

SEPARACION ELECTROFORETICA DE DOS PROTEINAS ENZIMATICAS EN PREPARACIONES PURIFICADAS DE ARGINASA DE HIGADO Y DE ERITROCITOS HUMANOS. MOVILIDAD DE LOS COMPONENTES RAPIDOS EN AMBAS PREPARACIONES *

Separation of two enzyme proteins in purified preparations of human liver and erythrocyte arginases by zone electrophoresis. Mobility of the fast components in both preparations.

JULIO CABELLO, VICTORIA PRAJOUX y MARÍA PLAZA

Instituto de Química Fisiológica y Patológica, Escuela de Medicina, Universidad de Chile, Borgoño 1470, Santiago, Chile.

Recibido para publicación el 28 de Enero de 1966.

RESUMEN

Las preparaciones purificadas de arginasa, obtenidas de hígado y de eritrocitos humanos, contienen dos proteínas con actividad arginásica que se separan por electroforesis en agar a pH 8,0 y 8,6. Uno de estos componentes enzimáticos (S) migra escasamente hacia el cátodo e incluye un 5 a 10% de la actividad arginásica total de las preparaciones. El segundo componente (F) se desplaza rápidamente hacia el cátodo y posee el 90 - 95% de la actividad arginásica. La velocidad de migración del componente F en las preparaciones eritrocíticas es mayor que la del componente F hepático.

Calculando las movilidades electroforéticas a diferentes pH de los componentes F en ambas preparaciones, se determinó el punto en que la carga eléctrica neta de la molécula es nula. El punto neutro encontrado es pH 7,1 para el componente hepático y pH 5,5 para el componente eritrocítico.

El desplazamiento hacia el cátodo decrece a medida que disminuye el pH, lo que no concuerda con la variación predecible de las cargas provenientes de la disociación de los grupos ionizables de la estructura polipeptídica, pero puede explicarse por la presencia de cargas adicionales correspondientes al Mn^{++} ligado a la enzima que se va disociando a medida que el pH desciende. De este modo, el punto de neutralidad estaría determinado por las cargas de los grupos disociables libres de los aminoácidos y por cargas variables agregadas a la molécula de la enzima, y su significado es distinto al del punto isoeléctrico de la proteína.

INTRODUCCIÓN

La arginasa —(L-arginina-urea hidrolasa, E.C.3.5.3.1) — enzima que cierra e inicia el ciclo de la ureogénesis a través de los productos de su actividad y que de este modo regula la transformación del amoniaco en urea— se encuentra en el hígado de los animales ureotélicos y en

la sangre de algunos mamíferos (1). En la especie humana, la razón entre las concentraciones de arginasa existentes en el hígado y en los eritrocitos fluctúa en torno de 60:1. Las enzimas purificadas a partir de hígado y de eritrocitos humanos, poseen propiedades cinéticas e inmunológicas similares (2, 3). La inmuno-electroforesis (4) y la cromatografía en celulosas sustituidas (5) revelan que en las preparaciones purificadas de una y de otra procedencia existen dos proteínas con actividad arginásica.

El análisis electroforético de las preparaciones purificadas, realizado en medios

* Este trabajo fue financiado por la Comisión de Ayuda a la Investigación Científica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Proyecto 62/19) y por la Fundación Rockefeller (Grant 60038) en un programa conjunto.

TABLA I

Actividad, proteínas y manganeso en 1 mg de las preparaciones parcialmente purificadas de arginasa hepática y eritrocítica humanas

Preparación	Actividad U	Proteínas mg	Manganeso mg	Actividad específica U/mg proteína
1. Hepática	104,40	0,412	0,046	252
2. Eritrocítica	4,02	0,676	0,057	8,4

provistos de distintos amortiguadores, ha permitido en cada una reconocer las proteínas que contienen, distinguir dos componentes que hidrolizan la arginina y definir algunas de sus propiedades físico-químicas.

El método electroforético proporciona, además, una información aprovechable para elaborar una técnica de purificación más avanzada de la enzima.

MATERIAL Y MÉTODOS

Preparaciones enzimáticas

Tomando como base el procedimiento de Roholt y Bagot que fracciona las proteínas por acción del calor, de la acetona y del sulfato de amonio en presencia de Mn^{2+} (6), se han obtenido preparaciones parcialmente purificadas de arginasa, a partir de homogenizados de hígado y de lisados de eritrocitos humanos, cuyas actividades son respectivamente 80 y 400 veces mayores que las de los tejidos originales.

La actividad enzimática y algunos datos sobre la composición de los productos usados en este trabajo aparecen en la Tabla I. La determinación del manganeso se realizó por el procedimiento de Ballentine y Burford (7).

Procedimiento electroforético

Se disolvieron 10 mg de arginasa hepática ó 50 mg de arginasa eritrocítica en 1 ml de agua bidestilada. 5 microlitros de cada una de estas soluciones se colocaron en el centro de portaobjetos cubiertos con agar al 1% que se prepara disolviéndolo en las mismas soluciones amortiguadoras empleadas como medio conductor.

La electroforesis se realizó con el aparato LKB a la temperatura ambiente, pasando una corriente de 4 a 7 miliamperios con una diferencia de potencial de 230 voltios, durante una hora. La caída de voltaje en las láminas fue de 3,5 a 4 voltios por cm.

Se emplearon soluciones amortiguadoras de tris-maleato 0,05 M entre pH 8,6 y 5,4, y de acetato 0,05 M entre pH 5,2 y 3,6. Todas las soluciones amortiguadoras contenían, además, Mn^{2+} 0,0001 M.

Al término de la electroforesis las láminas se dividieron en dos grupos iguales. a) Uno de ellos se cortó en 26 secciones trans-

versales de 3 mm. Cada sección se homogenizó en 0,5 ml NaCl 0,15 M y se midió la actividad arginásica después de activar la enzima con sulfato de manganeso 0,0026 M, según el método anteriormente descrito (8). Las proteínas se determinaron por el método de Lowry *et al.* (9); b) El segundo grupo de láminas se tiñó con amido schwarz (negro de naftaleno) según el procedimiento de Uriel (10).

Con estos datos se pudieron deducir las movilidades electroforéticas de las fracciones arginásicas de migración rápida que constituyen la masa principal de la enzima en ambas preparaciones. Considerando el limitado poder resolutivo de la técnica electroforética empleada, las posibles interacciones entre las diversas proteínas y los fenómenos electrocinéticos propios del agar, las cifras obtenidas no tienen un carácter riguroso y representan más bien un orden de magnitud.

La migración real de la enzima se obtuvo restando a la migración observada el desplazamiento por flujo electroosmótico, que se determinó midiendo las migraciones en agar de dos proteínas cuyas movilidades en electroforesis libre son conocidas: la seroalbúmina bovina y la ribonucleasa cristalina (11).

RESULTADOS

1.—Distribución de la arginasa hepática

Los perfiles de distribución de la actividad arginásica de las preparaciones hepáticas en los segmentos de la lámina de agar después de electroforesis a diversos pH, se exponen en la Fig. 1. El 90 a 95% de la actividad enzimática se concentra en una proteína (F) que migra rápidamente hacia el cátodo a pH 8,6 y 8,0. El 5 a 10% restante corresponde a una proteína (S) que permanece próxima al origen o migra lentamente en la misma dirección y que sólo se individualiza a pH 8,6 y 8,0. Si el pH al cual se efectúa la electroforesis es más bajo, el movimiento de las proteínas se retarda y ambas tienden a fundirse en una sola masa.

La proteína de mayor actividad enzimática (F) se desplaza hacia el polo ne-

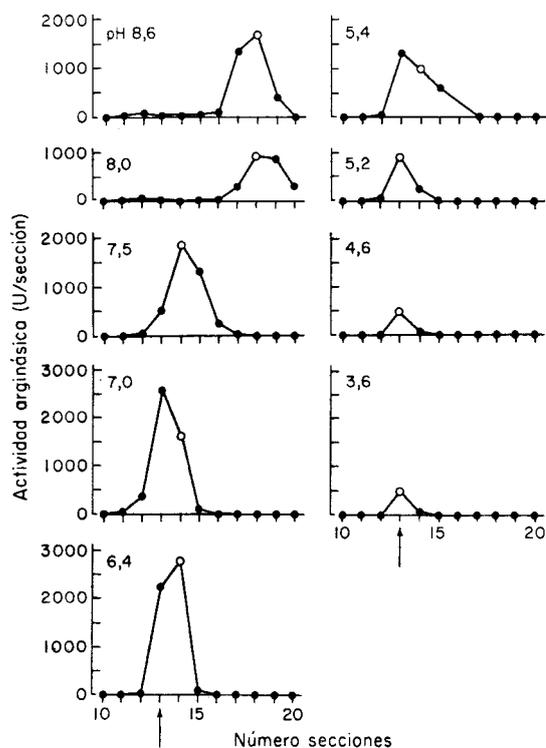


Fig. 1. Distribución de la actividad arginásica en una preparación parcialmente purificada a partir de hígado humano, después de migración electroforética en gel de agar, en medios de diferente pH. El círculo blanco de las curvas indica la sección en que la actividad específica es más alta. Las flechas señalan el punto de partida.

gativo con una velocidad de 15 mm/hora a pH 8,6 y 8,0. A pH 7,5, su desplazamiento se reduce a 3 mm/hora y no se modifica hasta pH 5,4 en tris-maleato. Por debajo de este pH, en amortiguador de acetato, la enzima se inactiva y permanece inmóvil en el punto de partida.

2.—Distribución de la arginasa eritrocítica

Los perfiles de distribución de la actividad arginásica de las preparaciones eritrocíticas en los segmentos de agar, después de electroforesis a diversos pH, se exponen en la Fig. 2. La zona que presenta la más alta actividad arginásica del eritrocito, al igual que en las preparaciones de hígado, corresponde a una proteína (F) que migra hacia el cátodo con una velocidad de 18 mm/hora a pH 8,6 y de 15 mm/hora a pH 8,0. A pH 7,5 su desplazamiento disminuye a 9 mm, persistiendo en esta posición hasta pH 6,4. A pH 5,4 y 5,2 la distancia de migración se

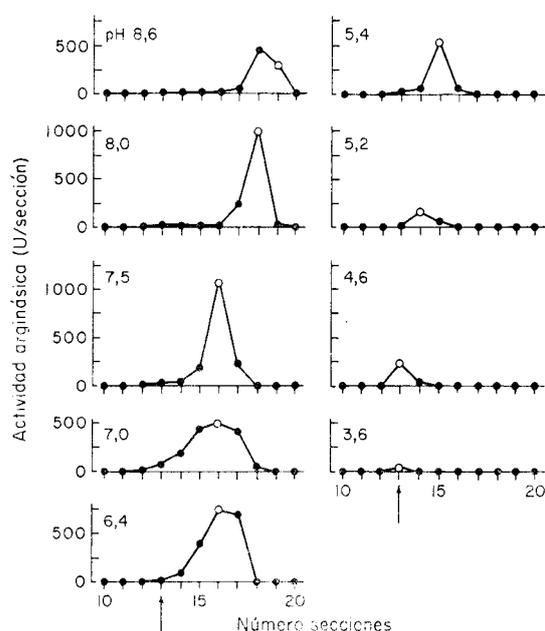


Fig. 2. Distribución de la actividad arginásica en una preparación parcialmente purificada a partir de eritrocitos humanos, después de migración electroforética en gel de agar, en medios de diferente pH. El círculo blanco de las curvas indica la sección en que la actividad específica es más alta. Las flechas señalan el punto de partida.

reduce a 3 mm. Por debajo de pH 5,2, la enzima se inactiva y permanece inmóvil en el punto de partida. Una segunda zona próxima al origen corresponde a una proteína (S) con escasa actividad arginásica.

Comparando el desplazamiento de los componentes rápidos en ambas preparaciones, es evidente que la movilidad electroforética del componente F eritrocítico es mayor que la del componente F hepático, pues el primero migra a mayor distancia entre pH 8,6 y 5,4 denotando poseer, en consecuencia, una carga positiva más elevada.

3.—Ubicación de las enzimas en las imágenes electroforéticas

Para apreciar la composición proteica de ambas preparaciones, se examinaron las láminas en que las proteínas fueron fijadas y teñidas, después de ser sometidas al mismo procedimiento electroforético.

Como muestran las imágenes electroforéticas (Fig. 3) la mejor dispersión de las proteínas y separación de la arginasa

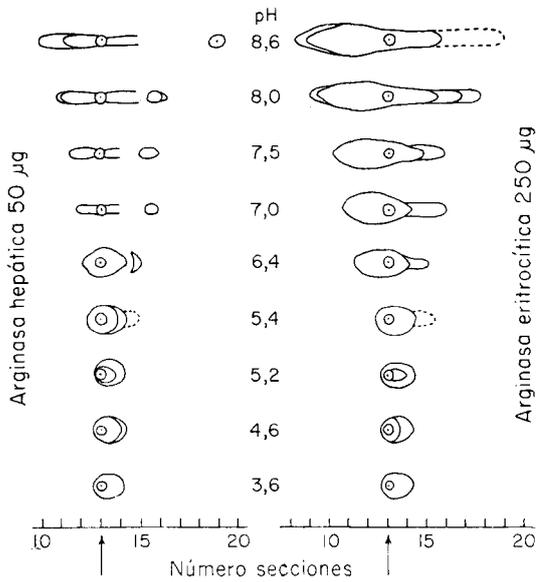


Fig. 3. Imagen electroforética de preparaciones de arginasa purificada de hígado (izquierda) y de eritrocitos humanos (derecha), teñidas con amido schwarz, después de migración electroforética a diferentes pH. Las flechas señalan el punto de partida.

tiene lugar a pH 8,6. A pH 8,0 e inferiores, la movilidad de las diversas proteínas tiende a disminuir y se van agrupando hasta constituir una masa común en el punto de partida. En las preparaciones hepáticas, a pH 8,6, la porción principal de la arginasa se desplaza como una proteína individual y homogénea cuya actividad específica es el doble de la existente en el producto original. En las preparaciones eritrocíticas, la actividad arginásica más importante se localiza en una zona no visible de las imágenes electroforéticas, alcanzando una actividad

específica 7-10 veces superior a la de la preparación inicial.

4.—Movilidad electroforética de los componentes rápidos

La migración directamente observada en la electroforesis de zona no indica la movilidad verdadera de la proteína, ya que la migración aparente es resultado del juego de dos fuerzas antagónicas principales: la carga eléctrica de los grupos disociables de la molécula y de la capa iónica que la rodea, que dependen del pH, naturaleza y fuerza iónica del amortiguador; y la corriente electroendosmótica de la solución amortiguadora que fluye hacia el cátodo, originada en la carga negativa de la fase estacionaria, en este caso el gel de agar. Otros factores que influyen sobre la velocidad de migración son la forma y tamaño de la molécula proteica y la estructura del gel cuya red capilar tortuosa opera como un cedazo.

Una determinación aproximada de la movilidad electroforética en nuestros experimentos requiere el empleo de proteínas de referencia, cuyas movilidades son conocidas, para calcular el desplazamiento electroendosmótico y sustraerlo de la migración observada. De este modo, la movilidad verdadera de los componentes F hepático y eritrocíticos se determinó aplicando un procedimiento similar al descrito por Raacke y Li (11) en el estudio de la α -corticotropina.

Los valores de la corriente electroendosmótica en cuatro diferentes magnitudes de pH se dedujeron de los desplazamientos de la seroalbúmina y de la ribonucleasa cristalina y sirvieron para corregir las distancias de migración observada (Tabla II).

TABLA II

Migraciones observadas y corregidas de los componentes F en preparaciones purificadas de arginasa (mm en una hora)

pH	Componente hepático		Componente eritrocítico		Flujo electroosmótico
	Migración observada	Migración corregida	Migración observada	Migración corregida	
5,4	3	—	2	—0,80	2,80
6,4	3	—2,13	9	3,87	5,13
7,0	3	—1,15	9	4,85	4,15
8,0	15	5,80	15	5,80	9,20
8,6	15	—	18	—	—

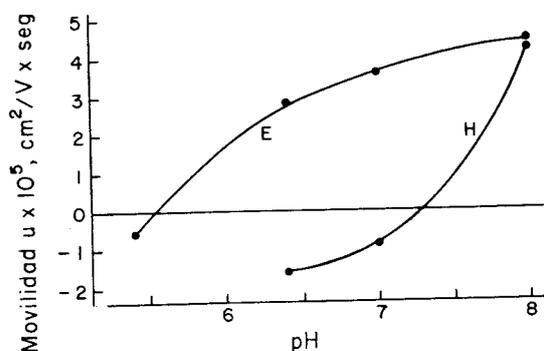


Fig. 4. Variaciones de la movilidad electroforética del componente de migración rápida a diferentes pH en preparaciones de arginasa purificada de hígado (H) y de eritrocitos (E).

Con estos datos, se calcularon las movilidades electroforéticas de los componentes rápidos (Tabla III, Fig. 4), cuya seguridad está sujeta a las restricciones ya mencionadas. Las movilidades verdaderas del componente F hepático caen rápidamente entre pH 8,0 y 7,0, invirtiéndose la dirección del desplazamiento. El componente F eritrocítico, en cambio, mantiene su carga positiva hasta pH 6,4, haciéndose negativa a pH 5,4. Estas variaciones en la magnitud y sentido de las movilidades electroforéticas, no admiten una explicación adecuada dentro de los conceptos que radican la carga de las proteínas en los grupos ionizables de sus residuos aminoacídicos.

Con esta información se determinó el valor de pH en que la proteína está desprovista de carga neta y es nula su migración. Este punto neutro, distinto del clásico punto isoeléctrico de las estructuras polipeptídicas es pH 7,1 para el componente F de la arginasa hepática, y pH 5,5 para el componente F de la arginasa eritrocítica.

DISCUSIÓN

Las preparaciones de arginasa purificada de hígado y de eritrocitos humanos son heterogéneas tanto en su composición proteica como enzimática, pues están constituidas por proteínas inactivas y por dos proteínas enzimáticas que se separan a pH 8,0 y 8,6 en electroforesis en gel de agar y en inmunoelectroforesis.

El componente S migra muy lentamente hacia el polo negativo. El componente

TABLA III

Movilidades electroforéticas en agar de los componentes F en preparaciones purificadas de arginasa ($U \times 10^5$, $cm^2/volt/seg$).

pH	Componente hepático	Componente eritrocítico
5,4	—	—0,6
6,4	—1,6	2,9
7,0	—0,9	3,6
8,0	4,3	4,5

F migra rápidamente hacia el polo negativo a pH 8,0 y 8,6. La velocidad de migración del componente F eritrocítico es superior a la del componente F hepático. A pH más bajos la migración catódica de los componentes F disminuye, lo que indica una disminución de la carga positiva de la molécula. Esta variación dependiente del pH no concuerda con la que podría esperarse si el origen de la carga de la molécula proviniera exclusivamente de los grupos ionizables de la cadena polipeptídica. En efecto, si la proteína se encuentra por encima de su punto isoeléctrico, la carga neta de la molécula será negativa y migrará hacia el ánodo. Si la proteína se encuentra, en cambio, por debajo de su punto isoeléctrico, tendrá carga positiva y migrará hacia el cátodo, pero esta carga y la movilidad aumentarán —y en ningún caso disminuirán— cuando el pH de sus soluciones baja.

La explicación más plausible de esta conducta anómala de los compuestos F en la electroforesis de zona es que gran parte de la carga positiva de la arginasa se origina en los iones Mn^{2+} fijados por enlaces coordinativos a la superficie de la enzima. La pérdida gradual de la carga positiva a medida que desciende el pH, no puede atribuirse al predominio de grupos con alto pK en la molécula, pues en tal caso el punto isoeléctrico de la arginasa debería ser superior a 8,6 y la carga positiva de la molécula iría, contrariamente a lo observado, aumentando con el descenso del pH, ya que los grupos negativos tienden a reasociarse.

La disminución de la carga positiva de la arginasa cuando aumenta la concentración de iones hidrógeno obedecería, en-

tonces, a la disociación gradual del Mn^{2+} combinado, que restablece la preeminencia de los grupos aniónicos compensados o bloqueados por el metal en medio alcalino.

La asociación o disociación reversible del catión Mn^{2+} a la enzima es un factor determinante de la carga positiva de la molécula. El punto neutro en que la movilidad de la arginasa es cero, encontrado en nuestros experimentos, debería llamarse, empleando un lenguaje conservador, punto isoelectrico aparente, ya que su significación no es la misma que la del punto isoelectrico clásico, determinado por la asociación o disociación del H^+ con grupos ácidos o básicos de la proteína y por la fuerza iónica del medio.

La mayor o menor proporción de Mn^{2+} ligado a la molécula modifica la carga y la movilidad de la enzima y explicaría la disparidad en los valores del punto isoelectrico de la arginasa, que van desde pH 4,05 a pH 6,6, dados por diversos autores (12, 13, 14).

La arginasa es, de este modo, una metaloproteína caracterizada por un amplio intervalo de separación en la escala de pH entre el punto isoelectrico "polipeptídico" y el punto de neutralización eléctrica determinado por una compensación de cargas que incluyen no sólo las provenientes de los aminoácidos sino también las que son inherentes al metal asociado.

Un reconocimiento incipiente de esta diferencia aparece ya contenida en la distinción que comúnmente se hace entre el punto isoiónico y el punto isoelectrico de una proteína.

El punto de neutralización de cargas del compuesto F eritrocítico es 5,5 y el del componente F hepático 7,1, lo que indica que el primero retiene tenazmente el Mn^{2+} formando una combinación más estable frente a los incrementos de la concentración hidrónica.

Es un hecho bien establecido que la presencia de Mn^{2+} es esencial para la actividad y estabilidad de la enzima, siendo éstas proporcionales, dentro de ciertos límites, a la cantidad de Mn^{2+} fijado. Por otra parte, el metal unido a la proteína es fácilmente dissociable y puede ser eliminado por diálisis. Es posible que, además de la fracción de Mn^{2+} ligado a la proteína y que forma parte del sitio activo o del mecanismo catalítico, exista también una fracción más variable que se

combina a la enzima sin afectar directamente su actividad, uniéndose por electrovalencia con grupos iónicos distantes del sitio activo, los que al disociarse en medio ácido reducen la carga positiva de la molécula sin modificar apreciablemente su actividad enzimática. En cierto nivel crítico de pH, que no está determinado, y que dependería de la concentración de Mn^{2+} , la fracción de metal unido al centro catalítico de la enzima también se disociaría, produciéndose la inactivación de la enzima, de carácter reversible.

Finalmente, la existencia de dos componentes (S y F) con actividad arginásica, tanto en la preparación hepática como en la eritrocítica, el gran desnivel de sus actividades específicas, y sus diferencias inmunoquímicas, electroforéticas y cromatográficas, suscitan el problema de determinar si ambos componentes son formas moleculares distintas o isozimas, o si una de ellas constituye subunidad o polímero de una estructura fundamental que se disgrega o asocia a nivel de la organización cuaternaria de la molécula.

SUMMARY

Partially purified arginase preparations from human liver and erythrocytes (Table I) appear heterogenous in agar gel electrophoresis. They are constituted by inactive proteins and by two enzyme proteins discerned at pH 8.0 and 8.6, that can be situated by the arginase activity found in sections of the agar slides.

One of these components (S) containing only 5 to 10 percent of the arginase activity in both preparations remains near the starting well and migrates slowly to the cathode. The second component (F) enclosing 90 to 95 percent of the arginase activity in both preparations moves fastly to the cathode at pH 8.0 and 8.6. The migration rate of the erythrocytes F component (Fig. 2) is higher than the migration rate of the liver F component (Fig. 1).

In the electrophoretic images of liver preparations, the F protein is located in a separate zone distant of other proteins (Fig. 3, left). In erythrocyte preparations the low concentration of its F protein does not give a visible spot (Fig. 3, right), but its position is made clear when the arginase activity of the agar plates is measured.

The electrophoretic mobilities of F components in both enzyme preparations can be calculated by recording the observed migration and subtracting the shift produced by electroendosmotic flux (Table II).

From the electrophoretic mobilities at different pH, the point where the anionic and cationic charges in the molecule compensate can be determined. This neutral point is pH 7.1 for the liver component and pH 5.5 for the erythrocyte component (Fig. 4 and Table III).

The electrophoretic behavior of these proteins at different pH, particularly the decrease of the cathodic migration when the hydronium concentration increases, may be explained by the action of heavy additional charges furnished by Mn^{2+} cations to the enzyme molecule, that would be gradually drawn away as pH is going down.

The number of complexed ions affect the electrophoretic mobility and the electric neutral point of the metalloprotein. This neutral point where inherent and acquired charges equilibrate does not correspond in this case to the usually defined isoionic and isoelectric points of the protein which are essentially determined by the dissociation of ionizable groups in the amino acid residues.

REFERENCIAS

- 1.— CABELLO, J., PRAJOUX, V., BASILIO, C. y PLAZA, M. — *Comp. Biochem. Physiol.* **6**:111, 1962.
- 2.— CABELLO, J., BASILIO, C. y PRAJOUX, V.— *Biochim. Biophys. Acta*, **48**:148, 1961.
- 3.— CABELLO, J., PRAJOUX, V. y PLAZA, M. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**:38, 1964.
- 4.— CABELLO, J., PRAJOUX, V. y PLAZA, M. — *Arch. Biol. Med. Exper.* **1**:168, 1964.
- 5.— BASCUR, L., CABELLO, J., VÉLIZ, M. y GONZÁLEZ, A. — *Resúmenes VI Congreso ALACF, Viña del Mar (Chile)*, N° 96, p. 45, 1964.
- 6.— GREENBERG, D. M., en *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P. y Kaplan, N. O. eds. Academic Press, New York, 1955, Vol. 2, p. 368.
- 7.— BALLENTINE, R. y BURFORD, D. D. en *Methods in Enzymology*, Colowick, S. P. y Kaplan, N.O. eds. Academic Press, New York, 1957, Vol. 3, p. 1014.
- 8.— CABELLO, J., PRAJOUX, V. y PLAZA, M.— *Biochim. Biophys. Acta*, **105**:583, 1965.
- 9.— LOWRY, O. H., ROSENBROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J. — *J. Biol. Chem.*, **193**:265, 1951.
- 10.— URIEL, J. y GRABAR, P. — *Bull. Soc. Chim. Biol.* **37**:783, 1955.
- 11.— RAACKE, I. D. y LI, C. H. — *J. Biol. Chem.* **215**:277, 1955.
- 12.— VAN SLYKE, D. D. y ARCHIBALD, R. M. — *Federation Proc.* **1**:139, 1942.
- 13.— MOHAMED, M. S. y GREENBERG, D. M. — *Arch. Biochem.* **8**:349, 1955.
- 14.— GRASSMAN, W., HÖRMAN, H. y JANOWSKY, O. — *Zeit. Physiol. Chem.* **312**:273, 1958.