITZ (8) midiendo las densidades ópticas de las disoluciones a $280\text{ m}\mu$, con un espectrofotómetro Beckman D.U. y utilizando el factor de densidad óptica correspondiente. El método se aplicó tanto para la determinación de la pro-

teína recuperada mediante técnicas cromatográficas, como para el establecimiento de las actividades proteolíticas de ambas enzimas.

El número de grupos DS^- unidos a las proteínas se estableció mediante el método de KARUSH y SONENBERG (6) midiendo la coloración desarrollada en la formación del complejo cloruro de rosanilina- DS^- , extraíble por una mezcla cloroformo-acetato de etilo (1/1 en volumen).

Para la realización de las electroforesis se empleó un aparato Pheromat y papel Whatman n.º 1, en las condiciones de tiempo y voltaje que se describen en cada caso concreto. El revelado de los electrogramas se practicó desecando las tiras de papel a 70°C , y sumergiéndolas en disolución saturada de «Negro Amidon» en metanol-acético (9/1) durante 15 minutos; después se escurren y lavan con agua destilada hasta que los líquidos de lavado salgan incoloros y, finalmente, se calientan a baño maría con una disolución de ácido acético al 10 %, hasta que el fondo del papel sea blanco. La presencia de DS^- en los electrogramas se revela por exposición de los mismos a la luz ultravioleta; las manchas producen una fluorescencia blanca característica.

La recuperación de las proteínas enzimáticas de las combinaciones solubles DS -Tripsina y DS - α -Quimotripsina se ha conseguido mediante cromatografía en columna, empleando como resina cambiadora la Dietil - amino - etil - celulosa (DEAE, Whatman 50) y siguiendo las prescripciones técnicas de PETERSON y SOBER (16).

Las medidas de viscosidad de las disoluciones mezcla de SDS y de proteína se han llevado a cabo empleando un viscosímetro de Ostwald, y trabajando a la temperatura de $25 \pm 0,01^\circ \text{C}$.

Las densidades de las disoluciones, a igual temperatura, se determinaron en picnómetros de 10 ml. de capacidad.

Resultados

La caracterización de las combinaciones solubles formadas entre las proteínas y el SDS se ha logrado mediante experiencias de electroforesis sobre papel; la medida de las viscosidades de las mezclas SDS -Proteína se ha utilizado para juzgar, en cada caso, de la acción desnaturalizante provocada por el SDS sobre las correspondientes macromoléculas proteicas.

Efecto de la concentración del SDS en la viscosidad de las disoluciones de tripsina y α -quimotripsina. — Las determinaciones de viscosidad se han realizado confeccionando diversas muestras con una concentración fija de SDS y concentraciones variables de proteína. Las muestras se prepararon mezclando 10 ml. de una disolución de proteína, de concentración variable, con 1,5 ml. de una disolución de SDS (10 mg./ml.), ambas en tampón fosfatos 0,025 M, y 3,5 ml. de tampón fosfatos de la misma molaridad y pH 8,0. Las mediciones se realizaron después de treinta minutos de preparadas las mezclas. Las cifras establecidas son viscosidades relativas respecto a una disolución que contenía únicamente la correspondiente concentración de detergente (sin proteína).

En la gráfica 1 se expresan los resultados en incrementos de viscosidad ($\eta_{\text{sp}}/c = \frac{\eta - \eta_0}{c}$), de cuya observación se deduce, que la adición de SDS provoca, en ambas proteínas, un fuerte aumento de viscosidad (mayor para la tripsina que para la α -quimotripsina), que no es proporcional a las relaciones ponderales SDS /Proteína; hasta valores de 0,2 (esta relación ponderal corresponde a proporciones molares igual a 18 para la tripsina, y a 19 para la α -quimotripsina), apenas se observan aumentos de viscosidad de las disoluciones: estas cantidades relativas coinciden con las necesarias para la máxima precipitación de la tripsina y de la α -quimotripsina mediante

SDS, cuando se trabaja a pH inferiores al punto isoelectrico de ambas enzimas (5). Para relaciones ponderales D/P comprendidas entre 0,2 y 0,4, la pendiente de la curva se acentúa; a 0,2 se produce una inflexión, y otra a 0,4, manteniéndose la viscosidad prácticamente constante para relaciones superiores.

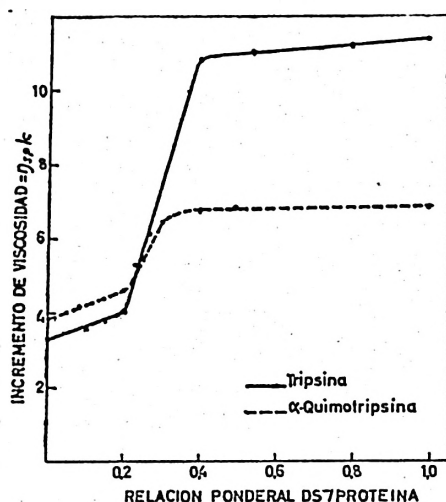


FIG. 1. Variación del incremento de viscosidad en función de la relación DS⁻/proteína.

Efecto del tiempo de contacto previo entre el SDS y la tripsina, el SDS y la α-quimotripsina. — Ensayos previos llevados a cabo con tripsina en disolución a pH 8, mostraron que experimenta un proceso espontáneo de desnaturalización, comprobable por la variación de viscosidad de sus disoluciones; por este motivo, las experiencias dirigidas a establecer los cambios viscosimétricos en función del tiempo de contacto previo con SDS, sólo se realizaron con la α-quimotripsina.

Se prepararon tres muestras de mezclas de α-quimotripsina y SDS en tampón, en las que las relaciones ponderales D/P fueron de 0,3, 0,5 y 2,0 respectivamente. Después de abandonadas a la temperatura ambiente, durante intervalos crecientes de tiempo, hasta un máxi-

TABLA I

Viscosidades de disoluciones SDS⁻ α-quimotripsina en función del tiempo de contacto previo.

Relación ponderal D/P	[α-quimotripsina] g./ml.	Tiempo contacto previo	Viscosidad relativa η/η_0	Δ de viscosidad η_{sp}/c
0,3	0,004	2 horas	1,0172	4,30
0,3	0,004	7 "	1,0215	5,38
0,3	0,004	25 "	1,0259	6,48
0,3	0,004	49 "	1,0273	6,82
0,4	0,005	2 "	1,0289	5,78
0,4	0,005	6 "	1,0304	6,08
0,4	0,005	25 "	1,0435	8,10
2,0	0,010	1 "	1,0701	7,01
2,0	0,010	5 "	1,0701	7,01
2,0	0,010	24 "	1,0693	6,93
2,0	0,010	53 "	1,0716	7,16

mo de 48 horas, se determinaron sus viscosidades y densidades. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla I.

De estos valores se deduce que para relaciones ponderales D/P igual a 0,3 y 0,5, las viscosidades de las disoluciones crecen con el tiempo de contacto previo a que haya estado sometida la mezcla de SDS y de α-quimotripsina, mientras que para relaciones ponderales D/P de 2,0, la viscosidad de la disolución es independiente del tiempo de contacto previo.

Caracterización de los complejos solubles Proteína-DS mediante electroforesis. Se han estudiado electroforéticamente sobre papel, el comportamiento de los complejos solubles que se forman al mezclar disoluciones de SDS y de proteína en determinadas proporciones. En el caso de la tripsina las relaciones D/P utilizadas han sido superiores a las necesarias para la redisolución del compuesto estequiométrico DS-Tripsina, de acuerdo con nuestros resultados previamente publicados (5). Con la α-quimotripsina se ha estudiado, además, la influencia del tiempo de contacto previo con el SDS.

Tripsina. — Se compararon electroforéticamente una disolución control de tripsina, preparada por mezcla de 5,0 ml. de una disolución de tripsina, (200 mg./ml.) en tampón fosfato disódico 0,2 M-ácido cítrico 0,1 M de pH 4, y 5 ml. del mismo tampón, con otra constituida por 5,0 ml. de tripsina, 4,5 ml. de SDS (100 mg./ml., en tampón de pH 4) y 0,5 ml. de tampón. La relación molar D/P de esta última mezcla es igual a 40,86, suficiente para redissolver al compuesto estequiométrico DS-Tripsina previamente formado. Como electrolito se utilizó el propio tampón fosfato-cítrico, de pH 4 y de fuerza iónica 0,15.

Las experiencias se realizaron con las muestras, después de abandonadas durante 12 horas a la temperatura ambiente. Para las electroforesis sobre papel se depositaron aproximadamente de 30 a 60 μ l. de sendas disoluciones, y se trabajó a 3,5 volt./cm. prolongándose la operación durante unas 6 horas.

La curva densitométrica 2a muestra que la proteína pura emigra hacia el cátodo; por el contrario la tripsina tratada con exceso de SDS emigra hacia el ánodo, exhibiendo una gran movilidad electroforética: indudablemente se trata de la proteína combinada con muchos grupos DS⁻, los cuales comunican al conjunto carga negativa y una incrementada movilidad.

α -Quimotripsina. — Para los análisis electroforéticos, las muestras se prepararon del siguiente modo: la disolución control de α -quimotripsina se confeccionó añadiendo 5 ml. de α -quimotripsina (100 mg./ml.) en tampón (fosfatos sódicos 0,05 M, de pH 8, y fuerza iónica 0,2) a otros 5 ml. del mismo tampón; la disolución mezcla de SDS y α -quimotripsina contenía 5 ml. de disolución enzimática de la composición ya indicada y 5 ml. de una disolución de SDS (100 mg./ml.) en tampón. La relación molar SDS/ α -Quimotripsina era igual a 94,6 y la ponderal igual a 1. Antes de la elec-

troforesis las muestras permanecieron en reposo a la temperatura ambiente durante 12 horas. Como electrolito se empleó el propio tampón ya descrito, prolongándose la electroforesis durante 6 horas con un potencial de 3 volt./cm.

La curva densitométrica 2b muestra como tanto la proteína pura como la tratada por SDS en exceso, emigran en la misma dirección anódica, si bien la proteína combinada con el DS⁻, lo hace con mayor movilidad que el enzima puro.

En un ensayo previo, paralelo al efectuado con tripsina, se pudo observar que a pH 4, la α -quimotripsina tratada con exceso de SDS (con objeto de redissolver el compuesto estequiométrico DS- α -quimotripsina previamente formado) emigra hacia el ánodo, dando lugar a la aparición de una banda única.

Influencia de la relación ponderal D/P en la formación de combinaciones DS- α -Quimotripsina. — Se prepararon diversas mezclas cuyas relaciones ponderales D/P fueron de 0,18; 0,24; 0,3; 0,5 y 2,0; que se abandonaron en reposo durante una hora a la temperatura ambiente. Las mezclas se prepararon mezclando volúmenes iguales de una disolución de α -quimotripsina (100 mg./ml.) y de otra de SDS de concentración variable, según la relación ponderal D/P requerida. Ambas disoluciones se prepararon en tampón fosfatos sódicos 0,025 M, de pH 8.

Los ensayos electroforéticos se realizaron a 4° C., utilizando como electrolito el tampón descrito, durante 7 horas y con potencial de 4,5 volt./cm.

Examinados los electrogramas antes de su revelado, bajo luz ultravioleta, ya se observaron unas bandas fluorescentes cuya localización coincidía exactamente con las que aparecen después al revelar con Negro Amido; la fluorescencia era debida al DS⁻ contenido en las combinaciones proteínicas de las manchas. En las curvas densitométricas que se exponen (2c, 2d, 2e, 2f, 2g) se pone de ma-

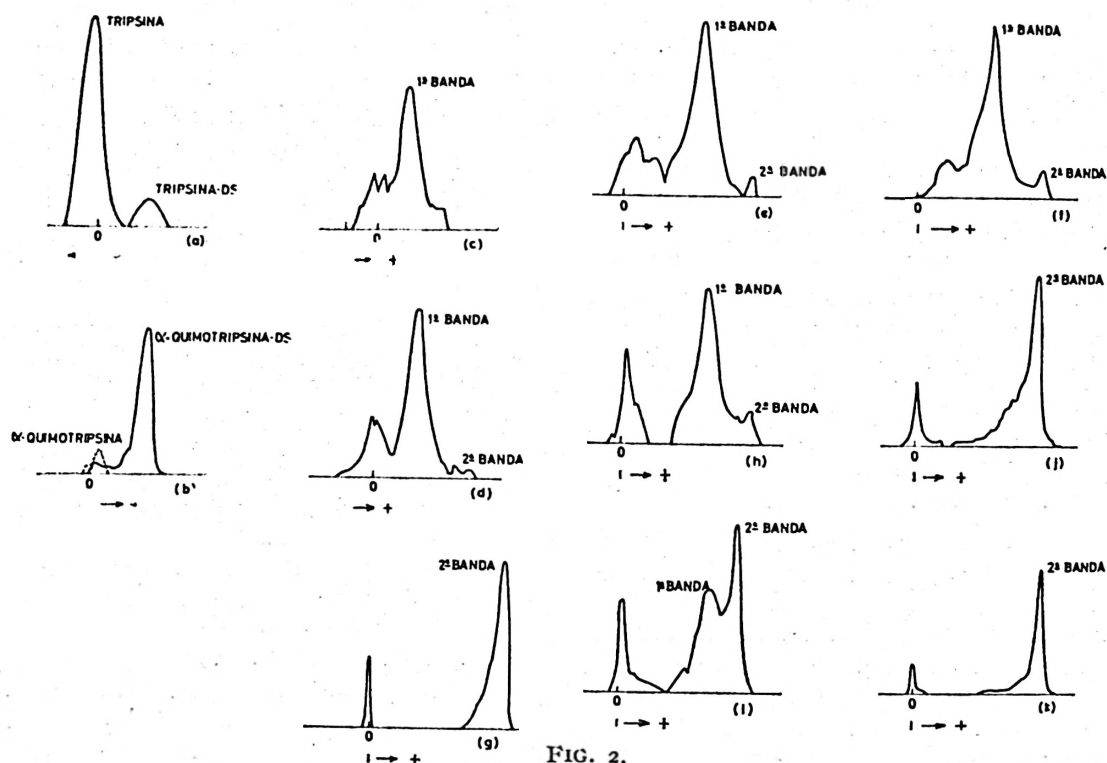


FIG. 2.

nifiesto como según sea la relación ponderal D/P de la mezcla sometida a electroforesis, aparecen una o dos manchas con movilidades claramente distintas.

Para una relación D/P igual a 0,18 se observa en el revelado la presencia de una sola mancha, también previamente detectada bajo luz U. V. Cuando los cocientes D/P valen 0,24; 0,3 y 0,5 aparecen dos manchas con distintas movilidades; la de menor recorrido es muy intensa y coincide con la primera de las bandas referida en el anterior experimento, mientras que la segunda, más débil, pero tanto más intensa cuanto mayor es la relación ponderal D/P, casi coincide con la banda de traslación del exceso del ion DS^- libre, observada bajo la luz U. V. Finalmente, para la relación D/P igual a 2, se nota la existencia de una sola banda, coincidente con el frente de avance del DS^- no combinado.

Efecto del tiempo de contacto previo entre el SDS y la α -Quimotripsina en la formación de combinaciones solubles.

Se prepararon disoluciones en las cuales la relación ponderal D/P fue de 0,3, 0,5 y 2,0, respectivamente, obtenidas por mezcla de volúmenes iguales de disolución de α -Quimotripsina (100 mg./ml.) y otra de SDS de concentraciones 30, 50 y 200 mg./ml., ambas en tampón fosfatos sódicos 0,025 M., de pH 8; se sometieron a la electroforesis al cabo de 1, 24 y 48 horas de reposo a la temperatura ambiente.

Los electrogramas se desarrollaron a 4° C. empleando como electrolito el tampón descrito, con una concentración en ClNa de 0,1 M., y fuerza iónica de 0,2; se prolongó la electroforesis durante 7 horas con una diferencia de potencial de 4,5 volt./cm.

Las curvas densitométricas 2e, 2h y 2i, se refieren a la relación D/P igual a 0,3; los valores obtenidos con la relación 0,5 aparecen en las figuras 2f, 2j y 2k y la gráfica 2g expresa el resultado obtenido con la relación D/P igual a 2,0.

Se deduce que para las relaciones 0,3

y 0,5 la movilidad de la primera banda, la más próxima al origen, aumenta con el tiempo de contacto previo, en tanto que disminuye su intensidad; simultáneamente crece la intensidad de la zona que casi coincide con el frente de avance del ion DS^- , detectada por ultravioleta y que corresponde a la segunda banda. La disolución cuya relación ponderal D/P es igual a 2,0 produce una sola banda, cualquiera que sea el tiempo de contacto previo, la cual casi se superpone con la banda de avance del ion DS^- libre.

Inhibiciones de las actividades enzimáticas de la tripsina y α -quimotripsina por el SDS. — En el trabajo anterior (5), al estudiar la acción inhibidora ejercida por el SDS sobre ambos enzimas proteolíticos pudimos establecer que la actividad residual del enzima dependía de la relación D/P y que se observaba una reactivación parcial de ambos enzimas al aumentar dicho cociente. Hemos revisado aquellos valores obtenidos (loc. cit.) estableciendo que el valor de la relación ponderal D/P en la que se produce la máxima inhibición enzimática se halla comprendida entre 1 y 2 (para ambos enzimas), a partir de cuyo valor se observa una reactivación que pasa por un máximo cuando el valor del cociente es 6; estos datos concuerdan sensiblemente con los previamente determinados por nosotros.

A continuación se exponen los resultados obtenidos del estudio de la influencia del pH y de la concentración salina del medio sobre las acciones inhibitoras ejercidas por el SDS sobre ambos enzimas.

Influencia del pH. — Los ensayos con tripsina se han realizado a pH 7,2, 7,6 y 8,0 (el punto isoelectrico del enzima es 7); con la α -quimotripsina se ha trabajado a pH 5,5, 6,5 y 7,6 (su punto isoelectrico es 5,5). La preparación de las muestras a incubar se llevó a cabo mezclando previamente disoluciones de SDS y del enzima en tampón fosfatos

sódicos, M/15, del pH adecuado, mantenidas, después de mezcladas, 30 minutos a la temperatura ambiente. De dichas disoluciones se tomó 1 ml. que se vertió sobre la mezcla formada por 5 ml. de sustrato (disolución de caseína al 1 %) y 4 ml. del tampón del pH adecuado, previamente ambientados a $37 \pm 0,01^\circ C$. La digestión se interrumpió al cabo de veinte minutos, por vertido sobre 10 ml. de ácido tricloroacético 0,3 N. Se centrifugó la disolución y se determinó la densidad óptica en el sobrenadante a 280 m μ .

Los resultados obtenidos aparecen en las gráficas 3a y 3b. Los valores de las relaciones D/P consignadas, corresponden a las mezclas en incubación.

Se observa en todas ellas que las variaciones del pH no provocan alteración en la posición del mínimo de actividad, que se presenta, con ambos enzimas, para relaciones D/P comprendidas entre 1 y 2. Más notable es la influencia del pH sobre la región de máxima activación, cuando los valores D/P son superiores a 2: se observa que el porcentaje de actividad recuperada es mayor al pH más bajo de los ensayados. Las variaciones de actividad observadas al variar el pH aparecen como mucho más acusadas en el caso de la α -quimotripsina.

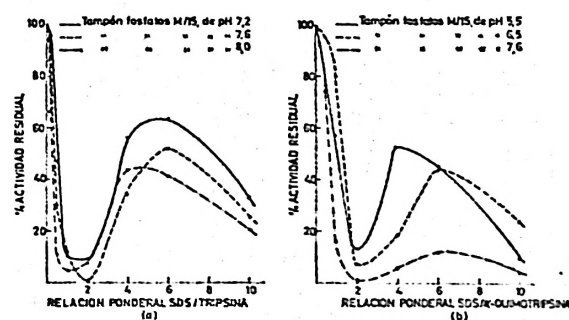


FIG. 3. Influencia del pH sobre la inhibición por el SDS, de las actividades tripticas y α -quimotripticas.

Efecto de la concentración salina. — Se prepararon distintas muestras con un contenido constante de enzima y propor-

ciones crecientes de SDS, en disoluciones tampón de diversas molaridades. Los ensayos de actividad enzimática se efectuaron a pH 7,6, con disoluciones tampón de fosfatos sódicos M/5, M/15 y M/40, respectivamente, utilizando la técnica ya descrita.

Los resultados obtenidos, que aparecen en las figuras 4a y 4b, ponen de manifiesto la influencia de la concentración salina mostrando que la tripsina experimenta una mayor recuperación de su actividad proteolítica cuanto menor es la concentración del tampón: cuando la concentración de éste es de M/5 no se produce reactivación del enzima, pero cuando es M/40 se observa una actividad enzimática de un 51,7 %, para una misma relación ponderal D/P.

La influencia de la concentración salina en la reactivación de la α -quimotripsina es mucho menor.

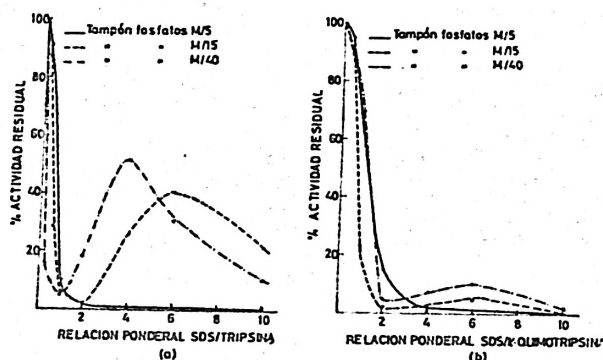


FIG. 4. Influencia de la concentración salina sobre la inhibición por el SDS de las actividades tripticas y α -quimotripticas.

Recuperación de las proteínas tripsina y α -quimotripsina de sus combinaciones con el SDS. — La recuperación de ambas proteínas enzimáticas después de su tratamiento por SDS y formación de las correspondientes combinaciones con el ion DS^- se ha logrado utilizando dos métodos distintos:

a) Por tratamiento de las disoluciones de las combinaciones DS-Proteína con sales solubles de bario, para pro-

vocar la precipitación del dodecilsulfato de bario, y determinar después las actividades enzimáticas de las disoluciones de tripsina y de α -quimotripsina resultantes de la liberación.

b) Por separación del ion DS^- por cromatografía en columna utilizando la resina catiónica dietil-amino-etil-celulosa (DEAE-celulosa, Whatman 50), que nos ha permitido, en todos los casos, la recuperación de las proteínas liberadas del ion DS^- .

Tratamiento por Ba^{++} de las disoluciones DS-Tripsina y DS- α -Quimotripsina. — Se mezclaron volúmenes iguales de una disolución de tripsina o de α -quimotripsina (1000 γ /ml.) y de disolución de SDS de concentraciones variables, preparadas ambas en tampón NH_3ClNH_4 , 0,1 M, de pH 7,6. Después de permanecer en reposo una hora a la temperatura ambiente, se tomaron 4 ml. de la disolución añadiéndoles 4 ml. de tampón y 2 ml. de una disolución acuosa de cloruro bárico 0,01 M. Se deja depositar el precipitado de laurilsulfato de bario durante 3 horas, separándose los sobrenadantes por centrifugación, y determinando en ellos las actividades proteolíticas residuales de los enzimas, empleando caseína como sustrato.

Los resultados obtenidos, que aparecen en las gráficas 5a y 5b, muestran la recuperación de actividades proteolíticas después de los tratamientos con cloruro

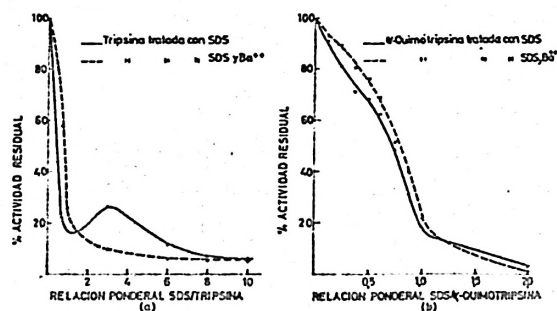


FIG. 5. Actividades tripticas y α -quimotripticas recuperadas de las combinaciones con el DS^- , mediante Ba^{++} .

bárico. En la tripsina se observa que la actividad se recupera parcialmente, siempre que la relación ponderal D/P haya sido inferior a 2 (en la que se producía la máxima inhibición); para valores superiores, el enzima recuperado resulta estar completamente inactivado.

Con la α -quimotripsina se observan muy ligeras reactivaciones en el enzima recuperado de su combinación con el DS^- .

Separación del ion dodecilsulfato unido a la tripsina y a la α -quimotripsina mediante cromatografía en columna. — Los ensayos realizados han permitido establecer el efecto desnaturizante ejercido sobre los enzimas por el SDS según su concentración, y por el tiempo de contacto entre el detergente y las proteínas.

La preparación de las muestras a cromatografiar se realizó mezclando 5 ml. de disolución de los enzimas, de 30 mg./ml., con 5 ml. de disolución de SDS de concentraciones variables, según la relación D/P deseada. Las muestras se abandonan a la temperatura ambiente, durante intervalos de tiempo comprendidos entre 1 y 40 horas. Se emplearon tampones fosfatos sódicos 0,2 M, como disolventes, de pH 7,2 para la tripsina y 6,5 para la α -quimotripsina.

Se adicionó 1 ml. de la mezcla SDS-Enzima a la columna (se han utilizado columnas de 2 cm. de diámetro por 17,5 cm. de longitud), previamente equilibrada con el tampón correspondiente y realizando la elución con el propio tampón anteriormente descrito en cada caso. Se recogieron fracciones de 1 ml. del eluido, y en ellas se determinó el contenido en proteína midiendo las densidades ópticas a 280 m μ y con auxilio de los correspondientes factores de densidad óptica.

La presencia del ion DS^- se determinó por el método de la rosanilina (loc. cit.) utilizando para ello muestras diluidas diez veces. La actividad enzimática re-

sidual se estableció por el método de KUNITZ (loc. cit.).

Tripsina. Influencia de la relación ponderal D/P en la recuperación cromatográfica de fracciones activas del enzima a partir de disoluciones de SDS y tripsina. Dado que el enzima se desnaturaliza espontáneamente a pH superiores al de su punto isoelectrico, y los ensayos se realizaron a pH 7,2 se cromatografiaron las muestras ya a los treinta minutos de contacto SDS y tripsina, y se empleó una velocidad de elución de 12 ml/h; en estas condiciones la tripsina pura (sin SDS) recuperada, es cromatográficamente homogénea, y conserva inalterada su actividad enzimática.

La recuperación de la tripsina tratada por el SDS se estudió para relaciones ponderales D/P igual a 0,2 0,5 y 1,4, correspondientes a las condiciones de máxima precipitación en el primer caso (cuando se trabaja a pH 4) y a las condiciones de máxima inhibición la última.

Los resultados obtenidos (en las gráficas 6a y 6b aparecen los correspondientes a las relaciones 0,2 y 1,4) muestran que el enzima recuperado resulta parcialmente desnaturizado por el SDS, hecho que se pone de manifiesto por la sucesiva elución de dos fracciones proteicas, activa la primera y desprovista de actividad la siguiente. Cuando la relación D/P es de 0,2 se observa que la tripsina recuperada es activa en su casi

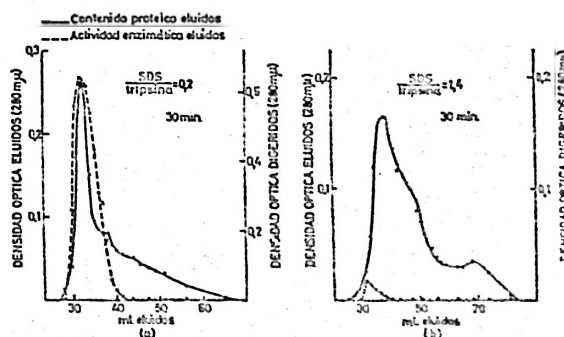


FIG. 6. Recuperación cromatográfica de la tripsina de sus combinaciones con SDS

totalidad. Cuando el cociente es igual a 0,5 aparecen, sin embargo, claramente dos fracciones proteicas distintas, una activa y la otra inactiva. Finalmente cuando la relación es de 1,4 se recupera una sola fracción protéica completamente inactivada.

α -Quimotripsina. Influencia de la relación ponderal D/P sobre la recuperación cromatográfica de fracciones activas del enzima a partir de disoluciones-mezcla de SDS y de α -quimotripsina.— Las condiciones de trabajo con este enzima se proyectaron teniendo en cuenta que la α -quimotripsina en disolución a pH 6,5 no sufre alteración alguna, al menos durante un intervalo de 40 horas.

La α -quimotripsina que hemos empleado, disuelta en tampón fosfatos sódicos 0,2M de pH 6,5, se comporta como cromatográficamente homogénea y la proteína recuperada por elución conserva su plena actividad.

La influencia de la relación ponderal D/P se determinó trabajando con tres disoluciones en las que los valores eran 0,2, 0,66 y 2,0, respectivamente; la primera y la última de las relaciones corresponden, respectivamente, a la de la máxima precipitación (trabajando a pH 4) y a la de máxima inhibición.

En las gráficas 7a y 7b se consignan los porcentajes de actividad enzimática recuperada cromatográficamente en función de la relación D/P, lo que pone de relieve la posibilidad de separar cuantitativamente la α -quimotripsina del ion DS^- , independientemente de cual sea el valor de dicha relación. En todos los casos se obtienen dos fracciones proteicas distintas, la que se eluye en primer lugar exhibe prácticamente un 100 % de actividad, mientras que la fracción que resulta eluida más lentamente es prácticamente inactiva. También se observa que la proporción entre los pesos de las fracciones activa e inactiva, decrece al aumentar la relación D/P.

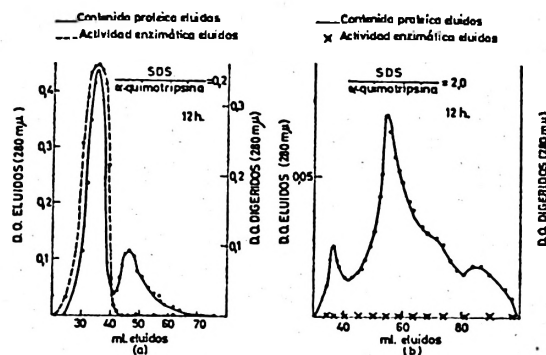


FIG. 7. Recuperación cromatográfica de α -quimotripsina de sus combinaciones con SDS.

Influencia del tiempo de contacto previo entre el SDS y la α -quimotripsina en la recuperación cromatográfica del enzima.— Los ensayos se efectuaron con una disolución de SDS y α -quimotripsina cuya relación D/P era igual a 0,66. Se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante períodos de tiempo de 1, 14 y 40 horas, sometiendo las tres muestras a la separación cromatográfica.

Se reúnen los resultados en las gráficas 8a, 8b y 8c en las que se observa como al aumentar el tiempo de contacto previo SDS- α -Quimotripsina, tanto mayor es la proporción de enzima desnaturalizado (inactivo) que se recupera. Se deduce que el proceso de desnaturalización de la α -quimotripsina por el SDS no es instantáneo y que la acción inducida no es totalmente reversible, ya que no toda la proteína unida al ion DS^- , recupera sus propiedades iniciales.

Constantes de inhibición K_i del SDS en los sistemas tripsina-caseína y α -quimotripsina-caseína.— La determinación de los valores de las constantes de MICHAELIS-MENTEN de los sistemas tripsina-caseína y α -quimotripsina-caseína y los de las constantes de inhibición (K_i) por el SDS de los mencionados sistemas se realizó gráficamente y por aplicación de la ecuación de LINEWEAVER y BURK (10).

Las concentraciones de SDS y de los enzimas se escogieron de modo que la

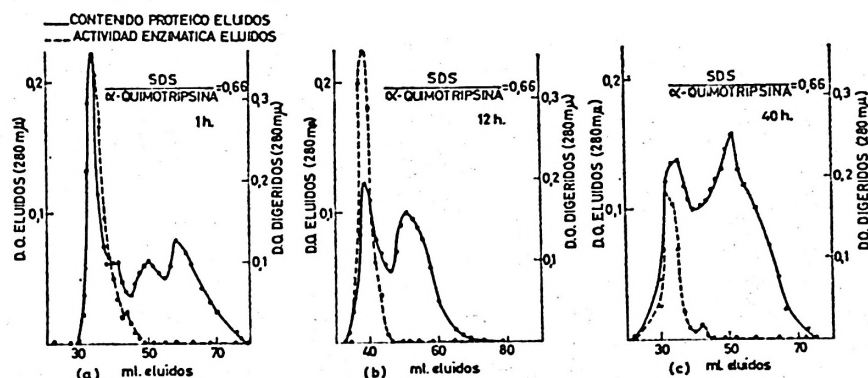


FIG. 8. Influencia del tiempo de contacto SDS- α -Quimotripsina en la recuperación cromatográfica de la α -quimotripsina.

relación D/P fuera inferior a 1 (relación de máxima inhibición) en todos los casos.

Para la preparación de las muestras de digestión se siguieron los métodos ya previamente indicados, trabajándose a pH 7,6 (tampón fosfatos sódicos 1/15 M) y a 25° C., tomando muestras de 1 ml. cada minuto. Las actividades proteolíticas se determinaron por el método de KUNITZ (loc. cit.) calculándose las velocidades iniciales para cada una de las concentraciones de sustrato ensayadas, con y sin inhibidor.

Los valores obtenidos aparecen en las gráficas 9a y 9b, en las que se representan los valores de $1/v$ frente a $1/S$, mostrando que el ion DS^- actúa como inhibidor competitivo de la tripsina y

α -quimotripsina en el intervalo de concentraciones ensayado.

Para el sistema tripsina-caseína se halló que $K_m = 4,08 \cdot 10^{-5}$ M, valor concordante con el hallado por NORD (19). En el sistema tripsina-DS-caseína, K_i es igual a $2,34 \times 10^{-5}$ M. Los valores correspondientes para los sistemas α -quimotripsina-caseína y α -quimotripsina-DS-caseína son respectivamente $K_m = 3,71 \times 10^{-5}$ M y $K_i = 1,5 \times 10^{-5}$ M. Se tomó como peso molecular de la caseína 75.000, aceptado por diversos autores (19) (12).

Discusión

El estudio de las acciones inducidas por el dodecilsulfato sódico sobre la tripsina y la α -quimotripsina, trabajando a pH superiores a los de los puntos isoeléctricos de cada uno de ambos enzimas (tripsina pH 7, α -quimotripsina pH 5,5), ha permitido establecer que los iones DS^- se unen a dichas macromoléculas formando combinaciones solubles DS-Proteína. (En un trabajo anterior hemos descrito la formación de compuestos estequiométricos insolubles [5].)

Operando en condiciones en las que la adición de SDS no produce precipitación alguna, esto es, a pH 7,6 con la tripsina, y a pH 8 con la α -quimotrip-

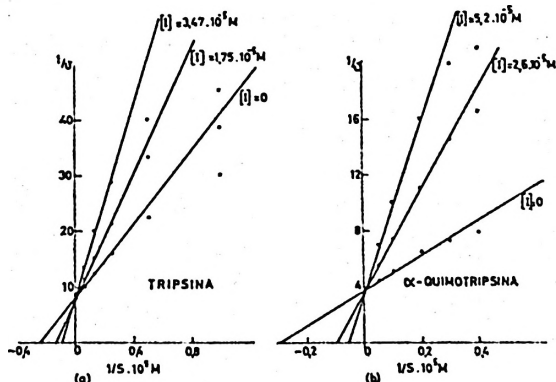


FIG. 9. Determinación de K_m y K_i para los sistemas enzima-SDS-caseína.

sina, se observan sendos aumentos de viscosidad de las disoluciones; en el caso de la tripsina, la curva de incrementos de viscosidad en función de la relación D/P experimenta una inflexión cuando la relación ponderal vale 0,2 (relación molar = 18) y otra cuando el cociente D/P vale 0,4 (relación molar = 36) (figura 1). La curva de la α -quimotripsina presenta una inflexión cuando la relación D/P es igual a 0,2 (relación molar = 19) y otra cuando 0,5 (relación molar = 47) (figura 1). Los puntos de inflexión de ambas curvas, parecen indicar la formación de dos complejos DS-Proteína, que deben contener, aproximadamente, igual y doble número de grupos DS^- que los correspondientes compuestos estequiométricos, los cuales, como ya se describió en el trabajo anterior, poseen sólo de 18 a 20 grupos DS^- (5).

Los estudios electroforéticos realizados parecen confirmar las anteriores interpretaciones. En efecto, sometidas a electroforesis en papel una disolución de tripsina y SDS, tamponada a pH 4, cuya relación ponderal D/P sea igual a 0,4 (40 mols de SDS) se observa una banda que emigra hacia el ánodo (en contraste con la tripsina pura, cuya emigración electroforética se realiza en dirección catódica); parece indudable que se trata de un complejo Tripsina-DS.

La electroforesis de las disoluciones mezcla de α -quimotripsina y de SDS se realizaron en medio tamponado a pH 8 (porque con este enzima no hay riesgos de autodigestión a este pH, como ocurriría con la tripsina). Experimentando con relaciones D/P igual a 0,18 (unos 18 mols de DS^-) y no excediendo de una hora el tiempo de contacto previo entre la proteína y el detergente, se observó una sola banda emigrante hacia el ánodo, es decir, en la misma dirección de traslación que el enzima puro, aunque con mayor movilidad (comunicada ésta, naturalmente, por los grupos DS^- que con-

tiene el complejo) (figura 2c). Pero si el valor del cociente D/P se va aumentando en sucesivos ensayos, por ejemplo, de 0,24 hasta 0,5 y 2,0, entonces la intensidad de dicha banda decrece hasta desaparecer, mientras que hace su aparición una segunda banda, dotada de una movilidad mucho mayor, puesto que avanza hacia el polo positivo casi con el propio frente del DS^- (figuras 2d, 2e, 2f y 2g). Parece claro que al aumentar la concentración de iones DS^- en la disolución, el complejo a que corresponde la primera mancha electroforética, incorpora nuevos grupos DS^- a su molécula, los que le comunican la mayor movilidad típica de la segunda banda, que cada vez resulta ser más densa.

El tiempo de contacto previo (1, 24 y 48 horas) entre el detergente y la α -quimotripsina tiene una influencia favorable en la incorporación de un mayor número de grupos DS^- , fenómeno no instantáneo, que tiene lugar gradualmente (a medida que se desnaturaliza la proteína), y que ha podido seguirse con las medidas viscosimétricas y con los análisis electroforéticos. Sin embargo, cuando la relación D/P es grande, por ejemplo, igual a 2, entonces se produce, casi inmediatamente, la asociación con el número máximo de iones DS^- .

Parece que con los anteriores hechos experimentales resultan bien caracterizados dos complejos DS-Proteína, tanto en el caso de la tripsina como en el de la α -quimotripsina, y que sus composiciones respectivas deben corresponder a las relaciones ponderales D/P 0,2 y 0,4 para la tripsina, y 0,2 y 0,4-0,5 para la α -quimotripsina. Los complejos solubles que deben contener hasta 40 grupos DS^- son lábiles, y no hemos podido aislarlos puros al estado sólido (por ejemplo, precipitándolos con disolventes orgánicos), ya que el lavado de los mismos les hace perder DS^- , y les convierte rápidamente en los correspondientes compuestos estequiométricos (3) (que contienen tantos

grupos DS^- como aminoácidos básicos las proteínas, esto es, 18 ó 20).

En la formación de las combinaciones estequiométricas, la alteración estructural inducida por el SDS en las configuraciones originales de los dos enzimas ensayados parece ser pequeña, puesto que ambas proteínas combinadas conservan prácticamente inalterada su actividad proteolítica (3), así como no experimentan cambios sensibles en sus viscosidades. Pero el aumento progresivo de nuevos grupos DS^- unidos a las proteínas, no sólo determina importantes descensos de sus actividades enzimáticas, sino que provoca grandes aumentos de viscosidad de las disoluciones, probable consecuencia de la desnaturalización experimentada por la molécula proteica.

Las propias características de la inhibición de las acciones de ambos enzimas inducida por el DS^- confirma que la unión de dichos iones a las moléculas proteicas debe provocar ciertas alteraciones estructurales. En efecto, para conseguir la máxima inhibición de las proteólisis catalizadas por ambos enzimas se precisa trabajar con relaciones D/P comprendidas entre 1 y 2; porque se observa que para relaciones mayores hay una recuperación aparente de la actividad enzimática, que podría interpretarse como debida a un desdoblamiento o apertura de las cadenas polipeptídicas, provocada por la incorporación de nuevos grupos DS^- , fenómeno que iría acompañado de la exposición de nuevos centros activos, antes ocluidos en la macromolécula; el fenómeno de aparente reactivación alcanza un máximo para la relación D/P = 6 que corresponde a una relación molar aproximada de 544 y 567 mols DS^- por mol de tripsina o de α -quimotripsina, respectivamente.

El tratamiento de las combinaciones DS-Proteína mediante ion Ba^{++} , con objeto de recuperar el enzima por precipitación del ion DS^- en forma de $\text{Ba}(\text{DS})_2$ y la recuperación cromatográ-

fica de la proteína a partir de los mencionados complejos, ponen de manifiesto la facilidad de su disociación, cualquiera que sea el número de grupos DS^- unidos por mol de proteína, puesto que en ambos casos hemos podido recuperar proteína pura (sin SDS).

Ambas técnicas de recuperación de los enzimas han permitido seguir el proceso de alteración estructural de la proteína que depende de la relación D/P utilizada; se consigue una recuperación total de proteína enzimáticamente activa cuando los valores no exceden de 0,2 (figura 6a y 7a) (18 y 19 mols de ion DS^- por mol de tripsina, o de α -quimotripsina, respectivamente). La fracción activa recuperada cromatográficamente disminuye mucho en cantidad, cuanto mayores son las proporciones; y resulta nula con la tripsina cuando la relación es 1,4 (figura 6b) y con la α -quimotripsina cuando su valor es igual a 2 (figura 7b). También depende de cual haya sido el tiempo de contacto previo entre la proteína y el SDS, ya que el porcentaje de proteína activa recuperada, para una misma relación D/P decrece al aumentar el tiempo de contacto entre el SDS y la proteína; para valores de la relación comprendidos entre 1 y 2, el proceso es muy rápido con ambos enzimas.

El SDS se comporta como un inhibidor competitivo de la hidrólisis triptica y α -quimotriptica de la caseína, para relaciones D/P comprendidas entre 0,25 y 0,5 en el caso de la tripsina y entre 0,35 y 0,7 con la α -quimotripsina. El valor de la constante de la inhibición competitiva del SDS sobre la hidrólisis triptica de la caseína es $K_i(\text{SDS}) = 2,34 \times 10^{-5} \text{ M}$; y el de la correspondiente constante en el caso de la α -quimotripsina es $K_i(\text{SDS}) = 1,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Resumen

Las variaciones de viscosidad observadas en distintas disoluciones mezcla de SDS y de

tripsina o de α -quimotripsina, a pH superiores a los puntos isoeléctricos de ambos enzimas, cuando se varían las relaciones D/P, y el estudio electroforético de tales disoluciones, permite establecer la existencia de dos combinaciones solubles DS-Proteína en cada uno de ambos casos: una de ellas se forma cuando la relación ponderal D/P es igual a 0,2 correspondiente a una relación molar igual a 18 con la tripsina, y 19 con la α -quimotripsina: estas cifras coinciden con el número de aminoácidos básicos presentes en un mol de las respectivas proteínas. La segunda combinación se forma cuando la relación D/P es igual a 0,4, que equivale a 40 mols de SDS por mol de proteína.

La unión de más o menos iones DS^- a la tripsina y a la α -quimotripsina es un proceso dependiente de la relación ponderal D/P y del tiempo de contacto previo entre ambas sustancias.

La acción inhibitoria ejercida por el ion DS^- sobre las actividades proteolíticas de la tripsina y de la α -quimotripsina es función de la relación D/P, pero no parece depender de la formación de las combinaciones descritas, puesto que la máxima inhibición se produce, en ambos enzimas, cuando la relación D/P se halla comprendida entre 1 y 2 (correspondientes a relaciones entre 100 y 200 mols DS^- por mol de proteína). La magnitud de las inhibiciones producidas depende del pH y de la concentración salina del medio.

El ion DS^- se comporta como un inhibidor competitivo de la hidrólisis triptica y α -quimotriptica de la caseína cuando las relaciones ponderales son de hasta 0,5 y 0,7 respectivamente. Se han establecido los valores de las respectivas constantes de inhibición.

La recuperación de las proteínas tripsina y α -quimotripsina activas de sus combinaciones solubles con iones DS^- a pH superiores al punto isoeléctrico de los enzimas, se logra por precipitación del DS^- unido a la proteína mediante sales de bario y eliminación del dodecilsulfato de bario.

Con el empleo de columnas de DEAE-Celulosa, también se consigue la separación cromatográfica del ion DS^- , y la recuperación total de las proteínas. Operando a pH 7,2 con los compuestos DS-Tripsina y a 6,5 con los de α -quimotripsina se obtienen dos fracciones cromatográficas, una enzimáticamente activa, pero inactiva la segunda; el porcen-

taje de la primera decrece al aumentar la relación D/P o el tiempo de contacto entre el detergente y la proteína, siendo igual a cero cuando D/P es igual a 1,4 si se trata de tripsina, y cuando D/P es igual a 2 en el caso de la α -quimotripsina.

Summary

The action of sodium dodecylsulphate upon trypsin and α -chymotrypsin. II. Characterization of soluble combinations.

The viscosimetric and electrophoretic behaviour of solutions containing both sodium dodecylsulphate (SDS) and either trypsin or α -chymotrypsin, suggest the production of two different complexes: one of them seems to be formed when the relationship SDS/Protein equals 0.2 (corresponding to about 20 mols DS^- per mol of protein), the second complex, when the value is higher, up to 0.4 (40 mols DS^-).

From these soluble, DS-Protein complexes, the corresponding free proteins can be recovered either by means of a DEAE chromatographic separation, or by adding Ba^{++} to the solutions, when all the DS^- comes down while liberating the attached proteins. By a careful elution of the DEAE adsorbates, two different fractions are recovered: the one which comes out first from the column is enzymatically active, whereas the second fraction is inactive (probably the denatured protein). The relative proportion of the first, active fraction, diminishes as the relationship SDS/Protein increases, or the detergent and protein contact period is longer. When the SDS/Protein value is higher than 1.4, only inactive trypsin is recovered; with α -chymotrypsin, no activity is recovered when the value equals 2.

With casein as a substrate, SDS proves to be a competitive inhibitor of trypsin and α -chymotrypsin proteolytic activities. In the case of trypsin the value of $K_i(SDS) = 2.34 \times 10^{-5} M$ the corres-

ponding value established with α -chymotrypsin is $K_1(\text{SDS}) = 1.5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

SDS denatures trypsin and α -chymotrypsin in a process that seems to be a function of the SDS relative concentration and of the contact time between the detergent and the proteins.

Bibliografía

- (1) ANSON, M. L. : *J. Gen. Physiol.*, **23**, 247, 1939.
- (2) ANSON, M. L. : *J. Gen. Physiol.*, **24**, 399, 1941.
- (3) DUNN, S. : *Biochem. Prep.*, V. 1, 222, 1949.
- (4) FOSTER, J. F. and AOKI, K. : *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 5215, 1958.
- (5) GUBERT, S., BOZAL, J. y CALVET, F. : *An. R. Soc. Esp. Fis. Quim.*, **59 B**, 563, 1963.
- (6) KARUSCH, F. and SONENBERG, M. : *Ann. Chem.*, **22**, 175, 1950.
- (7) KLOTZ, I. M. and URQUHART, J. M. : *J. Biol. Chem.*, **173**, 24, 1948.
- (8) KUNITZ, M. : *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291, 1957.
- (9) LEONARD, W. J. and FOSTER, J. F. : *J. Biol. Chem.*, **236**, PC. 73, 1961.
- (10) LINEWEAVER, H. and BURK, D. : *J. Am. Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
- (11) LUNDGREN, H. P., ELAM, D. W. and O'CONNELL, R. A. : *J. Biol. Chem.*, **149**, 183, 1943.
- (12) MCMEEKIN, T. L. and POLIS, B. D. : *Advances in Prot. Chem.*, **5**, 201, 1949.
- (13) MIRSKY, A. E. : *J. Gen. Physiol.*, **24**, 709, 1941.
- (14) PALMER, K. J. and GALVIN, J. A. : *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2187, 1943.
- (15) PAULING, L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **22**, 439, 1936.
- (16) PETERSON, E. A. and SOBER, H. A. : *Methods in Enzymology*, **5**, 3, 1962.
- (17) PUTNAM, F. W. and NEURATH, H. : *J. Biol. Chem.*, **159**, 195, 1945.
- (18) PUTNAM, F. W. and NEURATH, H. : *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 692, 1944.
- (19) SRI RAM, J., TERMINIELLO, L., BIER, M. and NORD, F. F. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **52**, 464, 1954.
- (20) TERESI, J. D. and LUCK, J. M. : *J. Biol. Chem.*, **174**, 653, 1948.
- (21) WU, H. : *Chinese J. Physiol.*, **5**, 321, 1931.

