

Uso de agentes quelatantes inmovilizados en el análisis estructural y purificación de tirosinasa

POR

M. Jiménez y J. L. Iborra

RESUMEN

Se ha analizado mediante isotermas de adsorción la naturaleza de la interacción de tirosinasa de epidermis de rana con el agente quelatante ácido etilendiaminotriacético inmovilizado en vidrio poroso (ED3A-CPG). La interacción es univalente y transcurre a través de centros polares independientes siguiendo isotermas del tipo de Langmuir.

Las diferentes velocidades y capacidades de adsorción de cada una de las formas activa e inactiva de tirosinasa al soporte ED3A-CPG han conducido a confirmar que la enzima activada por tripsina posee un estado conformacional más desplegado que la proenzima. En base a los estudios de adsorción de la enzima en el soporte ED3A-CPG a diferentes fuerzas iónicas se deduce que el equilibrio de asociación-disociación de la forma activa de la tirosinasa está más desplazado hacia estados más agregados a fuerzas iónicas superiores a 0,1 M de tampón fosfato. El agente quelatante ED3A-CPG se puede utilizar como un soporte poroso de naturaleza intercambiador iónico para la purificación de tirosinasa, mediante la adsorción del enzima a bajas fuerzas iónicas y posterior elución de la misma por incremento de la fuerza iónica del medio.

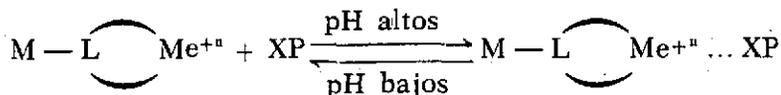
INTRODUCCION

La adsorción de proteínas de una disolución a una matriz sólida ha sido utilizada ampliamente para el aislamiento y purificación de macro-



moléculas por las diferentes técnicas de fraccionamiento bioquímico, tales como cromatografía de intercambio iónico (Pettersson, 1975), permeación en gel (Scopes, R. K., 1978), cromatografía de afinidad (Lowe y Dean, 1974), electroforesis de afinidad, etc. Asimismo se ha aplicado dicha adsorción en el conocimiento de la naturaleza y mecanismo de las interacciones bioespecíficas entre las macromoléculas biológicamente activas y sus efectores (Zaborsky, 1973).

En los últimos años, Porath et al. (1975) han desarrollado un método de fraccionamiento de proteínas, basado en la afinidad hacia metales iónicos pesados; dicha afinidad se basa en la estabilidad de los complejos que los aminoácidos His y Cis, integrantes de las cadenas polipeptídicas de las proteínas, pueden formar con los iones Cu, Zn y de otros elementos de transición en disoluciones acuosas neutras. Estos iones estarían físicamente unidos a geles de agarosas hidrofílicas, originando los denominados adsorbentes formadores de quelatos de proteínas. Si el metal es un elemento de transición, la afinidad de las proteínas por el soporte sería dependiente del pH de tal forma que se podía conseguir favorecer una selectividad por los aminoácidos His y Cis, en un rango de pH 6-8. El fundamento de la técnica puede expresarse de acuerdo con el siguiente equilibrio:



donde M es la matriz del gel, L es el ligando quelatante, Me es el ión metálico y X es el residuo de la proteína, XP. Posteriormente, este método se ha aplicado al aislamiento de la lactoferrina de leche humana (Lonerdal et al., 1977), a la purificación de interferón de fibroblastos humanos (Edy et al., 1977) y a la unión de pepsina, albúmina de suero bovino (Gozdzicka y Jozefiak, 1977). Las ventajas que se han atribuido a este método han sido entre otras una alta capacidad de unión, una total recuperación de la proteína sin pérdida de actividad de la misma y una facilidad de regeneración del soporte. También se han utilizado para la separación cromatográfica de distintos iones metálicos, «resinas» quelatantes que contenían el grupo funcional tioglicoloxi-metilo unido a poliestireno (Philips y Fritzs, 1978), así como geles hidrofílicos de glicolmetacrilato con grupos tioles unidos (Slovak et al., 1979). Los grupos funcionales iminodiacético unidos a un copolímero de estireno divinil benceno, bajo el nombre comercial de Chelex-100, encuentran su principal aplicación en la propiedad de sus grupos carboxílicos de actuar como intercambiado-

res catiónicos de ácido débil, variando su capacidad de intercambio según el pH del medio. Otro soporte quelatante también empleado como intercambiador iónico es el comercializado bajo el nombre de ED3A-CPG; este agente se prepara a partir de vidrio de poro controlado modificado con grupos aminopropilo, al cual se le ha unido un agente quelatante constituido por el ácido etilendiaminotriacético. Un intercambiador iónico estructuralmente relacionado con los anteriormente citados, pero que sólo posee un grupo carboxílico, es el CM-Sephadex, este intercambiador iónico, es un derivado de un dextrano modificado a cuyos residuos de glucosa de las cadenas de polisacáridos se les ha unido grupos carboximetilo.

El objeto del presente trabajo es la utilización de estos agentes quelatantes inmovilizados, CM-Sephadex, Chelex-100 y ED3A-CPG, en el análisis estructural de la enzima Tirosinasa de epidermis de rana, cuproproteína responsable de la síntesis de la melanina, que es extraída en su forma inactiva, pero que se puede activar con tripsina. El enzima cataliza no sólo la hidroxilación de monofenoles, sino también la oxidación del correspondiente difenol a o-quinona, que sufre posteriormente reacciones no enzimáticas que conducen a la formación del pigmento.

MATERIALES Y METODOS

El CM-Sephadex C-50 fue suministrado por la firma Pharmacia Fine Chemicals. Los agentes quelatantes insolubles Chelex-100 y ED3A-CPG se compraron a Bio-Rad y Pierce Chem. Co., respectivamente. La enzima Tripsina (E, C.3.4. 4,4) fue adquirida a Sigma Chem, Co., U.S.A.

Los procesos de extracción, activación del enzima y medida de actividad se llevaron a cabo según procedimientos anteriormente descritos (Lozano et al., 1975). La determinación de proteína se realizó por una modificación del método de Lowry, realizada por Hartree (1972). La velocidad de adsorción de la proteína bajo las formas de proenzima y enzima, a cada uno de los soportes se determinó mediante técnica de baño incubando proteína y soporte a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$ y extrayendo alícuotas mediante succión a través de una membrana de nylon, para medida de la actividad enzimática. La proteína retenida en cada uno de los geles se desorbió del mismo, por elución con tampón fosfato de fuerza iónica superior al de adsorción y posterior filtración a través de un embudo de vidrio de placa porosa número 5.

Las isotermas de adsorción de tirosinasa al soporte ED3A-CPG, se determinaron a partir de la cantidad total de enzima adsorbida (actividad)

por gramo de soporte húmedo (a) y de la cantidad de proteína libre en el equilibrio (c), a distintas relaciones soporte proteínas y a un pH y fuerza iónica determinadas. La cantidad de tirosinasa adsorbida al gel se determinó por diferencia entre las unidades totales de actividad introducidas al inicio de la adsorción y la actividad de tirosinasa libre presente en la disolución en el tiempo de equilibrio de interacción.

Para la purificación de la tirosinasa bajo la forma de proenzima mediante el soporte ED3A-CPG, se empaquetaron en una columna de 1,3 cm de diámetro, 2 g del soporte previamente equilibrado en tampón fosfato 0,05 M, pH = 7.

La adsorción de la proteína al gel se realizó por paso a través del mismo de 5 ml de un extrato de proenzima de actividad y concentración conocidas, en tampón fosfato del mismo pH previamente ajustado a una concentración de 0,05 M en dicho tampón.

RESULTADOS Y DISCUSION

CINÉTICA DE UNIÓN DE TIROSINASA A SOPORTES QUELATANTES

Las cinéticas de adsorción se efectuaron según la técnica de baño, empleando Tirosinasa en su forma de proenzima en tampón fosfato 0,05 M, pH = 7. La representación del logaritmo del porcentaje de actividad residual a lo largo del tiempo de interacción, para cada uno de los soportes está representada en la fig. 1. Se observaron unas variaciones lineales de disminución de la actividad en los tres soportes analizados con la salvedad de encontrar un proceso de adsorción bifásico con el ED3A-CPG. De este comportamiento se deduce que la adsorción de tirosinasa a este tipo de soporte sigue una cinética de primer orden cuyas constantes de velocidad pueden determinarse a partir de las pendientes de las rectas representadas en la fig. 1. A partir de los resultados obtenidos, se deduce que la velocidad de adsorción siguió un orden creciente dado por:

$$\text{Chelex 100} < \text{CM-Sephadex} < \text{ED3A-CPG}.$$

Aunque el Chelex posee dos grupos carboxilos ionizantes, la carga neta que manifiesta a dicho pH es de -1 , debido a la protonación del grupo imino del ácido iminodiacético. Es decir, posee la misma carga neta que el CM-Sephadex que sólo posee un grupo carboxilo ionizado y que el ED3A-CPG, que, sin embargo, muestra tres grupos carboxilos cargados negativamente. Por ello, el orden de adsorción de tirosinasa a cada

uno de los soportes podría estar en relación directa con el número de grupos carboxilos ionizados, con la salvedad del caso del Chelex. Puesto que en los experimentos de determinación de las constantes de adsorción se utilizó la misma concentración de grupos ionizados de cada uno de los soportes, la mayor adsorción observada de Sephadex respecto al Chelex había que atribuirla a que la matriz de CM-Sephadex es más hidrofílica, que la de Chelex y, por tanto, es más adecuada para la adsorción en general de proteínas y en particular de tirosinasa.

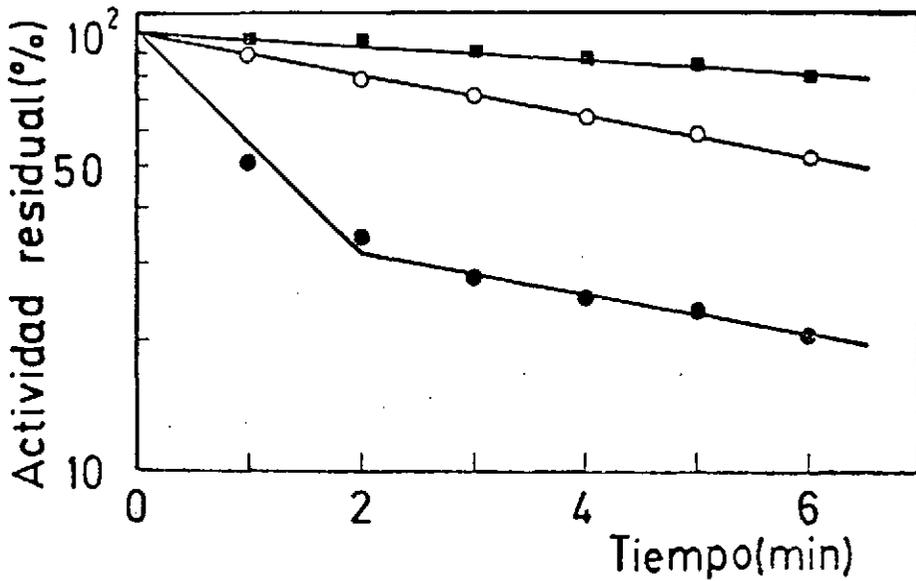


FIGURA 1.—Cinéticas de adsorción de tirosinasa, bajo la forma de proenzima, a agentes quelatantes inmovilizados.

- — ■ Chelex 100.
- — ○ CM-Sephadex.
- — ● ED3A-CPG.

INTERACCIÓN DE TIROSINASA CON ED3A-CPG

Debido a que el agente quelatante ED3A-CPG fue el que presentó una mayor velocidad y capacidad de adsorción del proenzima, con respecto a los otros soportes ensayados, se utilizó posteriormente en el análisis más detallado de las interacciones de tirosinasa de epidermis de rana bajo sus dos formas de proenzima y enzima con dicho soporte.

Cuando se midió el porcentaje de actividad residual que no se unió al soporte ED3A-CPG tanto de proenzima como de enzima, hasta un tiempo

de interacción de 15 minutos, se observó que la cinética de unión del proenzima transcurría a una mayor velocidad que la del enzima y que conducía a que el porcentaje de proteína unida al soporte bajo la forma de proenzima también fuera mayor que en el caso de la enzima (fig. 2). La

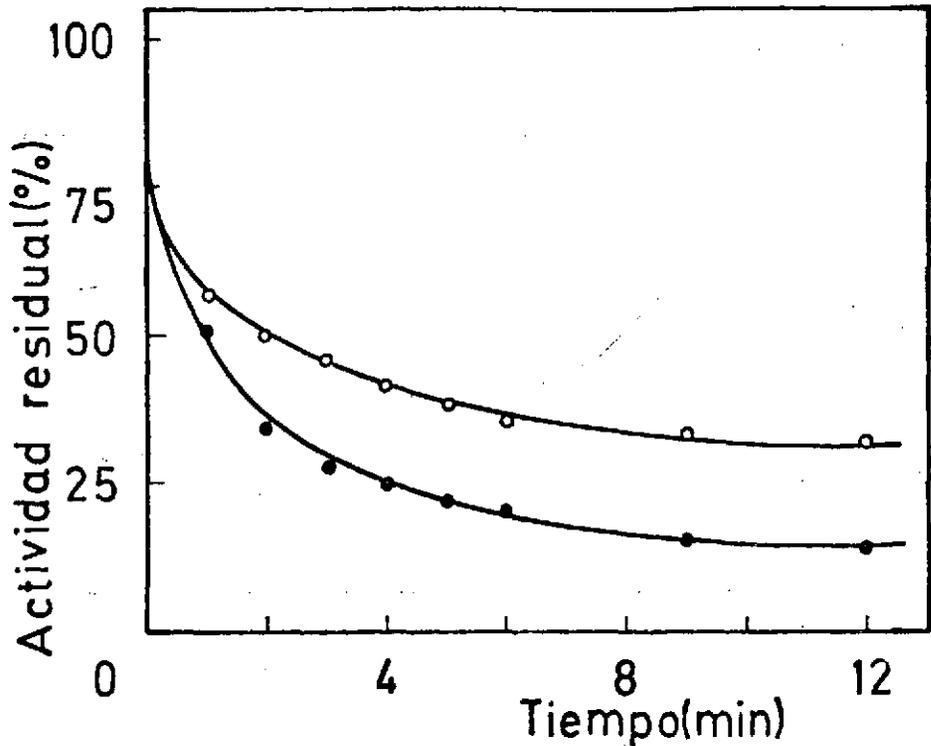


FIGURA 2.—Cinéticas de adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG. La adsorción se realizó a 25°C utilizando tampón fosfato 0,05' M, pH = 7,0.

○—○ enzima.
●—● proenzima.

cinética de unión fue de primer orden para ambas formas del enzima. La mayor interacción del proenzima con el ED3A-CPG en relación con la del enzima viene a confirmar la hipótesis de que la activación por tripsina del proenzima conduce a un desplegamiento de la cadena polipeptídica (Lozano et al., 1975) que provoca una mayor exposición al medio de residuos hidrofóbicos. Esto conduce también a confirmar que el tipo de interacción entre el ED3A-CPG y tirosinasa es de naturaleza electrostática. Y así, cuando se midió la cantidad de proteína que el ED3A-CPG era capaz

de unir a distintas fuerzas iónicas (fig. 3), se volvió a confirmar que el proenzima se unía en mayor proporción que el enzima y que las interacciones entre soporte y proteína son de naturaleza iónica, puesto que el porcentaje de actividad residual aumentó al incrementar la fuerza iónica

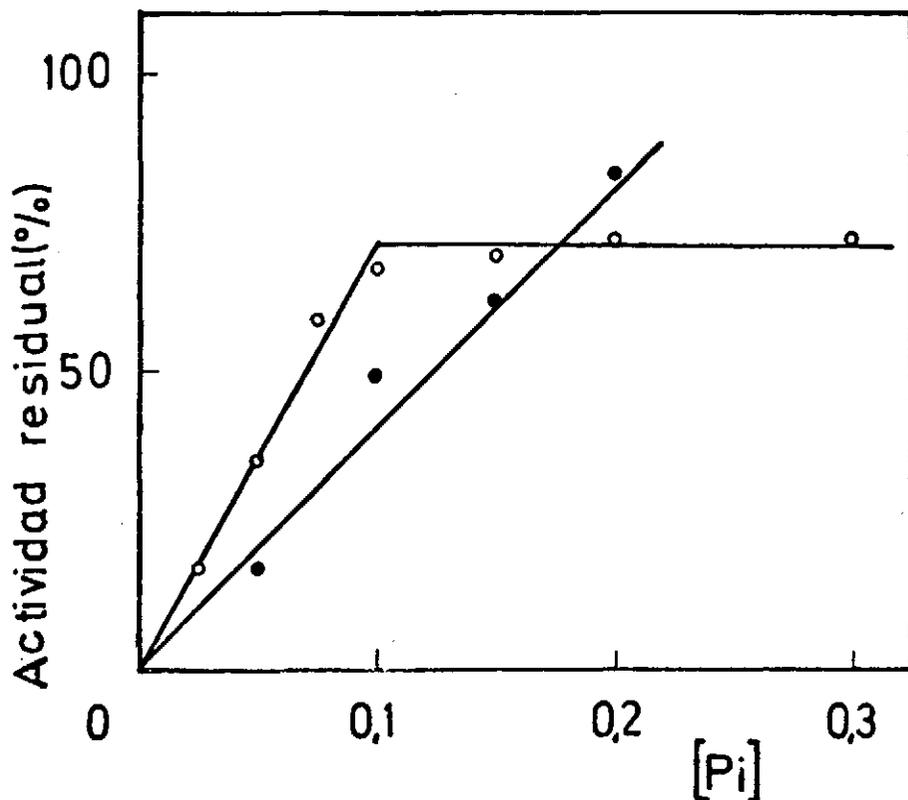


FIGURA 3.—Variación de la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG con la fuerza iónica. El porcentaje de actividad no retenida por el gel se midió a 25°C en tampón fosfato de pH = 7,0.

○ — ○ enzima.
● — ● proenzima.

del medio, ya que son tanto más perturbadas dichas interacciones cuanto mayor es el incremento de otros iones presentes en el medio. Pero el hecho más significativo de dicha figura está en la variación de la adsorción de la enzima al aumentar la concentración en fosfato. Existió un comportamiento bifásico cuyo punto de transición se encontró a una fuerza iónica de 0,1 M. Este comportamiento bifásico mostrado por el enzima podía

estar ocasionado por el desplazamiento que la fuerza iónica del medio podía provocar sobre el equilibrio de asociación-disociación de la enzima y por tanto en la interacción con el soporte. Como el equilibrio de asociación-disociación se establece entre las formas dimérica y tetramérica de la enzima (Ferragut, 1980), podría ser que a bajas fuerzas iónicas la forma que se uniera al soporte fuera la dimérica, mientras que al aumentar la fuerza iónica se provocaría la asociación del enzima y fuera la forma tetramérica la que se adsorbiera al soporte.

ISOTERMAS DE ADSORCIÓN DE TIROSINASA A ED3A-CPG

Al representar en coordenadas dobles logarítmicas las unidades de actividad adsorbida en función de las unidades libres en el equilibrio, por gramo de soporte, tanto para extractos de proenzima como de enzima, a 25° C, en tampón fosfato 0,05 M, pH = 7,0, se obtuvieron los correspondientes isotermas de Freundlich (Jenninsen, 1976) (fig. 4). Mientras que si

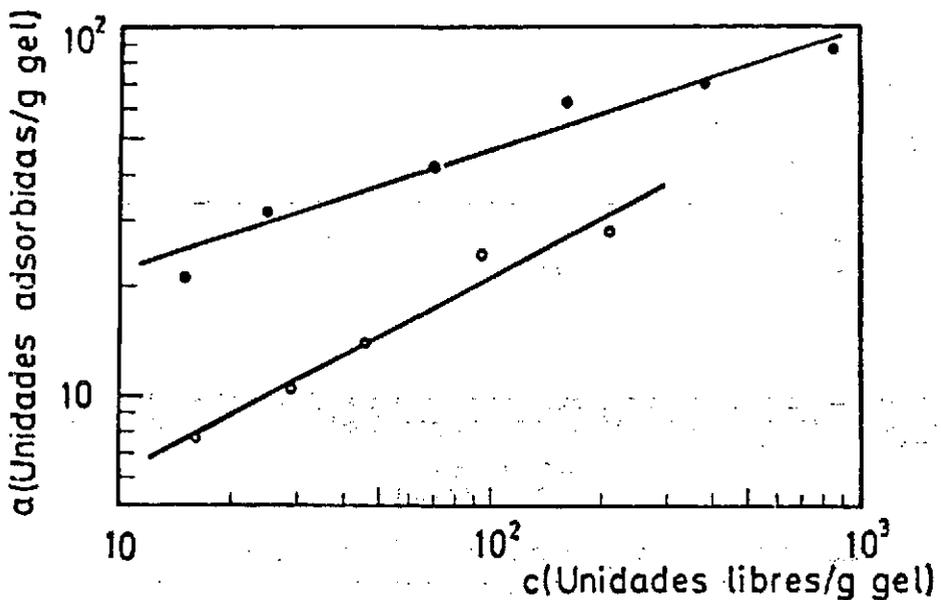


FIGURA 4.—Isotermas de Freundlich para la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG, a 25° C. La adsorción se realizó en tampón fosfato 0,05 M, pH = 7,0.

○ — ○ enzima.
● — ● proenzima.

los valores representados fueron los inversos de las citadas actividades, los isothermas resultantes son los de Langmuir (Barrow, 1968). A partir de las isothermas ajustadas, se calcularon las constantes de adsorción para ambas formas de tirosinasa y cuyos valores están expresados en la tabla I.

TABLA I

PARAMETROS DE ADSORCION DE TIROSINASA A ED3A-CPG

Constantes de adsorción (α), exponentes de adsorción ($1/n$) de las isothermas de Freundlich; constantes de adsorción (K'), constante de saturación (a_0) de las isothermas de Langmuir y de la representación de Scatchard; coeficientes (n_H) y constantes (K_H) de Hill, de la adsorción de tirosinasa de epidermis de rana en ED3A-CPG, en tampón fosfato 0,05-M, pH = 7 y a 25° C.

Forma de la proteína	Isotherma de Freundlich		Isotherma de Langmuir		Cte. de saturación de Scatchard	Representación de Hill	
	α	$1/n$	K'	a_0	a_0	n_H	$K_H \times 10^9$
Extracto proenzima en tampón P _i 0,05 M, pH = 7	10,4	0,33	0,48	76,4	83,3	1,04	22,4
Extracto enzima en tampón P _i 0,05 M, pH = 7	1,79	0,54	1,7	34,3	39,8	1,13	11,8

Las representaciones de Scatchard (Koshland, 1970) para las isothermas de Langmuir (fig. 5), que fueron las que mostraron mejores coeficientes de correlación, se encuentran expresadas en la fig. 6. Por extrapolación de la isoterma hasta el eje de abscisas se calculó la constante de saturación del gel (a_0) por la proteína, comprobándose que los valores obtenidos (tabla I) fueron muy próximos, en ambos casos, a los obtenidos por la ecuación de Langmuir.

Por último, se efectuaron las representaciones de Hill de las citadas isothermas de Langmuir, obteniéndose las gráficas de la fig. 7. De las rectas ajustadas por mínimos cuadrados se calcularon los valores de los coeficientes y constantes de Hill cuyos valores también vienen expresados en la tabla I. En base a los resultados obtenidos respecto a los parámetros de adsorción de los distintos isothermas expresados en la tabla I, se puede deducir que la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG responde a una interacción de tipo univalente; descrita en base al cumplimiento de los isothermas del tipo de Langmuir que indican que la proteína se une a centros individuales e independientes, lo cual también se confirma por la forma

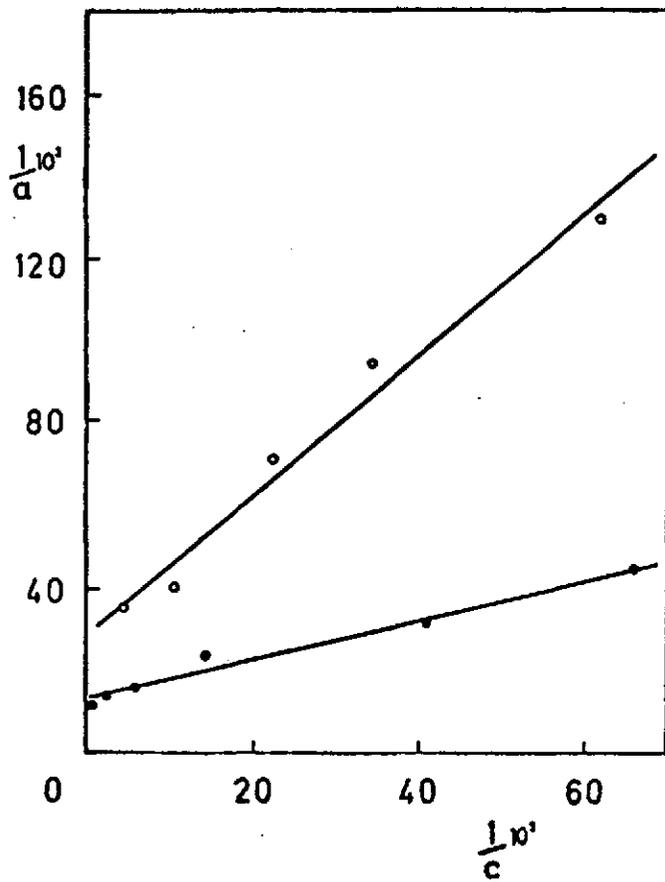


FIGURA 5.—Isotermas de Langmuir para la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG. a 25° C. La adsorción se realizó en tampón fosfato 0,05 M, pH = 7,0.
 ○—○ enzima.
 ●—● proenzima.

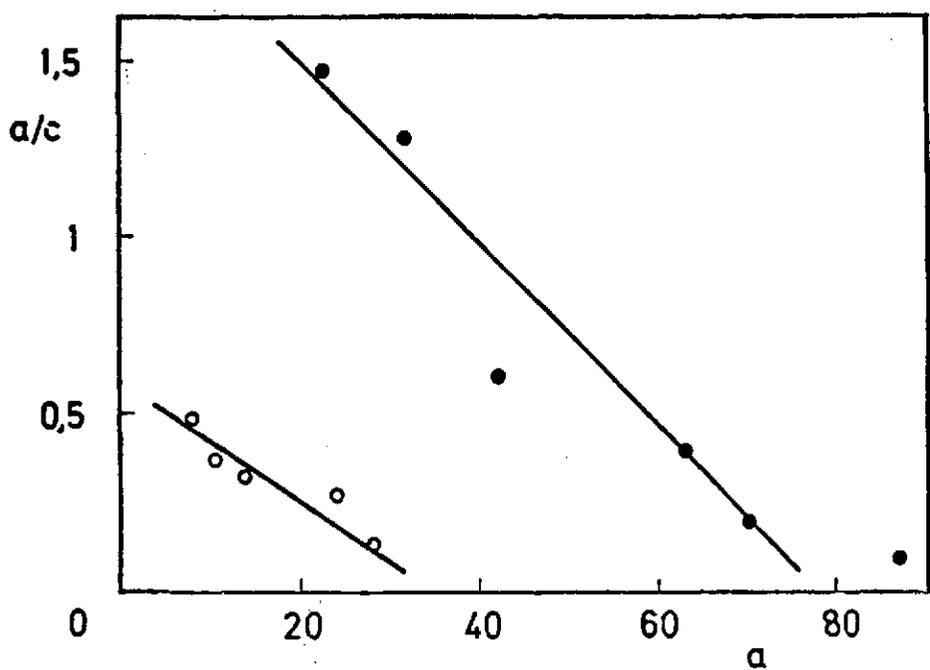


FIGURA 6.—Representaciones de Scatchard para las isotermas de Langmuir de la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG.
 ○—○ enzima. ●—● proenzima.



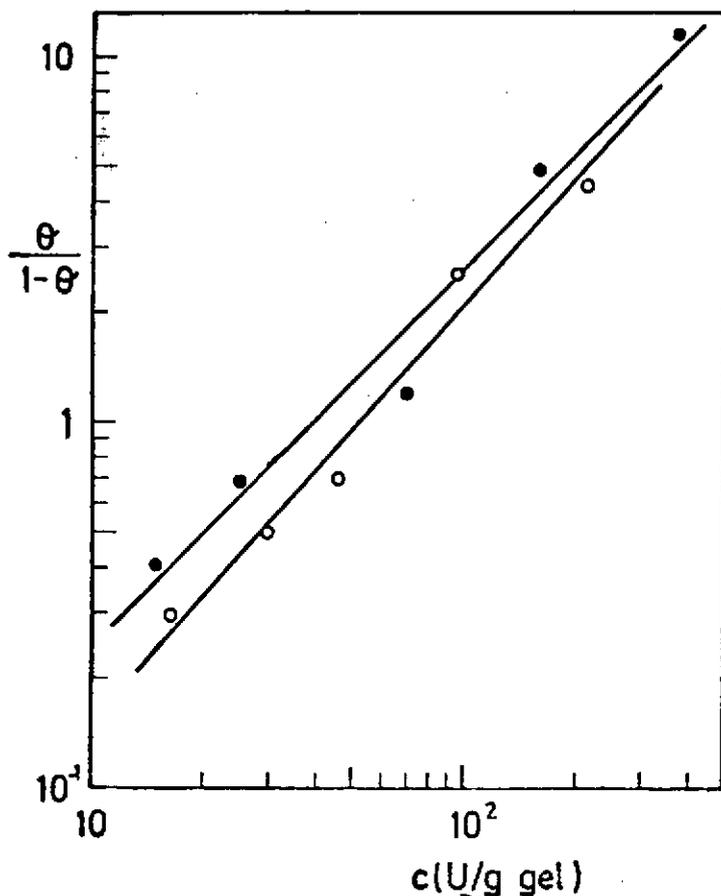


FIGURA 7.—Representación de Hill para la adsorción de tirosinasa a ED3A-CPG. Se utilizaron los valores obtenidos a partir de las isotermas de Langmuir representadas en la figura 5.

○ — ○ enzima.
● — ● proenzima.

de las curvas de Scatchard, que son completamente lineales, y los valores de los coeficientes de Hill, próximos a la unidad.

Los valores de la constante de saturación (a_0) permiten conocer la cantidad de proteína que satura al gel. Ya que en el caso del enzima, a_0 es mucho menor que para la forma inactiva de zimógeno, es factible deducir que el enzima posee una relación carga/superficie menor que la de la proenzima en su unión al soporte. Esta menor relación implicaría al mis-

mo tiempo, una menor densidad de grupos polares y una mayor superficie, achacable al desplegamiento de la molécula proteica en el proceso de activación.

PURIFICACIÓN DE TIROSINASA DE EPIDERMIS DE RANA POR CROMATOGRAFÍA EN ED3A-CPG

La tirosinasa se adsorbió como proenzima a fuerza iónicas bajas, suministradas por tampón fosfato 0,3 M. La figura 8 representa el perfil de

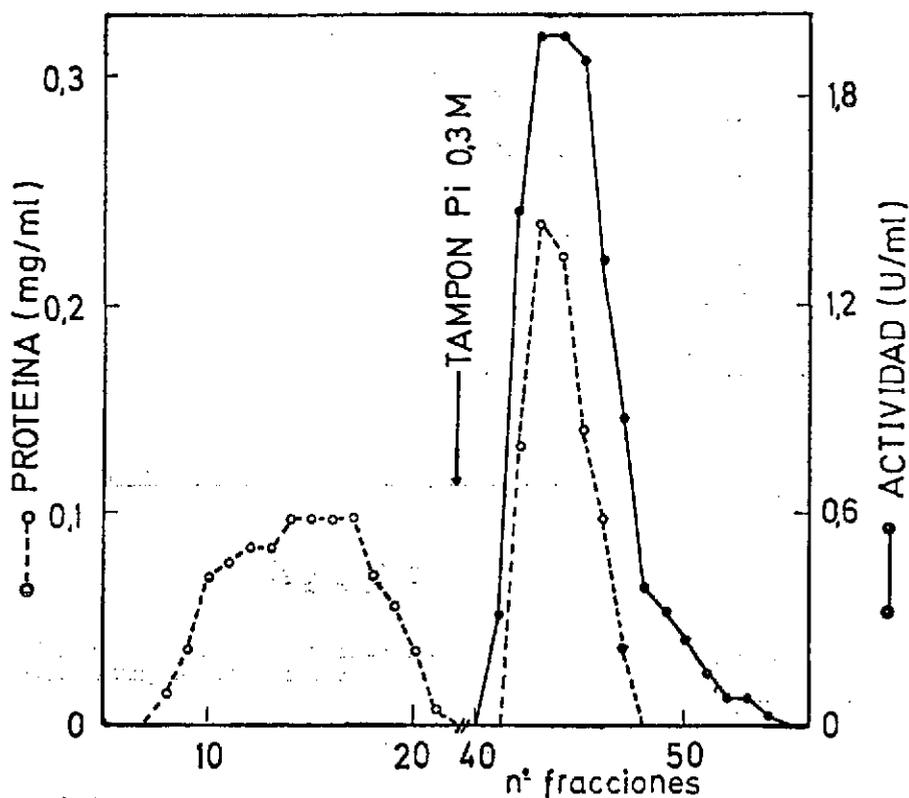


FIGURA 8.—Cromatografía de tirosinasa con ED3A-CPG. La adsorción se realizó con 5 ml de proenzima (38 U/mg) en fosfato 0,05 M, pH = 7,0 en una columna conteniendo 2,5 ml de gel, a una velocidad de 16 ml/h.

elución de actividad y proteína en la adsorción y desorción de 5 ml de extracto de proenzima en fosfato 0,05 M, pH = 7,0. Se observó una banda ancha de proteínas a fuerzas iónicas bajas sin actividad dopa oxidasa y

la aparición de un máximo de proteína que coincidió con el de actividad dopa-oxidasa al provocar la elución de tirosinasa con un incremento de la fuerza iónica. Los factores de purificación de las fracciones de mayor actividad, estuvieron comprendidos entre 8-11 y el porcentaje de proteína recogida osciló entre 80-90 %. Es decir, la interacción univalente de tirosinasa con el soporte ED3A-CPG puede aplicarse a la purificación de la misma, ya que los factores de purificación obtenidos son del mismo orden que los encontrados con CM-Sephadex y, sin embargo, la inactivación es menor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha subvencionado en parte por un proyecto de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

BIBLIOGRAFIA

- BARROW, G. M. (1980), *Química Física*, 2.ª ed., 2, 810-818, Editorial Reverté, Barcelona.
- FERRAGUT, J. A. (1980), «Análisis de la estructura cuaternaria de tirosinasa», Tesis doctoral, Universidad de Murcia, Facultad de Ciencias.
- GOZDZICKA-JOZEFIAK, K. A., y AUGUSTYNIAK, J. (1977), «Preparation of chelating exchangers with a polysaccharide network and low cross-linkage», *Journal of Chromatography*, 131, 91-97.
- HARTREE, E. (1972), «Protein determination: A modification of Lowry's method with a lineal photometric signal», *Anal. Biochem.*, 48, 422-427.
- IBORRA, J. L.; MANJÓN, A.; TARÍ, M., y LOZANO, J. A. (1979), «Activation of frog epidermis tyrosinase by immobilization on a solid support», *Gen. Pharm.*, 10, 143-145.
- KOSHLAND, D. E., Jr (1970), «The molecular basis for enzyme regulation», *The enzymes* (Boyer, P. D., ed.), 1, 341-396, Academic Press, N. Y.
- LONNERDAL, B.; CARLSSON, J., y PORATH, J. (1977), «Isolation of lactoferrin from human milk by metal chelate affinity chromatography», *FEBS Letters*, 75, 89-92.
- LOWE, C. R., y DEAN, P. D. G. (1974), *Affinity chromatography*, 10-80, Wiley and Sons, London.
- LOZANO, J. A.; MONTSERRAT, F.; GALINDO, J. D., y PEDREÑO, E. (1975), «Activatory action of trypsin on epidermis dopaoxidase», *Rev. Esp. Fisiol.*, 31, 21-28.
- PETTERSON, E. Å. (1975), *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Cellulosic ion exchangers*, Work, T. S., and Work, E.
- PHILLIPS, R. J., y FRITZ, J. S. (1978), «Chromatography of metal ions with a thioglycolate chelating resin», *Analytical Chemistry*, 50, 1504-1508.
- PORATH, J.; CARLSSON, J.; OLSON, I., y BELFRAY, G. (1975), «Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation», *Nature*, 258, 598-599.
- SCOPES, R. K. (1978), «Techniques for protein purification», en *Techniques in Protein and Enzyme Biochemistry*, Part I, B101/1-42, Elsevier/North-Holland, Comity Clare.
- SLOVAK, Z.; SMRZ, M.; DOAKAL, B., y SLOLAKOVA, S. (1979), «Analytical behaviour of hydrophilic glycomethacrylate gels with bound thiol groups», *Analytica Clinica Acta*, 111, 243-249.
- ZABORSKY, O. R. (1973), *Immobilized Enzymes*, CRC Press.