

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTRUCTURA PRIMARIA DE LA APOFERRITINA
DE HIGADO DE RATA.**

EXTREMO AMINO

31

EDGAR R. BARAHONA BUSTILLOS

Q U I M I C O

1 9 7 4



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
AGE 1974
FECHA 11/12/74
PROC.



QUIMICA

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE	PROF. ESTELA SANCHEZ DE JIMENEZ
VOCAL	PROF. ALEJANDRO BLANCO LABRA
SECRETARIO	PROF. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN
1er. SUPLENTE	PROF. ANGELA SOTELO LOPEZ
2do. SUPLENTE	PROF. VICTORIA VALLES DE BOURGES

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TRABAJO:

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION

SUSTENTANTE: EDGAR R. BARAHONA BUSTILLOS

ASESOR DEL TEMA: DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

La realización de este trabajo fue posible gracias a un donativo otorgado por MEAD JOHNSON DE MEXICO, S. A. de C. V., al Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de la Nutrición.

El reactivo Hi-Dex utilizado durante la experimentación fue gentilmente donado por el laboratorio Mead Johnson de México, S. A. de C. V.

El reactivo Desferal utilizado durante la experimentación fue donado gentilmente por el laboratorio Ciba de México, S. A.

Agradezco al personal del Departamento
División de Nutrición del Instituto Na-
cional de la Nutrición y de una manera
especial al I.B.Q. Eduardo Mendoza por
su colaboración y asesoría.

Agradezco al B. Pedro Campos del -
Instituto de Biología de la Univer-
sidad Nacional Autónoma su colabora-
ción en la realización de este tra-
bajo.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

AL DR. ALBERTO HUBERMAN WAJSMAN

A LA DRA. GRACIELA DELHUMEAU DE ONGAY

AL DR. JESUS M. RODRIGUEZ M.

A MIS MAESTROS

A MIS COMPAÑEROS DE LABORATORIO

CONTENIDO

	<u>PAGINA</u>
I INTRODUCCION	1
II ANIMALES, REACTIVOS Y METODOS	18
1. ANIMALES	18
2. REACTIVOS	18
N-acetil-L-serina-C ¹⁴	19
Acetil-hidrazida	20
2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida	20
Acido 2-pirrolidón-5-carboxílico	21
1-acetil-2-dansil-hidrazida	21
Preparación y regeneración de las resinas de intercambio iónico	21
3. METODOS	22
Aislamiento y purificación de ferritina de hígado de rata	22
A. Aislamiento	22
B. Purificación por cromatografía	23
C. Determinación de pureza	23
Reducción a apoferritina	24
Dinitrofenilación de la apoferritina de hígado de rata	25
Preparación de las placas de cromatografía.	26
Identificación del grupo bloqueador	27

Recromatografía del producto de la reacción de Phillips aplicada a la apoferritina de hígado de rata	29
4. Obtención y purificación del péptido inicial bloqueado	30
A. Desnaturalización	30
B. Hidrólisis enzimática	30
C. Cromatografía en columna de intercambio iónico	31
D. Cromatografía en columna de resina Dowex AG2-X8	32
E. Determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos de la columna de Dowex AG2-X8	32
F. Identificación por cromatografía bidimensional de la 1-acetil-2-dansil-hidrazida.	33
5. Hidracinólisis del péptido aislado	34
Hidrólisis enzimática con carboxipeptidasa A	34
6. Técnicas utilizadas en el transcurso de la experimentación	36
Determinación de proteína	36
Cuantificación de aminoácidos	36
Hidrólisis alcalina	37
Hidrólisis ácida	38
III RESULTADOS	42
Aislamiento	42

Purificación por cromatografía en Sephadex G-200	43
Criterio de pureza	43
Reducción a apoferritina	46
Investigación de la existencia del bloqueo del extremo amino	46
Identificación del grupo bloqueador	47
Obtención y purificación del péptido inicial bloqueado	54
Cromatografía en resina Dowex AG50-X8, H^+ ...	54
Cromatografía en columna de Dowex AG2-X8, Cl^- ..	56
IV DISCUSION	71
V CONCLUSIONES	90
VI BIBLIOGRAFIA	94

I

INTRODUCCION

Schmiedberg, farmacólogo alemán, describió en 1894 una substancia proteínica que llamó ferritina, que contenía 6% de hierro y cantidades variables de fósforo. El primero que tuvo buen éxito en aislarla de bazo de caballo y recristalizarla con sulfato de cadmio fue Laufberger en 1937 y la denominó ferritina, (1).

La ferritina es una holoproteína que consiste de una parte proteínica (apoferritina) y de un núcleo coloidal de hidroxí-fosfato férrico, de grado de saturación variable.

La ferritina se encuentra principalmente en bazo e hígado y en menor grado en médula ósea, riñón, músculo esquelético, corazón, placenta, testículo y en el plasma circulante en casos patológicos (2) aunque se le ha reportado también en casos normales (3, 4, 5). Existe esta proteína también en plantas, invertebrados e incluso en hongos.

Como se ve de los datos anteriores no está confinada totalmente a órganos vitalmente involucrados en el metabolismo básico del hierro. Parece ser que casi todas las células la sintetizan o son capaces de hacerlo, (aunque no

existen reportes de síntesis de esta proteína en cerebro).

El grado de saturación con hierro de la ferritina puede ir desde cero hasta un 25% del peso seco de la proteína (6). La ferritina saturada tiene un peso molecular de 900,000 daltons y contiene aproximadamente de 4,000 a 5,000 átomos de ión férrico por molécula (2), reportándose un promedio de saturación con hierro para la ferritina de bazo de caballo de 3,700 átomos (7).

La naturaleza exacta del complejo coloidal de hierro en la ferritina es incierto. Probablemente es un polímero de composición $(\text{FeOOH})_8 \cdot \text{FeO} \cdot \text{PO}_3\text{H}_2$ y se cree que el fósforo es un componente esencial. El diámetro de la micela es entre 70-75 Å y el de la proteína es de 120 Å (2).

El intercambio de hierro involucra interacciones de célula a célula, de moléculas que contienen hierro y con estructura apropiada para esa función.

La función principal de la ferritina, es la de almacenar el hierro en forma insoluble, de la cual puede ser movilizado, existiendo un equilibrio dinámico del hierro del tejido con el del plasma, en el cual circula asociado a la transferrina (8) que es una beta-globulina de peso molecular 80,000 daltons, capaz de combinarse con dos moléculas de hierro (9). De esta manera provee la ferritina de una reserva de hierro no tóxico intracelular y disponible para el metabolismo. Como ejemplo de esta disponibilidad, se encuentra con frecuencia en la literatura la hipótesis de que el hierro de la ferritina de reticulocito se utiliza para la síntesis de hemoglobina (9), hipótesis que no ha sido suficientemente probada.

El hierro también puede ser almacenado mediante la hemosiderina, proteína que no ha sido muy bien estudiada y que se cree pueda ser un producto de degradación de la ferritina.

Aún cuando el hierro es un elemento esencial para el organismo, puede escapar de la unión específica de las proteínas o células y entonces se le llama hierro libre y es tóxico en cualquier medida.

Desde que en 1947 se ha venido reconociendo clínicamente el envenenamiento por ingestión de sales de hierro,

se han propuesto mecanismos que tratan de explicar la toxicidad de este metal.

Por ejemplo, inyectado intravenosamente puede causar una muerte rápida (en 5 minutos) en forma tal que los órganos involucrados en su almacenaje y metabolismo no alcanzan a mostrar lesión.

La patogénesis por envenenamiento revela alteraciones severas que pueden resumirse en (10):

- a) Necrosis hemorrágica del tracto intestinal
- b) Acidosis metabólica
- c) Defectos de coagulación
- d) Daño hepático
- e) "Estado de choque"

Existen estudios que tratan de describir la morfogénesis de esta toxicidad (11). Witzleben ha observado mediante microscopía, daño severo en las mitocondrias de las células del hígado después de inyección intravenosa de sulfato ferroso. Además, este autor junto con Chaffery demostró por métodos histoquímicos alteración en un número de enzimas oxidativas de las células hepáticas, como son: deshidrogenasa succínica, citocromo oxidasa y adenosina trifosfatasa - (10).

Apoyados en estos datos y para explicar en parte la toxicidad debida al hierro, los autores defienden la hipótesis de que este metal causa una disminución en los equivalentes de reducción, con una iniciación consecuente de la peroxidación de lípidos de la célula (11).

Ahora bien, teniendo en cuenta este nuevo aspecto del hierro, podemos pensar en la ferritina como uno de los principales agentes destoxificantes de la célula. Resumiendo así para la ferritina sus tres funciones como (12):

- a) Almacén intracelular para el hierro
- b) Agente destoxificante

c) Regulador de la absorción del hierro

Se ha postulado desde hace tiempo que los polirribosomas unidos a membrana (fijos) son los responsables de la síntesis de proteínas exportables y que los polirribosomas que existen libres en el citoplasma, son los que sintetizan las proteínas que almacena la célula.

Siendo la ferritina una proteína almacenada era de pensarse que se sintetizara en los polisomas libres, de lo cual existe evidencia, (13).

Sin embargo, aún cuando podría decirse que estos polisomas libres son el sitio preferencial de síntesis de la apoferritina, existe cierta evidencia de que los polisomas fijos también intervienen en la síntesis de alguna subunidad de la ferritina (14).

La ferritina se aísla fácilmente de bazo de caballo en virtud de su estabilidad a altas temperaturas, su facilidad de precipitación con sulfato de amonio al 35-50% de saturación y de su fácil cristalización con sulfato de cadmio al 5%. Otros métodos de purificación además de los debidos a variaciones de pH y fraccionamiento con sales, son la cromatografía en carboximetil-celulosa, Sephadex G-200 y ultracentrifugación. La mayoría de los autores utiliza la combinación de todas estas técnicas. Sin embargo, para un aislamiento más específico y a pequeña escala es muy común encontrar en la literatura su aislamiento mediante anticuerpo específico, incluso se reporta que no existen diferencias inmunológicas entre ferritinas obtenidas por métodos diferentes de preparación (15).

Hay que tener siempre presente que influye mucho la especie y el órgano de que se trate, para aplicar con éxito los métodos de aislamiento y purificación antes mencionados. Por ejemplo, para la purificación por cristalización de la ferritina de hígado de rata, con sulfato de cadmio, se reporta que influye en el rendimiento la existencia de iones cloruro en el medio, la concentración de sulfato de cadmio, del cloruro de sodio, así como un pH adecuado (16).

Algunas veces es necesario trabajar con la ferritina o apoferritina de acuerdo con el estudio que se pretenda llevar a cabo. Entonces la apoferritina se obtiene a partir de la proteína nativa ya purificada, por eliminación

química del hierro mediante reductores como el hidrosulfito de sodio (ditionita, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), ácido ascórbico, ácido tioglicólico y quelantes tales como 2,2'-bipiridil o Desferal. A veces se obtiene directamente la apoferritina mediante ultracentrifugación. Sin embargo, no sería este un método de obtención sino de separación de las diferentes fracciones de ferritina con contenido variable de hierro.

Por diversas técnicas como equilibrio de sedimentación, equilibrio de sedimentación-difusión, difracción de la luz, etc., se han obtenido pesos moleculares para esta apoferritina que van desde 430,000 hasta 465,000 daltons y se sabe que la proteína consta de subunidades cuyo peso molecular también determinado por técnicas como filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida y equilibrio de sedimentación, varía entre 18,200-18,800 (2).

Sin embargo, existe mucha controversia en cuanto al número de subunidades que componen la molécula pues mientras existen datos que apoyan la hipótesis de que consta de 24 subunidades idénticas de 18,500 daltons cada una, se han encontrado diferencias en el peso molecular, reportando algunos investigadores para las subunidades 19,000, 10-11,000 y 7-8,000 daltons, para diferentes ferritinas, datos que contradicen la proposición de las 24 subunidades idénticas (14, 16). Con respecto a estos últimos datos no hay que perder de vista la alternativa de que se podría estar degradando la subunidad debido al procedimiento seguido de separación y purificación.

La apoferritina es estable entre pH 3-11 pero se disocia en sus subunidades a pH extremos, con dodecil sulfato de sodio (DSS) o cloruro de guanidina. Las subunidades se pueden reasociar mediante interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y posiblemente puentes de sales, (7).

Mediante técnicas de Dispersión Óptica Rotatoria (DOR) y Dicroísmo Circular (DC) revela un contenido de hélice alfa cercano al 50% y el espectro obtenido es independiente del contenido de hierro, sin embargo al eliminarlo totalmente se introducen cambios definitivos en el espectro que consisten en un incremento en el contenido de hélice alfa (1).

La liofilización también produce cambios profun-

dos en el espectro de DOR indicando que el agua asociada con la proteína juega una parte esencial en su estructura (2).

Mediante las propiedades electroforéticas de la proteína en cuestión podemos formarnos una idea de la conformación de la misma.

Se sabe que la ferritina y apoferritina presentan la misma movilidad electroforética y ambas precipitan con el antisuero antiferritina, (1).

La apoferritina se disocia en subunidades a pH extremos y el oligómero es estable entre pH 2.8 y 10.6, los pH medios en los que se disocia en cantidades iguales son de pH 2.6 y 11.62 y en un punto medio de pH igual a 3.76 se reasocia. Estos análisis revelan monómeros, dímeros y trímeros como intermediarios (1).

Se decía que los agregados están unidos por uniones covalentes más que por puentes de hidrógeno, pero estudios recientes indican que la ferritina efectúa asociación y disociación reversibles mediante uniones no covalentes (17) como interacciones hidrófobas, puesto que la apoferritina tiene un contenido relativamente alto de aminoácidos hidrófobos, especialmente leucina (1).

Por lo que respecta a la movilidad electroforética de las diferentes ferritinas existe bastante controversia de la cual se pueden citar algunos ejemplos: (siempre que se mencione igualdad o diferencia es en cuanto a propiedades electroforéticas).

Las ferritinas de hígado, bazo y médula ósea (humano) altamente purificadas no muestran diferencias, (18), sin embargo, existen contradicciones a este respecto (19).

En médula ósea de conejo se encuentran dos ferritinas diferentes (20, 21), al igual que en la humana (22).

Las ferritinas de hígado, bazo y médula de conejo son iguales. También lo son las ferritinas de hígado de rata (fetal, adulto y en regeneración). La ferritina de hígado de cerdo es diferente a la de eritrocito (probablemente siderocito) de la misma especie (18). Las ferritinas de corazón y riñón de rata son diferentes de la del hígado (23). La ferritina de caballo difiere de la de rata y la de neopla-

sia de rata y humano es diferente a la de tejido normal (24).

En cuanto a propiedades inmunológicas se puede mencionar lo siguiente:

Las ferritinas de caballo (hígado, bazo y placenta) son iguales a las de hígado de cerdo. La ferritina de conejo (hígado y placenta) difiere de la de hígado de cerdo. La ferritina de conejo (hígado y placenta) difiere de la de caballo (hígado, bazo y placenta), (15).

Estas diferencias reportadas como heterogeneidad de la molécula podrían representar la misma molécula en varios estados de agregación. Por ejemplo, la diferencia en migración podría considerarse de acuerdo a la concentración del gel como una diferencia en tamaño de la partícula y no en la carga neta, resultando la heterogeneidad como asociación de monómeros, dímeros, etc., siendo el monómero característico para una especie animal, (2).

Con técnicas más sensibles como es el electroenfoque se ha reportado microheterogeneidad de las fracciones obtenidas por cromatografía en carboximetilcelulosa, de la ferritina y apoferritina de bazo de caballo (25) y de hígado de rata (26) y aún con sólo electroforesis en gel de poliacrilamida en DSS también se ha reportado heterogeneidad de esta última proteína (14, 27).

Queda, sin embargo, la duda de si esta heterogeneidad es real. Si así lo fuera, estas diferencias obedecerían a la expresión de varios cistrones, o bien, serían alteraciones químicas posteriores a la síntesis de la subunidad sencilla.

Los datos anteriores nos proporcionan un panorama general de la forma de la molécula en cuanto a estados de agregación y de asociación, los cuales nos dan una idea sobre su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria.

Ahora bien, si aceptamos el hecho de que las propiedades fisicoquímicas y biológicas de una proteína están íntimamente ligadas a su estructura primaria o secuencia de aminoácidos, podríamos hacer notar que la proteína a que nos referimos, la apoferritina, no ha sido lo suficientemente estudiada, a pesar del hecho de que se trata de una proteína cuya importancia fisiológica ya ha sido mencionada y que además pre-

senta un modelo bastante adecuado para el estudio de la regulación de la síntesis de proteínas mediante estimulación específica.

Los datos que a continuación se presentan son, en su mayor parte, sobre la apoferritina de bazo de caballo, que ha sido la más extensivamente estudiada y en cuanto a su estructura primaria se puede mencionar que ha sido la única de la cual se conoce en parte dicha estructura.

Por ejemplo, se sabe que la apoferritina es digerida por tripsina a un grado 2.5 veces mayor que el grado de degradación de la ferritina. Algo semejante se encuentra con quimitripsina y subtilisina. Con pepsina y catepsina D no hubo mucha diferencia y se ve que a pH bajo, existe más susceptibilidad a proteólisis (28).

Los estudios de DOR y DC muestran que ambas proteínas efectúan un cambio conformacional en el rango de pH de 3.1 a 2.2 cambio que es dos veces mayor para apoferritina que para ferritina (28) y nuevamente se ve la influencia del hierro en las propiedades de esta proteína.

Se tienen algunos datos sobre su estructura primaria. Por ejemplo, se conoce su composición de aminoácidos, la cual se muestra a continuación (29), (en número de residuos por cada 18,500 daltons de peso molecular):

Aminoácido	Residuo
Glicina	10
Alanina	14
Valina	7
Leucina	25
Isoleucina	3
Prolina	3
Serina	9
Treonina	5
Aspártico	17
Glutámico	24
Cisteína	3
Metionina	3
Lisina	9
Arginina	9
Histidina	6
Fenilalanina	7

Aminoácido	Residuo
Tirosina	5
Triptofano	2

También ha sido reportada la secuencia de aminoácidos del péptido inicial por A. Suran (30):

N-acetil-serina-serina- glutamina-isoleucina-arginina, obtenida mediante hidrólisis triptica, purificación de los péptidos obtenidos por cromatografía de intercambio iónico (Dowex AG50W-X2, H^+) e hidrólisis con carboxipeptidasas A y B.

Se sabe que en base a 18,500 daltons como peso molecular de la subunidad y con la reacción de bromuro de cianógeno (CNBr) se encuentran 3 metioninas que corresponden a 4 péptidos que comienzan con Glu(X), Ile y Gly respectivamente, además del péptido inicial. El mapa triptico revela 25 péptidos (31) y el péptido que corresponde al carboxilo terminal tiene la secuencia siguiente:

Serina-glutamina-glicina-asparagina-alanina-leucina-lisina-arginina, obtenida por Mainwaring y Hofmann (32,) mediante hidrólisis enzimática de la apoferritina de bazo de caballo con pepsina, aislamiento del péptido por electroforesis en columna de celulosa, cromatografía de intercambio iónico (Dowex 50W-X8, H^+) y la secuencia de aminoácidos por hidrólisis enzimática con carboxipeptidasa A y B, y leucina aminopeptidasa.

Se sabe que la biosíntesis de la ferritina es inducida por hierro en casi todas las células que se han probado, incluyendo células en cultivo. Fue Granick el primero que utilizó esta inducción en 1946 y a partir de este momento, la estimulación de la síntesis ha sido revisada siempre, siendo los estimulantes más utilizados las sales ferrosas administradas por vía oral o parenteral como son: ascorbatos, citratos, lactatos o complejos coloidales de carbohidratos (hierro-Dextrán) y las sales altamente ionizables como son los cloruros y sulfatos (33). Con respecto a estas últimas sales, existen datos que afirman que son tan eficaces como las mencionadas al principio (34).

La cantidad de ferritina producida por la célula animal es controlada aparentemente por la cantidad de hierro

disponible y en la estimulación de su síntesis se han reportado incrementos en la concentración de esta proteína hasta 7 veces.

Granick (2) postuló que el hierro se combina con la apoferritina preexistente y que la presencia de la micela protege a la proteína contra la degradación.

Sin embargo experimentos hechos por Fineberg y Greenberg in vivo, mostraron que la administración de hierro aceleró la síntesis de novo de la parte proteínica de la ferritina al encontrar que la incorporación de L-leucina- C^{14} aparece primero en la ferritina pobre en hierro y luego de un período largo en la rica en hierro (17).

El hierro puede ser captado o liberado sin síntesis o degradación de la cápsula. La cinética de captación del hierro por la apoferritina es bastante compleja y se piensa que la apoferritina afecta la velocidad de oxidación del Fe^{+2} . Se ha postulado que las moléculas e iones penetran al interior de la molécula de apoferritina por los orificios de la cápsula proteínica, existiendo sitios activos en el interior que catalizan la oxidación del hierro formando un precipitado intramolecular muy grande que no puede escapar pasivamente.

Hay evidencia de que están involucrados en la actividad catalítica de la apoferritina los residuos de cisteína e histidina.

Algunos piensan que el hierro estabiliza a la ferritina, otros que la apoferritina se une a la ferritina pobre en hierro y otros que el hierro es captado gradualmente por la apoferritina.

Se piensa que la movilización del hierro a nivel fisiológico se logra mediante reducción, quelación y oxidación (1) y se ha encontrado evidencia de que en esta movilización reductiva del hierro a partir de la ferritina está involucrada una flavoproteína dependiente de nicotinamidadenina-dinucleótido reducido (NADH) a la que se le ha propuesto el nombre de ferriductasa (35). Por ejemplo, por diálisis de la apotransferrina contra ferritina en presencia de agentes quelantes y reductores hay transferencia inversa, hasta que la transferrina queda al 40% de saturación con hierro (1).

Existen muchas proteínas con o sin actividad enzimática que responden a estímulos con un incremento en su nivel de síntesis y a pesar de que existen evidencias sobre el papel de los cofactores y metales que causan la estimulación, se conoce poco acerca del mecanismo de la misma.

Para el caso de la biosíntesis de la ferritina mediante estimulación con hierro, existen bastantes evidencias, las cuales han impulsado a varios investigadores a localizar el nivel en el que ocurre dicha estimulación.

Existen dos niveles a considerar:

- a) El nuclear
- b) El citoplasmático

Al tomar en cuenta al núcleo, se puede hablar más específicamente de nivel transcripcional, que involucra síntesis de ácidos ribonucleicos mensajeros. Y si se habla de un incremento considerable en la síntesis de una proteína, por ejemplo apoferritina, se podría considerar a su vez un aumento en la biosíntesis del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) correspondiente.

Para el caso del nivel citoplasmático se entiende que es la regulación de la síntesis de proteínas por efectos diferentes al nivel nuclear.

Para estudiar estos niveles de regulación, los antibióticos más utilizados, cuando se trata del nivel nuclear son: Actinomicina D y Rifampicina.

Se sabe que la Rifampicina inhibe la síntesis del ácido ribonucleico (ARN) a nivel de la ARN-polimerasa dependiente del ácido desoxirribonucleico (ADN).

La Actinomicina D inhibe la síntesis de ARN debido a su acción directa con el ADN.

Para estudiar la regulación a nivel citoplasmático se pueden mencionar los siguientes antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas:

La Puromicina, que actúa en forma similar a un ácido ribonucleico de transferencia (ARNt) debido a su estructura parecida al grupo aminoacil-adenosina terminal de este último.

El Cloramfenicol y la Cicloheximida, que interfieren con el paso de formación del péptido, con la diferencia de que el primero funciona para procariotes (ribosomas 70S) y el segundo en eucariotes (ribosomas 80S).

La Estreptomicina también inhibe la síntesis de proteínas, uniéndose a la subunidad ribosomal 30S, posiblemente alterándola.

Para el estudio de la inhibición de síntesis del ARNm correspondiente a la apoferritina se ha empleado principalmente la Actinomicina D. Existen dos grupos que defienden sus hipótesis respectivas y que a continuación se mencionan:

Un grupo integrado por F. L. Yu y R. A. Fineberg quienes en 1965 (16) experimentaron incubando rebanadas de hígado de ratas estimuladas con hierro durante 3.5 horas, con leucina- C^{14} , y a las que se le administró Actinomicina D una hora antes del estímulo, aislándose posteriormente la ferritina mediante un anticuerpo específico. Al medir incorporación de la marca a ferritina, reportan para una dosis de 18 μ g de antibiótico por gramo de peso de animal, una inhibición en dicha incorporación de 85%. No midieron incorporación a proteína total.

Y. Yoshino, J. Manis y D. Schachter en 1966 (36), trabajando también en rebanadas de hígado de ratas estimuladas con hierro y tratadas con Actinomicina D 30 minutos antes del tratamiento con hierro, midieron por un lado incorporación de leucina- C^{14} a ferritina, la cual obtuvieron mediante precipitación inmunoquímica 3.5 horas después del estímulo. Por otro lado midieron incorporación de uridina-2- C^{14} a ARN, utilizando esta vez una concentración de antibiótico de 1 a 4 μ g/g de peso, reportando para la inhibición de la síntesis de ferritina de 54.4 a 91.2% y para la síntesis de ARN mensajero mencionan una inhibición, correspondiente a las mismas concentraciones de Actinomicina D de 57.7 a 80.3%. Estos mismos autores en 1968 (37) experimentaron en ratas, in vivo, dosis de 2 a 4 μ g de Actinomicina D 30 minutos antes de la estimulación con hierro y 3.5 horas después midieron incorporación de leucina- C^{14} a ferritina precipitada con anticuerpo, observando una inhibición de la respuesta al estímulo de 39.9 a 83.7%. En experimentos paralelos, estos mismos autores después de determinar el tiempo medio de incorporación de aminoácido radiactivo a ferritina, estimularon ratas con hierro administrado por vía intravenosa y 4.5 ó 18 horas después se les

se les aplicó la dosis de Actinomicina D, midiendo esta vez incorporación de ácido orótico- C^{14} a ARN durante 10 minutos, tanto en citoplasma como en núcleo reportando en el ARN nuclear incrementos en la incorporación de la marca de 9.7 a 106.0%.

Este grupo defiende la hipótesis del nivel transcripcional para el control de la síntesis de apoferritina.

El otro grupo constituido por los siguientes investigadores:

R. Saddi y A. Von der Decken en 1965 (38) utilizaron microsomas de hígado de ratas estimuladas con hierro durante 18 horas y a las que se les administró una hora antes de la estimulación, Actinomicina D en dosis de 0.8 μ g/g de peso, midiendo incorporación de DL-leucina- C^{14} tanto a albúmina que sirve como patrón interno, como a ferritina, ambas precipitadas con anticuerpos específicos. En esta forma comprobaron que existe un incremento en la incorporación de la marca a ferritina en las ratas tratadas con antibiótico del mismo orden que en las ratas estimuladas con hierro solamente.

J. W. Drysdale y H. N. Munro en 1966 (39) experimentaron en ratas en ayuno de 18 horas, estimuladas con citrato férrico amoniacal e inyectadas con Actinomicina D a concentraciones de 0.7 μ g/g de peso una hora antes o simultáneamente con el hierro. Dos horas después de la estimulación administraron leucina- C^{14} y midieron su incorporación a ferritina, encontrando un incremento de 3 a 4 veces mayor en las tratadas con hierro en comparación con el nivel normal. Paralelamente midieron incorporación de sulfato de adenina- C^{14} en ARN administrando el antibiótico 3 horas antes del pulso de adenina, observando un patrón de marcaje aproximadamente igual que en los animales control.

L. L. H. Chu y R. A. Fineberg en 1969 (40) trabajaron con células HeLa que incubaron con Actinomicina D en dosis de 5 μ g por ml de medio de incubación, durante 60 minutos (teniendo un ml de incubación 0.05 g de peso húmedo de células). Enseguida las estimularon añadiendo al medio citrato férrico amoniacal. Pasados 30 minutos agregaron leucina- C^{14} , continuando la incubación por 90 minutos más. En esta forma midieron incorporación de leucina- C^{14} a proteína total y a ferritina que aislaron inmunquímicamente. Por los resultados, no reportan efecto significativo en la captación de la marca que, comparado con el control (tratado con antibiótico), muestra inclusive un incremento de 15% sobre el nivel normal en cuanto a -

proteína total y para el caso de ferritina, la actinomicina duplicó la captación de leucina en presencia de hierro añadido.

En experimentos similares a los anteriores con la misma dosis de Actinomicina D más estimulación con hierro, y agregando al medio de incubación uridina- C^{14} 30 minutos después, midieron incorporación de la marca a ARN a diferentes tiempos y reportan una reducción de la incorporación de uridina de menos de 1.0%, comparada con el control.

J. A. Millar, R. L. Cumming, J. A. Smith y A. Goldberg en 1970 (12) midieron incorporación de leucina- C^{14} a ferritina de hígado de rata en animales estimulados con hierro y tratados con Actinomicina D en dosis de 1.5 μ g/g de peso, encontrando que en animales tratados con el antibiótico y estimulados con hierro no hubo inhibición aparente en la incorporación de la marca a ferritina precipitada inmunológicamente y aún más, encuentran que al aumentar el intervalo de administración de actinomicina y la estimulación con hierro, desde cero hasta 3 horas, el valor de incorporación de la leucina- C^{14} también aumentó.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos al utilizar una concentración de Actinomicina D considerada no tóxica (83) como la utilizada por el grupo de J. A. Millar por un lado y el grupo de J. W. Drysdale por otro y considerando que el ARNm para la apoferritina presenta una estabilidad que va desde horas hasta semanas (41), se podría concluir que el efecto del hierro en la célula para estimular o desencadenar la biosíntesis de la apoferritina es a nivel postranscripcional.

Tomando en cuenta lo anteriormente presentado, se puede mencionar que a este nivel de traducción existen tres parámetros a considerar involucrados en la velocidad de síntesis de una proteína, los cuales son:

- a) Velocidad de iniciación del péptido
- b) Velocidad de elongación
- c) Velocidad de terminación

Ahora bien, Vassart y colaboradores, quienes reunieron y procesaron con computadora los datos referidos al con-

trol postranscripcional de la biosíntesis de proteínas (42), sugieren que lo más probable es que el control a que nos referimos pueda descansar en el subnivel de iniciación del péptido.

OBJETIVO

Teniendo en cuenta por los datos anteriormente revisados que el estímulo de la biosíntesis de la apoferritina posiblemente radica en un nivel postranscripcional y considerando algunas de las propiedades de esta proteína como son:

- a) Distribución amplia en la naturaleza
- b) Respuesta específica al estímulo por hierro
- c) Facilidad relativa de aislamiento

Ella nos ofrece una excelente oportunidad para estudiar la regulación de la síntesis de proteínas en el hígado.

Sin embargo, para cualquier estudio de regulación como el mencionado es importante conocer el extremo amino de la proteína en cuestión. Para abordar el estudio de la iniciación de la síntesis de la apoferritina de hígado de rata se comenzó por dilucidar su estructura primaria, en su extremo amino, como base para correlacionar cualquier estudio posterior.

La apoferritina de hígado de rata ha sido profusamente estudiada en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas e inmunológicas, y los siguientes aspectos que presenta esta proteína, influyeron para iniciar el estudio de su estructura primaria:

- a) La estructura primaria de esta proteína en hígado de rata no ha sido reportada.
- b) Su abundancia relativa en el hígado en relación al volumen de este órgano.
- c) Su importancia en el metabolismo del hierro.
- d) Posibilidad de que exista una gran similitud entre las estructuras de la apoferritina de hígado de rata y la de bazo de caballo, hipótesis apoyada por la reacción inmunoquímica

cruzada entre ferritina de hígado de rata y anticuerpo antiferritina de bazo de caballo obtenido en conejo, mencionada con frecuencia.

- e) Como corolario del párrafo anterior la posibilidad de que la ferritina sea una proteína cuya estructura primaria haya sido conservada a lo largo de la evolución, como es el caso del citocromo c.

En base a todo lo anterior se desarrolló el siguiente programa de trabajo:

1. Estimulación de la síntesis de la ferritina en ratas.
2. Aislamiento y purificación de la ferritina del hígado
3. Comprobación de la pureza de la ferritina
4. Reducción de la proteína a apoferritina
5. Investigación de un posible bloqueo del aminoácido inicial
6. Hidrólisis enzimática de la proteína total
7. Purificación por cromatografía en columna de intercambio iónico del aminoácido o péptido inicial
8. Determinación cualitativa y cuantitativa del aminoácido inicial o bien de los aminoácidos componentes del péptido inicial

II

ANIMALES, REACTIVOS Y METODOS1. Animales

Se utilizan ratas albinas de la cepa Wistar.

La ferritina se aísla de hígados de ratas machos de 200 a 250 g, normales o estimuladas con hierro por inyección única intraperitoneal equivalente a 50 mg de hierro elemental (Hi-Dex, complejo hierro-Dextrán hidrogenado, solución inyectable, 100 mg de hierro elemental/ml; Mead Johnson de México). Alimentadas "ad libitum" y con duración de la estimulación de 24 horas.

2. Reactivos

Como proteínas patrón se utilizan: apoferritina de bazo de caballo (Pentex) y albúmina bovina (Sigma). Además, se sintetizan los siguientes compuestos que sirven como patrones:

a) N-acetil-L-serina y N-acetil-L-serina-C¹⁴

- b) Acetil-hidrazida
- c) 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida
- d) Acido 2-pirrolidón-5-carboxílico (ácido L-piroglutámico)
- e) 1-acetil-dansil-hidrazida

Los demás reactivos utilizados fueron comerciales y de grado analítico.

N-acetil-L-serina-C¹⁴

Se utiliza el método descrito por Narita (43), partiendo de 105.1 mg (1 mmola) de L-serina (Calbiochem, grado A, lote 107713), por duplicado y adicionando a uno de ellos 20 μ l de L-serina-C¹⁴ equivalentes a 2 μ C (NEC-286, lote: 177-279, 115.5 mC/mmola), agregar con agitación continua y a 4°, 50 μ l de anhídrido acético y 0.5 ml de hidróxido de sodio simultáneamente cada 15 minutos, repitiendo la operación 5 veces (la última aplicación es de 60 μ l de anhídrido acético y 0.6 ml de hidróxido de sodio), se continúa la agitación durante una hora más y posteriormente se liofilizan los productos de reacción.

Al liofilizado, se le hacen varias extracciones con etanol absoluto, las que se reúnen y se evaporan en un evaporador rotatorio al vacío, se redissuelve el residuo en el menor volumen de etanol absoluto y se le aplica varios ciclos de precipitación con éter anhidro, centrifugación a baja velocidad, eliminación del sobrenadante y redisolución del precipitado con etanol absoluto. Al final, se redissuelve el precipitado en etanol absoluto, se centrifuga para eliminar cualquier precipitado y se evapora el etanol. El producto seco se redissuelve en el menor volumen de agua, en este caso dos mililitros, y se aplica a una columna de Dowex AG50W-X2, H⁺, 111 cm x 1.9 cm (longitud x diámetro interno). Se eluye con agua, con un flujo aproximado de 100 ml/hora y un volumen vacío de 125.8 ml y se colectan fracciones de 3 ml c/u. Se comprueba la elución de la muestra que sale posterior al volumen vacío de la columna, tomando de cada fracción 20 ó 50 μ l de muestra, la cual se aplica a discos o tiras de papel Whatman 3MM que se secan con rayos infrarrojos y se cuenta cada papel en 10 ml de mezcla de centelleo, en un espectrómetro Packard Modelo 3330. Posteriormente se reúnen las fracciones con radiactividad, se evaporan

se resuspenden en el menor volumen de agua y se aplican a todo lo ancho y en el centro de una hoja de papel Whatman 3MM de dimensiones 27 cm x 30.6 cm, se efectúa electroforesis en ácido fórmico 0.5M, pH 2.0, 14.7 V/cm durante 75 minutos. Al final del tiempo se seca el papel y se corta a todo lo largo y en medio de la hoja una tira de 0.5 cm de ancho, de esta tira se cortan fracciones de un cm c/u en las que se determina la radiactividad, en esta forma se localiza la posición de la L-serina- C^{14} y la N-acetil-serina- C^{14} y se eluye del papel mediante etanol absoluto, se evapora el etanol y se resuspende el residuo en el menor volumen del mismo solvente. Toda esta misma secuencia se repite para la N-acetil-L-serina, aprovechando la calibración, tanto de la columna como de la posición de corrida en la elctroforesis, hecha previamente con el compuesto radiactivo.

Acetil-hidrazida

Se sigue el procedimiento descrito por A. I. Vogel (44), el cual consiste en poner en un matraz de fondo redondo y equipado con un refrigerante de agua, 4.0 ml de hidrazina anhidra (0.1 molas, más 25% en exceso, Pierce Chemical Co., d_4^{25} 1.0036 g/ml) y adicionar gota a gota 9.85 ml de acetato de etilo (J. T. Baker, d_4^{25} 0.895 g/ml), calentar hasta reflujo durante 15 minutos y luego agregar por el condensador suficiente etanol absoluto hasta lograr una solución clara, calentar durante 2 ó 3 horas más, destilar el alcohol etílico y enfriar. Recristalizar de etanol, p.f. 62-65°. Homogénea en cromatografía descendente en papel Whatman 3MM, sistema piridina:anilina:agua (9:1:4), revelando con nitrato de plata amoniacal (45). R_f 0.749.

2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida

Se utiliza exactamente el método de Phillips (46) descrito para proteínas en páginas posteriores, con la diferencia de que se parte de 200 mg de la acetil-hidrazida previamente sintetizada. Se recristaliza la 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida de etanol caliente más agua fría, p.f. 198-200°. Homogénea en cromatografía bidimensional descendente, en papel Whatman 3MM. Primera dimensión: sistema, butanol-2 saturado con biftalato de potasio 0.05M, pH 6.0. Segunda dimensión: fosfato monobásico de sodio 1M, pH 6.0.

Ácido 2-pirrolidón-5-carboxílico

Según el método de Dearborn y Stekol (47), se pesan 200 mg de ácido L-glutámico en una ampolleta, se le adiciona la misma cantidad en peso de agua destilada, se sella la ampolleta y se calienta entre 135-140°, se evapora el agua y se recristaliza de etanol, p.f. 162-163°.

1-acetil-2-dansil-hidrazida

Siguiendo el método de Schmer (48) se disuelven 200 mg de cloruro de dansilo (cloruro de 5-dimetilamino-1-naftalén-sulfonilo, Sigma) en 2 ml de acetato de etilo y se agrega 200 mg de acetil hidrazida. Se agita la solución a temperatura ambiente y después de 15 minutos aparece un precipitado de ácido 5-dimetilamino-1-naftalén-sulfónico. Después de 2 horas se elimina el precipitado por filtración y se lava una vez con acetato de etilo (el método original utiliza acetato de metilo). Los filtrados reunidos (aproximadamente 4 ml) se agitan con un ml de amortiguador citrato de sodio 0.2M, pH 3.5. La capa de acetato de etilo se concentra a aproximadamente 2 ml con corriente de nitrógeno y se filtra nuevamente. El disolvente restante se le permite evaporar lentamente en un tubo abierto, en esta forma se obtienen cristales que se filtran después de 24 horas y se lavan una vez con acetato de etilo, se secan en desecador al vacío y se determina punto de fusión, p.f. 182-184°.

Preparación y regeneración de las resinas de intercambio iónico

Dowex AG50W-X2 y Dowex AG50W-X8, 200-400 mallas, H⁺.

Se sigue el método de Kasper, descrito por Needleman (49), que consiste en pesar una cantidad determinada de la resina (BioRad, lotes 7083 y 7037), suspenderla en 3 ó 4 veces su volumen de hidróxido de sodio 2N, dejarla reposar durante 10-15 minutos y decantar. Repetir la operación de 4 a 5 veces. Filtrarla a través de un embudo Büchner y lavarla con una gran cantidad de agua bidestilada hasta obtener pH 5 (pH del agua) medido en el extremo inferior del embudo. Se regresa la resina seca a un vaso de precipitado y se resuspende nuevamente en 3 ó 4 volúmenes de ácido clorhídrico 4N, se deja reposar durante 10-15 minutos y se decanta. Repetir la operación de 4 a 5 veces y filtrar nuevamente en un embudo Büchner, lavar la resina con agua bidestilada hasta obtener pH 5.0. Resuspender al final la resina en el amortiguador adecuado.

Dowex AG2-X8, 200-400 mallas, Cl^- : (lote 2692, BioRad).

La resina se lava en un embudo Büchner con 0.5 a un litro de agua bidestilada a 60° , se pasa a un vaso de precipitados y se resuspende en 3 ó 4 veces su volumen de hidróxido de sodio 0.5N libre de carbonatos, se deja sedimentar durante 10 ó 15 minutos y se decanta (repetir la operación 4 ó 5 veces). Terminada esta operación, se filtra en un embudo Büchner y se lava exhaustivamente con agua bidestilada hasta obtener en el extremo inferior del embudo el pH del agua, luego se regresa a un vaso de precipitados y se resuspende el mismo número de veces, con 3 ó 4 veces su volumen de ácido clorhídrico 1N, decantando cada vez y al final se vuelve a filtrar en un Büchner y se lava con agua hasta obtener pH 5.

3. Métodos

Aislamiento y purificación de ferritina de hígado de rata.

A. Aislamiento

Para la obtención de esta proteína se utiliza el método de Linder-Horowitz et al. (23), que es a su vez una modificación del de Drysdale y Munro (50), el cual consiste en la homogeneización del tejido, calentamiento a 70° , eliminación de la hemoglobina contaminante y cromatografía en Sephadex G-200, Las operaciones se realizan a 4° .

Procedimiento:

Se sacrifica un lote de animales, en nuestro caso 20, ya sean normales o estimulados con hierro, por golpe en la cabeza, se extraen los hígados, se lavan, se secan con gasa y se pesan. Se cortan con tijeras en fragmentos pequeños y se homogeneizan con cuatro veces su peso de agua desionizada.

Enseguida, se diluye el homogeneizado con un volumen igual de cloruro de sodio 0.03M y se calienta a baño María, manteniendo la mezcla a 70° durante 10 minutos y se enfría en baño de hielo rápidamente hasta 4° . Se elimina el precipitado centrifugando a $15,000 \times g$ durante 20 minutos. (Cabezal MSE 69180, 11,500 rpm). A los sobrenadantes colectados se les adiciona 0.1 del volumen total de solución amortiguadora de acetato de sodio 0.2M, pH 4.8 y se deja reposar durante 30 minutos a 4° .

Nuevamente se centrifuga para eliminar el precipitado rojo que se forma a $15,000 \times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se lleva a pH 6.5 por adición de 0.1 del volumen total de fosfato dibásico de potasio 0.2M, precipitando la proteína con sulfato de amonio al 50% (29.1 g/100 ml de solución), durante dos horas con agitación y a 4° , centrifugando a baja velocidad, $850 \times g$ durante 10 minutos. Se resuspende el precipitado en el menor volumen de agua y se dializa contra agua con varios cambios durante 12 horas.

Como paso siguiente, se equilibra la solución impura de ferritina dializando contra amortiguador de fosfato dibásico de potasio 0.02M, pH 7.0 y se determina la concentración de proteína por el método de Lowry (51).

B. Purificación por cromatografía.

Se aplican a la columna de Sephadex fracciones de 3 ml c/u equivalentes a 50 mg de proteína, con las siguientes condiciones para la columna: 2.5 cm x 32.5 cm (diámetro interno x altura), volumen vacío 45 ml, volumen excluido 44 ml (medidos por aplicación de 3 ml de Dextrán-azul al 2% disueltos en el mismo amortiguador) y con flujo aproximado de 30 ml/h. La columna se equilibra previamente con la solución amortiguadora y la muestra se eluye con la misma solución, colectando fracciones de 3 ml c/u y reuniendo los tubos que visualmente forman un pico, ya que la ferritina tiene un color café rojizo.

Las fracciones de ferritina se precipitan con sulfato de amonio al 50%, se dializan contra agua por 12 horas y contra amortiguador de fosfato durante 24 horas.

C. Determinación de pureza.

La pureza de la ferritina excluida de la columna de Sephadex se determina mediante electroforesis de disco de gel de poliacrilamida según la modificación de Linder-Horowitz (23) al método original de Davis (52) que consiste en separación a pH 8.9 con amortiguador Tris-glicina. Los tubos miden 5 mm x 70 mm (diámetro interno x longitud) y contienen un ml de gel resolvente al 5% de acrilamida recristalizada (Eastman), más 0.2 ml de gel concentrador al 1.25% de la misma. Las muestras de proteína que se aplican sobre el gel superior, contienen entre 80 y 100 μ g de ferritina mezclados con un volumen igual de sacarosa al 60%, más una gota de

azul de bromofenol al 0.05% en etanol. La electroforesis se comienza con 2 mA/tubo, hasta que el indicador atravieze el gel superior, aumentando posteriormente la corriente hasta 5 mA/tubo. La corrida finaliza cuando el colorante se encuentra exactamente en el extremo inferior del tubo, hacia el ánodo. Inmediatamente se sacan los geles de los tubos ayudados por una aguja hipodérmica larga conectada a una jeringa llena de agua y se prosigue con la tinción con dos colorantes diferentes: unos geles se remojan en negro de amido (Amido Schwartz, Merck) al 1% en ácido acético al 7%, colorante específico para proteínas y otros geles o sea los duplicados, se remojan al mismo tiempo en una solución de ferrocianuro de potasio al 2% en ácido clorhídrico al 2% que desarrolla la reacción de azul de Prusia, específica para hierro (23). La decoloración se efectúa en ácido acético al 7% durante 24 horas (con varios cambios y con agitación) para los geles coloreados en negro de amido, y en agua, para los geles teñidos para hierro, con varios cambios y por el mismo tiempo.

Reducción a apoferritina.

Considerando a la ferritina pura, se procede a reducirla a la forma de apoferritina, eliminándole el hierro mediante un reductor fuerte como es el hidrosulfito de sodio (ditiotionita) y utilizando además varios quelantes. El método a seguir es el descrito por Pape (53) modificando al de Granick (54, 55), que consiste en:

Ajustar la solución de proteína a 1.5% y el pH a 4.6 con ácido acético, verter la solución a una bolsa de diálisis y dializar contra amortiguador acetato de sodio 1.0M, pH 4.6 (libre de oxígeno, por habérsele burbujeado nitrógeno) con ditiotionita al 4%. Se cambia el amortiguador a las 24 horas y se dializa durante 24 horas más. Al finalizar este intervalo se introduce a la bolsa que contiene la solución de ferritina, bipyridil (2,2-bipyridil, Merck) a una concentración final de 300 mg/100 ml, más cisteína a concentración final 0.1M, se dializa nuevamente contra mezcla acetato de sodio 1.0M, pH 4.6, ditiotionita al 4% por 24 horas y contra agua por 48 horas más. A continuación, dentro de la bolsa de diálisis se agrega 0.5 g de mesilato de desferrioxamina ($C_{25}H_{48}N_6O_8 \cdot CH_3SO_3H$, Desferal, Ciba), con ajuste previo de la solución a pH 7.6 con hidróxido de sodio 2N y, finalmente, diálisis exhaustiva contra agua.

Dinitrofenilación de la apoferritina de hígado de rata.

Para ello se utiliza el método de Sanger, descrito por Fraenkel-Conrat (56), el cual consiste en dinitrofenilación de la proteína, lavados con varios solventes, extracción con éter, hidrólisis ácida y cromatografía en capa fina de gel de sílice.

a) Se pesan 23.8 mg (aproximadamente una micromola, tomando como peso de la subunidad, 24,000 daltons) de apoferritina liofilizada de hígado de rata y se mezclan con 23.8 mg de bicarbonato de sodio y 960 mg de urea, se vierten en un matraz de fondo redondo de 50 ml, cubierto con un papel de aluminio y se le adiciona 2 ml de agua más 4 ml de 2,4-dinitro-fluoro-benceno al 5% en etanol (v/v), teniendo un volumen final de 6 ml y se agita durante 2 horas a temperatura ambiente.

b) Se pesan las mismas cantidades de apoferritina de bazo de caballo y los demás reactivos y se le adiciona las mismas cantidades de agua y de dinitrofluorobenceno y también se agita por dos horas a la misma temperatura.

c) En otro matraz se ponen 14 mg (0.2 micromolas) de albúmina bovina, más 14 mg de bicarbonato de sodio, 960 mg de urea y se procede en igual forma que en los incisos a) y b).

Además, se hizo un blanco con todos los reactivos menos proteína en las mismas condiciones.

Se para la reacción adicionando ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta alcanzar un pH 2.0.

Se lava la solución de reacción con tres porciones de 3 ml c/u de: éter (sin peróxidos)[†], etanol, agua, acetona y éter, centrifugando cada vez a baja velocidad y eliminando la fase de lavado ya sea con una pipeta Pasteur o decantando. Se evapora el residuo de éter en un baño a 37°, se resuspende el

[†]Nota.- El éter se trata previamente, mezclándolo con una cantidad igual de una solución saturada de sulfato ferroso en un embudo de separación, eliminando luego la capa inorgánica. De esta manera, queda libre de peróxidos.

precipitado en aproximadamente 2 ml de ácido clorhídrico 6N y se efectúa hidrólisis ácida durante 16 horas.

Efectuada la hidrólisis, se deja enfriar la ampolla y se filtra en un microembudo con papel Whatman No. 1, luego se diluye con agua hasta tener una concentración de ácido 1N y luego se extraen los dinitrofenil-aminoácidos con 4 porciones de 5 ml c/u de éter (sin peróxidos). El tubo de centrifuga de 12 ml (con tapón esmerilado) donde se efectúa esta extracción, se agita bien, se deja reposar y se extrae la capa orgánica con una pipeta Pasteur, se combinan los extractos etéreos y se les da un último lavado con 3 ó 4 ml de agua, eliminando ésta con una pipeta y quedándose con el éter lavado, el cual se evapora a sequedad en baño a 37°. Se resuspende en un volumen de acetona y se vuelve a evaporar, quedando ya listo para aplicarlo a las placas de cromatografía.

Preparación de las placas de cromatografía.

En un embudo de separación de 500 ml, se vierten:

a) Tolueno	120 ml
b) Piridina	36 "
c) Etilén-clorhidrina	72 "
d) Amoníaco 0.8N	72 "

en la forma siguiente: los tres primeros solventes se mezclan en el embudo de separación y al final se le adiciona el amoníaco por las paredes cuidando de que no se mezclen las dos soluciones. Se deja equilibrar esta mezcla por 16 horas, al final de las cuales se separa cuidadosamente la capa acuosa de amoníaco que es la inferior y con esta se equilibran las placas de cromatografía (Eastman Chromagram No. 6061 sin indicador fluorescente) en una cámara bien cerrada, por 16 horas. Entonces el extracto etéreo se resuspende en 0.02 ml de acetona y se aplica todo el volumen con un capilar, cuidando que no se salpique la placa, cubriéndola con un papel y dejando un orificio a la altura donde se va a aplicar la muestra. Se pone la placa de gel de sílice entre dos placas de vidrio, las cuales se sujetan con dos pinzas y se sumerge en la cuba que contiene la mezcla eluyente, que es la capa superior de la mezcla descrita al principio, cuidando que el eluyente no sobrepase el extremo superior de la placa. Se saca ésta con cuidado al

terminar de correr la primera dimensión y se deja secar en la forma siguiente:

10 minutos en corriente de aire

10 " en el horno a 60°

15 " en corriente de aire

en esta forma está listo el cromatograma para desarrollar la segunda dimensión cuya mezcla de elución consiste en:

Cloroformo	70 ml
Alcohol bencílico	30 "
Ac. acético glacial	3 "

esta segunda dimensión se corre en igual forma que la anterior cuidando de hacer girar la placa 90°.

Identificación del grupo bloqueador.

Para la determinación de este grupo bloqueador se sigue el método de Phillips (46), que consiste en:

Pesar 18.5 mg (una micromola, tomando como base 18,500 daltons para la subunidad) de apoferritina de bazo de caballo y de hígado de rata por separado y previamente secadas a 90° durante 12 horas, en una ampollita. Agregarle un ml de hidrazina anhidra, (Pierce Chemicals), pasarle una corriente de nitrógeno, aplicarle vacío, sellar la ampollita con un microsoplete, y calentar la ampollita en baño de aceite a 100° durante 17 horas.

Al finalizar este tiempo, se deja enfriar la ampollita, se destapa y se deja en un desecador que contiene ácido sulfúrico, haciéndole vacío al desecador con una bomba durante 5 minutos. Luego se deja el desecador cerrado hasta que se seque completamente el residuo de la ampollita (para asegurarse que la sequedad es completa, se deja aproximadamente 12 horas). Se recupera el residuo con un ml de amortiguador citrato de sodio-ácido clorhídrico 0.2N, pH 3, más 1.6 ml de etanol, pasándolo a un tubo de centrifuga de 12 ml con un tapón esmerilado. Se verifica el pH, teniéndolo que ajustar todavía con ácido clorhídrico y con papel indicador, dando un volumen fi-

nal de 3 ml. Entonces se le adiciona 0.4 ml de solución etanólica de 2,4-dinitro-fluoro-benceno (0.66 ml de la solución concentrada llevados a 10 ml con etanol absoluto) y se pone a incubar a 37-38° durante 4 horas y con agitación ocasional cuidando de cubrir el tubo de centrifuga con papel aluminio. Al finalizar el tiempo, se evapora el etanol con corriente de nitrógeno a no más de un ml y se ajusta a 2 ml con agua. Luego se efectúan 4 extracciones con 4 ml c/u de éter sin peróxidos, agitando, centrifugando a baja velocidad por 5 minutos y extrayendo la capa etérea con un capilar conectado a un matraz Kitasato que está conectado a su vez al vacío, pero cuidando que la aplicación del vacío para succionar la capa etérea sea muy débil. Del matraz Kitasato se recuperan los extractos, lavando bien con éter y pasando la muestra a un matraz de 50 ml de fondo redondo con boca 24/40 ó 19/38, evaporando previamente el éter. El matraz, al que se le adapta un dedo frío que contiene hielo picado y agua helada, se sumerge en un baño de aceite a 90°, aplicando el vacío al matraz mediante una bomba, 4 veces durante 4 minutos cada vez, para eliminar el exceso de dinitrofenol, dinitro-fenil-hidrazida y dinitro-fluoro-benceno, lavando cada vez el exterior del dedo frío.

Resuspender el residuo en 0.5 ml de etil-metil-cetona recién destilada y tomar 0.1 ml para aplicarlo a una hoja de papel Whatman 3MM de 46 cm x 46 cm, aplicando la muestra en el extremo superior derecho a 8 cm de cada lado. Se satura el papel con amortiguador biftalato de potasio-ácido clorhídrico 0.05M, pH 6.0 y se deja secar en corriente de aire antes de aplicar la muestra. Ya aplicada ésta, se mete en la cámara de cromatografía (Tanque Panglas, Shandon modelo 500), previamente equilibrada durante 10-12 horas con butanol-2 saturado con biftalato de potasio, que satura a su vez hojas de papel filtro que rodean las paredes del tanque. Luego de aplicada la muestra con un capilar, se deja equilibrar el papel filtro entre 2-3 horas dentro de la cámara, antes de adicionarle la solución para correr la primera dimensión del cromatograma. Dicha solución consiste de butanol-2 saturado con biftalato 0.05M, pH 6.0, en un embudo de separación durante toda la noche y se utiliza sólo la capa orgánica.

Terminada la primera dimensión que tarda aproximadamente 14 horas, se saca con cuidado la hoja de papel Whatman y se deja secar en corriente de aire y en la obscuridad, mientras tanto se satura nuevamente la cámara con amortiguador fosfato monobásico de sodio 1M, pH 6.0, utilizando el mis-

mo tiempo de saturación que para la corrida anterior, dejar luego la hoja de papel dentro de la cámara nuevamente durante 3 horas, antes de adicionarle el amortiguador de fosfato, que sirve para correr la segunda dimensión del cromatograma. Dicha corrida dura aproximadamente 4.5 horas.

Se elaboran patrones y se corren en las mismas condiciones descritas.

En esta forma se corr el compuesto patrón I, (2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida, 0.25 micromolas en etil-metil-cetona), sólo o bien mezclado con cantidades iguales de 2,4-dinitrofenol más 2,4-dinitrofenil-hidracida, como posibles contaminantes.

La localización del compuesto patrón I en el cromatograma se basa en el hecho de que la mancha que es amarilla y además absorbe la luz ultravioleta, se torna café al pasarle una corriente de amoníaco.

Recromatografía del producto de la reacción de Phillips aplicada a la apoferritina de hígado de rata.

Se efectúa el procedimiento descrito anteriormente, por triplicado y el producto final de la reacción se resuspende en 0.1 ml de etil-metil-cetona. Estas alícuotas de 0.1 ml se aplican por separado a 3 hojas de papel Whatman de 46 cm x 46 cm, pero adicionándole a una de ellas 0.25 micromolas del compuesto patrón I. Se efectúa la cromatografía bidimensional ya mencionada y se revela una sola hoja con vapores de amoníaco para localizar la mancha que nos interesa en el papel, se cortan de las dos hojas restantes el área circular donde se supone se encuentra la 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida, se corta en fracciones muy pequeñas y se eluye en la forma siguiente: se ponen las fracciones de papel en tubos de centrifuga de 40 ml, y por separado se añade a cada tubo, porciones de 5 ml de una mezcla de alcohol isopropílico-agua (1:4 v/v), se incuban a 38° durante una hora, se centrifuga a baja velocidad por 10 minutos y se decanta, se repite la operación tres veces, al final se reúnen los lavados en matraces de 50 ml para evaporarlos posteriormente, en esta forma queda una pasta de consistencia oleosa que se recupera en porciones de 0.2 ml de etil-metil-cetona. Estas porciones se colectan en tubos pequeños de centrifuga, se evaporan con corriente de nitrógeno y se resuspenden en 0.05 ml del mismo solvente. Entonces se aplica por separado todo el volumen de cada solución a dos ho-

jas de papel Whatman 3MM pretratadas y cromatografiadas como se mencionó antes, con la diferencia de que a una hoja se le adiciona 0.25 micromolas del compuesto patrón I.

Toda esta misma secuela se lleva a cabo con la apoferritina de bazo de caballo que sirve como control.

4. Obtención y purificación del péptido inicial bloqueado.

A. Desnaturalización.

Siguiendo el método de Kasper (57), se pesa la proteína, 184 mg de apoferritina de hígado de rata (9.94 micromolas, tomando como peso de la subunidad 18,500 daltons) y se disuelve en 18.4 ml de agua, quedando en esta forma a una concentración del 1%. Agregar un volumen igual de ácido tricloroacético al 10% y calentar en baño María, hasta ebullición durante 15 minutos, enfriar luego a 4° durante 10 minutos. Centrifugar a baja velocidad (2000 rpm por 10 minutos) y decantar. Agregar 5 ml de acetona, evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno y lavar la proteína 4 veces con porciones de 20 ml c/u de éter anhidro y sin peróxidos, centrifugando cada vez a baja velocidad y decantando. Al final de los 4 lavados, se seca la proteína desnaturalizada en baño de incubación a 37° o bien con corriente de nitrógeno, pero cuidando que ésta sea débil para evitar pérdida por proyecciones.

Lo mismo se repite con la apoferritina de bazo de caballo (Pentex Biochemicals) pero partiendo de 300 mg de la proteína (16.2 micromolas).

B. Hidrólisis enzimática.

Para esta hidrólisis se sigue el método de Marriq (58), con algunas modificaciones en la concentración inicial del amortiguador y la relación enzima-sustrato. Para ello, se resuspende la apoferritina de hígado de rata en 18.5 ml de bicarbonato de amonio 0.05M, pH 8.5 y la de bazo de caballo en 30 ml del mismo amortiguador (ambas en tubos de centrifuga de 40 ml). Se verifica el pH con el potenciómetro para que esté alrededor de 8 y se le agrega a la primera 18.4 mg de Pronasa (Calbiochem), disueltos en 0.3 ml de agua y a la segunda, 30 mg de la enzima disueltos en el mismo volumen. Se incuban ambas mezclas a 37° durante 24 horas, se agrega una cantidad igual de la enzima a las soluciones,

transcurridas las primeras 12 horas, verificando el pH y agitando ocasionalmente los tubos.

Al finalizar el tiempo de incubación se para la reacción agregándole unas gotas de ácido clorhídrico o fórmico concentrados y se mide el pH con papel indicador hasta 3 ó 4, se centrifuga a baja velocidad durante 10 minutos y el sobrenadante se evapora en matraces de 50 ml, en un evaporador rotatorio a presión reducida y a temperatura de 38°, se lleva casi a sequedad, se redisuelve 3 ó 4 veces con agua y se vuelve a evaporar para eliminar el exceso de ácido. Se recuperan los evaporados con 1 ó 2 ml de agua.

C. Cromatografía en columna de intercambio iónico.

Como queda algún material insoluble, entonces se centrifugan los tubos a baja velocidad y los sobrenadantes con un pH entre 4-5 se aplican a columnas de resina Dowex AG-50W-X8, 200-400 mallas, H^+ , (Bio.Rad Lab.) de 10.5 cm x 2 cm (longitud x diámetro), flujo 30 ml/horas, siendo calibradas las columnas previamente con N-acetil-L-serina- C^{14} o N-acetil-L-serina- C^{12} y recolectando las fracciones de 5 ml c/u. Para determinar en qué fracciones fueron eluidos los aminoácidos o péptidos ácidos, se toman de cada fracción 10 μ l y se aplican a tiras de papel Whatman 3MM, se deja secar y se remoja la tira en solución etanólica de verde de bromo cresol al 0.04% a pH básico, dando al secar, manchas de color amarillo en fondo azul, que corresponden a fracciones ácidas. O bien con rojo de metilo al 0.02% en amortiguador borato 0.03M, pH 7.8, (59), dando las mismas fracciones ácidas manchas de color rojo en fondo amarillo o rosa.

La fracción ácida sale de la columna de Dowex AG50 en los tubos 3 y 4, por lo que se reúnen los tubos del 2 al 5 inclusive y se evaporan en un matraz de 50 ml en un evaporador rotatorio, se recupera el residuo en un ml de agua y si hay material insoluble, se elimina mediante centrifugación. Del sobrenadante se toman fracciones de 10 μ l para efectuar hidrólisis ácida durante 16 horas, al final se evapora a sequedad el hidrolizado con corriente de nitrógeno y se resuspende en 20 μ l de agua, que se aplican a tiras de papel Whatman 3MM de 30.6 x 3 cm, efectuando la electroforesis con ácido fórmico 0.5M, pH 2.0, 14.7 V/cm durante 75 minutos en celda de electroforesis en papel, tipo Durrum, modelo R. Las tiras de papel, después de secadas al horno entre 60-80°, se revelan, las que corresponden a la muestra sin hidrolizar, con verde de bromocresol al 0.04% en etanol a pH básico, dan-

do una sola mancha amarilla con fondo azul en el centro u origen de la tira de papel, o bien revelando las tiras que corresponden al mismo volumen hidrolizado (5 μ l), con una solución etanólica de ninhidrina al 0.04%, calentándolas en el horno después de rociadas, a aproximadamente 100° hasta aparición de las manchas púrpuras características.

D. Cromatografía en columna de resina Dowex AG2-X8.

Se prepara una columna de Dowex AG2-X8, 200-400 mallas, Cl⁻, (Bio.Rad Lab.), de 32 cm x 0.9 cm (longitud x diámetro interno) con un volumen total del lecho de 20.34 y un volumen vacío de 7.7 ml que corresponden a un 38% del volumen total del lecho (60). La muestra con un volumen de 1 a 2 ml y un pH 6.0, ajustado con hidróxido de amonio, se la deja penetrar a la columna, se enjuaga con un ml de agua y se le aplica como solución eluyente, primero agua por medio de una bomba peristáltica y con un flujo de 20 ml/hora. En esta forma se colectan en una probeta 40 ml, aplicando enseguida a la columna un gradiente lineal de ácido clorhídrico de 0 a 0.02N en un volumen total de 300 ml (150 ml de agua y 150 ml de ácido clorhídrico 0.02N en el recipiente de reserva), con el mismo flujo anterior y recolectando fracciones de 3 ml c/u mediante un colector de fracciones.

Para definir el perfil de elución de la columna de Dowex AG2-X8, se toman alícuotas de fracciones alternas y se efectúa hidrólisis alcalina, según el método de Hirs (61) y reacción posterior con ninhidrina según método de Rosen (61). O bien, midiendo directamente en cada fracción, absorbencia a 206 nm en un espectrofotómetro Zeiss, modelo PQ II.

E. Determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos de la columna de Dowex AG2-X8.

Se toman alícuotas del pico principal que sale de la columna Dowex AG2-X8, se efectúa hidrólisis ácida según el método de Eveleigh, (63). Se diluye directamente hasta obtener ácido clorhídrico 1N y se aplica directamente a una columna de aminoácidos ácidos y neutros de un analizador Beckman modelo 120, utilizando esta vez, sólo el amortiguador de citrato de sodio 0.2N, pH 3.25, con un flujo de 60 ml/hora y temperatura de 53.2°.

Previamente se corre en el mismo analizador y en las mismas condiciones un patrón de aminoácidos a una concen-

tración de 0.25M c/u.

F. Identificación por cromatografía bidimensional de la 1-acetil-2-dansil-hidrazida.

Siguiendo el método de Schmer (48), se toman por separado 0.2ml (aproximadamente 0.16 micromolas de aminoácidos) del péptido de la apoferritina de bazo de caballo aislado en Dowex AG2 y 0.4 ml (aproximadamente 0.12 micromolas de aminoácidos) del péptido de la apoferritina de hígado de rata aislado también en Dowex AG2.

Se ponen en ampollitas y se llevan a sequedad con corriente de nitrógeno. Luego se les adiciona 0.3 ml de hidrazina anhidra a las dos ampollitas, se les pasa una corriente de nitrógeno, se les aplica vacío y se sellan las ampollitas, las que se calientan entre 105-110° durante 17 horas. Al final se evapora la hidrazina sobrante en un desecador al cual se le hace vacío durante 5 minutos.

Ya evaporada la hidrazina se resuspenden los residuos en 0.5 ml de amortiguador citrato de sodio 0.2M, pH 3.0, se pasa la mezcla a tubos de centrifuga de 12 ml y se les adiciona en 0.35 ml de etanol aproximadamente 1.6 micromolas de cloruro de dansilo (5-dimetil-1-naftalénsulfonil cloruro, Sigma) que equivale a un exceso de 10 veces este reactivo con respecto al péptido y se incuban las mezclas a 37° durante 24 horas. Se llevan nuevamente las muestras a sequedad con corriente de nitrógeno, se redisuelven en 0.3 ml de agua y se extraen 3 veces con el mismo volumen de éter sin peróxidos, se mezclan bien en un agitador tipo Vortex, se espera que se separen las dos capas y se extrae la capa orgánica con una pipeta Pasteur. Se reúnen las 3 extracciones de cada mezcla de reacción y se evapora el éter en un baño de incubación a 37°. Se resuspenden en 40 µl de cloroformo aplicando 10 µl de cada tubo a placas de gel de sílice (Eastman Chromagram, 6061 sin indicador fluorescente), activadas antes a 120° durante 30 minutos, aplicando además en los extremos opuestos a la aplicación del problema, 5 µl de una solución 1mM del patrón (II), 1-acetil-2-dansil-hidrazida en cloroformo y se afecta la primera dimensión en un sistema: cloroformo:n-butanol:ácido acético, 6/3/1, v/v/v, en un tiempo aproximado de 3 horas. Al finalizar ésta, se reactivan las placas a 100° durante 10 minutos y se efectúa la segunda corrida, cuidando de rotar las placas 90° y desarrollando la segunda dimensión en un sistema: alcohol isopropílico:acetato de etilo:amoníaco concentrado, 7/9/4, v/v/v, (el método ori-

ginal (48), utiliza acetato de metilo), con un tiempo aproximado de 3.5 horas. Se observan las placas con una lámpara de luz ultravioleta y se marcan las manchas. La síntesis del patrón (II), se describe en páginas anteriores.

5. Hidracinólisis del péptido aislado.

Según el método de Akabori (64), se toma un volumen de 1.3 ml (aproximadamente 0.45 micromolas de aminoácidos) del péptido correspondiente a la apoferritina de hígado de rata aislado en Dowex AG2, en una ampollita y se lleva a sequedad en corriente de nitrógeno. Se le adiciona 0.3 ml de hidrazina anhidra, se le burbujea nitrógeno, se le aplica vacío y se sella la ampollita. Se calienta a 105-110° durante 17 horas, luego se evapora el exceso de hidrazina en un desecador al cual se le aplica vacío y se redisuelve en 0.2 ml de agua.

Este volumen de 0.2 ml, se aplica a una columna de Dowex AG50W-X8, 200-400 mallas, H⁺, de dimensiones 5.3 cm x 0.7 cm (longitud x diámetro) con un flujo de 1 ml/4 minutos, y se eluye con agua, se colectan fracciones de 2 ml c/u, de las que se toma sólo la primera y se evapora, se resuspende en 0.3 ml de ácido clorhídrico 6N en una ampollita, se sella ésta y se calienta a 100° durante 8 horas. Terminada la hidrólisis, se evapora la solución y se resuspende en 20 µl de agua, los que se aplican a una tira de papel Whatman 3MM de 30.5 cm x 9 cm, aplicando la muestra problema en una extensión de 2 cm a lo ancho y en el centro e inmediatamente a ambos lados y colinealmente se aplican 10 µl de solución 0.01M de ácido glutámico, (Calbiochem). Se efectúa la electroforesis en la celda tipo Durrum, a 14.7 V/cm durante 75 minutos en ácido fórmico 0.5M, pH 2.0. Terminada la corrida, se seca la tira al horno a aproximadamente 80-100° y se revela con una solución de ninhidrina al 0.04% en etanol, rociando la tira y calentando a 100°.

Hidrólisis enzimática con carboxipeptidasa A.

Se utiliza una enzima con las siguientes especificaciones: COADFP 34A846, 49.5 mg/ml, 50.5 U/mg, Worthington Biochemical Corp., con una actividad de la enzima de 10-11 unidades por mg de proteína, según el método de Folk (65) y utilizando como sustrato hipuril-L-fenilalanina.

Se sigue el método descrito por Björn (66), que

consiste en disolver una cantidad conocida de péptido, en amortiguador Tris 0.05M, pH 8.0 y agregarle enzima en relación E/S de 1/20.

Se parte de 204 nanomolas del péptido de apoferritina de hígado de rata aislado en Dowex AG2-X8, cantidad que se disuelve en 0.1 ml de Tris 0.05M, pH 8.0, se le adicionan 10 μ l de una solución de la enzima y se incuba por 24 horas a 37°. Se agregan 10 μ l más de la enzima, transcurridas las primeras 12 horas.

Para obtener una solubilización completa de la enzima que viene suspendida en agua, se miden 5 μ l de la solución original y se disuelven en 0.1 ml de bicarbonato de amonio 0.2M, pH 9.5, más 0.1 ml de solución de cloruro de litio al 10%.

Hay que hacer notar que los cálculos para la cantidad de enzima necesaria, se multiplican por cinco debido a la actividad baja de la misma.

Al finalizar la hidrólisis se acidifica la solución, adicionando 5 μ l de ácido fórmico concentrado y centrifugando a baja velocidad para eliminar la enzima precipitada.

Se toma el sobrenadante con una micropipeta cuidando de dejar cierto volumen para evitar contaminación con la enzima precipitada y se evapora este sobrenadante a presión reducida y a 70°. Ya seco, se efectúa la reacción de dansilación siguiendo el método descrito por A. Niederwieser (67). Para ello se resuspende el residuo evaporado en 10 μ l de agua y se toma el pH con papel indicador para asegurarse de que se haya eliminado por completo el ácido fórmico. Se le adiciona 20 μ l de bicarbonato de amonio 0.2M, pH 9.5, más 30 μ l de solución de cloruro de dansilo 10mM en acetona y se incuba la mezcla a 37° durante 60 minutos. Al finalizar este tiempo se para la reacción adicionando 10 μ l de hidróxido de sodio 0.1M y se evapora la solución calentando a presión reducida o bien con corriente de nitrógeno.

Entonces se extraen los dansil-aminoácidos con porciones de 200 μ l de acetato de etilo saturado con agua (x4) cuidando de tomar sólo 100 μ l cada vez para evitar contaminaciones con el precipitado formado.

Los extractos de acetato de etilo reunidos se eva-

poran en baño María resuspendiendo luego en 200 μ l del mismo solvente, para dividirlos posteriormente en dos fracciones iguales, A y B. La fracción A se evapora en una ampollita y se le efectúa hidrólisis ácida, durante 16 horas. Terminada ésta, se evapora el contenido a presión reducida o con corriente de nitrógeno y se vuelve a extraer con acetato de etilo saturado con agua al igual que en la dansilación y se evaporan los extractos reunidos, nuevamente a baño María.

La fracción B se evapora por separado a baño María resuspendiendo entonces las dos fracciones A y B en 5 μ l de una mezcla piridina-agua al 50% y aplicando todo este volumen a dos placas de gel de sílice Eastman 6061 de 10 x 10 cm. Se corre una primera dimensión en un sistema: benceno: piridina:ácido acético, 16/4/1, v/v/v, con duración aproximada de 30 minutos y la segunda dimensión en un sistema: tolueno:2-Cl-etanol: amoníaco 25%, 6/10/4, v/v/v, (67), con duración de 60 minutos.

Se elaboran en paralelo blancos de hidrólisis enzimática sin el péptido inicial de la apoferritina de hígado de rata aplicándole toda la secuencia de dansilación y extracción, más otro blanco propio de la reacción de dansilación y un patrón de una mezcla de 3 aminoácidos dansilados, aplicando una nanomola de cada uno, (soluciones de dansil-glutamina, dansil-serina y dansil-glutámico, 1mM en ácido fórmico al 10%, Sigma).

6. Técnicas utilizadas en el transcurso de la experimentación. Determinación de proteínas.

Esta determinación se hace por el método de Lowry et al., en la forma descrita por Campbell y Sargent (50), cuyas modificaciones son: el uso de 0.4 ml de la solución diluida del reactivo de Folin-Ciocalteu (Merck) en vez de 0.5 ml y el empleo de una longitud de onda de 600 nm, en vez de 660 nm, en las determinaciones de absorbencia de las muestras.

Como patrón se usa una solución de albúmina bovina (solución al 22%, pH 7.5, Ortho Diagnostics).

Cuantificación de aminoácidos.

En todos los experimentos en los que se necesita cuantificar aminoácidos después de una hidrólisis ácida o alcalina, se sigue el método de H. Rosen, en la forma des-

crita por Greenstein y Winitz (62).

Reactivos:

- A. Disolver 490 mg de cianuro de sodio en un litro de agua bidestilada.
- B. Mezclar 270 g de acetato de sodio trinitratado, 200 ml de agua y 50 ml de ácido acético glacial, diluir hasta 750 ml con agua y medir pH (5.3-5.4)..
- C. Diluir 20 ml de solución A hasta un litro con la solución B.
- D. Disolver 3 g de ninhidrina en 100 ml de metil-celolve (esta solución debe tener un aspecto claro al mezclarla con agua o dar una prueba débil de peróxidos al probarla con solución acuosa de ioduro de potasio al 10%).
- E. Mezclar 50 ml de agua y 50 ml de alcohol isopropílico.
- F. Solución patrón de L-leucina 1mM.

Procedimiento:

Medir en tubos de ensayo y hasta un mínimo de un ml, de 0 a 0.5 micromolas de la solución patrón F, agregar con agitación 0.5 ml de la solución C y 0.5 ml de la solución D, calentar durante 15 a 18 minutos a Baño María cuidando de tapar los tubos con canicas. Al terminar el calentamiento dejar enfriar la mezcla de reacción y diluir con 10 ml de solución E, agitar vigorosamente y medir absorbencia a 570 nm.

Hidrólisis alcalina.

Se utiliza el método de Hirs (61), el cual consiste en:

Medir en tubos de ensayo alícuotas del péptido o proteína que se necesita hidrolizar hasta un volumen de 0.3 ml, agregar un ml de hidróxido de sodio 2.5N y calentar durante 2.5 a 3 horas en un baño de aceite a 100° (dejando los tubos destapados). Al final de este tiempo, las muestras secas o con un volumen final de 0.1-0.2 ml se diluyen con un ml de ácido acético al 30% y se determina cuantitativamente aminoácidos, según el método descrito anteriormente, (precaución, filtrar cada muestra antes de determinar densidad óptica).

Hidrólisis ácida.

Se sigue el método de Eveleigh, descrito por - Needleman (63), que a continuación se describe:

Medir la muestra a hidrolizar en una ampollita, en forma tal que guarde una relación final de 1% en la solución, evaporar ésta con corriente de nitrógeno y añadir 0.3 ml de ácido clorhídrico 6N, o bien sin evaporar adicionar un volumen igual a la muestra de ácido clorhídrico 12N. Congelar la ampollita en una mezcla de hielo seco-acetona. Sellar al vacío con un microsoplete y calentar la ampollita entre 105-110° durante 16 ó 24 horas según se trate de un péptido o de una proteína.

Pasado este tiempo, destapar la ampollita, evaporar a sequedad el contenido con corriente de nitrógeno y recuperar cuantitativamente el residuo con agua o un amortiguador adecuado.

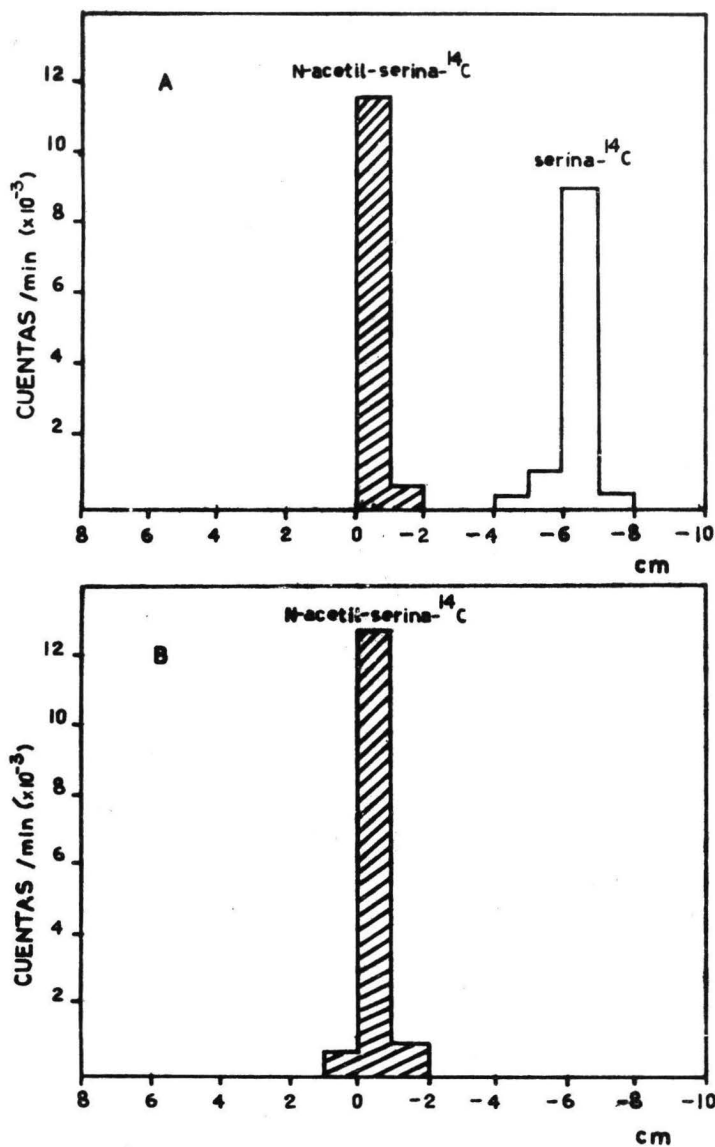


FIG. 1. ELECTROFORESIS EN PAPEL WHATMAN 3MM DEL COMPUESTO N-ACETIL-L-SERINA- ^{14}C con amortiguador de ácido fórmico 0.5M, pH 2.0, 14.7V/cm, durante 75 minutos. Tira de papel cortada en fracciones de un cm y contadas en 10 ml de solución de centelleo, en un Espectrómetro de centelleo líquido Packard, Modelo 3330. A. Antes de purificar. B. Después de purificar mediante electroforesis.

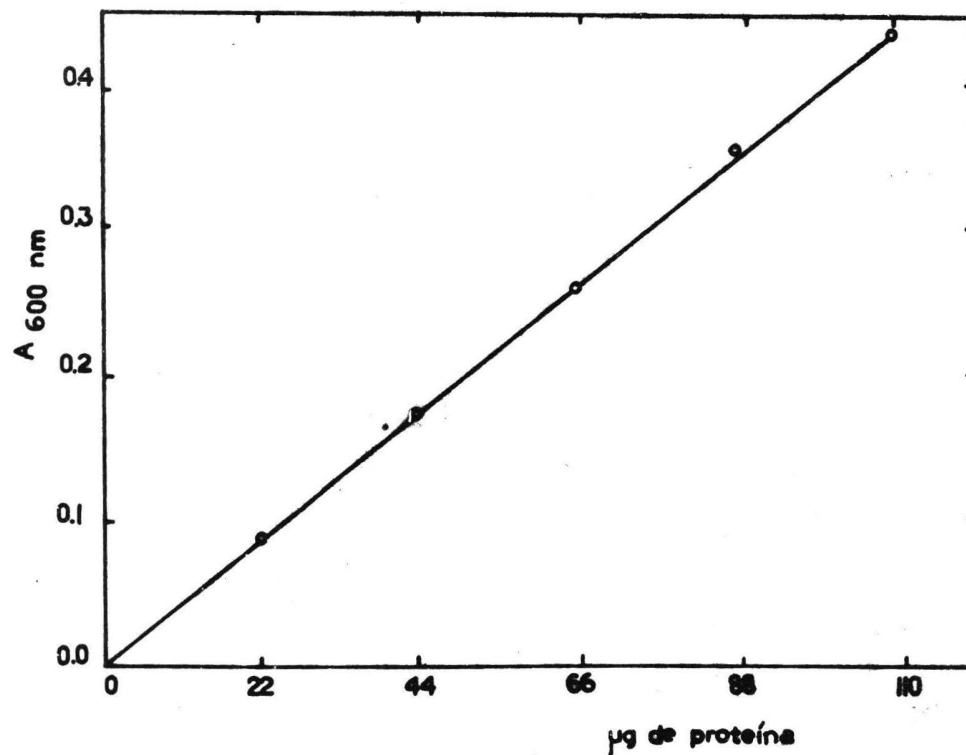


FIG. 2. CURVA PATRON DE ALBUMINA BOVINA PARA LA DETERMINACION DE PROTEINA POR EL METODO DE LOWRY (51). La solución patrón de albúmina bovina tiene una concentración de 110 µg/ml. Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones. (A: absorbencia).

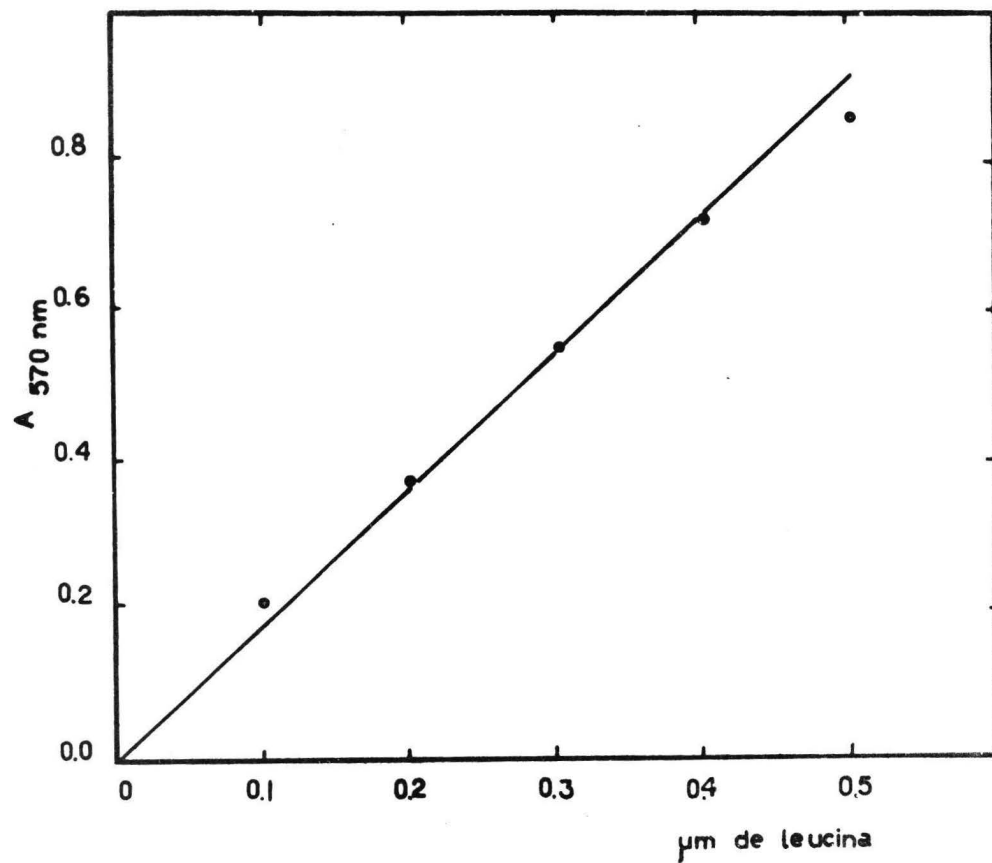


FIG. 3. CURVA PATRON PARA LA CUANTIFICACION DE AMINOACIDOS POR EL METODO DE ROSEN (62). Se utiliza una solución patrón de L-leucina 1mM y 10 ml de diluyente (alcohol isopropílico:agua 1:1, v/v). Cada punto representa la media aritmética de dos determinaciones. (A: - absorbencia).

III

RESULTADOS

Se partió de ratas estimuladas con el complejo hierro-Dextrán porque a partir de éstas se obtenía mediante la estimulación de la síntesis de ferritina, un rendimiento en el aislamiento de la misma del doble.

Aislamiento.

Por lo que respecta al aislamiento, es de hacerse notar que los pasos importantes son: el calentamiento a 70° y posterior ajuste del pH a 4.8 para eliminar la hemoglobina contaminante, y la precipitación de la ferritina a pH 6.5 con sulfato de amonio al 50%.

Uno de los problemas principales a los que se enfrenta al tratar de aislar esta proteína a gran escala, es el volumen tan grande que se obtiene desde un principio y puesto que no se contaba con una centrífuga capaz de centrifugar

volúmenes grandes a la velocidad requerida por el método, se resolvió en parte el problema centrifugando algunas veces a baja velocidad por el doble del tiempo, bajando en esta forma ligeramente el rendimiento.

Otro aspecto a cuidar, es la diálisis contra agua, posterior a cada precipitación con sulfato de amonio al 50%, la cual debe tardar como máximo 12 horas, puesto que si se prolonga la diálisis, comienza a aparecer un precipitado, causando un rendimiento bajo al no poderlo solubilizar nuevamente para cromatografiar en Sephadex G-200.

Purificación por cromatografía en Sephadex G-200.

Se trató de purificar la ferritina, cristalizando con sulfato de cadmio, según el método de Michaelis (68), pero como no se obtuvieron buenos resultados, se decidió por la cromatografía en Sephadex. El método reporta éxito, con la ventaja de poder seguir visualmente la elución debido al color de la proteína por el hierro. En esta forma se pudo establecer un pico, tomando del mismo y a partir del tubo donde se encontraba la mayor densidad óptica, los tres tubos inmediatos anteriores y los dos posteriores, eliminando así los extremos de la corrida. En esta forma se aseguró que la ferritina estuviera puro aún cuando el rendimiento fuere bajo. La figura 4, muestra el perfil de elución de la proteína registrada a 254 nm (registro UVICORD, LKB).

Es necesario hacer notar que con este método de purificación existe una pérdida cercana al 50%, aún cuando no se eliminen los extremos del perfil de elución, anteriormente mencionados.

Criterio de pureza.

El criterio para determinar la pureza de la ferritina que salió de la columna de Sephadex fue el siguiente: al comparar el número de bandas obtenidas en los geles con las diferentes tinciones, este número debe coincidir, puesto que si existieran más bandas en el gel coloreado para proteína indicaría que la ferritina no está pura. En la figura 5, se muestra el densitograma de los diferentes geles, que equivale a la fotografía de los mismos. Se hace notar que en la figura 5A, hay diferencia en la logitud porque este gel se encontraba suspendido en agua.

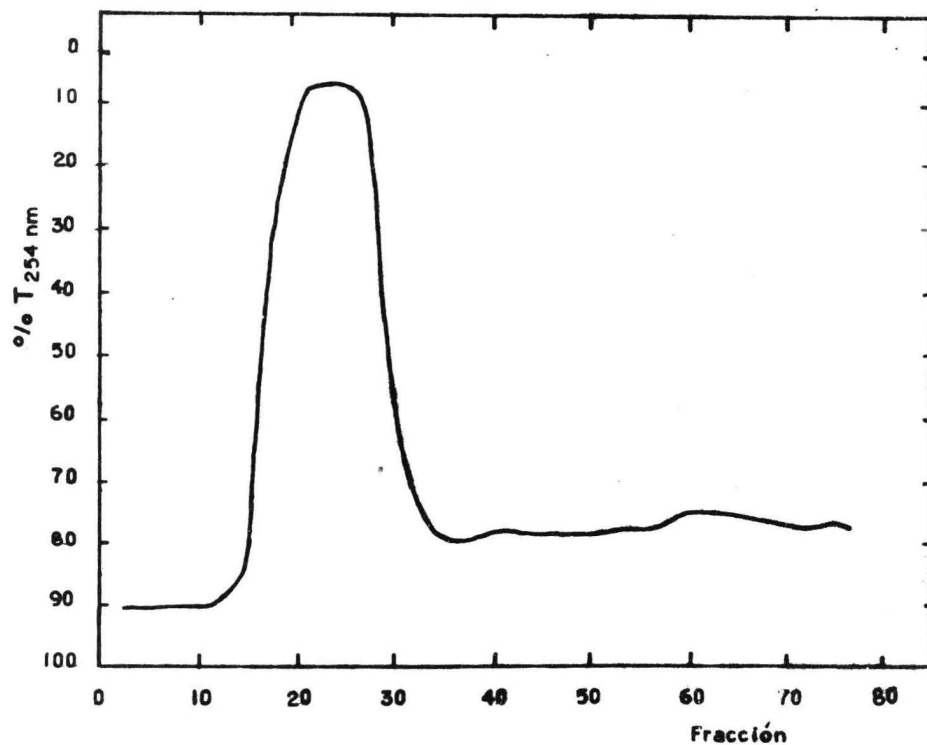


FIG. 4. CROMATOGRAFIA EN SEPHADEX G-200 DE LA FERRITINA DE HIGADO DE RATA. Muestra aplicada de 3 ml, equivalentes a 50 mg de proteína, a una columna de 2.5 x 32.5 cm (diámetro por altura). Amortiguador de elución: fosfato dibásico de potasio 0.02M, pH 7.0, flujo 30 ml/h. Se colectaron fracciones de 3 ml c/u. Registro Uvicord, LKB, 254 nm. (T: transmitancia).

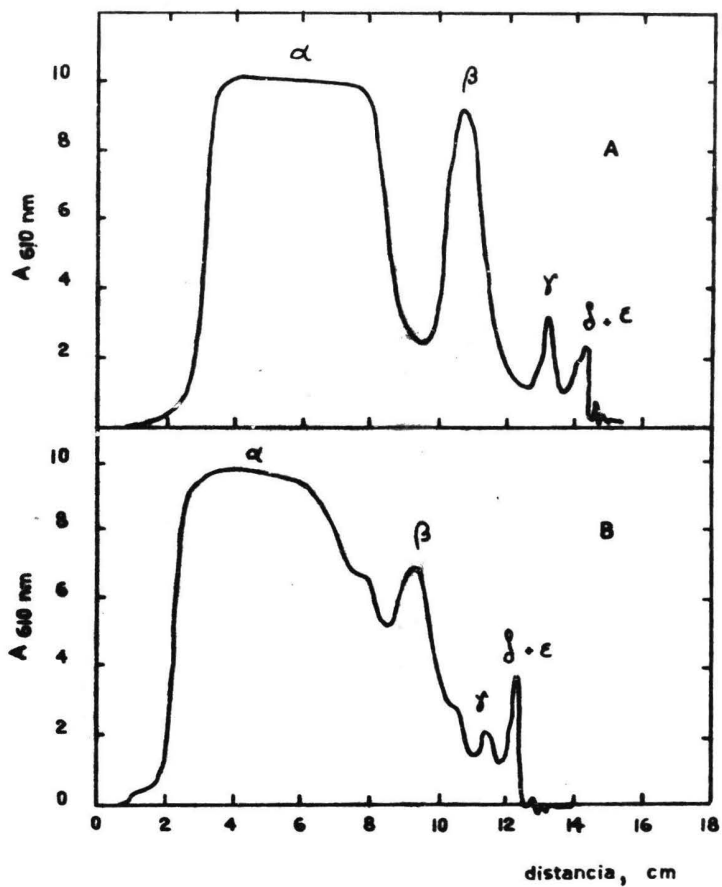


FIG. 5. DENSITOGAMA DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA DE LA FERRITINA PURIFICADA EN SEPHADEX G-200. A. Tinción con ferrocianuro de potasio al 2% en ácido clorhídrico al 2%, (Azul de Prusia), gel suspendido en agua. B. Tinción con Negro de Amido, gel suspendido en ácido acético al 7%. Densicord, Respuesta D-3. (A: absorbencia).

Reducción a apoferritina.

Desde un principio se trató de reducir la ferritina de hígado de rata según lo reportado por Suran y Terver (69), adicionando directamente dentro de la solución de ferritina, el hidrosulfito de sodio (ditionita) a una concentración de 350 mg de reductor por cada 75 mg de proteína disuelta en un volumen de 10 ml. Sin embargo, para llevar a cabo la reducción en nuestro caso, se utilizó una cantidad de ditionita del doble de la relación reportada. Hubo necesidad de aplicar la solución de proteína a una columna de Sephadex G-25 (grueso) y eluir con una solución de acetato de sodio 0.05M, pH 4.8. En esta forma es un poco difícil seguir la elución de la apoferritina si no se cuenta con un registrador y las fracciones con proteína se determinan mediante su absorbencia a 280 nm o precipitación de una alícuota de cada fracción, con ácido tricloroacético. También se comprobó en alícuotas de cada fracción, la ausencia de hierro, mediante la reacción de Azul de Prusia.

Con esta cromatografía en Sephadex G-25, también se obtiene una pérdida en la recuperación de la proteína cercana al 50%.

Por el contrario, al utilizar el método descrito en páginas anteriores, se obtiene una reducción de la ferritina más efectiva y un rendimiento del 100%. En este caso se determinó la ausencia de bandas de proteína con hierro, quedando únicamente las reveladas con Negro de Amido.

Investigación de la existencia del bloqueo del extremo amino.

Como uno de los propósitos iniciales del trabajo, fue comparar la apoferritina de hígado de rata con la de bazo de caballo en cuanto a estructura, el camino a seguir era determinar si la proteína en cuestión tenía su extremo amino bloqueado como lo está en la de bazo de caballo.

Se utilizó el método de la dinitrofenilación ya descrito, haciendo notar que se introdujo la innovación de darle a la extracción con éter de los dinitrofenil-aminoácidos un último lavado con agua, para eliminar restos de contaminantes como el dinitrofenol. Sin embargo, aún se tuvieron algunos contaminantes como puede verse en las cromatografías.

Previamente se elaboró una mezcla patrón de 2,4-

dinitrofenil-aminoácidos (en total 18), pesando un mg de c/u y disolviéndolos en 2.5 ml de acetona, aplicando 10 μ l de la mezcla total (un μ l equivale a 0.2 micromolas) a una placa de gel de sílice.

Las figuras 6,7 y 8 muestran los resultados de las cromatografías de el patrón de los 2,4-dinitrofenil-aminoácidos, de la albúmina bovina y de la apoferritina de hígado de rata. Se omite el blanco porque salió igual al de la apoferritina de rata, esto es, sólo los contaminantes usuales y ninguna otra mancha correspondiente a algún aminoácido dinitrofenilado. La detección de las manchas se efectúa, utilizando una lámpara de luz ultravioleta.

Por el contrario, la placa correspondiente a la albúmina bovina sí presenta una mancha característica para el dinitrofenil-aspartico, aminoácido con el que comienza la estructura primaria de esta proteína. Con esta evidencia se puede estar seguro que nuestro sistema de reacción sí funcionó.

Como en esta forma se comprobó que la apoferritina de hígado de rata no presenta reacción con el reactivo de Sanger, se infiere que la proteína está bloqueada en su extremo amino. Siendo el siguiente paso determinar cuál es el grupo bloqueador.

Identificación del grupo bloqueador.

Mediante la hidracinólisis y posterior dinitrofenilación de la proteína se obtuvieron buenos resultados.

Se sabe que la hidrazina reacciona con las proteínas o péptidos, para dar una mezcla de aminoacil-hidrazidas, más el aminoácido del extremo carboxilo, libre. Si la proteína o péptido están bloqueados, se obtiene además la hidrazida del grupo bloqueador, la que combinada con el 2,4-dinitro-fluorobenceno, da la hidrazida dinitrofenilada del grupo bloqueador, la cual es más fácil de descubrir, de extraer y de cuantificar.

Al aplicar este método, la precaución que se debe tomar al evaporar el exceso de hidrazina después de la reacción, es no aplicarle vacío al desecador durante mucho tiempo, puesto que la acetil hidrazida es volátil y además se parte de una micromola de la proteína. Sólo se aplica el

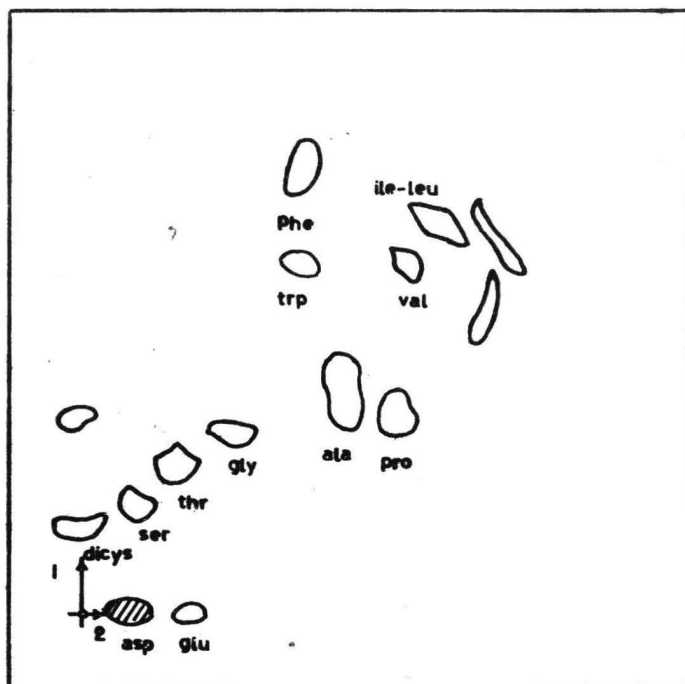


FIG. 6. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DE UNA MEZCLA PATRON DE DINITROFENIL-AMINOACIDOS. Ascendente en placa delgada de gel de sílice. 1. Tolueno:piridina:etilén-clorhidrina-amoniaco 0.8N (10G/30/30/60, v/v/v/v). 2. Cloroformo:alcohol bencílico:ácido acético (70/30/3, v/v/v).

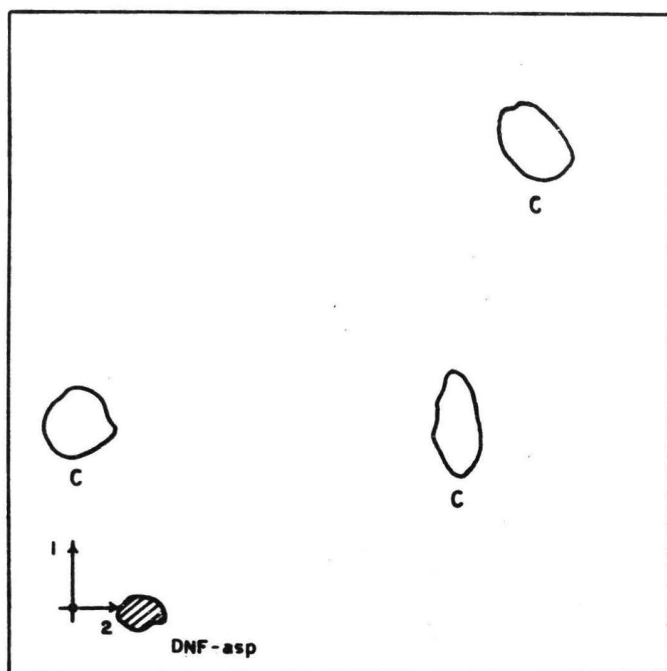


FIG. 7. DETERMINACION DEL GRUPO AMINO TERMINAL DE LA ALBUMINA BOVINA, (PATRON).
 Reacción de Sanger. Cromatografía bidimensional ascendente en placa delgada de
 gel de sílice. 1. Tolueno:piridina:etilén-clorhidrina-amoniaco 0.8N (100/30/30/
 60, v/v/v/v). 2. Cloroformo:alcohol bencílico:ácido acético (70/30/3, v/v/v).
 (C: contaminantes).

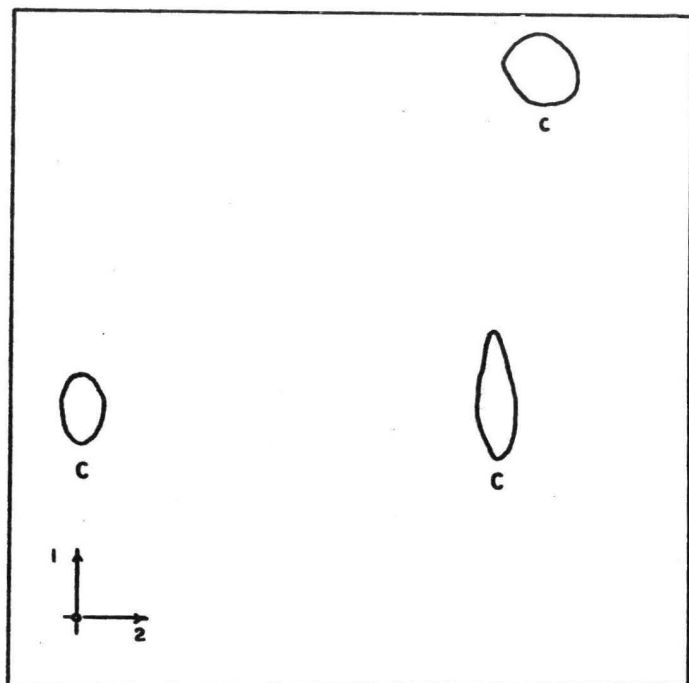


FIG. 8. DETERMINACION DEL GRUPO AMINO TERMINAL DE LA APOFERRITINA DE HIGADO DE RATA. Reacción de Sanger. Cromatografía bidimensional ascendente en placa delgada de gel de sílice. 1. Tolueno:piridina:etilén-clorhidrina-amoníaco 0.8N (100/30/30/60, v/v/v/v). 2. Cloroformo:alcohol bencílico:ácido acético (70/30/3, v/v/v). (C: contaminantes).

vacío durante 4-5 minutos.

Ahora bien, al tratar de eliminar el exceso de dinitrofenol que es el principal contaminante de la reacción, mediante un dedo frío y con vacío, se le aplicó éste por más tiempo que el reportado, puesto que, teniendo en cuenta el alto punto de fusión de la 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida (198-200°) es poco probable que se sublime. En cambio el dinitrofenol con un punto de fusión de 112-114° sublima al calentar cuidadosamente y aún más al abatir el punto de fusión, debido al vacío efectuado. No obstante, después de este tratamiento aún quedaba como impureza el dinitrofenol, en tal forma que hubo necesidad de recromatografiar.

Como se mencionó en Métodos, se recromatografiaron dos muestras correspondientes al producto de la reacción descrita con la apoferritina de hígado de rata, adicionándole a una muestra, el patrón (I). Al finalizar la segunda dimensión se compararon ambas cromatografías, obteniéndose el mismo número de manchas para cada hoja de papel, revelando luego con amoníaco al que tenía el patrón adicionado, confirmando entonces en esta forma, que la apoferritina de hígado de rata da con hidrazina y con 2,4-dinitrofluoro-benceno, el compuesto patrón (I), o sea la 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida.

Las figuras 9 y 10 muestran los resultados de las cromatografías del compuesto patrón (I) y del producto de reacción de la apoferritina de hígado de rata con hidracinolisis y dinitrofenilación posterior. En experimentos anteriores y pensando en cuantificar el grupo acetilo bloqueador, se trató de cuantificar dicho grupo eluyendo la mancha con 5 ml de mezcla alcohol isopropílico-agua (1:4, v/v), incubando a 38° y agregándole a cada tubo 0.5 ml de hidróxido de sodio 1N, midiendo absorbencia a 420 nm y comparando en una curva patrón el porcentaje de recuperación en la elución, pero los resultados no fueron reproducibles, no aproximados a los valores reportados por Phillips del 70% (que corresponde a una relación aproximada de 1:1 de grupo acetilo a cadena polipeptídica). En nuestro caso, esta recuperación estaba aún más lejos de ser obtenida, puesto que se tuvo que recromatografiar, debido a que el área donde se encontraba el compuesto esperado, estaba contaminada.

Ahora bien, si el grupo bloqueador es un grupo acetilo, el camino a seguir es determinar cuál es el aminoácido

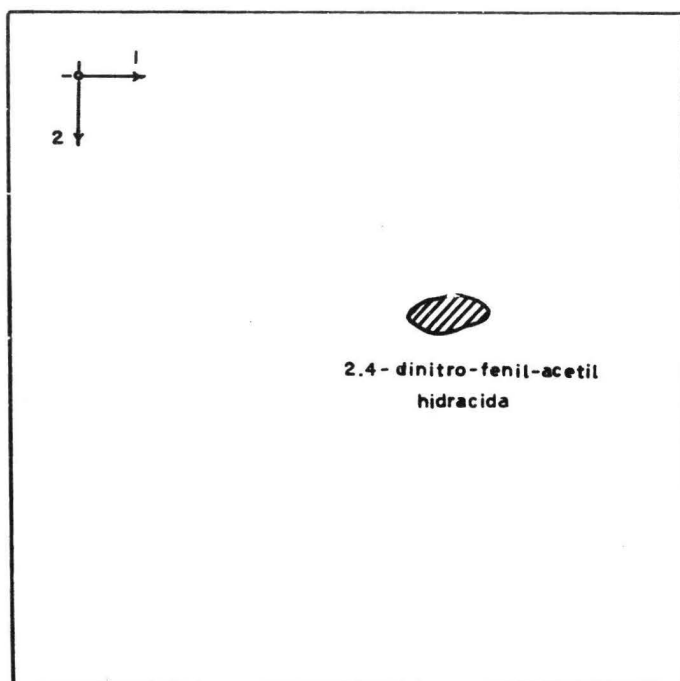


FIG. 9. COMPUESTO PATRON 2,4-DINITROFENIL-ACETIL-HIDRAZIDA. Cromatografía bidimensional descendente en papel Whatman 3MM. 1. 2-butanol, saturado con biftalato de potasio 0.05M, pH 6.0. 2. Fosfato dibásico de potasio 1M, pH 6.0.

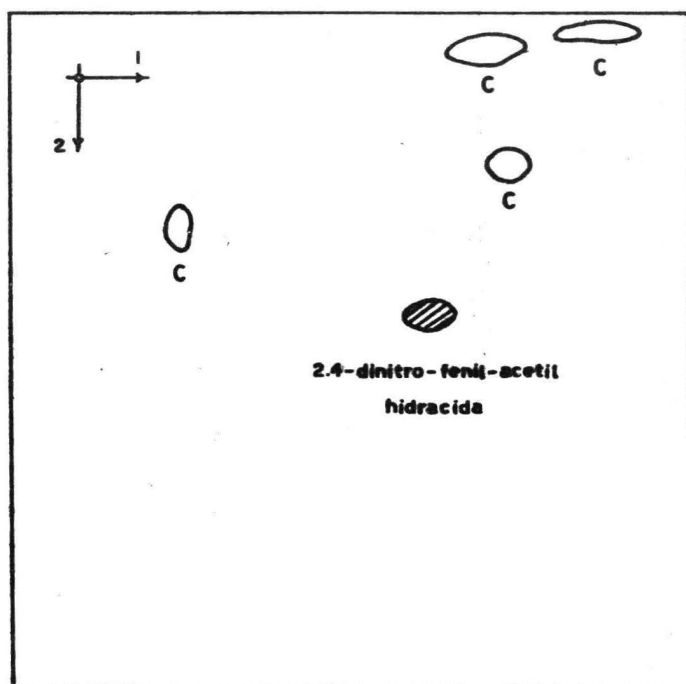


FIG. 10. REACCION DE HIDRACINOLISIS MAS DINITROFENILACION DE LA APOFERRITINA DE HIGADO DE RATA. Cromatografia bidimensional descendente en papel Whatman 3MM. 1. 2-butanol, saturado con biftalato de potasio 0.05M, pH 6.0. 2. Fosfato dibásico de potasio 1M, pH 6.0.

terminal bloqueado. Para ello, se pensó en un principio en la hidrólisis triptica, puesto que para la apoferritina de bazo de caballo, se reportaba un pentapéptido aislado con dicha hidrólisis (30). Sin embargo por dificultades técnicas se abandonó este método.

Obtención y purificación del péptido inicial bloqueado.

Al utilizar la Pronasa, que es una mezcla de enzimas inespecíficas, se pensó que la posibilidad mayor era obtener sólo el aminoácido inicial bloqueado, más una mezcla de aminoácidos y péptidos pequeños.

Con esta esperanza, se siguió el método descrito de hidrólisis enzimática, empezando primero con una desnaturalización puesto que es necesario hacer accesibles los extremos amino. Se probaron entonces varios métodos de desnaturalización para la apoferritina de hígado de rata, utilizando para ello en un principio la urea y más tarde calor. Como no dió resultados satisfactorios se decidió entonces por el método ya reportado, haciendo la aclaración de que en el método original incuban la protefina en solución de ácido tricloroacético a 37° y nosotros en el laboratorio calentamos esta solución portefina, a ebullición (en baño María) debido a la dificultad que presenta esta protefina para desnaturalizarse.

Al comentar la desnaturalización es de hacerse notar que con este método se obtiene una recuperación del 95%, si se toma en cuenta, que a lo largo del procedimiento, existe la posibilidad de pérdida por solubilidad y manipulación.

Cromatografía en resina Dowex AG50W-X8. H⁺.

La resina Dowex 50 es un copolímero estireno-divinilbenceno sulfonado, con diferentes grados de reticulabilidad, fuertemente ácida, que intercambia cationes. Esto es, tiene grupos iónicos activos y fijos, los cuales están siempre equilibrados con un número equivalente de iones opuestos cargados y móviles, que pueden ser intercambiados por otros iones de carga similar.

En esta forma, esta resina permite pasar libremente a través de su red, los aminoácidos y péptidos ácidos.

Por lo que respecta a la cromatografía en Dowex AG50-X8, H^+ , no presentó problema y en las electroforesis del eluido hidrolizado con ácido siempre se obtenían 5 manchas que corrían hacia el cátodo, de las cuales 3 correspondían a los aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutámico y serina. Y las otras manchas no se identificaron (notando que estas últimas dos manchas se revelaban más débiles con ninhidrina). También debe mencionarse que en este sistema de electroforesis ácida, la treonina se empalma con el ácido glutámico, sin olvidar que existe la posibilidad de más enmascaramientos en la resolución de aminoácidos con nuestro sistema.

Un aspecto importante, fue la regeneración de la resina.

Desde este momento y debido a los resultados obtenidos al aplicar esta cromatografía, se empezó a sospechar que la enzima actuó, no a nivel de liberación del primer aminoácido bloqueado, lo cual apoyan varios reportes (70, 71), sino que podría existir un péptido bloqueado, lo cual confirmaban los hechos de que el eluido de la columna, en electroforesis en papel con ácido fórmico 0.5M, sin hidrólisis ácida previa, daba una sola mancha en el origen de color amarillo, al ser revelada con la solución etanólica de verde de bromocresol, lo cual indicaba que se trataba de algún compuesto ácido, que no corría hacia ningún polo, y que daba prueba negativa con ninhidrina.

Otro resultado favorable, fue el obtenido en la electroforesis de la misma muestra anterior pero hidrolizada con ácido, en la que se obtenían como ya se mencionó, 5 manchas, entre las que se encontraban, ácido glutámico y serina. Tomando en cuenta que el péptido inicial de la apoferritina de bazo de caballo contiene dos residuos de serina por uno de glutamina, el resultado obtenido con la proteína de rata era muy sugerente.

En esta forma se comprobó que la cromatografía en Dowex 50, no era suficiente para darnos un producto final eluido puro. Además hay que tener presente que de esta misma columna se pueden eluir varias fracciones ácidas y una de ellas es el ácido piroglutámico que invariablemente se obtiene en este tipo de resina, o bien péptidos del tipo glutamil-aspártico, además de los que contienen residuos de fosfoserina o ácido cisteico.

Cromatografía en columna de Dowex AG2-X8, Cl⁻.

Este tipo de resina, contiene grupos de amonio cuaternario, en forma de cloruro, y están clasificadas como resinas fuertemente básicas, e intercambiadoras de aniones.

Como se decidió por la cromatografía en este tipo de resina, el problema no consistía en la técnica en sí, sino en la detección de los péptidos eluidos de la columna. Se probó primero seguir dicha elución con hidrólisis alcalina, en fracciones alternadas, y los valores obtenidos y graficados, descubrieron un péptido bloqueado mediante reacción con ninhidrina, antes y después de la hidrólisis alcalina.

Los resultados de este método se muestran en la figura 11, donde se ven dos picos bien definidos para la hidrólisis de la apoferritina de rata, definiendo como pico I, las fracciones recolectadas y reunidas, desde la fracción número 42 a la 46, y como pico II las fracciones que van del 52 a la 56. Para determinar cual pico era el que nos interesaba, se efectuó hidrólisis ácida en alícuotas de cada pico, las que se evaporaron y resuspendieron en 0.2 ml de amortiguador citrato de sodio 0.2N, pH 2.2 y se aplicaron a un analizador de aminoácidos Beckman, Modelo 116, eluyendo la muestra con amortiguador citrato de sodio 0.2N, pH 3.25 al principio, el cual se cambió por el mismo amortiguador pero de pH 4.25 transcurrida una hora, con un flujo de 110.5 ml/hora, y temperatura de 56°. Se observó en esta forma para el pico I los siguientes aminoácidos: treonina, serina y ácido glutámico en relación 0.75:1:1 y como contaminantes menores, ácido aspártico, alanina y glicina. Para el pico II se tenían: ácido glutámico y ácido aspártico en la relación 1:1 más algunos otros aminoácidos como impurezas. Hay que hacer notar que en una cromatografía previa de una hidrólisis con Pronasa de la apoferritina de bazo de caballo, se obtuvieron los mismos picos, que al pasarlos en el analizador y bajo las mismas condiciones, dieron como pico I, serina y ácido glutámico en la relación esperada de 2:1 más los mismos contaminantes, pero en menor proporción y para el pico II se tenían ácido glutámico y ácido aspártico en la relación 1:1 también con pocos contaminantes.

En esta forma se pensó que el péptido bloqueado que se parecía al inicial, era el denominado pico I (figura 11) y que el contaminante fuerte para el caso de la apoferritina de hígado de rata, que era la treonina, podría ser

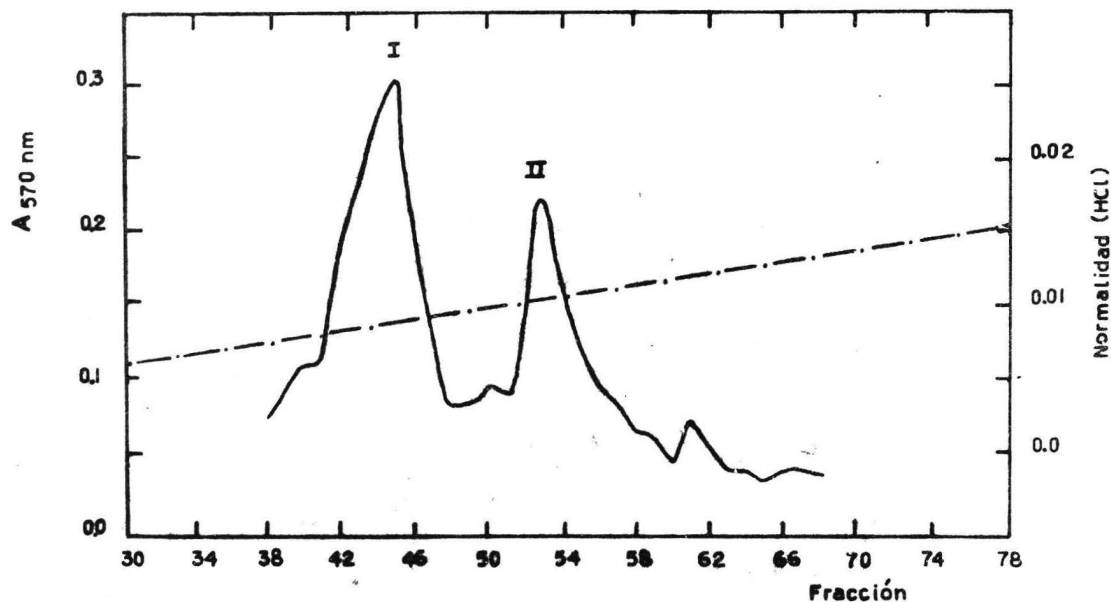


FIG. 11. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO DE LOS PRODUCTOS DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA CON PRONASA DE LA APOFERRITINA DE HIGADO DE RATA. En Dowex AG2-X8, Cl^- , (después de haber pasado por la columna de Dowex AG50-X8, H^+), columna 32 x 0.9 cm, flujo de 20 ml/h, eluido con un gradiente lineal de ácido clorhídrico de 0 a 0.02N. A las fracciones colectadas de la columna se les efectuó hidrólisis alcalina y posteriormente reacción con ninhidrina. Fracciones eluidas de la columna e identificadas con hidrólisis alcalina (—). Gradiente aplicado a la columna (— · — · —). (Para abreviar la gráfica, se comenzó por el tubo 30). (A: absorbencia).

un contaminante real, puesto que para la hidrólisis ácida se reunieron las fracciones cercanas al hombro que presenta el pico I de la figura 11.

Fue en esta etapa cuando se pensó en definir mejor el perfil de elución mediante lectura de todas las fracciones que salieron por la columna, directamente a 206 nm en un espectrofotómetro Zeiss, Modelo PMQ II, teniendo como resultado la figura 12, en la cual, la línea punteada corresponde a la hidrólisis enzimática de la apoferritina de hígado de rata, que a su vez corresponde perfectamente al patrón de elución de la misma proteína, pero de bazo de caballo (línea continua), también se incluye en la figura el gradiente aplicado a la columna y que se representa desde el tubo número 20 con el objeto de hacer más breve la gráfica, (ver figura número 12).

Como se ve por la figura 12, se obtuvieron bien definidos 5 picos, denominados picos: I', II', III', IV' y V'.

La pauta para escoger el pico I' como el correspondiente al péptido inicial bloqueado, fue mediante pruebas de electroforesis, en alícuotas tomadas de las fracciones números 38 y 39, que corresponden exactamente a los picos obtenidos para el caso de la hidrólisis enzimática de la apoferritina de hígado de rata y bazo de caballo, respectivamente, a los que se le efectuó prueba de ninhidrina, antes y después de hidrólisis ácida.

De ahora en adelante todas las pruebas posteriores que se tratan de efectuar con el péptido, se harán sobre las fracciones 38 y 39, ya mencionadas.

Como puede esperarse, ahora se puede trabajar con un material cromatográficamente puro, y los resultados de esta hidrólisis se presentan en la figura 13, en la cual se ve, además del patrón de aminoácidos (figura 13C), que la preparación se encontraba bastante pura y que ahora sí se podrían efectuar con más confianza los cálculos para las determinaciones de las relaciones existentes entre la serina y el ácido glutámico que en el péptido inicial de la apoferritina de caballo es de 2:1 (2 serinas por una glutamina).

Dichos cálculos efectuados por el método de integración de Base por Altura, reportado por Spackman (72), dieron por resultado para el péptido inicial de la apoferriti-

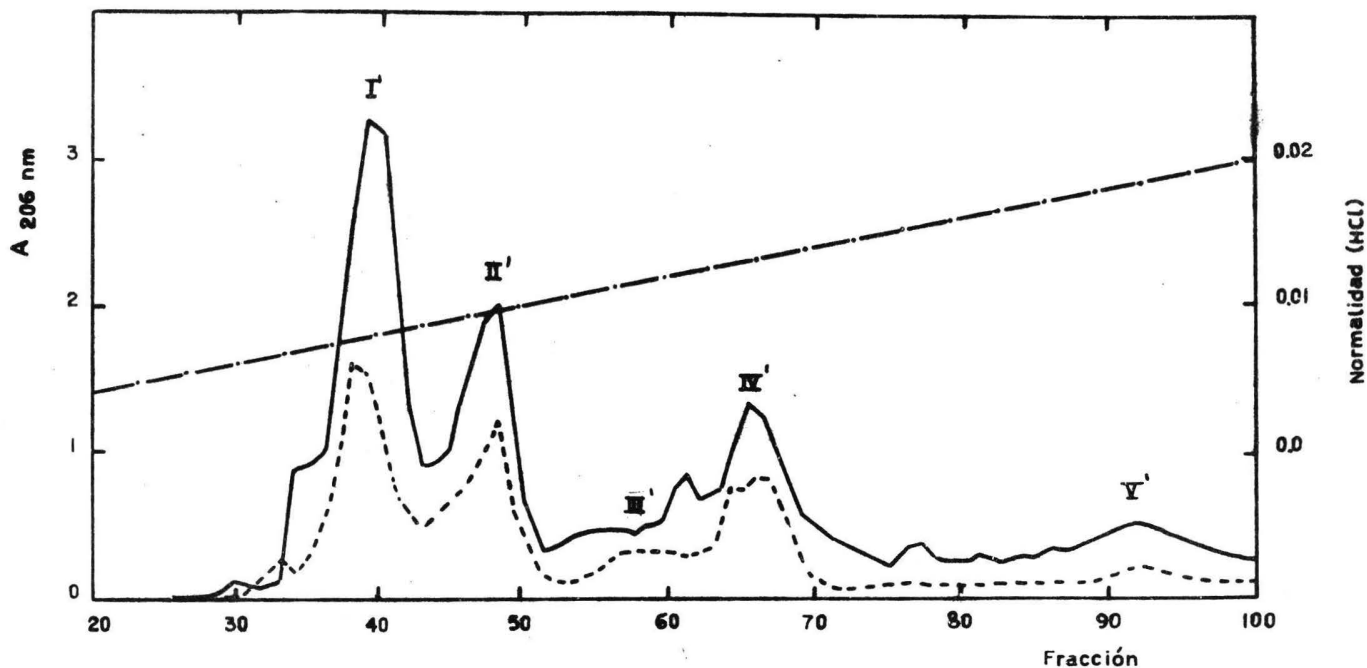


FIG. 12. PATRON DE ELUCION DE LOS PEPTIDOS OBTENIDOS DE LAS APOFERRITINAS DE BAZO DE CABALLO (—), E HIGADO DE RATA (- - -) CON PRONASA. Cromatografía de intercambio iónico en Dowex AG2-X8, Cl^- , (semipurificados previamente en Dowex AG50-X8, H^+), eluido con un gradiente lineal de ácido clorhídrico de 0 a 0.02N, columna de 32 x 0.9 cm, flujo de 20 ml/h. Las fracciones se leyeron directamente en un Espectrofotómetro Zeiss, PMQII, 206 nm. Gradiente aplicado a la columna (-.-.-). (Para abreviar la gráfica, se comenzó por el tubo 20). (A: absorbencia).

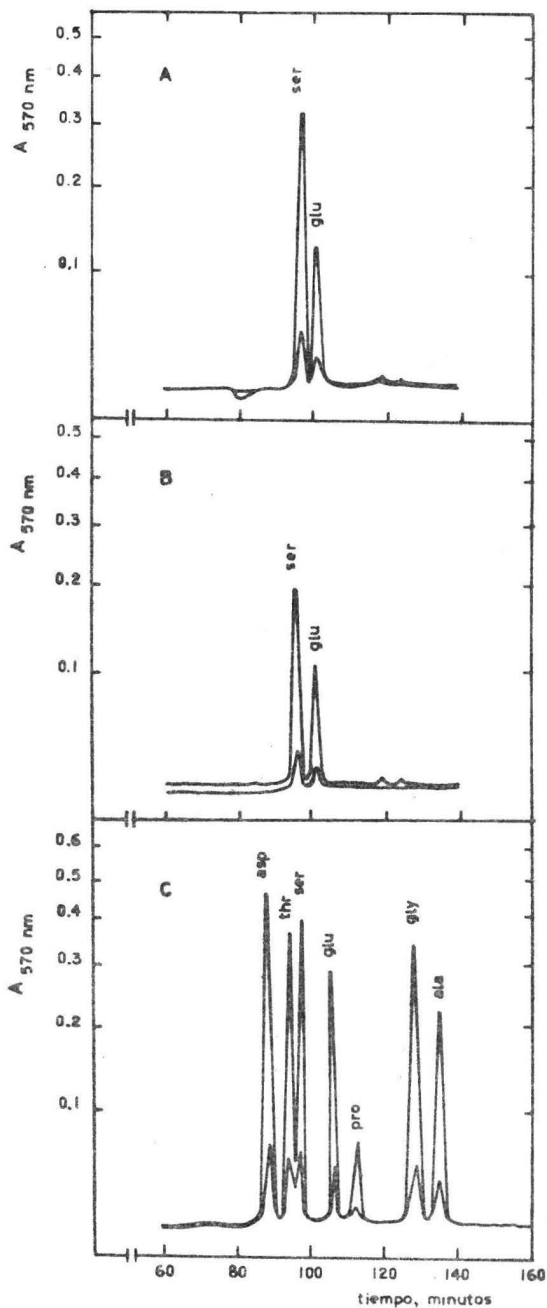


FIG. 13. CROMATOGRAFIA DE ELUCION DEL PICO I DE LA FIGURA 12 DESPUES DE HIDROLISIS CON ACIDO CLORHIDRICO 6N, EN UN ANALIZADOR DE AMINOACIDOS MODELO BECKMAN 120. Amortiguador citrato de sodio 0.2N, pH 3.25, flujo de 60 ml/h, 53.2°. A. Pico I' correspondiente al péptido inicial de la apoferritina de bazo de caballo. B. Pico I' correspondiente al péptido inicial de la apoferritina de hígado de rata. C. Mezcla patrón de aminoácidos (0.25 micromolas de c/u). (A: absorbencia).

tina de bazo de caballo, (pico I', fracción 39, figura 12) obtenido mediante el método descrito y que nos sirvió siempre como patrón, una relación serina:ácido glutámico de 1:0.45, figura 13A y para la misma proteína de hígado de rata, esta misma relación fue de 1:0.58, figura 13B.

Si se observa la figura 13, se ve que la posición de elución de los aminoácidos glutámico y serina correspondientes a las hidrólisis de las apoferritinas de hígado de rata y bazo de caballo respectivamente, no corresponden exactamente al patrón de aminoácidos. Esta diferencia posiblemente se debe a las diferentes condiciones de las corridas, pues para el caso de las hidrólisis, éstas se aplicaron directamente a la columna del analizador (sin previa evaporación del ácido clorhídrico 6N), y la mezcla de aminoácidos patrón se aplicó disuelta en el amortiguador usual.

Estos datos nos autorizan a reportar en forma confiable una relación de 2 serinas por un glutámico(X) para el péptido inicial bloqueado de la apoferritina de hígado de rata.

Con los datos obtenidos hasta ahora, casi podríamos afirmar que la similitud entre los péptidos, el patrón y el estudiado, llegaba hasta la secuencia. Sin embargo, para permitirnos esta afirmación se necesitaban más pruebas.

Entonces se pensó en atacar el problema en 3 formas diferentes que a continuación se citan:

- a) Identificación por cromatografía bidimensional de la 1-acetil-2-dansil-hidrazida.
- b) Identificación del producto de reacción de la hidrazina con el péptido aislado.
- c) Hidrólisis enzimática del péptido con carboxipeptidasa A.

Para el caso a) se obtuvo con este método un producto idéntico al patrón (II) (1-acetil-2-dansil-hidrazida), que equivale al método utilizado para la dinitrofenilación. Además, la dansilación es un método más sensible.

Las cromatografías correspondientes al patrón elaborado, a la hidracinólisis combinada con dansilación de los péptidos obtenidos de las apoferritinas de caballo y de rata,

se muestran en las figuras 14,15 y 16 en las que se verifican las coordenadas del compuesto patrón (II) con el esperado de los péptidos.

Se pensó en identificar el producto de reacción de la hidrazina con el péptido aislado, que en este caso sería el último aminoácido libre. Se sabe que con este método se obtendría en nuestro caso, acetil-hidrazida, seril-hidrazida, más ácido glutámico(X) libre, y para extraer este aminoácido, Akabori (64), utiliza un aldehído, por lo que se trató de obtenerlo con banzaldehído, y como el método no fue eficaz, se introdujo la innovación de pasar la mezcla de hidracinólisis directamente por una columna de Dowex AG50W-X8 de las dimensiones mencionadas en la sección de métodos.

Se corrió la muestra obtenida de la columna de Dowex AG50 (5.3 x 0.7 cm) y posteriormente hidrolizada con ácido, en electroforesis, con muestras de ácido glutámico aplicadas colinealmente al problema, y luego de terminada la corrida y revelada la tira de papel con ninhidrina, se obtuvo una sola mancha, es decir se unieron por sus extremos los patrones puestos y el problema, obteniéndose así para la mancha problema un R_f , idéntico al del ácido glutámico.

Es necesario hacer notar lo indispensable de la hidrólisis, puesto que se ha probado que el ácido glutámico en la resina Dowex AG50 se convierte en ácido piroglutámico, es decir se cicliza (43, 73), y en esta forma da prueba negativa con ninhidrina, y no corre en electroforesis a pH ácido. Al calentar nuevamente con ácido, se vuelve a regenerar el ácido glutámico (74).

Se concluye por estas pruebas, definitivamente, que el último aminoácido del péptido inicial, obtenido de la apoferritina de hígado de rata es un residuo de ácido glutámico(X).

Por los resultados obtenidos de los incisos a) y b) se confirma nuevamente que el péptido aislado en la columna de Dowex AG2-X8, sí es el que corresponde al inicial y que el grupo bloqueador, es un grupo acetilo.

Hasta aquí, los resultados confirman una secuencia: N-acetil-serina-serina-glutámico(X), sin embargo, en el péptido correspondiente a la apoferritina de bazo de caballo se ha reportado un residuo de glutamina.

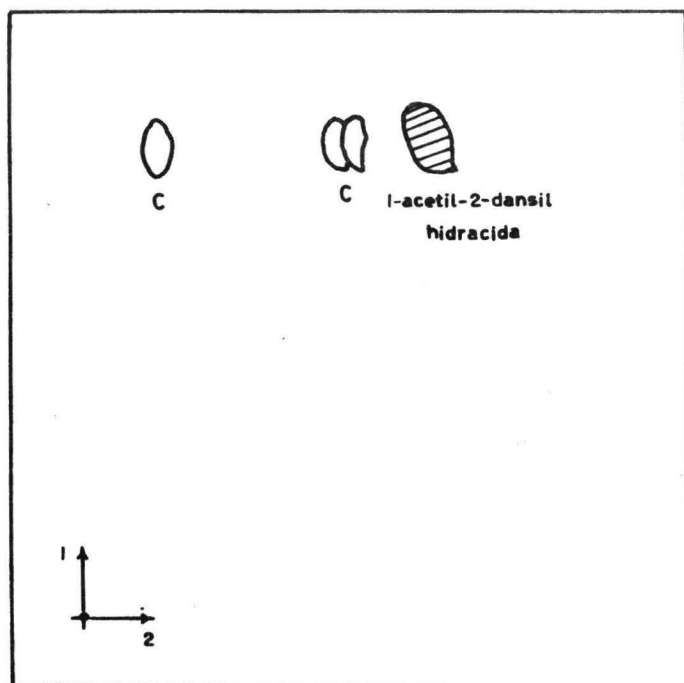


FIG. 14. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DEL COMPUESTO 1-ACETIL-2-DANSIL-HIDRAZIDA, (PATRON II). En placa delgada de gel de sílice. 1. Cloroformo:n-butanol:ácido acético (6/3/1, v/v/v). 2. Alcohol isopropílico:acetato de etilo:amoníaco 25% (7/9/4, v/v/v).

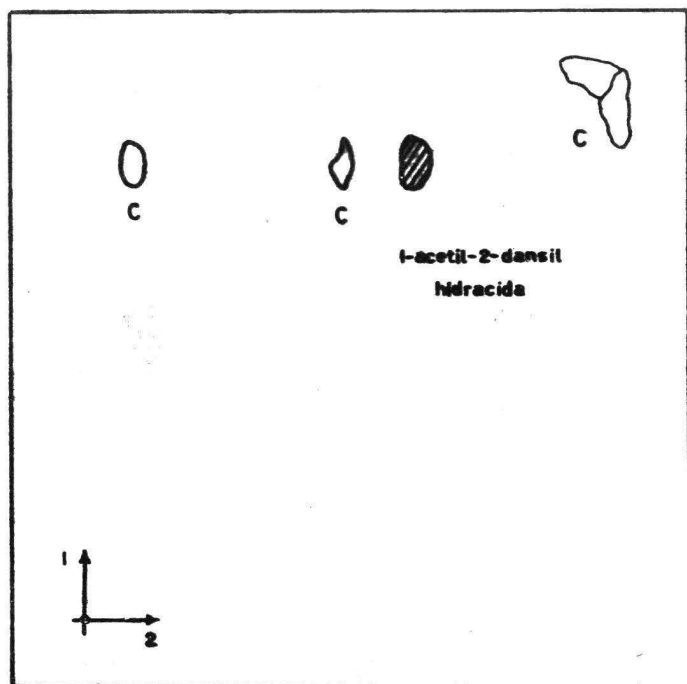


FIG. 15. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA APOFERRITINA DE BAZO DE CABALLO CON HIDRAZINA, MAS DANSILACION POSTERIOR. En placa delgada de gel de sílice. 1. Cloroformo:n-butanol:ácido acético (6/3/1, v/v/v). 2. Alcohol isopropílico:acetato de etilo:amoníaco 25% (7/9/4, v/v/v).

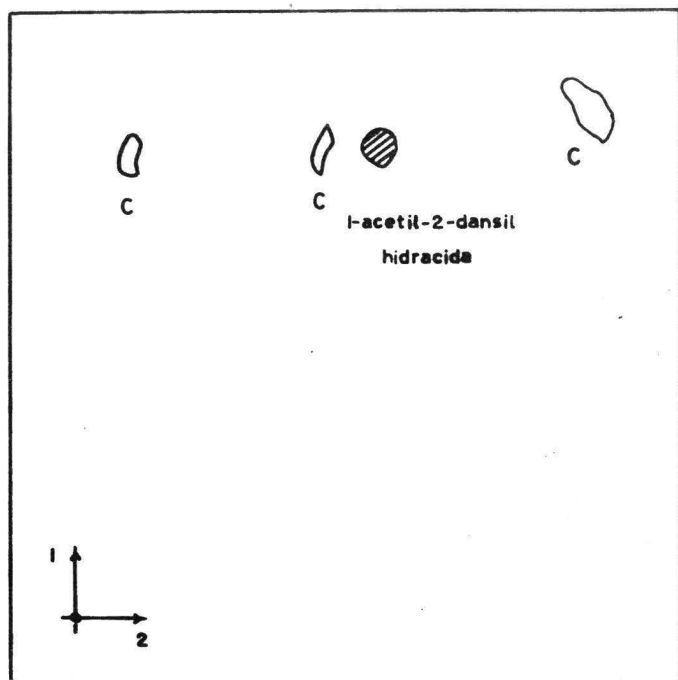


FIG. 16. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA APOFERRITINA DE HIGADO DE RATA CON HIDRAZINA, MAS DANSILACION POSTERIOR. En placa delgada de gel de sílice. 1. Cloroformo:n-butanol:ácido acético (6/3/1, v/v/v). 2. Alcohol isopropílico:acetato de etilo:amoníaco 25% (7/9/4, v/v/v).

Si tomamos en cuenta el hecho de que en toda nuestra experimentación para identificar cada residuo se ha utilizado hidrólisis ácida, principalmente, y tomando en cuenta el hecho de que en este tipo de hidrólisis, cualquier residuo de glutamina o asparagina, invariablemente se convierten en residuos de ácido glutámico y ácido aspártico, más amoníaco, nos queda entonces la duda, si el último residuo del péptido de la apoferritina de rata es un ácido glutámico o una glutamina.

Fue entonces cuando decidimos utilizar la hidrólisis enzimática con carboxipeptidasa A. Este tipo de hidrólisis más específico, presenta 3 aspectos: que rompe las uniones peptídicas comenzando por el extremo carboxilo, su cinética es específica en cuanto al residuo de aminoácido de que se trate, y respeta los grupos amido de la glutamina y asparagina (75).

Aprovechando estas ventajas, se decidió utilizar la hidrólisis enzimática ya mencionada, haciendo notar que como se tenía una actividad 5 veces menor de la reportada por el proveedor, se utilizó para la hidrólisis un exceso de 5 veces más de la enzima. La única desventaja a considerar, era una contaminación 5 veces más por parte de la enzima en la mezcla de reacción, desventaja que se equilibra elaborando blancos y asegurándose de la precipitación de la enzima al final de la hidrólisis y eliminación del precipitado.

Para el caso de la solubilización de la carboxipeptidasa A, se utilizaron los métodos descritos por Ambler (75), y como no funcionaron, se utilizó el método de Folk (65), con una modificación que consistió en utilizar bicarbonato de amonio 0.2M en vez del amortiguador de Tris, reportado.

Los resultados de las cromatografías correspondientes a la hidrólisis con carboxipeptidasa A, se muestran en las figuras 17, 18 y 19 que corresponden respectivamente a un patrón de aminoácidos dansilados (dansil-serina, dansil-glutámico y dansil-glutamina), hidrólisis enzimática con carboxipeptidasa A más dansilación, del péptido de la apoferritina de hígado de rata (fracción A, ver Métodos), e hidrólisis enzimática del mismo péptido combinada con dansilación, más hidrólisis ácida, (fracción B, ver Métodos).

En esta forma se comprueba que el aminoácido ter-

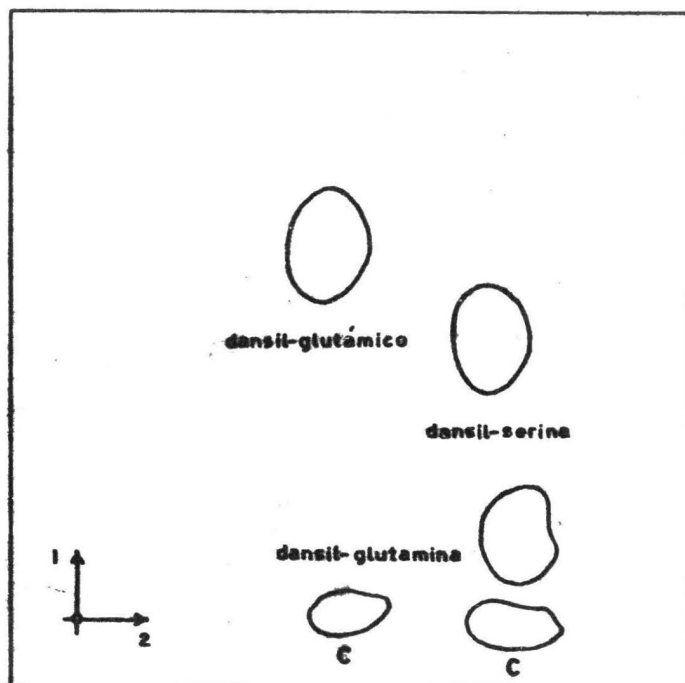


FIG. 17. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DE UNA MEZCLA PATRON DE DANSIL AMINO-ACIDOS. En placa delgada de gel de sílice. Aplicación, 1.66 nanomolas de cada uno (concentración 1mM en fórmico al 10%). 1. Benceno:piridina:ácido acético (16/4/1, v/v/v). 2. Tolueno:2-cloro-etanol:amoníaco 25% (6/10/4, v/v/v). (C: contaminantes).

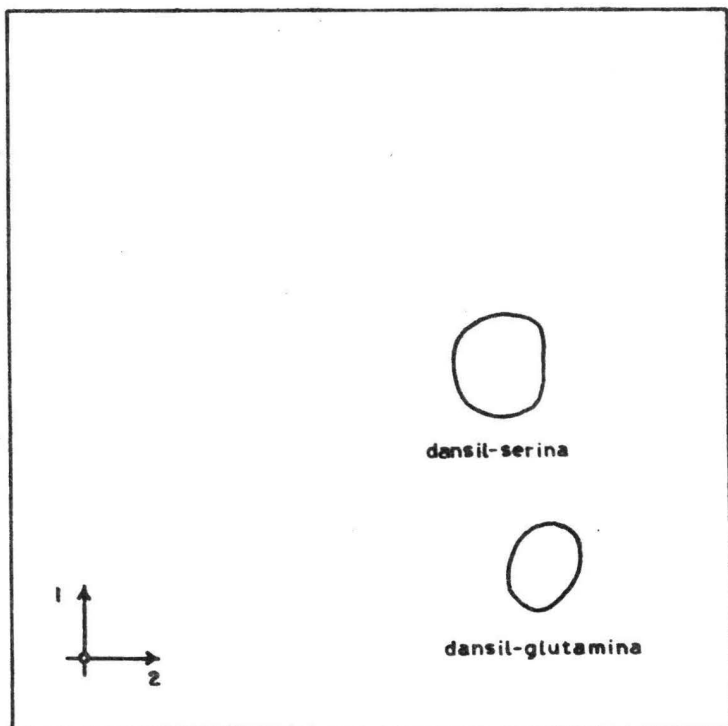


FIG. 18. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA CON CARBOXIPEPTIDASA A, MAS DANSILACION Y EXTRACCION CON ACETATO DE ETILO (FRACCION A, VER METODOS), DEL PEPTIDO INICIAL DE LA APO-FERRITINA DE HIGADO DE RATA. (Del pico I, fig. 12). En placa delgada de gel de sílice. 1. Benceno:piridina:ácido acético (16/4/1, v/v/v). 2. Tolueno: 2-cloro-etanol:amoníaco 25% (6/10/4, v/v/v).

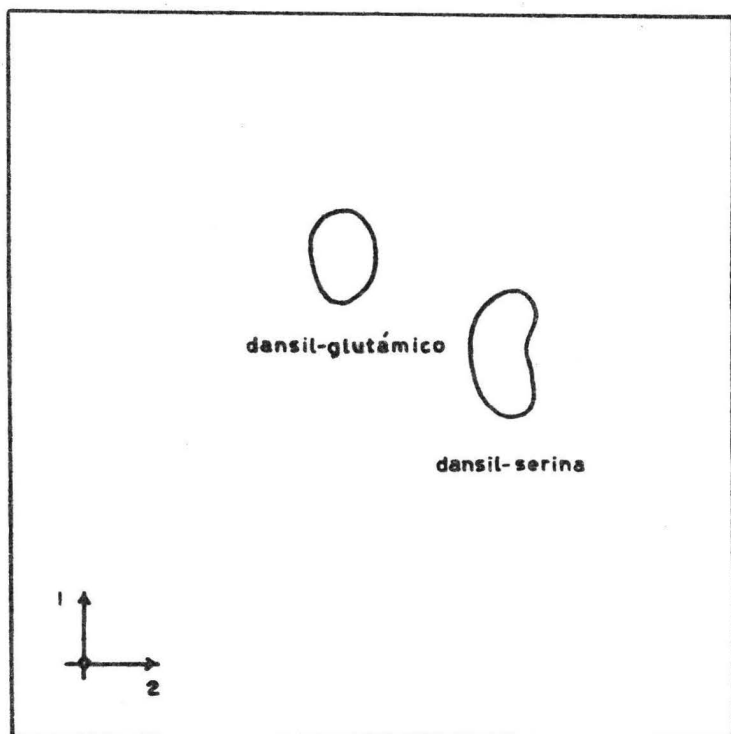


FIG. 19. CROMATOGRAFIA BIDIMENSIONAL DEL PRODUCTO DE REACCION DE LA HIDROLISIS ENZIMATICA CON CARBOXIPEPTIDASA A, MAS DANSILACION Y EXTRACCION CON ACETATO DE ETILO (FRACCION B, VER METODOS), MAS HIDROLISIS ACIDA POSTERIOR CON HCl 6N, DEL PEPTIDO INICIAL DE LA APOFERRITINA DE HIGADO DE RATA. (Del pico I, fig. 12). En placa delgada de gel de sílice. 1. Benceno:piridina:ácido acético (16/4/1, v/v/v). 2. Tolueno:2-cloro-etanol:amoníaco 25% (6/10/4, v/v/v).

minal del péptido inicial de la apoferritina de hígado de rata es una glutamina, puesto que como se ve en la cromatografía, la dansil-glutamina se convierte en dansil-glutámico, mediante hidrólisis ácida.

Como se ve por las figuras 18 y 19 se tiene una mancha correspondiente a dansil-serina, lo cual comprueba aún más la funcionalidad de la enzima y del sistema.

Se hace la aclaración de que la misma secuencia se comprobó antes con el péptido inicial de la apoferritina de bazo de caballo que ha servido como patrón desde el principio.

IV

DISCUSION

Para el estudio de la estructura primaria de una proteína o péptido es necesario llenar ciertos requisitos, como son:

- a) Partir de una proteína o péptido puro.
- b) Utilizar técnicas moderadas de desnaturalización, para hacer accesibles los grupos de interés.
- c) Investigar si el grupo amino o carboxilo terminales, existen libres, bloqueados o en forma cíclica.
- d) Utilizar hidrólisis enzimáticas.
- e) Utilizar hidrólisis químicas: ácida, básica o con bromuro de cianógeno (BrCN).

Para el caso de la ferritina de hígado de rata, se utilizó el

método de purificación ya descrito, tomando en cuenta ventajas inherentes a la molécula, tales como: soportar temperaturas elevadas (hasta 80°), fraccionamiento mediante precipitación con sulfato de amonio a concentraciones de 35-50% (1), cromatografía en Sephadex G-200, aprovechando el peso molecular elevado de esta proteína.

Un método de purificación alternativo, utilizado con frecuencia es la cristalización de la ferritina con sulfato de cadmio al 5%. Sin embargo, al tratar de aplicarlo a la ferritina de hígado de rata no dió buenos resultados, tal vez porque no se tomaron en cuenta detalles como presencia de otros iones (Cl^- , NH_4^+), concentración de sulfatos de amonio y de cadmio, pH adecuado (5.5-7), etc. (16, 76), ya que el método puede exigir ciertas modificaciones y consideraciones para una especie y órgano diferentes para los que fue diseñado. Además, hay que tener presente que la cristalización de una proteína no necesariamente produce una proteína pura, como es el caso de la albúmina de rata (77).

El criterio que se siguió para considerar a la ferritina pura fue mediante la electroforesis de disco en gel de poliacrilamida. Este método tiene la ventaja de proporcionar una matriz de acrilamida sin carga, en la cual la separación de una mezcla proteínica se basa en la filtración molecular a través de un poro, y diferencias de movilidad de la proteína al aplicarle un campo eléctrico. Además presenta la ventaja de que se pueden utilizar cantidades de proteína del orden de microgramos y visualizar claramente la separación de los diferentes componentes de la mezcla. Las condiciones experimentales de la electroforesis de la ferritina, descritas por Linder-Horowitz (23) se detallaron en la sección de Materiales y Métodos. Al igual que en el experimento original, se utilizaron dos métodos diferentes de tinción, uno con negro de amido que es el colorante para proteínas y otro con solución de ferrocianuro de potasio al 2% en ácido clorhídrico al 2%. Si se obtiene el mismo número de bandas obtenidas, corresponden a proteína con hierro; si salieran bandas diferentes en los geles teñidos para proteína, quiere decir que es una proteína diferente que no contiene hierro y por lo tanto es una impureza. Como se ve en el densitograma, se obtuvieron bandas que representan la misma molécula en diferentes estados de agregación.

Considerando suficiente este criterio de pureza se procedió a reducir la ferritina a apoferritina. Los resul-

tados que se obtuvieron siempre que se aplicó el método descrito anteriormente, fueron: recuperación 95%, reducción 100%. Este porcentaje alto de eliminación de hierro, se obtuvo debido a los varios ciclos de reducción, quelación y diálisis, aplicados a la ferritina. Por el contrario, cuando se utilizó el método descrito por Suran (69) en el que utiliza 350 mg de hidrosulfito de sodio (ditionita) aplicados directamente a la solución de proteína a una concentración de 60-90 mg de ferritina en 10 ml de amortiguador acetato de sodio 0.05M, pH 4.8, nunca se llegó a una reducción total de la ferritina.

Como se mencionó al principio de esta sección, es requisito indispensable para determinar la estructura primaria de la apoferritina de hígado de rata, que todos los grupos de interés como son los extremos amino y carboxilo, así como las posiciones internas, se encuentren lo más accesibles posibles. Además, hay que tener en cuenta que en el caso de la necesidad del uso de enzimas proteolíticas, la mayoría de éstas muestran una mínima acción hacia las proteínas nativas. De aquí que se haga necesario desnaturalizar a la proteínas, esto es, disgregar su configuración nativa tridimensional. Más aún, se hace imprescindible para el caso de la apoferritina, la cual presenta estructura cuaternaria, (1).

Las técnicas más utilizadas para el desdoblamiento de una proteína dependen de si las cadenas están unidas covalentemente o no covalentemente. Para el primer caso se requiere aplicar métodos químicos; para el segundo caso, resulta en una buena disociación de la molécula el modificar el medio que la rodea.

La desnaturalización puede ser reversible e irreversible, suave o vigorosa. Necesariamente debe ser vigorosa, tomando en cuenta la calidad del sustrato, para obtener el mayor porcentaje de acceso a la acción de la enzima o de los diferentes agentes químicos, más no debe ser drástica, que dé como resultado un rompimiento interno de una cadena polipeptídica o destrucción de algún grupo unido covalentemente y diferente a una unión peptídica.

Los agentes desnaturalizantes más empleados suaves y reversibles, son soluciones concentradas de urea (8M) o cloruro de guanidina (6M), al utilizar estos dos agentes se hace necesario eliminarlos, si no totalmente, sí hasta un grado tal, que no caucen reacciones laterales no deseables,

debido a contaminantes tales como cianuros que pueden encontrarse presentes en la urea.

Otros medios de desnaturalización son: el calor, cambio de pH, o precipitación con soluciones concentradas de ácido tricloroacético, trifluoroacético y ácido fórmico anhidro.

En el laboratorio se utilizó la desnaturalización con urea para la determinación del extremo amino por el método de Sanger y la desnaturalización combinada con calor más precipitación con ácido tricloroacético al 5% para las subsecuentes hidrólisis enzimáticas. Este último método fue el que proporcionó el mayor éxito y la mayor recuperación.

A la apoferritina electroforéticamente pura, se le aplicó la reacción de Sanger a pH básico y con urea, clásico para determinaciones del extremo amino terminal en proteínas o péptidos y mediante este método se logró la identificación y aislamiento del 2,4-dinitrofenil-aspartico, que es el aminoácido inicial de la albúmina bovina, que se utilizó como patrón para probar la funcionalidad del método. Al mismo tiempo se corrió una muestra de apoferritina de hígado de rata, tratada en las mismas condiciones y sólo se lograron visualizar las manchas contaminantes que correspondían con el blanco.

Como el resultado de la reacción de Sanger con la apoferritina fue negativo, se pensó en la posibilidad de un bloqueo en el extremo amino de la proteína. De entre los diferentes grupos bloqueadores que existen se pueden mencionar los siguientes: el formilo, en proteínas de procariotes o mitocondriales; el acetilo, extensamente encontrados en la naturaleza en organismos eucariotes; grupos cuya estructura no ha sido completamente elucidada como son los grupos aldehído o cetona unidos al grupo amino terminal (base de Schiff); grupos amida; residuos cíclicos de glutámico o glutamina en posición inicial; o bien la muy remotamente posible ciclización total de la molécula, como es el caso de la gramicidina S.

Para determinar la naturaleza del grupo bloqueador se utilizó la combinación de dos reacciones; primero, hidracinólisis de la proteína total y dinitrofenilación posterior, en este último caso se utilizó pH ácido para eliminar contaminaciones por dinitrofenilación de grupos alfa-amino,

y epsilon-amino de la lisina. En esta forma se pudo determinar mediante cromatografía en papel, bidimensional y descendente, un compuesto que resultó ser la 2,4-dinitrofenil-acetil-hidrazida, identificada mediante un compuesto patrón elaborado.

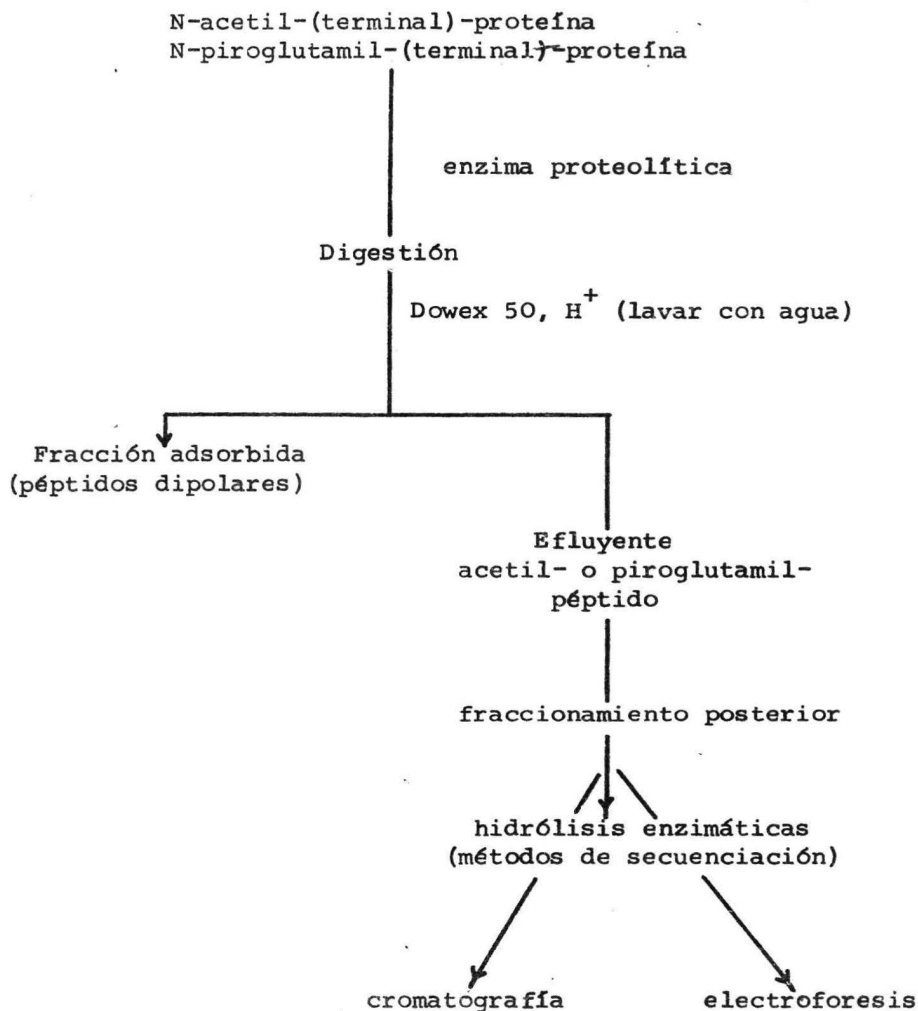
Este mismo grupo bloqueador se identificó por un segundo método que consistió nuevamente en una reacción combinada de hidracinólisis más dansilación posterior, con la diferencia de que en esta ocasión se utilizó el péptido inicial bloqueado, obtenido mediante cromatografía en columna de intercambio iónico, obteniéndose esta vez el compuesto 1-dansil-2-acetil-hidrazida. Este último método resultó más sensible que el de la dinitrofenilación, puesto que se reporta la aplicación del mismo a una escala de 1-10 nanomolas de péptido o proteína (67). En el laboratorio se logró visualizar el compuesto dansilado a partir de 20 nanomolas.

Cierta clase de enzimas ha llegado a ocupar una posición privilegiada en la investigación de la secuencia de aminoácidos de una proteína o péptido. Estas proteínas presentan características ventajosas intrínsecas a la molécula, como son:

- a) Su cinética
- b) Especificidad de sustrato
- c) Respeto a la composición química del sustrato ya hidrolizado

Teniendo en cuenta estas ventajas, se pensó en determinar el aminoácido inicial bloqueado de la apoferritina mediante una hidrólisis enzimática. Para ello se utilizó la mezcla de enzimas proteolíticas Pronasa (*Streptomyces griseus*) que siendo inespecífica podría proporcionar el aminoácido inicial unido a su grupo bloqueador, además de aminoácidos y péptidos internos de la molécula. Aún cuando se sabe que al probar una enzima con un nuevo sustrato, es necesario buscar mediante experimentación las condiciones más adecuadas para la hidrólisis del nuevo sustrato, en el laboratorio utilizamos exactamente el método de hidrólisis ya descrito en la sección correspondiente, con la única modificación que consistió en utilizar el doble de concentración de enzima, que la reportada por Marriq (58). Después de efectuada la hidrólisis el problema era obtener el producto esperado de dicha hidrólisis

en una forma menos contaminada. Para este tipo de análisis, Narita (78), reporta una secuencia de análisis que es la siguiente:



Siguiendo esta secuencia, se utilizó una combinación de cromatografías: primero en resina Dowex 50, de la cual se obtuvo una fracción ácida impura en electroforesis

a voltaje medio y pH 2.0.

Se decidió por la segunda cromatografía en columna de Dowex AG2, que retiene aminoácidos y péptidos básicos. En esta forma se obtuvo mediante reacción con ninhidrina, antes y después de hidrólisis alcalina, un perfil de elución, cuyas fracciones reunidas y analizadas en un analizador de aminoácidos Beckman Modelo 116, resultaron impuras pero con cierta similitud al péptido inicial correspondiente a la apoferritina de bazo de caballo. Consiguientemente se trató de definir mejor el perfil de elución del efluente de la columna de Dowex AG2, mediante determinación directa de la absorbencia de cada fracción a una longitud de onda de 206 nm en un espectrofotómetro Zeiss, Modelo PMQ II. Este método resultó ser magnífico para determinar con exactitud las fracciones que desarrolló el gradiente de ácido clorhídrico aplicado a la columna, con la ventaja de que no existe la pérdida de tiempo y material que requieren las técnicas usuales de hidrólisis ácida y alcalina y posterior cuantificación con ninhidrina.

Con este método se logró determinar cualitativamente y cuantitativamente en un analizador de aminoácidos - Beckman, Modelo 120, los aminoácidos componentes del péptido que resultó bloqueado. Esta vez se utilizó sólo el amortiguador citrato de sodio 0.2N, pH 3.25. Así, se obtuvo una relación serina:glutámico de 1:0.58 que corresponden perfectamente a la relación de dos serinas por una glutamina del péptido de apoferritina de caballo.

Siempre que se necesitó cuantificar aminoácidos del péptido ya identificado espectrofotométricamente, se utilizó la hidrólisis básica con hidróxido de sodio 2.5N. Dicha hidrólisis aún cuando no ha sido extensivamente utilizada para degradación de proteínas y polipéptidos, tiene la ventaja de que es muy rápida y en un tiempo relativamente corto se tienen los resultados cuantificables. Otra ventaja es que el triptofano no se descompone en este tipo de hidrólisis. También se utiliza esta hidrólisis para regenerar aminoácidos obtenidos por métodos de análisis de extremo amino terminal como son los derivados dinitrofenilados y feniltiohidantoinicos.

Las desventajas las podemos enunciar como las siguientes: al terminar la hidrólisis se tiene una cantidad de sales muy grande que podría interferir seriamente en una cro-

matografía o electroforesis posterior.

También se tiene descomposición de cierta clase de aminoácidos como son: serina que se descompone a glicina y alanina; treonina que produce glicina, alanina y ácido alfa-aminobutírico; arginina que da ornitina, citrulina y amoníaco; cisteína y cistina que producen alanina, ácido sulfhídrico, amoníaco y ácido pirúvico. Los aminoácidos que resultan estables en álcali son racemizados a un grado considerable (79).

Ninguna de estas descomposiciones se comprobaron porque sólo se utilizó este tipo de hidrólisis para cuantificar en forma rápida la concentración de aminoácidos de un péptido y las condiciones utilizadas se pueden considerar suaves.

La hidrólisis que más se utilizó en el transcurso de toda la experimentación fue la denominada hidrólisis ácida completa, utilizando ácido clorhídrico comercial 6N, a 105-110° durante 16 horas (normalmente se utilizan 24 horas para hidrólisis completa). En otras hidrólisis de este tipo denominadas parciales, se utiliza toda una gama de condiciones, como por ejemplo: para el ácido clorhídrico, se reportan normalidades desde 2N hasta 12N, para la temperatura, de 20° a 110° y para el tiempo, hasta 48 horas o más. Con estas variables se han podido estudiar y determinar condiciones favorables de cinética de la reacción y labilidad de ciertos grupos constitutivos de los aminoácidos.

Sin dejar de tomar en cuenta que cada proteína presenta un problema individual, se puede generalizar que los hidrolizados obtenidos mediante las condiciones de la hidrólisis completa, adecuadamente reflejan las condiciones de la mayoría de los aminoácidos que constituyen la proteína antes de la hidrólisis.

Los problemas ya determinados para este tipo de hidrólisis (completa) son los siguientes (79):

a) Destrucción extensiva de glutamina, asparagina y triptofano, que son convertidos cuantitativamente a ácidos glutámico y aspártico con producción estequiométrica de amoníaco (aunque también se ha observado que el aumento de amoníaco es proporcional también a la desaparición de serina y treonina). Para el triptofano no se conoce la naturaleza exacta de los productos de destrucción, sólo se conoce que

son los anillos indol los que experimentan ruptura.

b) Otros aminoácidos son destruidos en menor grado y la disminución en su rendimiento es una función del tiempo de hidrólisis. Ejemplo: serina y treonina se destruyen de 5-10% dependiendo del tiempo de hidrólisis. También se ha reportado la destrucción de otros aminoácidos como cisteína, aspártico, glutámico, lisina, arginina, tirosina y prolina.

c) Existen reportes sobre pérdidas de serina y glutámico durante la eliminación del ácido clorhídrico por desecamiento y no como consecuencia directa de la hidrólisis.

Para nuestro caso, no se encontraron problemas de pérdidas apreciables, tal vez porque se utilizó menos tiempo de hidrólisis o sea 16 horas (también se aconseja tiempos de hidrólisis de 8 horas para péptidos pequeños), condiciones de ausencia de oxígeno y eliminación del ácido clorhídrico residual mediante corriente de nitrógeno.

Ahora bien, por lo que respecta a la ausencia de metales, se utilizó un ácido clorhídrico comercial y no el de punto de ebullición constante que es el recomendado para estos casos.

Siempre se obtuvieron muestras hidrolizadas totalmente limpias, sin el indicio de suspensiones extrañas denominadas huminas. En esta forma los resultados obtenidos mediante el analizador de aminoácidos, son una prueba directa de la funcionalidad de la hidrólisis utilizada y los datos reportados nos hacen pensar que los pequeños errores en la medición de la relación serina:glutámico de los péptidos, se debe más bien, a errores aceptables de la experimentación.

Con los datos obtenidos de composición cualitativa y relativa de los aminoácidos del péptido inicial bloqueado de la apoferritina de hígado de rata se hace necesario determinar la secuencia de dicho péptido, esta secuencia podría ser cualquier número de combinaciones obtenidas con estos tres residuos de aminoácidos.

Se sabe que el método de hidracinólisis desarrollado por Akabori (64), efectuado sobre una portefina o péptido, resulta en la liberación del aminoácido correspondiente al carboxilo terminal. Mediante este método efectua-



do sobre el péptido obtenido de la columna de Dowex AG2 y electroforesis en papel, se determinó que el aminoácido final del péptido inicial bloqueado correspondía a un residuo de ácido glutámico. Como este residuo se obtuvo pasándolo a través de una columna pequeña de Dowex AG50, y sabiendo que una propiedad de esta resina es la de catalizar la transformación de los residuos de ácido glutámico o glutamina a piroglutámico (78), hubo necesidad de hidrolizar con ácido clorhídrico este producto (piroglutámico o pirrolidón carboxílico) para regenerar el ácido glutámico (74) e identificarlo por la electroforesis ya mencionada. Con este método, todavía no se podía discriminar si el residuo final del péptido era ácido glutámico o glutamina.

Se pensó en utilizar la hidrólisis enzimática del péptido mencionado, con carboxipeptidasa A. Como se mencionó antes se utilizó una enzima de baja actividad, sobrepasando esta dificultad mediante el empleo de una relación E/S de 5. En esta forma y por cromatografía bidimensional en placa delgada de gel de sílice, se obtuvo como residuo carboxilo terminal del péptido un residuo de glutamina, identificándolo como dansil-glutamina, comprobando su conversión a dansil-glutámico mediante hidrólisis ácida posterior. Además, se obtuvo al mismo tiempo en la hidrólisis con carboxipeptidasa A, dansil-serina.

En esta forma se logró una secuencia completa del péptido inicial de la apoferritina de hígado de rata, obtenido mediante hidrólisis con Pronasa de: N-acetil-serina-serina-glutamina, que se asemeja en parte al péptido inicial de la apoferritina de bazo de caballo, con la diferencia de que dicho péptido fue obtenido por hidrólisis con tripsina y tiene dos aminoácidos más que son isoleucina y arginina (30).

Al hidrolizar con Pronasa ambas ferritinas, tanto de bazo de caballo como de hígado de rata y tratar de aislar el péptido inicial, se obtuvieron 2 gráficas idénticas, fig. 9, lo cual nos hace suponer que ambas proteínas conservan una semejanza notable y que las diferencias que reportan algunos investigadores entre los péptidos tripticos (31), de ambas proteínas, podrían ser modificaciones leves de aminoácidos.

Es necesario hacer la aclaración, que la mayoría de los cálculos y experimentos se efectuaron en base a 18,500 daltons de peso molecular para la subunidad y que la molécula

de apoferritina de hígado de rata consta de 24 subunidades posiblemente idénticas, y sin dejar de considerar los reportes existentes sobre la proteína, en el sentido de que existe heterogeneidad entre sus subunidades (27); de que posiblemente no sea sintetizada 100% en los ribosomas libres (14) y que además es una glicoproteína (80).

Si consideramos los reportes frecuentes de la reacción immunoquímica cruzada entre la ferritina de hígado de rata y el anticuerpo antiferritina de bazo de caballo obtenido en conejo, nos hace sospechar que ambas proteínas tienen una gran semejanza en su estructura primaria, aún cuando se trate de dos especies genéticamente distantes.

Existen varios puntos a favor para considerar la gran semejanza entre la estructura primaria de las dos ferritinas consideradas, la de bazo de caballo y la de hígado de rata.

- a) Reacción immunoquímica cruzada entre ferritina de hígado de rata y anticuerpo antiferritina de bazo de caballo.
- b) Se ha reportado diferencia leve entre los péptidos obtenidos con tripsina de ambas ferritinas.
- c) La función se ha conservado a través de las especies.
- d) Se obtiene el mismo patrón al tratar ambas proteínas con Pronasa y aislamiento del péptido inicial en Dowex AG2.

Una molécula ideal para propósitos comparativos es el citocromo c, localizado en la mitocondria de todas las células aerobias, junto con otras enzimas involucradas en el sistema de transporte de electrones, que funcionan en la fosforilación oxidativa.

El citocromo c de vertebrados superiores, tiene muchos aspectos en común, como son: una secuencia constante alrededor del grupo cisteína que sostiene al grupo hemo, acetilación del grupo amino terminal y posiciones homólogas de aminoácidos (81).

En esta forma podemos comparar las estructuras del citocromo c de humano, mono Rhesus, chimpancé y Erythrocebus patas (a), con la del conejo (b), (81), de los cuales se tienen las siguientes secuencias:

(a) Acetil-gly-asp-val-glu-lys-gly-lys-lys-ile-phe-ile-met-lys-cys-ser-

(b) Acetil-gly-asp-val-glu-lys-gly-lys-lys-ile-phe-val-gln-lys-cys-ala-

como se ve, las diferencias son leves entre estos péptidos y si se comparan las proteínas en su totalidad las diferencias son menos notables.

Parece que en los vegetales, el citocromo c ha sufrido más modificaciones a través de la evolución biológica.

Se sabe que la apoferritina es una proteína cuya biosíntesis es fácilmente estimulada por hierro (en forma de diferentes compuestos) y por los experimentos efectuados hasta la fecha existe mayor tendencia a considerar que el estímulo del hierro es a nivel postranscripcional, esto es, no involucra síntesis de novo del ARNm correspondiente a la apoferritina. Hasta la fecha no se ha podido dar una explicación satisfactoria a este tipo de estímulo y se pueden mencionar algunas hipótesis, como:

a) Que el estímulo causa una inducción aparente al estabilizar un precursor inestable de ferritina, tal vez apoferritina, contra la degradación por proteólisis, lo cual confirma el contenido de marca (L-leucina- C^{14}) en fracciones bajas en hierro y en condiciones de estimulación (39, 82).

b) O bien, por estudios con Actinomicina D, se ve que el hierro no altera la expresión del gen de la apoferritina y que probablemente estimula la síntesis a nivel citoplasmático, utilizando el ARNm ya existente para la subunidad de apoferritina (23).

c) Otra hipótesis, es que la unión del hierro a péptidos nacientes de ferritina sobre los polisomas, anula una inhibición de la biosíntesis de apoferritina (2).

d) El hierro captado por la célula podría aumentar la velocidad de traducción del mensaje de ferritina o

podría actuar en algún paso de integración de la ferritina a partir de sus subunidades (39, 83).

Es de esperarse que el mecanismo de inducción por hierro de la apoferritina sea más complejo y Vassart (42) ha reportado que el mecanismo de control postranscripcional de la biosíntesis de una proteína probablemente descanse en el nivel de iniciación del péptido.

A este nivel se pueden considerar varios factores.

Por ejemplo, en organismos procariotes (84) se ha encontrado que la mayoría de las proteínas se inician con el aminoácido metionina y pocos con alanina y serina. Existen dos ácidos ribonucleicos de transferencia (ARNt) para metionina, uno que se encuentra formilado y se representa como $\text{ARNt}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ y otro no formilado que se representa por ARNt^{Met} , ambos son esterificados por la misma metionil-ARNt-sintetasa y el primero es formilado por una transformilasa específica, siendo el donador de formilo el N^{10} -metionil-tetrahidrofolato.

Existen además factores de iniciación proteínicos presentes generalmente en los ribosomas crudos que se pueden eliminar por extracción con soluciones salinas de 0.5-1.0M.

El sistema sintetizador en procariotes comprende subunidades ribosomales (30S y 50S), $\text{ARNt}_{\text{f}}^{\text{Met}}$, ARNm, GTP y tres factores proteínicos de iniciación: IF1, IF2, IF3.

El primer paso, es la formación del complejo de iniciación: subunidad ribosomal 30S-IF3-ARNm (se piensa que el factor IF3 reconoce al codón de iniciación AUG o GUG del ARNm y evita la asociación con la subunidad 50S).

El factor IF2 dirige la unión del $\text{ARNt}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ iniciador al complejo anteriormente formado. En este paso se requiere GTP.

El factor IF1 promueve la utilización catalítica del IF2. Se piensa que se requiere para la liberación del factor IF2 y presumiblemente GDP del complejo 70S.

Intervienen además las proteínas ribosomales S₁₉

y S₂₁ para el ARNt^{Met}_f, S₂, S₁₈ y S₂₀ para el factor IF3, S₉ y S₁₃ para el aminoacil-ARNt (sitio A del ribosoma).

Al complejo de iniciación así formado, se le une la subunidad 50S para formar un monosoma funcional y prosigue la elongación. El ARNt iniciador en el complejo de iniciación se une al sitio P del ribosoma y el sitio A, que se encuentra libre, recibe al segundo aminoacil-ARNt. Para ello se requiere de un factor denominado T (subdividido en Tu y Ts) y GTP. Se forma la primera unión peptídica mediante la peptidil-transferasa que forma parte de la subunidad 50S.

El siguiente paso en esta elongación del péptido es el regreso del péptido ya formado y que se encuentra en el sitio A, al sitio P del ribosoma para dejar libre de nuevo al sitio A. Este paso es el denominado de translocación y requiere del factor G, hidrólisis de GTP y proteínas ribosomales posiblemente del tipo contráctil. Se repite el ciclo tantas veces como aminoácidos tenga la cadena polipeptídica y al final se llega a una señal de terminación que es un suceso único y requiere de dos factores de liberación denominados R₁ y R₂ (R₁ funciona con los trinucleótidos UAA, UAG y R₂ funciona con los trinucleótidos UAA, UGA) que liberan al péptido y al último ARNt, se separan las subunidades ribosomales al interaccionar con una proteína, posiblemente algún factor de iniciación.

En esta forma, la biosíntesis de una proteína, comprende tres secuencias: de iniciación y terminación que son específicas y de elongación que es cíclica.

A diferencia de la iniciación en procariotes, para los organismos eucariotes el ARNt iniciador es un ARNt^{Met}_f formilable por la ARNt-transformilasa de procariotes, pero no formilado. En mitocondria y cloroplastos existe el ARNt formilado iniciador descrito para bacteria (85, 86).

Se propone un modelo secuencial y similar para eucariotes, para la formación del complejo de iniciación entre la subunidad 40S de eucariotes y los factores de iniciación, que para este sistema son: M1, M2, M3. Aún cuando se ha tratado de correlacionar la funcionalidad de estos factores con los existentes en procariotes, se tienen dudas, puesto que hay que tomar en cuenta que en eucariotes parece ser muy difícil obtener un sistema ribosomal absolutamente dependiente de los factores de iniciación y en algunos casos se ha necesitado lavar las subunidades con concentraciones altas de

sales, lo cual podría alterar al ribosoma en sí. Además todos los sistemas que se han descrito son in vitro, que dista mucho de lo que realmente acontece in vivo (87).

En conclusión, la iniciación por un ARNt_f^{Met} especial puede ser un fenómeno universal en la síntesis de todas las proteínas de procariotes y eucariotes. Y la mayor diferencia estriba en que en bacteria y mitocondria es necesario el bloqueo del ARNt iniciador, mientras que en eucariotes no.

Existen experimentos en mamíferos que confirman que muchas proteínas, si no todas, contienen en sus péptidos nacientes y en la posición N-terminal, metionina y en aquellas en las que no se encuentra este aminoácido se piensa que existe una aminopeptidasa específica para este aminoácido inicial como por ejemplo en la biosíntesis de hemoglobina, (88, 89).

Con frecuencia aparecen reportadas y cada día son más, las proteínas con un grupo acetilo bloqueador del extremo amino. Con las ya existentes se puede elaborar la siguiente lista:

Proteína	Secuencia
Virus del mosaico del tabaco	Ac-ser-tyr-ser-
Hormona estimulante de los melanocitos-alfa (MSH)	Ac-ser-tyr-ser-met-glu-
Histona IV (timo de ternera)	Ac-ser-gly-arg-gly-lys-
Miosina (músculo de conejo)	Ac-ser-ser-asp-ala-
Hemoglobina de carpa	Ac-ser-leu-ser-asp-lys-
Apoferitina (bazo de caballo)	Ac-ser-ser-gln-ile-arg-
Histona F2a2 ⁺¹	Ac-ser-gly-arg-
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (langosta)	Ac-ser-lys-ile-gly-ile-
Fosfoglicerato cinasa de eritrocito (sangre humana)	Ac-ser-
Anhidrasa carbónica C (eritrocito humano) ⁺²	Ac-ser-
Anhidrasa carbónica A (bovina)	Ac-ser-
Anhidrasa carbónica B (bovina) ⁺²	Ac-ser-

Proteína	Secuencia
Péptido del precursor del Factor XIII (liberado en presencia de Trombina) (bovina) ⁺³	Ac-ser-glu-ser-gly-thr-
Péptido del precursor del Factor XIII (liberado en presencia de Trombina) (humano) ⁺³	Ac-ser-glu-thr-ser-arg-
Proteína estructural mitocondrial (corazón de ternera)	Ac-ser-
Enolasa (músculo de conejo) ⁺¹	Ac-ala-gly-lys-
Virus 4 del pepino	Ac-ala-tyr-asn-pro-ile-
Queratina (lana)	Ac-ala-
Anhidrasa carbónica B (eritrocito humano)	Ac-ala-ser-pro-asp-
Hemoglobina-alfa (rana)	Ac-ala-leu-
Citocromo c (trigo)	Ac-ala-ser-phe-ser-glu-
Mielina básica (bovina)	Ac-ala-ser-ala-gln-lys-
Deshidrogenasa láctica (M ₄) (hígado de rata)	Ac-ala-ala-
Deshidrogenasa láctica (H ₄) (corazón ternera y pollo)	Ac-ala-thr-
Citocromo c (mung-beam, girasol)	Ac-ala-ser-phe-ala-glu-
Adenovirus tipo 2 Hexon ⁺⁴	Ac-ala-thr-pro-ser-
Citocromo c (humano)	Ac-gly-asp-val-glu-
Ovalbúmina	Ac-gly-ser-gly-ile-ala-
Hemoglobina fetal F ₁ (humano) ⁺¹	Ac-gly-his-phe-
Citocromo c (pollo) ⁺⁶	Ac-gly-asp-ile-
Citocromo c (camello) ⁺⁵	Ac-gly-
Virus del mosaico amarillo del nabo	Ac-met-gln-ile-asp-lys-
Tropomiosina (músculo de conejo) ⁺¹	Ac-met-asp-ile-
Cristalino alfa	Ac-met-asp-ile-ala-
Deshidrogenasa láctica (M ₄) (tiburón pequeño)	Ac-thr-ala-leu-lys-asp-
Fibrinopéptido (bovino) ⁺¹	Ac-thr-glu-phe-
Hemoglobina A ₁ -beta (pollo)	Ac-val-thr-leu-
Actina (músculo de conejo)	Ac-asp-glu-(thr,ala)-
Hialuronidasa	Ac-(tyr,leu,phe,ala,glu)-
(90), (70) ⁺¹ , (58) ⁺² , (91) ⁺³ , (92) ⁺⁴ , (93) ⁺⁵ , (81) ⁺⁶ .	

Es interesante notar que el grupo acetilo N-terminal se encuentra en plantas y animales y que las proteínas acetiladas terminan en glicina, alanina, serina y poco frecuentemente en metionina y otros aminoácidos como: treonina, valina y aspártico.

Mientras que por un lado se llegó a la conclusión de que la función bioquímica del grupo N-acetilo en las proteínas no es significativa, Narita en 1962 (90) propuso la hipótesis de que la síntesis de proteínas en eucariotes es iniciada a partir de un aminoácido acetilado, a diferencia del sistema de procariotes en que la formilación del $\text{ARNt}_{\text{f}}^{\text{Met}}$ parece ser esencial para el proceso de iniciación (84). Esta hipótesis es apoyada por algunos hechos como son la evidencia de la iniciación con acetil-aminoacil-ARNt en sistema libre de células en hígado de rata en el caso de síntesis de histonas; la presencia de una peptidil-ARNt-hidrolasa (95), sugiere que puede haber iniciación tanto con acil-aminoacil-ARNt como con $\text{ARNt}_{\text{f}}^{\text{Met}}$, pudiendo existir dos mecanismos para síntesis de proteínas en eucariotes, y que la selección la efectúa la célula genéticamente.

Por lo que respecta a la frecuencia de acetil-serina como extremo amino de muchas proteínas, se puede considerar que existe literatura en la que se menciona que el N-acetil-seril-ARNt ocurre naturalmente en homogenados de hígado de rata (y en regeneración) y que puede ser formado aún "in vitro" a partir de seril-ARNt y acetil-CoA, uniéndose primero la serina al ARNt y posterior acetilación del complejo. Este N-acetil-seril-ARNt está involucrado en la iniciación de la síntesis de histonas f2a (94).

La existencia de una actividad enzimática de peptidil-ARNt-hidrolasa unida a ribosomas fijos y libres, con amplia actividad hacia 3 de los 4 N-acetil-seril-ARNt de hígado de rata, resolubles mediante cromatografía en fase reversa, hace pensar que al menos una de las 4 entidades mencionadas, podría desempeñar un papel especial en el citoplasma de hígado de rata (95), posiblemente en una forma particular de iniciación de síntesis de proteínas o bien de determinadas proteínas en organismos eucariotes.

En el hígado de ratas estimuladas con el complejo hierro-Dextrán durante 4 horas, posterior perfusión del hígado durante 15 minutos con mezcla de aminoácidos más serina- C^{14} y/o acetato- H^3 de sodio y extracción del ARNt en condiciones óptimas, se ha encontrado una nueva entidad que es el N-acetil-seril-ARNt (96). Por otro lado se ha en-

contrado que la síntesis de apoferritina de hígado de rata es estimulada fácilmente con el mismo complejo y que además se inicia con N-acetil-serina. Si correlacionamos estos dos últimos descubrimientos con el hecho de que el mecanismo de regulación de esta proteína se acerca más al modelo de control postranscripcional, se puede elaborar una hipótesis de que el N-acetil-seril-ARNt desempeña el papel de iniciador en la biosíntesis de esta proteína en particular.

El campo para demostrar el papel biológico del N-acetil-seril-ARNt continúa abierto y un camino a seguir sería la identificación de la peptidil-puromicina N-acetilada aislada de un sistema libre de células, como el descrito por Shafritz (97), quien reporta la identificación de ferritina obtenida en reticulocitos de conejo, dependiente de ARNm aislado de polisomas de hígado, también de conejo.

Con este sistema se podría discriminar entre las posibilidades de acetilación de proteínas que presentan este grupo bloqueador y que a continuación se describen:

a) Que esté involucrado directamente el N-acetil-seril-ARNt, en la iniciación de la síntesis de apoferritina, al igual que el efecto que se le adjudica en la biosíntesis de las histonas reportado por Liew et al. (94).

b) Que no se encuentre involucrado directamente en la iniciación y que la acetilación N-terminal de la apoferritina tenga lugar sobre el ribosoma después de la iniciación de la cadena polipeptídica y antes de la terminación de la misma, como es el ejemplo descrito por Strous (70, 98), para la síntesis de la cristalina alfa. Igualmente, los reportes sobre acetilación de péptidos parecidos a histonas descritos por Pestana, en los que la acetilación N-terminal podría deberse a una actividad de acetil-transferasa unida a ribosomas de hígado de rata, (99).

c) O bien, que en la síntesis de apoferritina exista una transpeptidación en ausencia de ribosomas, como la descrita por Soffer, en la que le adjudica esta propiedad a una enzima (arginil-ARNt-proteína transferasa) soluble, en mamíferos, que cataliza la transferencia de un residuo de arginina del arginil-ARNt a proteínas o péptidos aceptores que cumplan con el requisito de la existencia de un grupo amino-terminal-ácido como es el ácido glutámico o el ácido aspártico (100).

Este mismo autor describe para bacteria, la presencia de una leucil, fenilalanil-ARNt-proteína transferasa, que cataliza la transferencia de estos dos aminoácidos, cargados a sus respectivos ARNt, a proteínas o péptidos que comienzan con residuos básicos, como son arginina, lisina y menos específicamente histidina, (101).

El probar estas hipótesis, cualesquiera que sean los resultados obtenidos, ayudará a desentrañar el significado de la presencia de la entidad N-acetil-seril-ARNt y su posible papel en la iniciación de la síntesis de la apoferritina de hígado de rata y demás proteínas que comienzan con N-acetil-serina.

V

CONCLUSIONES

Hasta la fecha, entre las proteínas cuya función es la de manejar y almacenar el hierro en organismos superiores, la apoferritina de bazo de caballa ha sido la más estudiada en cuanto a su estructura primaria.

La estructura correspondiente a la apoferritina de hígado de rata no ha sido reportada aún y considerando la importancia que tiene esta proteína y las ventajas que presenta la estimulación de su síntesis, la facilidad de su aislamiento y la disponibilidad de este animal común en el laboratorio, se utilizaron las técnicas clásicas ya establecidas para elucidar su estructura primaria en su extremo amino.

1.- Para ello se estimularon ratas con el complejo hierro-Dextrán (Hi-Dex), con el cual se redujo a cero la mortalidad debida a intoxicación por hierro libre, mortalidad que se observó al estimular en un principio con otros complejos comerciales de hierro-Dextrán.

Mediante la estimulación con hierro se obtuvo un rendimiento en el aislamiento de dicha proteína del doble, con

respecto al animal normal.

2.- Para la purificación se siguió el siguiente orden:

- a) Calentamiento del hígado homogeneizado a 70° durante 10 minutos. Eliminación del precipitado por centrifugación.
- b) Ajuste del pH, primero a 4.8 seguido de una centrifugación y posteriormente a 6.5.
- c) Precipitación de la proteína soluble mediante sulfato de amonio al 50%.
- d) Cromatografía en Sephadex G-200.
- e) Reducción a apoferritina mediante hidrosulfito de sodio (ditiotionita) y quelantes como bipyridil y Desferal.

3.- Se determinó el grado de pureza mediante electroforesis de disco en gel de poliacrilamida y se siguió la siguiente secuencia en el análisis de su estructura.

- a) Identificación del aminoácido del extremo NH_2 -terminal por el método de Sanger.
- b) Debido al resultado negativo de esta reacción se investigó un posible bloqueo.
- c) Se determinó la naturaleza del grupo bloqueador por el método de Phillips: hidracinólisis de la proteína total más dinitrofenilación. Mediante este método el grupo bloqueador resultó ser un grupo acetilo.
- d) Se comprobó la naturaleza del grupo bloqueador por un segundo método más sensible, que es la combinación de la hidracinólisis más dansilación posterior.
- e) Se logró la ruptura enzimática de las uniones peptídicas utilizando la mezcla de enzimas denominada Pronasa, con la cual se obtuvieron además de algunos péptidos internos,

el correspondiente al inicial bloqueado de la proteína.

- f) El residuo ácido obtenido con la hidrólisis enzimática anterior, se semipurificó en una columna de Intercambio iónico de Dowex AG50W-X8, H^+ (10.5 x 2 cm).
- g) Se semipurificó aún más este residuo ácido que resultó ser el péptido inicial, (pico I', fig. 12) mediante una segunda cromatografía en Dowex AG2-X8, Cl^- (32 x 0.9 cm) y un gradiente de elución de HCl de 0 a 0.02N.
- h) Se determinó el perfil de elución, mediante lectura de cada fracción eluida de la última columna a 206 nm, resultando este método más efectivo y más limpio que el alterno de determinación colorimétrica con ninhidrina, antes y después de hidrólisis alcalina.

4.- Con el péptido puro, así obtenido, se determinó nuevamente la naturaleza del grupo bloqueador y con carboxipeptidasa A e hidracinólisis se determinó la secuencia del mismo, y que es la siguiente: N-acetil-serina-serina-glutamina-.

5.- Es pertinente hacer la aclaración, que los cálculos efectuados en el transcurso de la experimentación se hicieron en base a 18,500 daltons como peso molecular de la subunidad de apoferritina que consta de 24 subunidades, y considerando homogeneidad de la molécula en tanto no se pruebe categóricamente lo contrario. Al mismo tiempo es necesario hacer notar, que la molécula de apoferritina presenta una estabilidad especial hacia los agentes desnaturizantes, poco usual en las proteínas globulares. El procedimiento de desnaturalización de la apoferritina de hígado de rata, durante nuestra experimentación (precipitación con ácido tricloroacético al 5%, más calentamiento a ebullición, ver Materiales y Métodos), se consideró suficiente aunque no se determinó el porcentaje de desnaturalización.

Aún cuando la apoferritina de bazo de caballo e hígado de rata han sido extensivamente estudiadas en lo que respecta a su estructura cuaternaria, el campo para su estudio permanece aún amplio y los resultados obtenidos en el

transcurso de esta experimentación podrían ayudar a dilucidar algunos aspectos concernientes a la biosíntesis de proteínas como son:

- a) Iniciación de síntesis de proteínas en organismos superiores.
- b) Participación de ciertos N-acetil-aminoacil-ARNt en la iniciación de síntesis de proteína en organismos superiores.
- c) Mediante la determinación de la secuencia total ahondar más en la investigación de la cinética de captación y liberación del hierro.
- d) Confirmación de la hipótesis del mecanismo de control postranscripcional de la biosíntesis de la apoferritina de hígado de rata.
- e) Comparación entre las apoferritinas de otras especies y comprobación de su evolución biológica.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Crichton, R. R. Structure and function of ferritin, *Angew. Chem. Internat. Edit.* 12:57-65 (1973).
- 2.- Crichton, R. R. Ferritin: structure, synthesis and function, *New Eng. J. Med.* 284:1413-1422 (1971).
- 3.- Jacobs, A. and Miller, F. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *British Med. Journal.* 4:206-208 (1972).
- 4.- Siimes, M. A. and Addiego, J. E. Ferritin in serum: diagnosis of iron deficiency and iron overload infants and children. *Blood*, 43:581-590 (1974).
- 5.- Lipschitz, D. A. and Cook, J. D. A clinical evaluation of serum ferritin as index of iron stores. *New Eng. J. Med.* 290:1213-1216 (1974).
- 6.- Drysdale, J. M. Regulation of ferritin synthesis in Regulatory mechanisms for protein synthesis in mammalian cells, San Pietro, A., Lamborg, M. R. (Eds.) 431-465, Academic Press, N. Y. (1968).
- 7.- Crichton, R. R. The biochemistry of ferritin, *Brit. J. Haematol.* 24:677-680 (1973).
- 8.- Fletcher, J. and Huehns, E. R. Function of transferrin, *Nature* 218:1211-1214 (1968).
- 9.- Rigby, P. G. The utilization of iron, *Clinical Toxicology.* 4:559-569 (1971).
- 10.- Whitten, Ch. F. and Brough, A. J. The pathophysiology of acute iron poisoning, *Clinical Toxicology*, 4:585-595 (1971).
- 11.- Witzleben, C. L. and Buck, B. E. Iron overload hepatotoxicity: A postulated pathogenesis. *Clinical Toxicology*, 4:579-583 (1971).
- 12.- Millar, J. A. and Cumming, R. L. C. Effect of actinomycin D, Cycloheximide and acute blood loss on ferritin synthesis in rat liver, *Biochem. J.* 119:643-649 (1970).

- 13.- Redman, C. M. Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver, J. Biol. Chem. 244:4308-4315 (1969).
- 14.- Konijn, A. M. and Baliga, B. S. Synthesis of liver ferritin on free and membrane-bound polyribosomes of different sizes, FEBS Letters 37:249-252 (1973).
- 15.- Marsden, R. J. and Ducker, H. A. Immunological studies on the organ and species, specificity of ferritin from horse, rabbit and pig, Comp. Biochem. Physiol. 43B:217-221 (1972).
- 16.- Yu, F. L. and Fineberg, R. A. Biosynthesis of ferritin by liver slices, J. Biol. Chem. 240:2083-2087 (1965).
- 17.- Fineberg, R. A. and Greenberg, D. M. Ferritin biosynthesis. III. Apoferritin, the initial product, J. Biol. Chem. 214:107-113 (1955).
- 18.- Lee, J. C. K. and Richter, G. W. Ferritin from different organs of man, rat, rabbit and pig. Comp. Biochem. Physiol. 39B:325-333 (1971).
- 19.- Alfrey, C. P. and Lynch, E. C. Characteristics of ferritin isolated from human marrow, spleen, liver and reticulocytes, J. lab. clin. Med. 70:419-428 (1967).
- 20.- Gabuzda, T. G. and Pearson, J. Two molecular forms of ferritin in rabbit marrow, Nature 220:1234-1235 (1968).
- 21.- Gabuzda, T. G. and Pearson, J. Metabolic and molecular heterogeneity of marrow ferritin, Biochim. Biophys. Acta 194:50-54 (1969).
- 22.- Gabuzda, T. G. and Gardner, F. H. Observations on Fe⁵⁹ labeled bone marrow ferritin, Blood 29:770-779 (1967).
- 23.- Linder-Horowitz, M. Iron induction of electrophoretically different ferritins in rat liver, heart and kidney, Biochim. Biophys. Acta, 200:442-448 (1970).
- 24.- Richter, G. W. Comparison of ferritins from neoplastic and non-neoplastic human cells, Nature 207:616-618 (1965).
- 25.- Urushizaki, I. and Niitsu, Y. Microheterogeneity of horse spleen ferritin and apoferritin, Biochim. Biophys. Acta 243:187-192 (1971).

- 26.- Urusnizaki, I. and Ishitani, K. Micronheterogeneity of rat liver ferritin comparison of electrofocusing and chromatographic fractions, *Biochim. Biophys. Acta* **328**: 95-110 (1973).
- 27.- Niitsu, Y. and Ishitani, K. Subunit heterogeneity in ferritin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **55**:1134-1140 (1973).
- 28.- Crichton, R. R. Studies on the structure of ferritin and apoferritin from horse spleen. II. Chymotrypsin, subtilisin, cathepsin D and pepsin digestion of ferritin and apoferritin, *Biochim. Biophys. Acta* **229**:75-82 (1971).
- 29.- Bryce, Ch. F. A. and Crichton, R. R. The subunit structure of horse spleen apoferritin. I.- The molecular weight of the subunit, *J. Biol. Chem.* **246**:4198-4205 (1971).
- 30.- Suran, A. A. N-terminal sequence of horse spleen apoferritin, *Arch. Biochem. Biophys.* **113**:1-4 (1966).
- 31.- Crichton, R. R. and Millar, J. A. The organ-specificity of ferritin in human and horse liver and spleen, *Biochem. J.* **131**:51-59 (1973).
- 32.- Mainwaring, W. I. P. and Hofmann, T. Horse spleen apoferritin: N-terminal and C-terminal residues, *Arch. Biochem. Biophys.* **125**:975-980 (1968).
- 33.- Williams, D. R. Metal ions in vivo. Iron in the metals of life, 15, Van Nostrand, Reinhold, London (1971).
- 34.- Forth, W. and Rummel, W. Iron absorption, *Physiol. Rev.* **53**: 724-792 (1973).
- 35.- Crichton, R. R. A role for ferritin in the regulation of iron metabolism, *FEBS Letters* **34**:125-128 (1973).
- 36.- Yoshino, Y. and Manis, J. Actinomycin D and the regulation of apoferritin synthesis in rat liver, *Nature* **210**:538-539 (1966).
- 37.- Yoshino, Y. and Manis, J. Regulation of ferritin synthesis in rat liver, *J. Biol. Chem.* **243**:2911-2917 (1968).
- 38.- Saddi, R. and Von der Decken, A. The effect of iron adminis-

tration on the incorporation of L-leucine into ferritin by rat liver system. *Biochim. Biophys. Acta* 111:124-133 (1965).

- 39.- Drysdale, J. W. and Munro, H. N. Regulation of synthesis and turnover of ferritin in rat liver, *J. Biol. Chem.* 241: 3630-3637 (1966).
- 40.- Chu, L. L. H. and Fineberg, R. A. On the mechanism of iron-induced synthesis of apoferritin in Hela cells, *J. Biol. Chem.* 244:3847-3854 (1969).
- 41.- Revel, M. and Hiatt, H. H. The stability of liver messenger RNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 51:810-818 (1964).
- 42.- Vassart, G. and Dumont, J. E. Translational control of protein synthesis a simulation study, *Biochim. Biophys. Acta* 247:471-485 (1971).
- 43.- Narita, K. Isolation of acetylseryltyrosine from the chymotryptic digests of protein of five strains of tobacco mosaic virus, *Biochim. Biophys. Acta* 30:352-359 (1958).
- 44.- Vogel, A. I. Elementary practical organic chemistry, pag. 433 Longmans (1951).
- 45.- Narita, K. End group determination in Protein sequence determination, Needleman, S. B. (Ed.) 8:88, Springer-Verlag, Berlin (1970).
- 46.- Phillips, D. M. A micromethod for the determination of N- and O-acetyl groups, *Biochem. J.* 86:397-401 (1963).
- 47.- Deaborn, Stekol, (U.S.). L-pyroglutamic acid in The Merck Index, Stecher, P. G. (Ed.) pag. 895 Merck & Co. Inc., Rahway, N. J. U.S.A. (1968).
- 48.- Schmer, G. and Kreil, G. Micromethod for detection of formyl and acetyl groups in proteins, *Anal. Biochem.* 29:186-192 (1969).
- 49.- Kasper, Ch. B. Fragmentation of proteins for sequence studies and separation of peptide mixtures, in Protein sequence determination, Needleman, S. B. (Ed.) 8:167 y 172, Springer Verlag, Berlin (1970).
- 50.- Drysdale, J. W. and Munro, H. N. Small-scale isolation of fe-

- ferritin for the assay of the incorporation of C^{14} -labelled amino acids, *Biochem. J.* 95:851-858 (1965).
- 51.- Campbell, P. N. and Sargent, J. R. (Eds.) Estimation of total protein by the method of Lowry et al. (1951) in *Techniques in protein biosynthesis* 1:299-300, Academic Press, London (1967).
 - 52.- Davis, B.J. Part II.- Disc electrophoresis-II, Method and application to human serum proteins, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121:404-427 (1964).
 - 53.- Pape, L. and Multani, J. S. In vitro reconstitution of ferritin, *Biochemistry* 7:606-612 (1968).
 - 54.- Granick, S. Ferritin. I.- Physical and chemical properties of horse spleen ferritin, *J. Biol. Chem.* 146:451-461 (1942).
 - 55.- Granick, S. and Michaelis, L. Ferritin. II.- Apoferritin of horse spleen, *J. Biol. Chem.* 147:91-97 (1943).
 - 56.- Fraenkel-Conrat, H. and Harris, J. I. Recent developments in techniques for terminal and sequence studies in peptides and proteins in *Methods of biochemical analysis*, Glick, D. (Ed.) 2:359-426, Interscience Publishers, Inc. New York (1955).
 - 57.- Kasper, Ch. B. Fragmentation of protein for sequence studies and separation of peptide mixtures in *Protein sequence determination*, Needleman, S. B. (Ed.) 8:152 Springer-Verlag, Berlin (1970).
 - 58.- Marriq, C. and Luccioni, F. Sur les anhydrases carboniques erythrocytaires VII.-Caractérisation d'un résidu D'acétyl-sérine N-terminal dans les anhydrases carboniques C humaine et B bovine, *Bulletin de la société de Chimie Biologique* 52:253-267 (1970).
 - 59.- Yoshida, A. Micromethod for determination of blocked NH_2 -terminal amino acids of protein: Application to identification of acetyl serine of phosphoglycerate kinase and pyroglutamic acid of glucose 6-phosphate dehydrogenase, *Anal. Biochem.* 49:320-325 (1972).
 - 60.- Dowex: Ion exchange, The Dow Chemical Company (Ed.), Laboratory guide, pag. 58, Midland, Michigan (1964).

- 61.- Hirs, C. H. W. and Moore, S. Peptides obtained by tryptic hydrolysis of performic acid-oxidized ribonuclease, J. Biol. Chem. 2:623-641 (1956).
- 62.- Rosen, H. Colorimetric methods in Chemistry of amino acids, Greenstein, J. P. and Winitz, M. (Eds.) 2:1309-1310, John Wiley & sons. Inc., New York (1961).
- 63.- Eveleigh, J. W. and Winter, G. D. Amino acid composition determination in Protein sequence determination, Needleman, S. B. (Ed.) 2:92-95, Springer-Verlag, Berlin (1970).
- 64.- Akabori, S. and Ohno, K. On the hydrazinolysis of proteins and peptides: A method for the characterization of carboxyl-terminal amino acids in proteins, Bull. Chem. Soc. Japan 25:214-218 (1952).
- 65.- Folk, J. E. and Schirmer, E. W. The porcine pancreatic carboxipeptidase A system, J. Biol. Chem. 238:3884-3894 (1963).
- 66.- Björn, W. Primary structure of peptides released during activation of human plasminogen by urokinase, Eur. J. Biochem. 39:1-9 (1973).
- 67.- Gros, C. and Labousse, B. Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins, Eur. J. Biochem. 7:463-470 (1969).
- 68.- Michaelis, L. Ferritin and apoferritin in Advances of protein chemistry, Anson, M. L. and Edsall, J. T. (Eds.) III: 53-66 Academic Press Inc. Publishers, New York (1947).
- 69.- Suran, A. and Tarver, H. Heterogeneity of horse spleen ferritin and apoferritin: Comparison of electrophoretic and chromatographic fractions, Arch. Biochem. Biophys. 111:399-406 (1965).
- 70.- Strous, J. A. M. and van Westreenen, H. Synthesis of lens protein in vitro N-terminal acetylation of alpha-crystallin, Eur. J. Biochem. 38:79-85 (1973).
- 71.- Narita, K. N-terminal group of ovalbumin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 5:160-164 (1965).
- 72.- Spackman, D. H. and Stein, W. H. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, Anal. Chem. 30:1190-1206 (1958).

- 73.- Smyth, D. G. and Stein, W. H. The sequence of amino acids residues in bovine pancreatic ribonuclease: Revisions and confirmations, *J. Biol. Chem.* 238:227-234 (1963).
- 74.- Vickery, H. B. and Pucher, G. W. Glutamic acid and glutamine in *Chemistry of the amino acids*, Greenstein, J. P. and Winitz, M. (Eds.) 3:1935, John Wiley & Sons, Inc. New York (1961).
- 75.- Ambler, R. P. Enzymatic hydrolysis with carboxipeptidases in *Methods in enzymology*, Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N. (Eds.) XXV:143-154, Academic Press, New York (1972).
- 76.- Fineberg, R. A. and Greenberg, D. M. Ferritin biosynthesis I.-Crystallization of guinea pig ferritin, *J. Biol. Chem.* 214:91-96 (1955).
- 77.- Rodríguez, y G. G. (Tesis Recepcional). Aislamiento, purificación y caracterización de la albúmina sérica de rata. Universidad Iberoamericana, (1974).
- 78.- Narita, K. End group determination in Protein sequence determination, Needleman, S. B. (Ed.) 8:85, Springer-Verlag, Berlin (1970).
- 79.- Hill, R. L. Hydrolysis of proteins in *Advances in protein chemistry*, Anfinsen, C. B. and Anson, M. L. (Eds.) 20:37-107, Academic Press, New York (1965).
- 80.- Ishitani, K. and Niitsu, Y. Subunit structure and heterogeneity of ferritin, *Fed. Proc.* 33:1478 (1974).
- 81.- Dayhoff, M. O. and Eck, R. V. (Eds.) Cytochrome c in *Atlas of protein sequence and structure 1967-68*, pag. 85-92 National Biomedical Research Foundation, McGreggor & Werner, Inc. U. S. A.
- 82.- Drysdale, J. W. and Munro, H. N. Failure of actinomycin D to prevent induction of liver apoferritin after iron administration, *Biochim. Biophys. Acta* 103:185-188 (1965).
- 83.- Munro, H. N. and Drysdale, J. W. Role of iron in the regulation of ferritin metabolism, *Fed. Proc.* 29:1469-1473 (1970).

- 84.- Lucas-Lenard, J. and Lipmann, F. Protein biosynthesis in the Ann Rev. Biochem. Snell, E. E. (Ed.) 40:409-448, Annual Reviews, Inc. California (1971).
- 85.- Bianchetti, R. and Luchini, G. Endogenous synthesis of formyl-methionine peptides in isolated mitochondria and chloroplasts, Biochem. Biophys. Res. Commun. 42:97-102 (1971).
- 86.- Lucchini, G. and Bianchetti, R. Puromycin dependent formation of initial peptides as a method to measure the initiation, Biochem. Biophys. Res. Commun. 51:144-150 (1973).
- 87.- Haselkorn, R. and Rothman-Denes, L. B. Protein synthesis in the Ann Rev. Biochem. Snell, E. E. (Ed.) 42:397-438, Annual Reviews, Inc. California (1973).
- 88.- Wilson, D. B. and Dintzis, H. M. Protein chain initiation in rabbit reticulocytes, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66: 1282-1289 (1970).
- 89.- Jackson, R. and Hunter, T. Role of methionine in the initiation of haemoglobin synthesis, Nature 227:672-676 (1970).
- 90.- Narita, K. The N-terminal acetyl group of proteins and its possible implications for protein biosynthesis, in Proteins, structure and function, Funatsu, M. et al., (Eds.) 2:227-259, Kodansha, Ltd. Tokyo (1972).
- 91.- Nakamura, S. and Iwanaga, S. Amino acid sequence of the peptide released from bovine factor XIII following activation by thrombin, Biochem. Biophys. Res. Commun. 56: 250-256 (1974).
- 92.- Jörnvall, H. An acetylated N-terminus of adenovirus type 2 hexon protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 56:304-310 (1974).
- 93.- Sokolovsky, M. and Moldovan, M. Primary structure of cytochrome c from Camel (Camelus dromedarius), Biochemistry 11:145-149 (1972).
- 94.- Liew, C. C. and Haslett, G. W. N-acetyl-seryl-tRNA and polypeptide chain initiation during histone biosynthesis, Nature 226:414-417 (1970).

- 95.- Menninger, J. R. and Deery, S. The metabolic role of peptidyl-tRNA hidrolase II.-Peptidyl-tRNA hydrolase activity on washed rat liver ribosomes, *Biochim. Biophys. Acta*, 335:185-195 (1974).
- 96.- Rodríguez, J. M. et al. Modificaciones en la población de ácidos nucleicos de transferencia del hígado de rata relacionados con la inducción de la síntesis de la apo-ferritina. IX Reunión Anual de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. Noviembre 1-4, 1972; Hotel Real de Minas, Guanajuato, Gto. México.
- 97.- Shafritz, D. A. and Drysdale, J. W. Translation of liver messenger ribonucleic acid in a messenger dependent reticulocyte cell-free system. Properties of the system and identification of ferritin in the product, *J. Biol. Chem.* 248:3220-3227 (1973).
- 98.- Strous, G. J. A. M. and Berns, A. J. M. N-terminal acetylation of the nascent chains of alfa-crystallin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58:876-884 (1974).
- 99.- Pestana, A. and Pitot, H. V. N-terminal acetylation of histone-like nascent peptides on rat liver polyribosomes, in vitro, *Nature* 247:200-202 (1974).
- 100.- Soffer, R. L. Peptide acceptors in the arginine transfer reaction, *J. Biol. Chem.* 248:2918-2921 (1973).
- 101.- Soffer, R. L. Peptide acceptors in the leucine, phenylalanine transfer reaction, *J. Biol. Chem.* 248:8424-8428 (1973).