

Tesis de Posgrado

Estudios preliminares sobre la secuencia de los aminoácidos en el citocromo c de corazón de caballo

Schejter, Abel

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Schejter, Abel. (1957). Estudios preliminares sobre la secuencia de los aminoácidos en el citocromo c de corazón de caballo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0933_Schejter.pdf

Cita tipo Chicago:

Schejter, Abel. "Estudios preliminares sobre la secuencia de los aminoácidos en el citocromo c de corazón de caballo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0933_Schejter.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

1. 19.3

FCEN-BA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Estudios preliminares sobre la secuencia de los aminoácidos
en el citocromo c de músculo de corazón de caballo.
(Resumen)

Tesis de Abel Schejter

1957

Rev. de Tesis? 933

933

CONCLUSIÓN

En la primera parte se exponen brevemente los antecedentes del descubrimiento y primeros estudios sobre el citocromo c, y se resume el estado actual de los conocimientos acerca de su estructura.

En la parte experimental se da cuenta de los trabajos realizados, cuyo resumen es el siguiente:

1) Se obtuvo citocromo c a partir de músculo de corazón de caballo por el método clásico. La preparación obtenida se liofilizó y se purificó por cromatografía sobre columna de Amberlite IRC-50, resina de intercambio catiónico; se obtuvieron varias fracciones, empleándose para los estudios realizados la primera de ellas según el orden de elución.

2) Se llevó a cabo la hidrólisis con tripsina, en razón de los datos conocidos acerca de su especificidad con respecto a los carboxilos de lisina y arginina. Los productos de la hidrólisis fueron separados por electroforesis sobre papel de filtro a pH 6,5. Sobre los electroforetogramas se ejecutaron reacciones de péptidos en general y reacciones específicas de arginina, histidina, tirosina y triptofano. Los péptidos obtenidos fueron separados nuevamente por cromatografía bidimensional sobre papel; una vez eluidos se los sometió a la hidrólisis en medio ácido. Los productos de la hidrólisis total fueron cromatografiados bidimensionalmente sobre papel e identificados los aminoácidos componentes. Una fracción electroforética denominada neutra fué dejada para un trabajo posterior.

3) El número total de péptidos obtenido sobrepasa al que hubiera podido esperarse de la especificidad de la tripsina, teniendo en cuenta análisis sobre número total de aminoácidos en el citocromo c. Lo mismo ocurre para gran parte de los aminoácidos. Se sometió luego la mezcla de péptidos que se obtiene de la hidrólisis tripsínica a la separación por cromatografía sobre columna de Dowex-50, resina de intercambiador catiónico, mediante una elución en gradiente continuo del pH. Se obtuvo de este modo una curva en la cual hay 17 picos. En el mismo laboratorio se hallan en progreso actualmente análisis de estructura de estos péptidos (Feitelson, Margoliash y Frowirth, comunicación personal).

4) De los resultados obtenidos por la separación electroforética y cromatográfica sobre papel puede extraerse la conclusión de que en el citocromo

UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA SECUENCIA DE LOS
AMINOACIDOS EN EL CITOCROMO C DE CORAZON DE CABALLO

TESIS

DE

ABEL SCHEJTER

1957

TESIS 933

S

933

A MIS PADRES

Los trabajos que a continuación se presentan fueron ejecutados en los laboratorios del Departamento de investigación del Cáncer, Escuela de Medicina "Hadassah", Universidad Hebrea de Jerusalem, Israel, bajo la supervisión de su Director, el Dr. Emanuel Margoliash.

Deseo expresar ante todo mi agradecimiento a las autoridades de la Fundación Ketty Mirelman, Editorial Israel, Buenos Aires, que al honrarme con la beca "Ketty Mirelman" para los años 1954-55 y 1955-56 me permitieron efectuar estas investigaciones. Asimismo quiero agradecer en especial al Dr. José Mirelman, cuyo trato paternal durante mi estadía en Israel me sirvió de gran estímulo para la realización de mi trabajo.

Quiero manifestar mi profundo reconocimiento al Dr. Emanuel Margoliash, maestro cabal que me guió con sus enseñanzas durante mi permanencia en su Departamento, y a los restantes miembros de éste y otros institutos y cátedras de la Universidad Hebrea cuyo compañerismo y buena voluntad pude comprobar en todo momento.

Agradezco asimismo al Profesor Jorge Mendive por las sugerencias que me hiciera para la redacción y presentación de esta tesis.

INTRODUCCION

En los años 1886 y 1887, Mac Munn describió un grupo de pigmentos celulares a los que llamó histohematinas; pero recién en 1925, Keilin retomó el tema al observar, por medio de un microespectroscopio, la presencia de bandas de absorción comunes a células de animales y plantas superiores. Keilin demostró que efectivamente existen pigmentos celulares caracterizados por dichas bandas a los cuales denominó citocromos. Uno de ellos presenta máximos de absorción en 550 $m\mu$. (banda α) y en 520 $m\mu$. (banda β), además de un máximo en 400 $m\mu$. (banda de Soret) característico del anillo tetrapirrólico: este pigmento es el llamado citocromo c.

Se demostró mas tarde (Keilin, 1930) que el citocromo c. puede ser extraído de células de levadura, obteniéndose una solución límpida de color rojo oscuro, y fué comprobada su presencia en gran número de organismos aeróbicos. Se observó, además, la presencia de una porfirina en la molécula (Hill y Keilin, 1930). En 1935 Theorell publicó un método de preparación, mediante el cual obtuvo una proteína de reacción altamente básica unida a una porfirina, y demostró la presencia de hierro en la molécula)

A partir de ese entonces, el estudio de la estructura química de este importante pigmento respiratorio puede dividirse en los siguientes capítulos:

- a) Purificación del citocromo C.
- b) Determinación de la estructura de la porfirina y del modo de unión de éste a la porción proteica de la molécula.
- c) Análisis cuantitativo de los aminoácidos presentes en la molécula proteica.
- d) Determinación de los uniones hierro-proteína que dan origen al hemocromógeno.
- e) Estudio de la estructura estereoquímica.
- f) Determinación de la secuencia de los aminoácidos presentes en la molécula.

PURIFICACION DEL CITOCROMO C.

El método de preparación de Theorell (1936) permite la obtención de un polvo rojo cuyo contenido en hierro es de 0.34%. Un preparado con la misma proporción de hierro fue logrado mediante la extracción, a partir de un homogenizado de músculo cardíaco, con ácido tricloroacético 0.145 N, precipitación de impurezas con sulfato de amonio a pH neutro y precipitación final del citocromo con ácido tricloroacético al 20% (Kellin y Hartree, 1937).

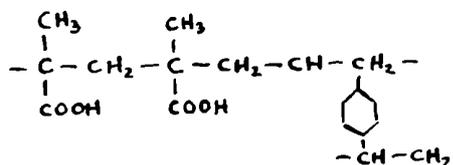
La electroforesis de este preparado en el aparato de Tiselius puso en evidencia (Theorell y Akesson, 1939) que el mismo no era homogéneo. Empleando un aparato apto para el trabajo en mayor escala, éstos mismos autores lograron obtener -

(Theorell y Akesson, 1941) a partir de citocromo c con 0,34% de hierro un preparado que contiene 0,43% del metal, trabajando con solución Buffer de fosfato de sodio a pH 7,82. Este producto es homogéneo a la electroforesis, pero el método resulta sumamente largo para la obtención de cantidades adecuadas para el estudio de la estructura química.

Se persistió en la búsqueda de un proceso de purificación más sencillo y de mayor rendimiento; así se logró preparar citocromo c con 0,43% de hierro por medio de precipitación a pH 10 con sulfato de amonio saturado (Keilin y Hartree, 1945) o bien precipitando con cloroformo hirviendo (Tson, 1951). - También fue empleada la electroforesis sobre papel (Palau, 1952)

Actualmente se prefieren los métodos de absorción en resinas de intercambiadores catiónicos. En 1950 se introdujo el uso de la Amberlite IRC50. Esta es una resina poliacarboxilica, que presenta la siguiente estructura:

(Campbell y Work, 1954)*



Palau y Meilands(1950) absorbieron el citocromo C en una columna de la mencionada resina trabajando a pH 9; en primer lugar notaron que una fracción dorada que no contiene citocromo c era eluida rápidamente, y que al aumentar el pH de la solución eluyente se obtenían gradualmente una fracción

de citocromo c reducido, y luego otra de la enzima oxidada.

Heilands (1952) trabajó a pH 7 empleando como eluyente solución saturada de acetato de amonio. Margolish (1952) comprobó cualitativamente que cualquier catión puede ser usado indiferentemente para la elución, fenómeno corroborado en forma cuantitativa por Boardman y Partridge (1953). Un método de absorción en una sola operación fue publicado por Margolish (1954) quien analizó también las fracciones que aparecen en el proceso cromatográfico (Margolish, 1954).

El empleo de las resinas de intercambio catiónico se ha generalizado en los últimos años, y resulta muy útil en el caso de proteínas de bajo peso molecular, como la ribonucleasa (Hirs, Moore y Stein, 1953). En el caso del citocromo C, cuyo peso molecular oscila entre 12.000 y 13.000 (Heilands, 1952), y cuyo punto isoeléctrico es marcadamente alto, 10,65 (Tint y Weiss, 1950), el intercambio catiónico se halla facilitado por el elevado número de lisinas presentes en la molécula proteica (Ehrenberg y Theorell, 1955). - No ocurre lo mismo con la impureza que presentan las preparaciones con 0,34 % de hierro, que consiste en globina derivada de mioglobina (Margolish, 1954), la que no es retenida por la columna.

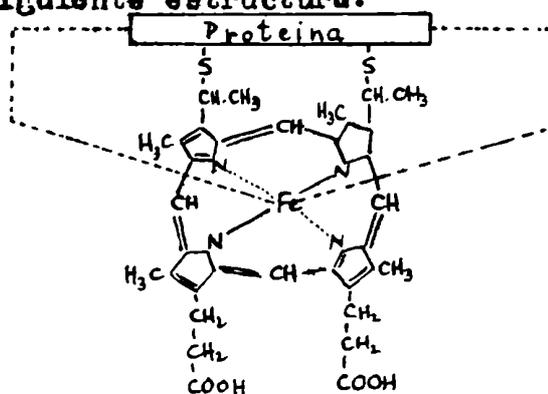
Debe hacerse notar, sin embargo, que el citocromo c no se comporta en la columna de igual modo que la resina (Boardman y Partridge, 1955), puesto que al disminuir el pH, mientras que el volumen de elución para el aminocíto tiende a cero

luego de pasar por un máximo, para el citocromo e dicho volumen de elución tiende a infinito, no pudiendo ser eluido por debajo de pH 6. Cualquiera sea la solución eluyente, la primera fracción que se obtiene consiste en citocromo e reducido: es interesante hacer notar al respecto que Zeile y Reuter (1933) observaron que el citocromo e reducido se absorbe en caolín, mientras que el citocromo e oxidado no lo hace.

En el curso de este trabajo se empleó para la preparación de citocromo e de músculo de corazón de caballo el método de Keilin y Hartree (1937) y se lo purificó, para obtener un preparado con 0,43 % de hierro, por el método cromatográfico de Margolinsh (1954). Los detalles se dan más abajo.

ESTRUCTURA DE LA PORFIRINA

Los primeros estudios sobre la porfirina del citocromo e fueron llevados a cabo por Hill y Keilin (1930). Por medio de medidas polarográficas, Theorell (1939) demostró que en el citocromo e no existen uniones -S-S- ni grupos /-SH, lo que lo llevó a sugerir que el enlace proteína-porfirina consiste en uniones del tipo tioéster, postulando para la molécula la siguiente estructura:



Mediante el uso de sales de plata, Paul (1950) logró separar el grupo prostético de la proteína; asimismo se comprobó que las cadenas laterales 2 y 4 de la porfirina del citocromo c son grupos α -hidroxistilo, y que los dos residuos de cisteína en la enzima se hallan unidos a los átomos de carbono en posición α de dichas cadenas laterales 2 y 4, (Paul, 1951, 1951b), lo que confirma la fórmula propuesta por Theorell y explica asimismo la conocida estabilidad de la molécula de citocromo c.

ANÁLISIS CUANTITATIVO DE LOS
AMINOÁCIDOS

Los datos más completos sobre la composición de la parte proteica del citocromo c han sido publicados por Ehrenberg y Theorell (1955), quienes analizaron con el método de Moore y Stein (1949) una preparación obtenida de músculo de corazón de bovino. Se dan a continuación:

<u>AMINOACIDO</u>	<u>NUMERO DE RESIDUOS POR MOLECULA DE</u> <u>CITOCROMO C. -</u>
Aspartico	9,4
Serina y/o Treonina	8,5
Glutámico	11,9
Glicina	16,6
Ajanina	6,6
Valina	3,3
Proline	3,9
Isoleucina	6,2
Leucina	6,2
Tirosina	3,8
Lisina	18,3
Histidina	3,1
Arginina	3,4
Fenil alanina	3,3
Metionina	2
Cisteina	2
Triptofano.	1

Esto hace un total de aproximadamente 108 aminoácidos en la molécula, para un peso molecular que oscila alrededor de - 13.000.

El número de metioninas y cisteínas que aparece en la tabla anterior fué determinado para el citocromo c de corazón de bovino por Palens (1955) quien determinó la metionina por el método de Baernstein (1936) y empleó para el azufre total tres métodos cuantitativos diferentes (Josephson, 1939; Zimmermann, 1950 y Kirsten, 1953) en razón de las discrepancias con trabajos anteriores que daban como resultado seis átomos de azufre por molécula (Theorell y Akesson, 1941a).

Debe hacerse notar que se han comprobado diferencias de composición del citocromo c en diversas especies. Palens (1954) comprobó que el número de aminoácidos varía en el pollo, el salmón y el buey. Por un método microbiológico halló que mientras que en el pollo y el buey hay tres histidinas presentes por molécula, en el salmón hay solamente dos. En el caso del caballo, Margolish (1955), encontró cuatro histidinas por molécula por un método colorimétrico (Macpherson, 1942).

SOBRE LA FORMACION DEL HEMOCROMÓGENO

Como consecuencia de experiencias de titulación espectrofotométrica, se suryiró (Theorell y Akesson, 1941b) que dos grupos imidazólicos de histidina se encuentran ligados al hierro en el citocromo c para formar el hemocromógeno. (Paul (1951a) comparando los resultados de titular citocromo c por un lado y la porción proteica de la molécula por el otro, sólo pudo constatar que una histidina interviene en la formación

del hemocromógeno, mientras que el segundo grupo puede ser tanto unimidazol como un carboxilo.

Paleus, Ehrenberg y Tuppy (1955) efectuaron medidas de titulación, espectrofotometría y susceptibilidad magnética sobre un péptido unido a la porfirina que se obtienen cuando se trata el citocromo c con pepsina (Tsou, 1949), llegando a la conclusión de que el hemocromógeno de dicho producto se halla formado por un grupo imidazólico de histidina y un grupo α -amino de valina o ϵ -amino de lisina, Margolish- (- 1955) sugiere asimismo que en el citocromo c uno de los grupos formadores del hemocromógeno no es imidazol de histidina, basándose en la reacción del citocromo c con 1-Fluoro-2-4-dinitrobenceno.

Recientemente (Ehrenberg y Theorell, 1955) se ha vuelto a formular la hipótesis de que el hierro se halla ligado a dos imidazoles, mientras que por otra parte se sostiene (Margolish, Frohwirt y Weiner, comunicación personal) que los grupos responsables de la formación del hemocromógeno son un imidazol de histidina y un ϵ -amino de lisina.

ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA ESTEREOQUÍMICA

Conocida la secuencia de los aminoácidos más cercanos a la porfirina (ver más abajo) Ehrenberg y Theorell (1955) construyeron un modelo atómico de dicho péptido, hallando que era compatible con los resultados experimentales una es-

estructura en forma de hélice de tipo α (Pauling, 1953), siempre que se suponga que en dicho péptido una de las valencias del hierro se halla ocupada por un grupo imidazólico y la otra está libre. En razón del bajo valor hallado experimentalmente - para el volumen específico molar (Therrell, 1936) los autores citados sugieren que el grupo hemo se halla ubicado en el interior de la molécula, de tal modo que no contribuye prácticamente al volumen de ésta.

En cuanto se refiere a la estructura total de la molécula, Arndt y Wiley (1955) observaron que existen en ella hélices del tipo α por medio de difracción de rayos X.

Otro modelo atómico del péptido en cuestión ha sido construido por Margolish, Frowirth, y Weiner (comunicación personal); en el mismo un grupo imidazol y un grupo ϵ -amino de lisina, se hallan ligados al átomo de hierro, requiriéndose para ello, una cadena peptídica totalmente extendida.

LA SECUENCIA DE LOS AMINOACIDOS EN EL CITOCROMO

C₂

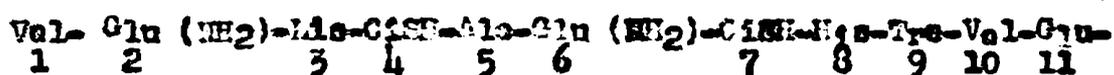
Cuando se trata el citocromo e con enzimas proteolíticas, como pepsina o tripsina, en cualquiera de dichos casos se obtiene un péptido al cual permanece ligada la porfirina, a través de las uniones tióter (Tsu, 1951).

La secuencia de aminoácidos ha sido establecida en ambos péptidos, siguiendo los métodos generales de Sanger (Sanger, -

1949b). En el péptido resultante de hidrolizado con tripsina a partir del citocromo c de corazón de caballo, buey y cerdo, se observa la siguiente secuencia (Tuppy y Dodo, 1954 a, b).



El péptido que se obtiene como consecuencia del hidrolizado con pepsina, con material proveniente de buey y salmón, muestra la secuencia siguiente: (Tuppy y Palens, 1955).



Los mismos autores comprobaron que en el caso del pollo la alanina en la posición 5 se halla sustituida por serina. Además, los dos residuos de cisteína en posiciones 4 y 7 se hallan unidos a la porfirina, de la cual pueden ser separados por la acción de los sales de plata (Pohl, 1950) o mediante la acción del ácido perbórico (Sanger, 1949a).

Tanto los problemas de estructura estereoquímica como la elucidación final de la estructura del hemocromógeno y la relación que las propiedades estructurales puedan tener con la actividad enzimática del citocromo c, requieren el conocimiento de la secuencia de los aminoácidos a lo largo de toda la cadena proteica. Con tal objeto, se ha iniciado un estudio de la misma.

En este trabajo se ha intentado aplicar el método de de-

(4) Esta secuencia fué también hallada en el citocromo c de caballo (Margoliash, Frowirth y Weiner, comunicación personal)

gradación sucesiva, aplicando a proteínas, a partir del aminoácido nitrógeno-terminal (Frankel-Conrat, 1954a). Además se ha intentado obtener una división de la molécula en péptidos cuyos aminoácidos carboxilo-terminales sean lisina o arginina por medio de la hidrólisis con tripsina, sobre la base de la especificidad de acción proteolítica de esta última (Bergmann y Fruton, 1941).

Los péptidos, así obtenidos han sido sujetos a diferentes métodos de separación y sobre ellos se han realizado estudios de estructura.

PARTE EXPERIMENTAL

PREPARACION Y PURIFICACION DEL CITOCROMO C

El citocromo c conteniendo 0,34% de hierro fue preparado de acuerdo con las indicaciones de Hillin y Hartree (1937 y 1945). El proceso es el siguiente: Se elimina toda la sangre y los restos de tejido graso y tejido conectivo del corazón de caballo. La porción muscular se desmenuza hasta obtener una pasta, a la que se agrega ácido tricloroacético 0,145 N en la proporción de un litro por kilogramo de músculo. Luego de mezclar se deja reposar durante cuatro horas y se prensa el material. El líquido obtenido se lleva a pH 7,3 con HONa al 10%. Se agrega sulfato de amonio en la proporción de 500 gramos por litro, y una vez disuelto éste se deja filtrar durante la noche a través de pe-

pejes de filtro grandes plegados. Al filtrado, que contiene el citocromo c acompañado de diversas impurezas, se lo vuelve a tratar durante 2½ horas con sulfato de amonio, agregando esta vez 50 gramos por litro. Todo el precipitado que se forma se elimina y sobre el filtrado se precipita el citocromo c mediante el agregado de ácido tricloroacético al 20% a razón de 25 ml. por litro de solución. Después de centrifugar, se suspende el citocromo c en la cantidad mínima necesaria de agua destilada, se lo coloca en un tubo de celofán y se dializa contra una solución de ClNa al 0,5% hasta eliminar el sulfato de amonio. Se agregan unas gotas de cloroformo, se agita y se filtra obteniéndose así una solución de citocromo c al 1% aproximadamente. Esta última es liofilizada, obteniéndose un polvo rojo, sumamente soluble en agua, que contiene 0,34 % de hierro.

El material así obtenido fue purificado por cromatografía sobre la resina de intercambio catiónico Amberlite IRC-50, fabricada por la casa Rohm and Haas Co., Filadelfia. La resina fue preparada de acuerdo con las siguientes indicaciones (Margolish, 1954a): el material proporcionado comercialmente se calienta hasta 80% con un exceso de $\text{HCl } 2\text{N}$, se lava con agua y se vuelve a calentar con un exceso de $\text{HONH}_2 \text{ } 2\text{N}$, y vuelve a lavarse finalmente con agua. Unos 50 gramos de la resina humedecida son trabajados en un mortero o tratados en un licuador hasta obtener una pasta: se los agita luego con 300 ml de agua y se deja reposar durante 15 segundos, decantándose de

inmediato. La fracción remanente en el fondo del vaso vuelve a ser molido, repitiéndose el proceso de molienda y decantación hasta que prácticamente ha sido decantada toda la resina. Se vuelve a calentar el polvo decantado con exceso de $\text{HONH}_4\text{ 2H}$. Se agita, se suspende el polvo en un litro de agua y se decanta a los 15 segundos: la fracción decantada se deja reposar durante 5 minutos y se vuelve a decantar, empleándose para la cromatografía el residuo que queda en el fondo del vaso. Este se coloca en un filtro de placa de vidrio y se succiona hasta que no pase más agua: luego se extienden las partículas sobre un recipiente cubierto con papel de filtro y se dejan secar al aire hasta que no se percibe olor de amoníaco.

Las partículas obtenidas de la resina en su forma catión NH_4^+ tienen un tamaño que oscila entre 100 y 150 mesh (unidad inglesa referida al número de hilos por unidad de superficie del cedazo).

Debe hacerse notar que a lo largo de todo el trabajo se emplea únicamente agua bidestilado en recipientes de vidrio, a fin de evitar contaminaciones que afecten a las propiedades enzimáticas.

Las partículas obtenidas se suspenden nuevamente en agua y se las vuelve en una columna de vidrio de 30 cm. de largo y 2,5 cm. de diámetro, tratando de realizar esta operación en una sola vez y previa agitación de la resina en el agua en que está suspendida, a fin de obtener una columna cromatográfica uniforme -

en lo que se refiere al diámetro de las partículas. El fondo del tubo cromatográfico ha sido cubierto previamente con un trozo de algodón, suficiente para impedir el paso de las partículas a través del angostamiento inferior. Sin dejar en ningún momento que la parte superior de la columna quede en contacto con el aire, ya sea agregando líquido a mayor velocidad o cerrando convenientemente la salida inferior, se hace pasar por la columna agua bidestilada hasta que el líquido de salida reduce su pH hasta aproximadamente 7 según la indicación de papeles de reacción adecuados.

Se agrega a la columna alrededor de 1 gramo de citocromo c preparado según se indicó más arriba, disuelto en la menor cantidad de agua posible.

Se prosigue con el agregado de agua durante una media hora; el citocromo c queda absorbido en la porción superior de la columna, formando un anillo de color rojo muy oscuro. La elución se comienza con acetato de amonio 0,25 M, que se agrega a una velocidad de flujo de 1,3 a 1,5 ml. por minuto; casi de inmediato comienza a recogerse la impureza, cuya naturaleza proteica es fácil de evidenciar pues presenta un máximo de absorción en 280 m μ y, además, su solución forma una abundante espuma al ser agitada.

Debido al objeto preparativo de este experimento, la velocidad de flujo se graduó de modo de obtener un descenso lento y uniforme del anillo coloreado que se desprende de la porción superior en la cual se ha absorbido el citocromo c. De este modo

se puede recoger toda la fracción que se eluye con esa concentración de catión amonio, en unos pocos milímetros. Si una vez eliminada esta fracción, se aumenta la concentración del $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ a 0,50 M, se obtiene otra fracción: una tercera se eluye con la sal en solución, 0,75M y una cuarta con acetato de amonio 1M. Estas cuatro fracciones han sido llamadas respectivamente I, IIa, IIb y IIc, y representan aparentemente estados de denaturalización progresiva del citocromo c, que involucran un "desenrollamiento" creciente de la molécula. Se ha comprobado una pérdida progresiva de las propiedades enzimáticas en el mismo orden de la elución (Margolish, Frowirth y Weiner, comunicación personal). Para el análisis de la estructura química se prefirió usar en este trabajo únicamente la fracción I, que se eluye con acetato de amonio 0,25 M.

La solución obtenida se dializó contra agua bidestilada en un tubo de celofán, cambiando el líquido varias veces hasta obtener reacción negativa de ion amonio. Luego se vertió la solución en un cristizador, se congeló en un "deep-Freezer" a -20°C y se liofilizó en la cámara de evaporación de una parato de liofilización centrífuga de la casa Edwards Co., Londres.

Se obtuvo de este modo un polvo rojo oscuro que contiene 0,465% de hierro.

HIDROLISIS DEL CITOCROMO C CON TRIPSINA

Una muestra de citocromo c con 0,465% de hierro fue someti

da a la hidrólisis con tripsina, con el objeto de obtener péptidos cuyos aminoácidos carboxiloterminales fueron lisina o arginina.

La hidrólisis se efectuó en las siguientes condiciones:

Citocromo c	0,395 g.
Tripsina (recristalizada)	0,012 g.
Folúmen final.	380

Todas las determinaciones del pH fueron realizadas con electrodo de vidrio. El citocromo c fué disuelto en agua y llevado a pH7,8. En esas condiciones se agregó la tripsina, después de lo cual se tituló la solución con H_2NH_4 0,081N varias veces durante el curso de la reacción llevando siempre a pH7,8, con el objeto de mantener las condiciones óptimas para la acción enzimática y seguir el curso de esta última.

Una vez finalizada la digestión la solución fué calentada a ebullición y filtrada. Apareció un precipitado rojo, que se sabe está constituido por el péptido unido a la porfirina (Tuppy y Bodo, 1954a). Eliminado este último por filtración, se procedió a liofilizar la mezcla de péptidos obtenida en la misma manera en que se hizo lo propio con el citocromo c.

ELECTROFORESIS SOBRE PAPEL DE LA MEZCLA DE PEPTÍ-
DOS

Con el objeto de separar e identificar los péptidos obteni-

dos por medio de la hidrólisis, 5 mg. de la muestra obtenida fueron sometidos a la electroforesis sobre papel Whatman 3 MM. (Darum, 1950). Se cortó una tira de este de 58 cm. de largo por 15 cm. de ancho. El papel fué sumergido en una cubeta que contenía buffer a pH 6,5 de la siguiente composición:

Piridina	100 ml.
Agua destilada	900 "
Acido acético	4 "

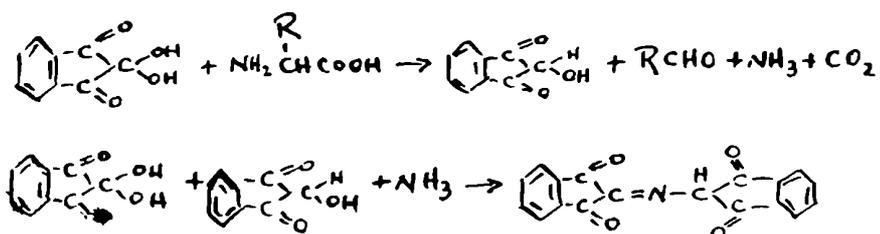
El exceso de solución buffer fué eliminado secando a medias el papel en corriente de aire frente a una campana. Se colocó luego la tira de papel sobre una placa de vidrio de dimensiones apropiadas. Sobre una línea, trazada sobre el papel, antes de ser humedecido con el buffer, aproximadamente en su centro y paralelamente al eje menor de la tira, se aplicó por medio de un capilar de vidrio 5 mg. de la muestra disueltos en dos gotas de agua, dejando libres 1,5 cm. a ambos márgenes. Dejando 0,5 cm. del margen superior se aplicó una gota conteniendo lisina y ácido glutámico. El papel fué cubierto cuidadosamente con una placa de vidrio similar, tratando de evitar la formación de burbujas de aire. Los extremos del papel que sobresalen a ambos lados de la placa de vidrio fueron sumergidos en sendas cubetas que contenían la misma solución buffer. Por medio de electrodos con contacto de mercurio, el sistema fué conectado a una fuente de potencial consistente en un rectificador que transforma

la corriente de la línea general, alternada de 220 volts, en corriente continua de 520 volts. Una vez cerrado el circuito se obtuvo una intensidad de corriente de 16 miliamperes, la que al término del experimento de tres horas de duración había ascendido a 32 miliamperes debido al calentamiento del sistema. Sin embargo, trabajando en estas condiciones el calentamiento es muy pequeño, razón por la cual no fue necesario emplear sistemas refrigerantes para evitar que se quemara el papel (Markham y Smith 1952).

Finalizada la electroforesis, la hoja fue secada con cuidado de no tocar el sector ocupado por los peptidos y se colgó frente a una campana, donde se la dejó secar en corriente de aire durante la noche hasta eliminar de ella el olor característico de los solventes empleados.

Se cortaron cinco tiras de dos cm. de ancho paralelamente al eje mayor del papel y se las sometió a reacciones características de: aminoácidos, arginina, histidina, triptofano y tirosina, según se detalla a continuación:

a) Reacción general para grupos $-NH_2$ y $-COOH$ libres (Tomms y Kolb, 1951); se empleó la reacción de la ninhidrina:



La tira de papel tomada por sus extremos fué sumergida en una solución de ninhidrina al 0,25% en acetona y luego de ser secada al aire se la calentó hasta 105°C en un horno cromatográfico. En todas las zonas ocupadas por péptidos se observó la aparición de manchas de color púrpura violado (fig. 4a).

b) Reacción de Sakaguchi para la identificación de arginina (Acher y Crocker, 1952); la tira de papel colgada de un extremo fué pulverizada con solución de α -naftol al 0,01% en etanol que contiene urea al 5%, a la que se agregó cinco lentejas de HOK momentos antes de su empleo. Después de dejar secar al aire la tira, se volvió a pulverizar con una solución de 0,7 ml. de bromo en 100 ml. de HOK al 5% hasta humedecer totalmente el papel. Una coloración anaranjada apareció en las zonas que contienen péptidos de arginina o el aminoácido libre. (Fig. 4b).

c) Reacción de Peuly para la histidina (Baldrige y Lewis, 1953). La tira fué pulverizada con una solución compuesta de la siguiente manera: 1g de ácido sulfanílico y 1 ml de HCl concentrado en 100 ml de solución al 0,7% de nitrito de sodio, a la que se agregó un trozo de hielo en el aparato pulverizador instantes antes de su empleo. Después de dejar secar al aire, la tira fué pulverizada con solución de CO Na_2 al 10%, apareciendo manchas de color rojo cereza características del imidazol de la histidina, además de una mancha de color pardo atribuida a un residuo de tirosina (Ver fig. 4c.)

d) Reacción de Ehrlich para el triptofano (Smith, 1953);

Se pulverizó la tira de papel con solución de 1g de para-dimetilamino-benzaldehído en 90 ml de acetona y 10 ml de H Cl concentrado. Apareció una mancha parda (ver fig. 4d).

e) Reacción para la tirosina (Acher y Crocker, 1952): La tira se pulverizó con nitroso β naftol al 0,1% en etanol 95%; luego de secar con corriente de aire caliente se pulverizó con NO_3H al 10%, se secó y calentó a 100°C durante tres minutos en un horno cromatográfico, apareciendo una mancha azulada (Ver - fig. 4 e)

Luego de efectuadas estas reacciones preliminares, se repitió el experimento de electroforesis anterior sobre bandas de papel diferentes, obteniéndose idénticos resultados para la posición de los péptidos en el papel. En este paso del proceso la única reacción que se efectuó fue la de la ninhidrina, ejecutada sobre una tira tomada de la parte superior de la banda. Las fracciones ácidas A1 y A2 fueron cortadas en el resto del papel según se indica en la fig. 5: el extremo que contenía péptido fue ligeramente recortado para darle forma de punto de flecha y el otro extremo fue doblado apropiadamente y colgado de una varilla de vidrio de modo que el extremo quedará sumergido en el agua de una cubeta (trough) en el fondo de la cual el papel era mantenido por una varilla.

La cubeta se colocó en un soporte adecuado de material plástico y la punta de flecha se ubicó exactamente en el centro de la boca de un pequeño balón de Kolbe de 10 c.c. de cuello largo

con extremo esmerilado, apoyado sobre un aro de plastilina. Todo se cubrió con una caja de plástico, cuidando de colocar en el piso un cristizador con agua para mantener un ambiente húmedo en el interior y favorecer la elución. Esta se efectúa dejando que el papel absorba agua de la cubeta y la deje atravesar toda su superficie hasta caer, acumulada en forma de gota, por la punta de flecha. Para los péptidos estudiados, la elución a temperatura ambiente dura de dieciocho a veinticuatro horas. Por lo general dentro de un mismo aparato se colocan varios papeles con sus respectivos baloncitos, y cuando se considera que el proceso ha terminado se verifica, antes de suspenderlo para todos los papeles, efectuando la reacción de la ninhidrina sobre uno de ellos: en caso de reacción positiva, se prosigue la elución en los demás durante un tiempo prudencial.

De la elución de cada uno de los papeles se recogieron 3 a 5 ml de solución de péptido. Los elutos procedentes de cortes análogos del papel se juntan y se evaporan en uno de los baloncitos calentando exteriormente a unos cincuenta grados y aplicando a través de una trampa una bomba de agua común que permite obtener un vacío de 100 mmHg. Las trampas son de vidrio y el extremo de las mismas se halla esmerilado y adaptado al cuello del baloncito. Durante la evaporación es conveniente someter al sistema baloncito-trampa a una suave traslación y cuidar de no exagerar en el calentamiento, de modo que no se formen espumas muy susceptibles de aparecer en soluciones de péptidos algo elevados.

En el caso de las fracción ácida o aniónica A1 sobre la cual se halla presente también el péptido que contiene la porfirina, es muy notable el fenómeno de la formación de espumas, las que tienden a subir por el cuello del balon originando pérdidas, además de los fenómenos de superficie que pueden producirse en dichas espumas y que pueden afectar a la estructura de los peptidos en consideración. Por esa razón, en el caso de la fracción A1 la evaporación se ha efectuado generalmente sin exceder una temperatura exterior de 30°C.

Mientras que los productos de elución de todas las demás fracciones son soluciones incoloras que al ser evaporadas dan lugar a un solido a veces parduzco o a depósitos incoloros, en el caso de la fracción A1 tanto la solución como el producto secto, tienen color de rosado a rojo ladrillo.

Con el objeto de obtener una mejor separación de las fracciones básicas o catiónicas se hizo una nueva electroforesis en las mismas condiciones que en el experimento anterior, pero en lugar de ubicar el material inicialmente en el centro del papel se colocó en el extremo del mismo junto al compartimiento anódico. De este modo, la experiencia pudo prolongarse hasta 7 horas sin que las fracciones más básicas salieran del sector del papel comprendido entre las placas de vidrio y logrando una mejor separación de los mismos (Vcr fig. 3).

Después de revelar las electroforetogramas por el método de la ninhidrina sobre la porción superior de la banda de papel, el

resto del mismo fué cortado según las líneas indicadas en la fig. 3 y los papeles fueron sometidos a elución y evaporación tal como se describió anteriormente. De cuatro a seis fracciones análogas de otros tantos electroforetogramas fueron reunidas y evaporadas en conjunto para preparar el material necesario para la cromatografía de partición. Este proceso se aplicó a las fracciones B1, B2, B⁶⁵~~B3~~, B4, B6 y B7. La fracción denominada N, situada entre las fracciones básicas y las ácidas, fué analizada por un procedimiento análogo en otro trabajo (Margoliesh y Schejter, en preparación).

CROMATOGRAFIA DE PARTICION DE LOS PEPTIDOS

Las fracciones A1, A2, B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B7 fueron sometidas a cromatografía sobre papel en dos dimensiones (Consden, Gordon y Martin 1947). Se empleó en todos los casos papel Whatmann N° 1. Para la primera dimensión se utilizó como solvente el sistema fenol - agua - amoníaco 0,3% (Sanger y Zuppy 1951) preparado del siguiente modo: al frasco conteniendo cristales de fenol (procedencia BDI) se agrega agua destilada hasta que ésta llene el recipiente. Se deja reposar todo un día; luego se emplea siempre la capa inferior que se extrae con una pipeta larga, cuidado de no agitar demasiado para evitar que se vuelvan a mezclar las fases. Una cantidad de este solvente se coloca en el piso del recipiente dentro del cual se desarrollan los cromatogramas, agregándosele luego una pequeña cucharadita

de cianuro de potasio; además se coloca un vaso de precipitación grande conteniendo un litro de agua y 3 cc. de HONH_4 concentrado. El agregado de CNK tiene por objeto evitar la formación de productos de oxidación del fenol, que suele tomar una coloración rojiza y no da resultados satisfactorios como solvente cromatográfico.

Para la segunda dimensión se empleó el solvente butanol ácido acético-agua preparado como sigue: 50 volúmenes de alcohol butílico, 10 volúmenes de ácido acético y 40 volúmenes de agua se agitan brevemente y se deja reposar el frasco que los contiene durante diez días antes de usarse la capa superior como solvente cromatográfico. Una porción de dicha capa se coloca en un cristizador en el piso del recipiente cromatográfico para saturar el ambiente.

La cromatografía se llevó a cabo en un cuarto termostático mantenido a una temperatura de 23°C . El desarrollo de la primera dimensión se dió por terminado poco antes de que el frente del solvente alcanzara el extremo inferior del papel. Luego de marcar dicho frente con un lápiz se eliminó el exceso de fenol colgando los papeles en un horno cromatográfico y haciendo pasar una corriente de aire a temperatura ambiente hasta que el olor del fenol desapareciera. Luego se hicieron cortes en el extremo inferior del papel en el sentido de la segunda dimensión, de modo de que el borde quedara dentado para permitir la salida de solvente del papel, y se desarrolló la segunda dimensión, dejando

descender al solvente durante 36 horas. Se sacó según se describió en el caso del fenol y se revelaron los cromatogramas por pulverización con ninhidrina. Se hicieron duplicados de los cromatogramas para cada fracción; uno de ellos se reveló con ninhidrina 0,25% en acetona o en alcohol isopropílico; el otro se reveló con ninhidrina 0,025% sin calentamiento. En este último se cortaron y eluyeron los peptidos según se indica en las figuras 4 a 11 (Conaden, Gordon y Martin, 1947).

Los peptidos obtenidos, una vez eluidos y evaporados tal como se describiera para las fracciones resultantes de la electroforesis, fueron sometidos a la determinación de los aminoácidos componentes.

DETERMINACION DE LOS AMINOACIDOS COMPONENTES

Los peptidos una vez secos, fueron disueltos con unas gotas de HCl 5,6N destilado en recipientes de vidrio, y transportados por medio de pipetas capilares a tubos capilares de vidrio grueso que se cerraron a la llama y fueron colocados en estufa a 105°C durante 18 horas. No hubo necesidad de recurrir a la hidrólisis alcalina, pues él o los peptidos conteniendo triptofano no se encuentran en la fracción N que no se investigó en el curso de este trabajo.

Una vez finalizada la hidrólisis cada capilar fué abierto; se transvasó su contenido a baloncitos como los empleados anteriormente, siempre mediante el empleo de pipetas capilares, y

se sometió a evaporación tal como se detalló para los péptidos. Sin embargo, la necesidad de obtener mezclas aptas para la cromatografía obligó a repetir la evaporación hasta eliminar el HCl, lo que se hizo agregando gotas de agua o de alcohol etílico al final de cada evaporación y repitiendo esta última, hasta desaparición del olor ácido.

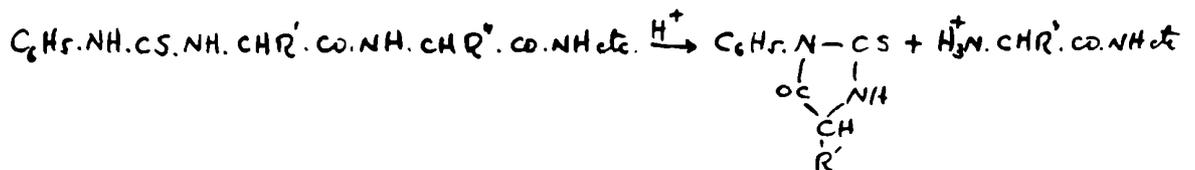
Cada una de las mezclas de aminoácidos resultante, fueron cromatografiadas sobre papel en dos dimensiones: la primera de ellas con fenol-agua-NH₃ 1% CNK (difiere del solvente para péptidos en que el vaso colocado en el piso del gabinete contiene - 10 c.c. de HONH₄ por litro de agua): la segunda, el sistema butanol- ácido acético- agua tal como se describió más arriba.

Los cromatogramas fueron revelados pulverizando con ninhidrina al 0,25% en acetona y calentando a 105°C (Tosmies y Kolb, 1951). Un cromatograma típico, mostrando la ubicación de los aminoácidos que resulta de los solventes empleados se ven en la fig. 12.

DEGRADACION ESCALONADA DEL CITOCROMO C.

La formación de hidantoinas a partir de aminoácidos por acción del fenilisocianico sobre el grupo amino terminal fué aplicada primitivamente a péptidos simples (Abderhalden y Brockmann, 1930; Bergmann, Kann y Miskeley 1927). El empleo de fenilisocianico fué introducido por Edman, quien sintetizó una serie de fenil tiohidantoinas (Edman, 1950a) y sugirió el uso de dicho reactivo para la degradación escalonada de péptidos su-

periores, aprovechando la ruptura del fenilisotiopéptido en feniltiohidantoína del aminoácido nitrógeno terminal y el resto peptídico intacto, que se produce en medio ácido (Edman, 1950b):



Cuando se intenta aplicar el método a proteínas, se tropieza con la dificultad de que estas se vuelven insolubles al ser tratadas por el reactivo. Para obviar dicha dificultad, actualmente se ejecuta la reacción sobre trozos de papel de filtro (Frenkel-Conrat, 1954), procedimiento sugerido por Leonis (1952)

En nuestro intento de degradar escalonadamente la molécula de citocromo C, se procedió de acuerdo con el método de Frenkel Conrat, Harris y Levy (1955).

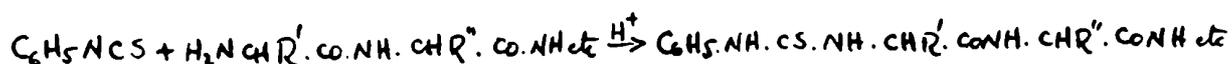
El fenilisotiociónico fue sintetizado a partir de anilina y sulfuro de carbono de acuerdo con Darius, Brewster y Olander (1946).

Se preparó eter absoluto libre de peróxidos por agitación con cristales de sulfato ferroso; el dioxano se mantuvo libre de peróxidos refluyéndolo durante diez horas en presencia de sodio metálico, destilándolo luego desde el mismo balón y manteniéndolo permanentemente congelado en un "deep-freezer". La piridina fue refluída en presencia de óxido de berio y destilada.

Se cortaron ocho trozos de papel de filtro Whatman n° 1 de

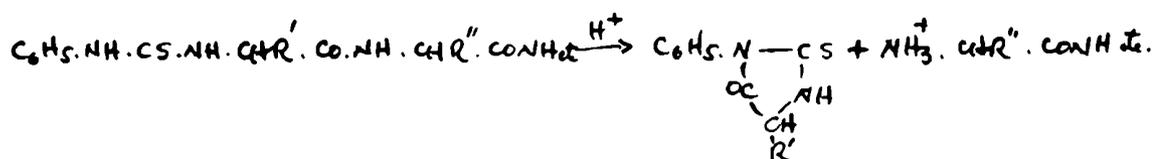
1 x 5 cm los que fueron suspendidos de una varilla de vidrio mediante brochas cromatográficas. La varilla se colocó en una corriente de aire frente a una campana. Por medio de una micropipeta se agregó a cada uno de los papeles 0,05 ml. de una solución al 5% de citocromo c, fracción I, cubriendo de modo uniforme la superficie del papel excepto el extremo por el cual se hallaba sujeto. Esta operación fue fácil de ejecutar debido a la coloración fuertemente roja de la solución empleada. Durante el resto del trabajo los papeles fueron transportados únicamente por medio de pinzas de acero inoxidable con el extremo aliñado de modo tal que no pudieran dañar al papel.

Los papeles se dejaron secar en corriente de aire y enseguida se les agregó 0,05 ml de solución recién preparada de fenilisotiocianico al 20% en dioxano. Todavía húmedos se los colocó en pequeños vasos de precipitación, los cuales fueron a su vez ubicados en el fondo de un frasco, donde se habían puesto previamente 5 ml de piridina, 5 ml. de dioxano y 5 ml de agua. El frasco fue cerrado con tapa de rosca, debajo de la cual se colocó una hoja de aluminio y se introdujo en una estufa mantenida a 40°C, donde se lo mantuvo durante 3 horas. Durante dicho período se produjo la reacción:



Con el objeto de eliminar el exceso de reactivo, los trozos de papel fueron colocados en tubos de ensayo a los cuales se agregó benceno hasta cubrir los papeles (aproximadamente 5 ml). Los tubos se colocaron en las pinzas de un agitador con "acción de muñeca" donde se los agitó durante tres horas, cambiando dos veces el benceno en la operación. Los papeles se escurrieron y se volvieron a introducir en tubos, cubriéndolos esta vez con una mezcla de volúmenes iguales de alcohol absoluto y éter. Así se los dejó durante una noche. Luego se renovó la mezcla y se continuó el lavado con agitación por períodos de tres horas. Al final de cada uno de estos, los líquidos de lavado se reunieron y se determinó la densidad óptica de una alícuota de la solución obtenida para una longitud de onda de 270 mμ en un espectrofotómetro de absorción de Hilger. Cuando la densidad óptica medida fué menor de 0,025 se dió por terminado el lavado; en las tres etapas de degradación ejecutadas sobre el citocromo c, ello ocurrió después del tercer período de tres horas.

La segunda fase de la reacción:



se llevó a cabo de la siguiente manera: los trozos de papel fueron extendidos sobre cápsulas de Petri, donde se los dejó secar. Se ubicó luego las cápsulas con los papeles en el piso de un de-

secador, en el cual se colocaron además un vaso conteniendo ácido acético glacial y otro con ácido clorhídrico 6N, de 50 ml. cada uno. El desecador fué convenientemente cubierto y evacuado por medio de una trompa de agua común hasta 100 mm Hg; así se lo cerró y se lo mantuvo a temperatura ambiente entre 20 y 25°C durante la noche. Se procuró realizar esta operación a una hora avanzada de modo de poder suspenderla a primera hora de la mañana siguiente sin dejar transcurrir más de 10 horas. El desecador se llevó a la presión normal y gradualmente, se lo abrió y los trozos de papel se colgaron de una varilla de vidrio tal como en la primera operación del proceso, sometiéndoselos a una corriente de aire hasta que se disipó el olor característico de los ácidos.

La extracción de las 3-fenil-2-tiohidantoína formada se llevó a cabo colocando los trozos nuevamente en tubos de ensayo, donde se los cubrió con la mezcla de volúmenes iguales de éter y alcohol absoluto; los tubos fueron agitados durante cuatro horas, al cabo de los cuales se reunieron los líquidos de lavado y se midió la densidad óptica de la solución obtenida entre las longitudes de onda de 255 a 280 m μ , poniendo especial cuidado en la determinación del máximo. El lavado se prosiguió durante cuatro horas más con solvente fresco, el que se agregó a la solución anteriormente obtenida, volviendo a leerse la curva de absorción en la zona citada de ultravioleta.

Por último, los papeles se dejaron durante la noche en presencia de solvente renovado. A la mañana siguiente el solvente se volcó y los papeles se dejaron secar suspendidos de la varilla de vidrio. Una vez secos, se dió comienzo nuevamente al proceso, empezando por el agregado del fenilisotiocianico. La solución de la 3-fenil-2-tiohidantoína, una vez determinado su volumen, fué evaporada a sequedad bajo presión reducida empleando baloncitos de Kolbe adecuados. El residuo fué disuelto en una o dos gotas de acetona y se cromatografió para identificar el producto obtenido.

La cromatografía se llevó a cabo sobre papel Whatman n° 1, previamente impregnado en solución de elmidón al 0,5% preparado por ebullición y secado durante una hora a 40°C en un horno cromatográfico (Sjoquist, 1953). Como solvente se empleó una mezcla de 40 ml de heptano redestilado, 40 ml de n-butanol previamente refluído con óxido de bario y destilado y 20 ml de ácido fórmico al 90%. La muestra se colocó en el papel por medio de un capilar de vidrio, tratando de obtener un círculo de no más de 4 mm. de diámetro. El papel se colgó de una cubeta, dentro de un recipiente de vidrio en cuyo fondo había un cristizador conteniendo una porción de solvente, y se dejó equilibrar durante la noche. Dentro del mismo recipiente se colgó un papel similar en otra cubeta pero sin contener material para ser cromatografiado. Dos horas antes de agregar el solvente a la cubeta de la cual

pendía el papel con la substancia a identificar, se comenzó el descenso del solvente en el papel sin substancia, para equilibrar el ambiente superior del recinto cromatográfico con respecto a los vapores del solvente. Se inició entonces la cromatografía, llegando el frente del solvente hasta una escasa distancia del margen inferior del papel al cabo de unas seis horas, todo el proceso se llevó a cabo en un cuarto termostático mantenido a 23°.

Una vez finalizado el desarrollo, el papel fue colgado al aire y se lo dejó secar, habiéndose marcado previamente con un lápiz la altura alcanzada por el frente del solvente. Cuando el papel estuvo seco, se lo pulverizó con una mezcla fresca de volúmenes iguales de iodo 0,01M en IK 0,5M y azica sódica 0,5M. De inmediato se observó la formación de manchas blancas sobre el fondo pardo violáceo característico de la reacción del iodo con el almidón. Los valores de R_f se midieron con respecto al frente del solvente y por comparación con las manchas obtenidas por medio de 3-fenil-2-tiohidantoinas cromatografiadas conjuntamente, sintetizadas como lo indican Fraenkel-Conrat, Harris y Levy (1955).

RESULTADOS DE LA HIDROLISIS CON TRIPSINA

Tabla 1
Curva de la reacción

Tiempo (minutos)	Nº H ₂ CO ₃ 0,081 N
30	0,2
60	0,6
120	1,6
180	2,2
210	3,7
270	4,1
300	4,8
330	4,8
390	5,1
420	5,2
450	5,2

El número de grupos -COOH teóricamente liberados se calculó sobre la base de un peso molecular del citocromo c de 12.000 obteniéndose:

$$\text{Número de -COOH} = \frac{0,081 \times 5,2 \times 12.000}{0,394 \times 1.000} = 12,8$$

Aparecieron así aproximadamente 13 grupos carboxilo liberados, lo que supone un total de 14 péptidos. La cifra es evidente-

mente baja con respecto a lo esperado, puesto que del número de lisinas y argininas era doble suponer alrededor de 22 péptidos. Posteriormente se realizó una nueva hidrólisis en condiciones similares:

Citócromo c (Fracción I)	1.100 g.
Tripsina (recristalizada)	0,034 g.
Volumen final	400 ml
Temperatura	38°C
pH	7,62-7,64

La titulación se llevó a cabo con HONH_4 0,095N siendo el volumen total empleado al finalizar la hidrólisis de 12,25 ml. por lo que el número de grupos $-\text{COOH}$ teóricamente liberados asciende a 13,5 lo que prácticamente coincide con el resultado de la primera operación citada. La figura 1 muestra la curva de esta titulación.

SEPARACION ELECTROFORETICA SOBRE PAPEL

La figura 2 muestra cinco tiras paralelas de un mismo electroforetograma de la mezcla de los péptidos. De acuerdo con la tira superior, que representa la reacción de la ninhidrina, se observan 13 manchas principales, además de una mancha de fierente forma y que está determinada por el "core" o péptido unido a la porfirina. Por razones de comodidad para el trabajo posterior las manchas fueron divididas en 5 grupos principales: dos aniónicos

(A1 y A2) dos catiónicos (B1 y B2) y uno neutro (N).

De los grupos aniónicos, aún el más extremo no lo están fuertemente como el testigo ácido glutámico; en cambio existe una mancha en el grupo catiónico B2 que avanzó más aún que el testigo lisina. El grupo A1 lleva consigo el "core".

Se observan en la segunda tira cuatro manchas correspondientes a arginina, mientras que el análisis de aminoácidos (Ehrenberg y Theorell, 1955) da como resultado 3,4 residuos en la molécula. Uno de ellos aparece en el grupo neutro mientras que los demás están distribuidos en diferentes grupos catiónicos, como era de esperar.

La tercera tira muestra tres manchas características de histidina, a las que debe sumarse un residuo más de dicho aminoácido presente en el "core" cuyo color enmascara el de la reacción. Asimismo hay una mancha, cuyo color corresponde al de la tirosina, en la fracción N.

Las tiras restantes muestran que los residuos de triptófano y tirosina se encuentran en la fracción neutra. El hecho de que aparezca una sola mancha de tirosina no implica contradicción con el resultado de 3,8 residuos dado por el análisis mencionado, puesto que la fracción neutra está compuesta por varios péptidos (Kergolish, comunicación personal).

La figura 3 muestra el electroforetograma destinado a resolver en forma más conveniente las fracciones catiónicas. Aparecen once manchas, las que por comodidad fueron divididas en siete grupos

(B1, B2, B3, B4, B5, B6 y B7): los cortes del papel para la elución se llevaron a cabo según las líneas de puntos.

Se intentaron, sin éxito, las reacciones de coloración empleadas en el electroforograma anterior: ello quizás ocurra a raíz de la baja concentración, debida principalmente a la dispersión de las manchas sobre el papel.

ESTUDIO DE LAS FRACCIONES

La figura 4 muestra el cromatograma correspondiente a la fracción A1. La mancha correspondiente al "core" es de color rosado, en contraste con el tono rojo ladrillo que presenta sobre el electroforograma, pero el cambio se debe a la dispersión del péptido en una superficie mucho mayor de papel. Las cruces que aparecen dentro de cada péptido indican la intensidad de la mancha observada de acuerdo con una escala arbitraria. Los resultados de la hidrólisis de cada uno de los péptidos aparecen en la tabla 2.

Las figuras 5 a 11 representan los cromatogramas de las fracciones 12 del primer electroforograma y B2 a B7 del segundo electroforograma. De la fracción B1 de este último no se obtuvieron manchas significativas. En la tabla 2 están registrados los resultados de la hidrólisis de cada uno de los péptidos dibujados en la figura citada: la identificación se hace por el número escrito dentro del péptido, precedido por el símbolo de fracción de origen. - Los cruces, que figuran a continuación -

del nombre de cada aminoácido dan una idea de la intensidad de la mancha, según una escala arbitraria. La abreviatura Leu comprende el grupo cromatográfico de las leucinas, formado por leucina, isoleucina y fenilalanina, que no pueden ser resueltas con el par de solventes fenol-amoniaco y butanol-acetico. La abreviatura Bas1 incluye a los aminoácidos básico -lisina o arginina, que se supone son los residuos carboxilo -terminales de los péptidos obtenidos, en razón de la especificidad de la tripsina. La abreviatura Bas2 significa que en el péptido ha sido hallado un segundo aminoácido básico: se trata de histidina, puesto que de acuerdo con lo que se sabe acerca de la acción hidrolítica de la tripsina los otros dos aminoácidos básicos posibles no pueden hallarse juntos en un solo péptido; además se confirmó la presencia de histidina con la reacción de Pauly.

La tabla 3 contiene el total de cada uno de los aminoácidos presentes en los diferentes péptidos después de las separaciones electroforéticas y cromatográficas bidimensional sobre papel. Su número es evidentemente muy grande, y desde un primer momento es lógico suponer que los péptidos que no contienen por lo menos un aminoácido básico son productos de ruptura de los obtenidos originalmente por la hidrólisis tripsina. Eliminando todos estos péptidos y tomando solamente en cuenta aquellos que contienen aminoácidos básicos, se obtienen los resultados que registra la Tabla 4 para el número de aminoácidos totales.

¶ Una segunda eliminación de péptidos se ha hecho sobre la

base de la hipótesis de que los grupos de péptidos (B2-1, B2-2); (B2-7, B2-8) y B4-1, B4-2, B4-3) representan cada uno un único péptido.

En realidad dichos grupos de péptidos, cuando fueron revelados los cromatogramas de las fracciones B2 y B4, se los dibujó y marcó separadamente por una mera presunción de que pudieran ser diferentes, aún cuando existía una continuidad visible en las manchas tal como se indica en las figuras 6 y 8. La similitud en las intensidades de los manchas de los diferentes aminoácidos después de efectuar separadamente la hidrólisis y la cromatografía, abona la suposición de que se trata de péptidos únicos.

TABLA 2

Resultados de la hidrólisis total a aminoácidos de los péptidos separados por electroforesis y cromatografía.

<u>Péptido</u>	<u>Aminoácidos</u>
A1-1	Asp 2 2 2 2: Glu ++++: Ala ++++: Ser ++: Gln ++: The ++
A1-2	Asp +++: Glu +++: Ala +++: Gln +: Val +: Leu +
A1-3	Asp +++: Glu +++: Ala +:(Ser-Gln) +: Val+: Leu +
A2-4	Glu +++: Gln +++: Val +++: Bas +++
A2-5	Glu +++ Asp +: Gln +: Ala +: Val +: Leu +: Bas +
A2-6	Glu ++++: Leu ++++: Tre +++: Bas +++: Tir +
A2-8	Asp ++: Glu ++: Val ++: Leu ++

Peptide

Aminoácidos

- A2-9 Asp +++: Glu +++: Ala +++: Trp + : Leu +++ (dos
manchas diferentes)
- A2-10 Asp +++: Glu ++: Ala ++:(Ser Gln) ++: Val+ : Leu +
- A2-11 Glu ++: Asp +: Ala +: Val +: Leu +: (Gln-Ser) +
- B2-1 Glu + : Ala +: Gln+: Val +: Leu +: Bos +: Asp +
- B2-2 Asp +: Glu +: Gln +: Ala +: Val +: Leu +: Bos +
- B2-3 Asp +: Glu +: Gln +: Ala +: Val +: Leu +: Bos +
- B2-7 Glu ++: Ala ++: Gln ++: Trp ++: Val ++: Leu ++:
Pro ++: Bos 1 ++: Bos 2 +
- B2-8 Glu ++: Ala ++: Gln ++ Trp ++: Val +: Leu ++:
Bos1 +++: Bos2 ++: Pro +
- B3-3 Glu ++: Gln +: Ala +
- B3-4 Glu ++: Ala ++: Ser ++: Asp. +: Gln +: Trp +: Val +:
Leu +: Bos +
- B3-6 Muchas muy débiles y no significativas.
- B3-8 Glu ++: Ala ++: Leu ++: Bos +
- B4-1 Glu +++: Gln +++: Asp ++: Ala ++: Val++: Bos ++:
Leu +
- B4-2 Glu +++: Gln +++: Asp ++: Ala ++: Val +: Bos +: Leu +
- B4-3 Gln +++: Asp ++: Glu ++: Ala ++: Val +: Bos +: Leu +
- B4-4 Gln +++: Bos +++: Asp ++: Glu ++: Ala +
- B4-5 Muchas muy débiles y no significativas
- B4-6 Gln +++: Asp ++: Glu ++: Ala ++: Bos +

<u>Péptido</u>	<u>Aminoácidos</u>
B4-7	Glu ++:Ala ++: Gli ++
B4-8	Glu +: Gli +
B4-9	Manchas muy débiles y no significativas
B4-10	Glu +: Gli +
B5-1	Asp +: Glu +: Ala +: Bli +: Bas +
B5-2	Ala ++: Gli ++: Ser ++: Cys ++: Asp +: Glu +
B5-3	Gli ++: Ser ++: Cys ++: Asp +: Glu +: Ala +: Val + Leu +
B5-4	Gli ++: Ser ++: Asp ++: Glu ++: Ala +: Val +: Leu +
B5-6	Gli ++: Ser ++: Asp +: Ala +: Val +: Leu +
B5-7	Asp +: Glu +: Ala +: Gli +: Ser +: Val +: Leu +: B
B5-8	Asp ++: Ala ++: Gli ++: Leu ++: Bas ++
B5-9	Asp ++: Ala ++:Gli ++:Bas ++: Glu +: Leu +:Cys +
B6-1	Asp ++: Ala ++: Gli ++: Ser ++: Bas ++: Glu +
B6-2	Asp +: Gli +: Ala +:
B6-3	Bas 1 +++: Gli ++: Ala ++: Bas 2 ++: Asp +: Glu + Val +: Leu +: Met +
B6-4	Asp +++: Glu +++:Gli +++:Ser +++:Cys +++: Tre +++ Leu ++: Val +: Bas 1 +: Bas 2 +
B7-1	Asp ++: Glu ++: Gli ++: Ala +

NOTA: Las abreviaturas empleadas son las mismas que usan corriente-
mente en trabajos sobre secuencia de aminoácidos, pero las

hemos adaptado a la ortografía castellana. En la Tabla 3 pueden verse las abreviaturas correspondientes a cada aminoácido.

TABLA 3

Incluye todos los aminoácidos presentes en los péptidos obtenidos por hidrólisis con tripsina y separación por electroforesis sobre papel y posteriormente cromatografía bidimensional sobre papel, excluyendo al "core" y los péptidos presentes en la fracción M de la electroforesis.

	<u>Número</u>	<u>Abrevuaturas</u>
Alanina.	35	Ala
Aspártico.	31	Asp
Cisteína.. . . .	4	Cis
Glicina.	37	Gli
Glutámico.	38	Glu
Leucinas	26	Leu
Metionina.	1	Met
Prolina.	2	Pro
Serina.. . . .	11	Ser
T Tirocina	2	Tir
Treonina	8	Tre
Valina	23	Val
Básicos 1 (Lisina-Ar- giniña).. . . .	24	Bas 1

	<u>Número</u>	<u>Abreviaturas</u>
Básico 2 (Histidina)	4	Bas 2
Total	246	

TABLA 4

Incluye los aminoácidos de las fracciones A1, A2, B2, B3, B4, B5 y B6 correspondientes a los peptidos que contienen por lo menos un aminoácido básico.

Alanina	20
Aspártico	17
Cisteína	2
Glicina	21
Glutámico	22
Leucinas	18
Metionina	1
Prolina	2
Serina	4
Tirosina	1
Treonina	6
Valina	15
Básicos 1 (Lisina-Arginina) . . .	23
Básicos 2 (Histidina)	4
Total	156

e Incluye los aminoácidos correspondientes a los péptidos de las fracciones A1, A2, B2, B3, B4, B5, y B6, pero considerando que los péptidos (B2-1, B2-2): (B2-7, B2-8) y B4-1, B4-2, B4-3) son idénticos.

Alanina.	15
Aspártico.	14
Cisteína	2
Glicina.	16
Glutámico.	17
Leucinas	13
Metionina.	1
Prolina	1
Serina.	4
Tirosina	1
Treonina	4
Valina.	10
Básicos 1 (Lisina-Arginina). .	18
Básicos 2 (Histidina).	3
Total.	119

DISCUSION DE LOS RESULTADOS DE LA HIDROLISIS
TRIPSICA Y SEPARACION DE LOS PRODUCTOS RE-
SULTANTES

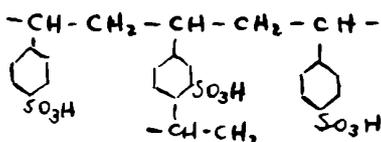
De la observación de las tablas 3, 4, y 5 resulta evidente en primera instancia que la cantidad de péptidos obtenidos en la separación es excesivamente grande y no corresponde exactamente a lo que se deseaba conseguir, vale decir, no son todos los péptidos separados eslabones independientes de la cadena del citocromo c. Muchos de ellos son productos de ruptura de los péptidos que resultan de la acción de la tripsina.

Algunos de los péptidos pueden ser los que originariamente se hallan presentes en la cadena, entre dos aminoácidos básicos lisina o arginina-, y estos deben encontrarse entre los que sirvieron para construir la Tabla 4, es decir que pueden ser los identificados como A2-4, A2-5, A2-6, B2-1, B2-2, B2-3, B2-7, B2-8, B3-4, B3-8, B4-1, B4-2, B4-3, B4-4, B4-6, B5-1, B5-7, B5-8, B5-9, B6-1, B6-3 y B6-4. Estos suman en total 22 y si se considera, como se ha hecho para construir la Tabla 5 y en razón de la similitud de composición y de localización cromatográfica que los pares B2-1 y B2-2; B2-7 y B2-8; y el tercero B4-1; B4-2 y B4-3 corresponden a péptidos únicos, resulta el número total reducido a 18. No obstante, hay que tener en cuenta que deben agregarse otros péptidos tales como el "core": los presentes en la fracción H que han sido objeto de un estudio aparte (Margolias y Schejter, en preparación) y el péptido carboxilo terminal, de la molécula del citocromo c, que no tiene forzosamente que contener

aminoácido básico -lisina o arginina. En vista de ello, aun el número resulta elevado en comparación con el de 21 a 22 que era lógico esperar de acuerdo con la especificidad de la tripsina (Bergmann y Frutton, 1941).

Desde los primeros trabajos sobre especificidad en la acción proteolítica de la tripsina (Hofmann y Bergmann, 1939, - 1941) en los cuales se estableció que esta solo actuaba sobre el carboxilo de la lisina de la arginina, sólo se han obtenido confirmaciones de este resultado y aún ha sido posible preparar un sustrato sintético para la acción de la tripsina transformando un residuo de cisteína en una cadena pentaatómica de configuración especial similar a la de la lisina (Lindley, 1956). Por ello, no es posible atribuir la cantidad elevada de péptidos a la acción de dicha enzima proteolítica y si debe pensarse en cambio que los procesos de separación, que incluyen varios calentamientos, evaporaciones al vacío y fenómenos de superficie repetidamente aplicados, son los causantes de esta anomalía observada en los resultados. Una confirmación en primera aproximación de esta hipótesis se tuvo cuando el mismo hidrolizado tripsico fué sometido a un único proceso de separación por cromatografía sobre columna de resina de intercambio iónico.-

Este experimento se ejecutó sobre una columna de Dowex-50 con 4% de "crosslinking", de la casa Rohn and Haas, U.S.A., cuya estructura es la siguiente: (Campbell y Work, 1954).



Para la elución se empleó un par de soluciones buffer mezcladas en un recipiente por medio de un agitador magnético en proporciones tales que diera por resultado un gradiente continuo de pH, que varió así de 5,1 al comienzo de la operación hasta 10,0 cuando se le dió término. Se obtuvieron diecisiete picos, como puede observarse en la figura 13. Algunos de ellos pueden constituir una mezcla de péptidos, pero de cualquier modo el número total se mantiene dentro de las predicciones lógicas.

No pudiendo constatarse cuales de los péptidos obtenidos en la separación electroforética-cromatográfica son reales eslabones en la cadena del citocromo c, se dejó el trabajo en este estado y se prefirió usar para los estudios de estructura - los productos de la separación por cromatografía en columna; no obstante, pueden extraerse de los resultados señalados en la Tabla 2 a 5 algunas indicaciones que consideramos de interés.

Número de cisteínas en la molécula: En el citocromo c de corazón de bovino se hallan 2 residuos de cisteína (Paleus, 1955), los que están presentes en el "core" de la molécula (Tuppy y Bodo, 1954a, 1954b; Tuppy y Paleus, 1955). En el citocromo c de corazón

de caballo también aparecen dos cisteínas en el "core" (Tuppy y Bodo, 1954a, 1954b; Margolish, Frowirth y Weiner, comunicación personal), pero de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo existen más residuos de cisteína en la molécula: considerando solamente los péptidos que contienen aminoácido básico, ello ocurre en los identificados como B5-9 y B6-4.

El péptido B5-9 no puede ser considerado como un derivado de ruptura del "core", puesto que contiene leucina y aspártico, a diferencia de este último en el cual dichos aminoácidos no se hallan presentes. Por idénticas razones el péptido B6-4, que presenta en su composición aspártico, glicina, serina y leucina, todos ellos ausentes en el "core", tampoco puede ser un producto de hidrólisis del péptido del "core". Además la composición de ambos péptidos presenta diferencias suficientes como para afirmar que uno no es producto de ruptura del otro. Estas razones permiten deducir que en el citocromo c de corazón de caballo hay, fuera del "core", por lo menos dos residuos de cisteína, lo que hace un total de 4, a diferencia de las 2 que halló Paleus en el bovino. Por otra parte, ya han sido señaladas otras diferencias de composición para el citocromo c de diferentes especies (Paleus, 1954).

Número de histidinas en la molécula: Mientras que en el caso del corazón de bovino se demostró la presencia de tres residuos de histidina por molécula de citocromo c y en la misma substancia

obtenida del salmón se verificó la presencia de dos solamente (Palaus, 1954), para el corazón de caballo Margolish(1955) halló cuatro histidinas por molécula de citocromo c. En nuestro trabajo este resultado aparece confirmado tanto por el electroforograma (fig. 2c) que muestra tres manchas rojas de histidina características de la reacción de Pauly (la cuarta histidina se halla en el "core" de la molécula), como por las posteriores separaciones cromatográficas de las cuales resultan tres péptidos diferentes que contienen histidina: el par B2-7, B2-8, y los identificados como B6-3 y B6-4. Se concluye, en vista de las diferencias de composición de estos tres péptidos, que el citocromo c de corazón de caballo contiene efectivamente cuatro residuos de histidina.

Debe hacerse notar que de los tres péptidos señalados uno es de importancia fundamental, pues debe ser el correspondiente al extremo amino-terminal de la molécula, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo por el método de degradación con fenilisotiocianato según los cuales la histidina es el aminoácido nitrógeno-terminal de la cadena.

Número de argininas: De acuerdo con los resultados del electroforograma de la figura 2, hay por lo menos cuatro argininas en la molécula. Estas no perdieron sus ubicadas, empero, en los cromatogramas, debido quizás a la baja concentración en la mancha.

RESULTADOS DE LA DEGRADACION CON FENILISOTIOCIANATO

El primer ciclo de la degradación del citocromo c a partir del aminoácido nitrógeno terminal mediante el empleo del fenilisotiocianato dió, como resultado de la extracción en alcohol-éter una solución incolora y transparente que observada en el ultravioleta por medio de un espectrofotómetro de Hilger presentaba un máximo de absorción en $267 \text{ m}\mu$ para lecturas hechas entre 260 y $275 \text{ m}\mu$ (Figura 14).

El cromatograma de una fracción de la solución dió como resultado dos manchas: una con R_f de $0,20$ y la otra con R_f de $0,60$. La primera, de acuerdo con la Tabla 6 corresponde a feniltionidantioilhistidina; la segunda no corresponde al PTH de ningún aminoácido de los incluidos en la Tabla 6, que son los identificados como presentes en el citocromo c y su presencia que de ser explicada en cambio por la interpretación del mecanismo de la degradación (Edman, 1956) como se verá en la discusión posterior.

Los productos del segundo ciclo de la degradación dieron una curva de absorción en el ultravioleta que presenta una amplia meseta entre 240 y $270 \text{ m}\mu$ que se mantuvo prácticamente idéntica después de haber sido tratada en clorhídrico $3N$ durante la noche a 40°C y repitiendo el proceso a 56°C durante 80 horas (Figura 15)

El cromatograma dió como resultado una mancha blanca y larga desde el punto de R_f $0,20$ hasta el extremo alcanzado por el solvente. En estas condiciones el proceso se detuvo y no se rea-

lizaron más degradaciones.

TABLA 6

Características de las feniltionidantoinas de varios aminoácidos (Tomadas de Fraenkel-Conrat, H., Harris, J.I. y Levy, L., 1955, y de Sjequist, J., 1953)

Aminoácido	Máximo de Absorción	R _F en el solvente usado
Alanina	268,5	0,80
Arginina	265	0,24
Aspártico	268,5	0,64
Cisteína	271,5	0,81
Fenilalanina	270,5	0,87
Glicina	267,5	0,66
Glutámico	269	0,66
Histidina	265,5	0,20
Isoleucina	269,5	0,90
Leucina	269	0,91
Lisina (ε-PTC)	270	0,76
Metionina	270,5	0,85
Prolina	271,5	0,85
Tirosina	271	0,77
Treonina	269,5	0,70
Triptofano	269,5	0,78
Valina	270	0,88

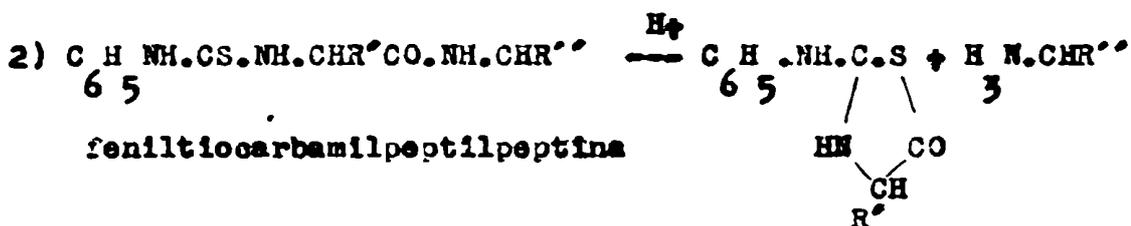
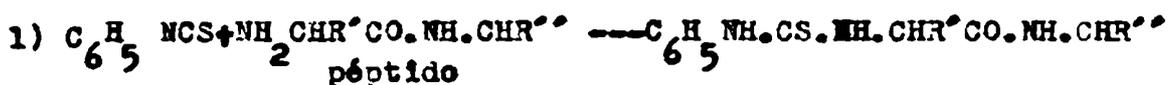
Discusión de la degradación con fenilisotiocinato

Los resultados del primer ciclo permiten afirmar que el ci todromo c de múscula de corazón de caballo purificado por cromatografía en columna de Amberlita IRC-50 tiene un sólo aminoácido nitrógeno terminal, y que este es la histidina. En efecto, los datos de la cromatografía coinciden exactamente con el correspondiente a la histidina de acuerdo con Sjoquist (1953) en lo que respecta a la mancha de R_f 0,20: la otra mancha no tiene paralelo en ninguno de los datos de la Tabla 6. Nuestro resultado coincide con el del otro autor (Margoliash, 1955), quien llegó a idéntica conclusión mediante el empleo del método del 1-fluor-2-4-dinitrobenceno (Sanger, 1945; Porter y Sanger, 1948)

Recientemente se ha informado (Matsubara, Hagihara, Horio y Okumuki, 1957) que aplicando el método del fluordinitrobenceno el citocromo c de corazón de caballo cristalizado según Hagihara, Horio, Yamashita, Nozaki y Okumuki (1956) se obtuvo como único aminoácido nitrógeno-terminal un residuo de arginina. No podemos explicar esta contradicción con nuestro resultado salvo suponiendo que el proceso de cristalización conduzca a la pérdida de la molécula nitrógeno-terminal de histidina. Tenemos al respecto noticias de que en otra porción de la molécula, el llamado "core", del citocromo c, la unión peptídica histidil-treonina es sumamente lábil (Margoliash, Frewirth y Weiner, comunicación personal.)

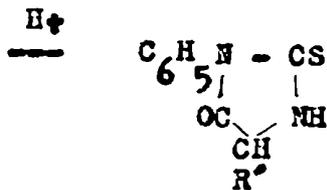


La presencia de dos manchas en el cromatograma de los productos del primer ciclo de la degradación está de acuerdo con la interpretación del mecanismo de la reacción debida a Edman (1956). Según este autor, la feniltiocarbamil-peptilpeptina obtenida por la acción del fenilisotiocianico sobre el grupo nitrógeno-terminal del péptido atacado se cicliza, a favor de una incorporación de protones, donde lugar a la formación de una 2-anilino-4-aminoacidil-5-tiazolinona. Esta puede transformarse luego directamente en la 5-aminoacidil-3-fenil-2-tiohidantoina que sirve para identificar al aminoácido, en una reacción favorecida por el calor; o bien la molécula puede volver a abrirse en medio acuoso para ciclizarse definitivamente en la forma deseada. El proceso puede esquematizarse de la siguiente manera:



PC

2-anilino-4-R'-5-tiazolinona
calor



5-R^o-3-Fenil-2-Tiohidantoína

En tanto que las feniltiohidantoínas del tipo cuya fórmula estructural general se observa arriba tienen máximo de absorción entre 260 y 275 milimicrones, las anilino-tiazelenonas presentan máximos entre 250 y 255 milimicrones. Por lo demás ambas sustancias reaccionan con la azida sódica y el iodo, dando lugar a las manchas blancas que se producen al revelar el cromatograma: ello explica la aparición de manchas dobles e indica a la vez que es conveniente esperar un tiempo prudencial antes de la ejecución del cromatograma, sometiendo a la solución problema a la acción de ácidos y del calor moderado, de modo de llevarla a la forma de tiohidantoína que es la más cómoda para la cromatografía. Este proceso, por otra parte, puede ser puesto en evidencia por la observación repetida de las curvas de absorción en la zona adecuada del ultravioleta.

El resultado de la cromatografía de la solución obtenida a partir del segundo ciclo de la degradación indica la presencia de una cantidad de manchas indefinidas que se extienden a lo largo de todos los valores posibles del R_f . Se puede concluir en vista de ello que en esas circunstancias se ha producido una ruptura

de toda la molécula en tiohidantoinas de aminoácidos y péptidos diversos y por ello el experimento se detuvo allí.

Creemos que el fenómeno puede ser explicado teniendo en cuenta la gran cantidad de residuos de lisina presentes en la molécula: el Fenilisotiocianico ataca también a los grupos -amino de las lisinas y se adosa a ellos dando lugar a una cadena sumamente inestable, en especial por efecto estérico de los radicales adosados. El tratamiento a baja presión y en medio sumamente ácido como lo es el que se emplea para la ciclización de así por resultado una ruptura de la cadena en eslabones inidentificables. Otros autores señalan, con el mismo método, la identificación de hasta diez residuos consecutivos en un acta de ce-péptido, pero este contiene sólo dos lisinas muy separadas una de la otra (Harris y Roos, 1956).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

1) Se llevó a cabo la hidrólisis del citocromo c de músculo de corazón de caballo purificado por cromatografía sobre columna de resina de intercambio catiónico, empleando a tal efecto la tripsina en razón de los datos conocidos acerca de su especificidad. Los productos de la hidrólisis fueron separadas por electroforesis sobre papel de filtro y las fracciones obtenidas vueltas a separar por cromatografía bidimensional sobre papel. Los péptidos obtenidos fueron sometidos a la hidrólisis total en me-

dio ácido, con excepción de una fracción electroforética denominada neutra, la que es objeto de un trabajo por separado. Los productos de la hidrólisis total fueron cromatografiados bidimensionalmente sobre papel e identificados los aminoácidos como componentes.

2) El número total de péptidos obtenidos de esa forma sobrepasa el que hubiera podido esperarse de acuerdo con la especificidad de la tripsina; lo mismo ocurre para gran parte de los aminoácidos, cuyo número es por lo general mayor que el que resulta de análisis previos del citocromo c. Se hallan en progreso actualmente en el mismo laboratorio análisis de estructura de los péptidos separados por cromatografía sobre columna de resinas de intercambio iónico (Feitelson, Margolish y Frowinckh, comunicación personal).

3) De los resultados obtenidos puede extraerse la conclusión de que en el citocromo c de músculo de corazón de caballo existen por lo menos dos residuos de cisteína aparte de los dos que se hallan presentes en el "core" de la molécula y sirven para mantener a la cadena peptídica unida al grupo porfirínico. El número de histidinas, por otra parte, es de cuatro: una de ellas se halla en el "core" y está directamente relacionada con la formación del hemocromógeno. El número de argininas es de cuatro por lo menos.

4) La molécula de citocromo c fué sometida a la degradación

BIBLIOGRAFIA

- Abderhalden, E. y Brockmann, H., *Biochem. Z.* 225, 386, 1930.
- Acher, R. y Crocker, C., *Bioch. Biophys. Acta* 9, 704, 1952.
- Arndt y Riley, D.P., *Proc. Roy. Soc. London B*, 141, 1953, 3.
- Baernstein, H.D., *J. biol. Chem.* 115, 25, 1936.
- Baldrige, R.C. y Lewis, H.B., *J. biol. Chem.* 202, 169, 1953.
- Bergmann, M., Kann, E. y Miesley, A., *Ann.* 458, 56, 1927.
- Bergmann, M. y Frutton, J.S., *Advances in Enzymology* 1, 63, 1941.
- Boardmann, N.K. y Partridge, S.M., *Nature, Lond.*, 171, 208, 1953.
- Boardmann, N.K. y Partridge, S.M. *Biochem. J.* 59, 543, 1955.
- Campbell, P.N. y Work, T.S., *British Medical Bulletin* 10, 196, 1954.
- Conden, R. Gordon, A.H. y Martin, A.J.P., *Biochem. J.* 41, 590, 1947.
- Darius, F.B., Brewster, R.G. y Olander, C.P. en Gilman H. y Blatt A.H. *Organic Synthesis*, John Wiley & Sons (New York) 1946.
- Durrum, E.L., *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 2943, 1950.
- Edman, P., *Acta chem. scand.* 4, 277, 1950.
- Edman, P., *Acta chem. scand.* 4, 283, 1950.
- Edman, P., *Acta chem. scand.* 10, 761, 1956.
- Ehrenberg, A. y Theorell, H., *Acta chem. scand.* 9, 1193, 1955.
- Fraenkel-Conrat, H.J. *Amer. Chem. Soc.* 76, 3606, 1954.
- Fraenkel-Conrat, H. y Harris, J.I., *J. Amer. Chem. Soc.* 76, 6058, 1954.
- Fraenkel-Conrat, H. Harris, J.I. y Levy, A.L. en David Glick, *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience (New York) 1955.
- Hagihara, B., Horio, T., Yamashita, J., Nozaki, M. y Okunuki, K., *Nature, Lond.* 178, 629, 1956.
- Harris J.I. y Roos, P., *Nature, Lond.* 178, 90, 1956.

- Hill, R. y Keilin, D., Proc. Roy. Soc. London B 107, 286, 1930.
- Hirs, C.H.W., Moore, S. y Stein, W.H., J. biol. Chem. 200, 493, 1953.
- Hofman, K y Bergmann, M., J. Biol, Chem 130, 81, 1939.
- Hofman, K y Bergmann, M. J. Biol Chem. *ibid* 138, 243, 1941.
- Hoppe-Saylor, F., Zeitschr. f. Physiol. Chem. 14, 106, 1890.
- Josephson, B., The analyst 64, 181, 1939.
- Keilin, D., Proc. Roy. Soc. London B 98, 312, 1925.
- Keilin, D., Proc. Roy. Soc. London B 106, 418, 1930.
- Keilin, D., y Hartree, E.F., Proc. Roy.Soc.London B.122, 298, 1937.
- Keilin, D. y Hartree, E.F., Biochem. J. 39, 289, 1945.
- Kirsten, W., Anal. Chem. 25, 74, 1953.
- Leonis, J., Bull. Soc. Chim. des Belges 61, 524, 1952.
- Levy, L., Zeitschr. f. Physiol. Chemie, 13, 309, 1889.
- Lindley, H., Nature, Lond 178, 647, 1956.
- MacMunn, C.A., Phil. Trans. 177, 267, 1886.
- MacMunn, C.A., J. of. Physiol. 8, 57, 1887.
- Macpherson, H.T., Biochem. J. 36, 59, 1942.
- Margoliash, E., Nature, Lond. 170, 1014, 1952.
- Margoliash, E., Biochem. J. 56, 529, 1954.
- Margoliash, E., Biochem. J. 56, 535, 1954.
- Margoliash, E., Nature, Lond. 175, 293, 1955.
- Markham, R. y Smith, J.D., Biochem. J. 52, 552, 1952.
- Matsubara, H., Hagihara, E., Horio, T. y Okunuki, K., Nature,
Lond. 179, 250, 1957.
- Moore, S. y Stein, W.H., J. biol. Chem. 178, 53, 1949.
- Neillands, J.B., J. biol. Chem. 197, 701, 1952.

- Paleus, S. y Neillands, J.B., Acta chem. scand. 4, 1024, 1950.
- Paleus, S., Acta chem. scand. 6, 969, 1952.
- Paleus, S., Acta chem. scand. 8, 971, 1954.
- Paleus S., Acta chem. scand. 9, 335, 1955.
- Paleus, S., Ehrenberg, A. y Tuppy, H., Acta chem, scand. 9, 365, 1955.
- Paul, K.C., Acta chem. scand. 4, 239, 1950.
- Paul, K.G., Acta chem, scand. 5, 379, 1951.
- Paul, K.G., Acta chem. scand. 5, 389, 1951.
- Pauling, L. en Les Proteines, Bruxelles. 1953.
- Porter, R.R. y Sanger, F., Biochem. J. 42, 287, 1948.
- Sanger, F., Biochem. J. 39, 507, 1945.
- Sanger, F., Biochem. J. 44, 126, 1949.
- Sanger, F., Biochem. J. 45, 563, 1949.
- Sanger, F., y Tuppy, H., Biochem. J. 49, 463, 1951.
- Sjoquist, J., Acta chem. scand. 7, 447, 1953.
- Smith, I., Nature, Lond. 171, 43, 1953.
- Theorell, H., Biochem. Z. 279, 463, 1935.
- Theorell, H., Biochem. Z. 285, 207, 1936.
- Theorell, H., y Akesson, A., Science 90, 67, 1939.
- Theorell, H. Biochem. Z. 298, 242, 1939.
- Theorell, H., y Akesson, A., J. Amer. chem. Soc. 63, 1804, 1941.
- Theorell, H. y Akesson, A., J. Amer. chem. Soc. 63, 1818, 1941.
- Tint, H. y Reiss, W., J. biol. Chem. 182, 385, 1950.
- Toennies, G. y Kolb, J.J., Anal. Chem. 23, 823, 1951.
- Tsou, C.L., Nature, Lond. 164, 1134, 1949.
- Tsou, C.L., Biochem. J. 49, 362, 1951.

Tuppy, H. y Bodo, A., Monatsh. f. Chemie 85, 807, 1954.

Tuppy, H. y Bodo, A., Monatsh. f. Chemie 85, 1024, 1954.

Tuppy, H. y Paleus. S., Acta chem. scand. 9, 353, 1955.

Zelle, K. y Reuter, P., Z. physiol. Chem. 221, 101, 1933.

Zimmermann, W., Microchemie 35, 80, 1950.-

Figura 1

Curva de hidrólisis del citocromo o por la tripsina

Ordenadas: Carborillos Liberados
Abscisas: Minutos

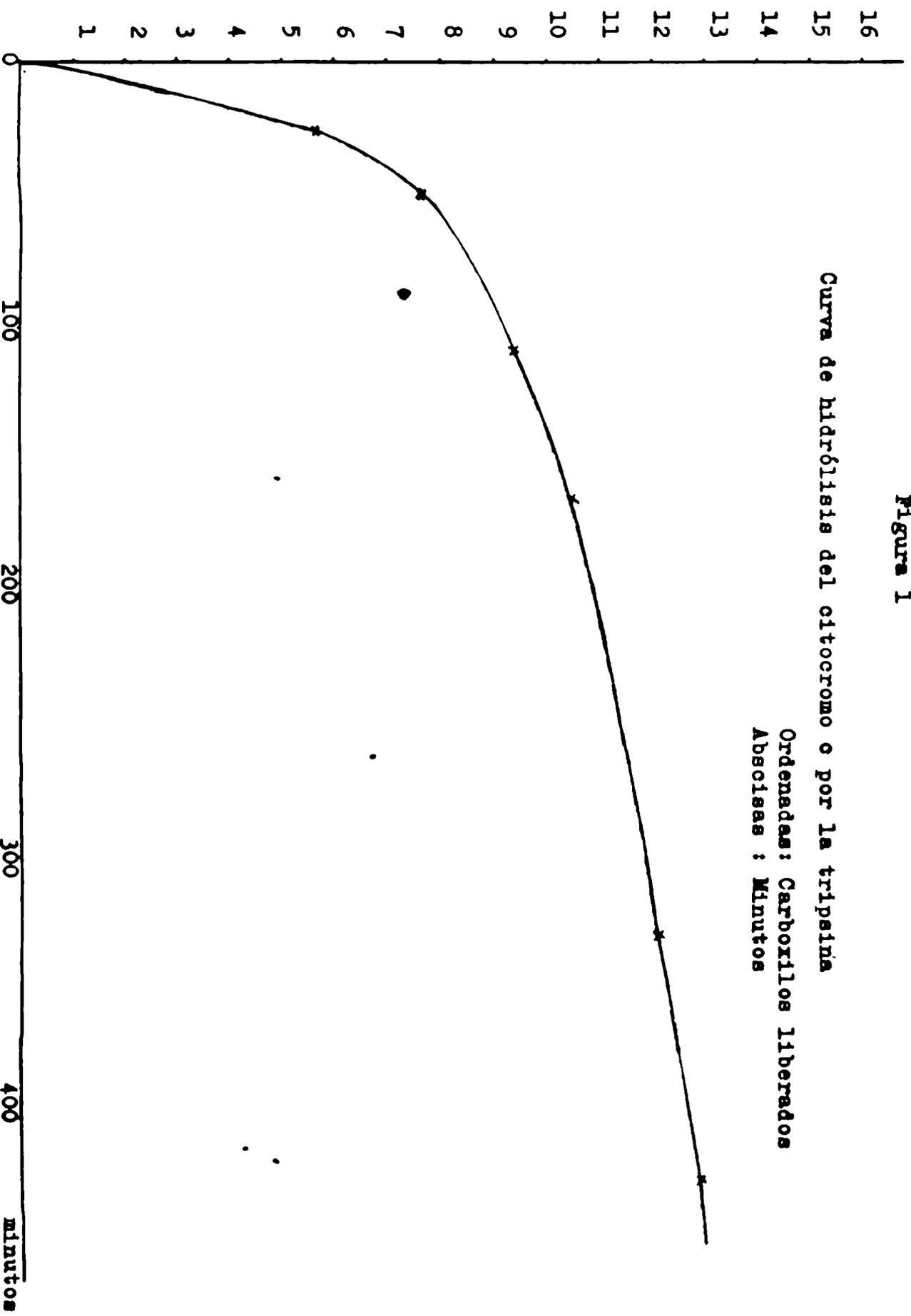


Figura 2

Electroforesis del hidrolizado tripsínico de citocromo c

Papel:3MM. pH:6,5. Voltaje:520 volt. Intensidad:16632 miliampere. Tiempo:3 horas

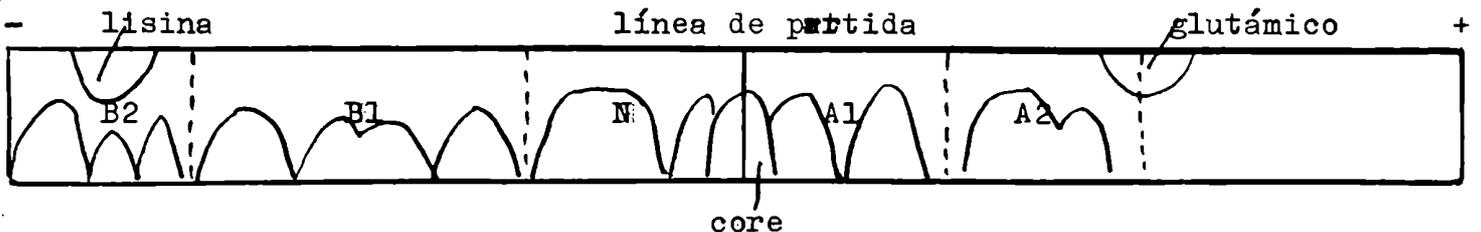


Fig. 2a (péptidos en general)

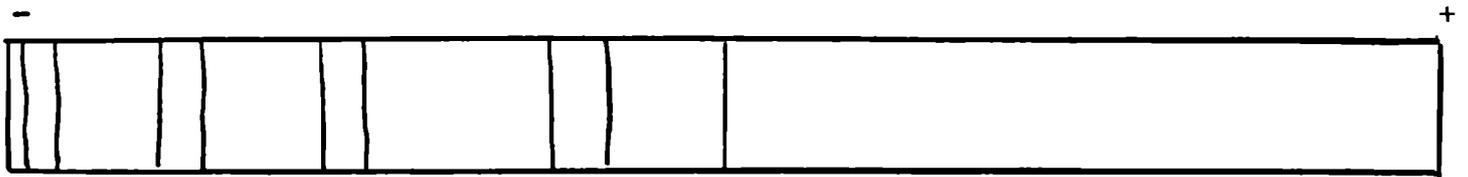


Fig. 2b (arginina)

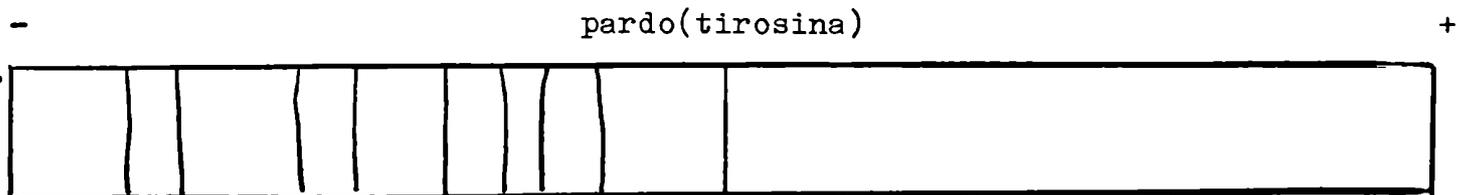


Fig. 2c (histidina y tirosina)

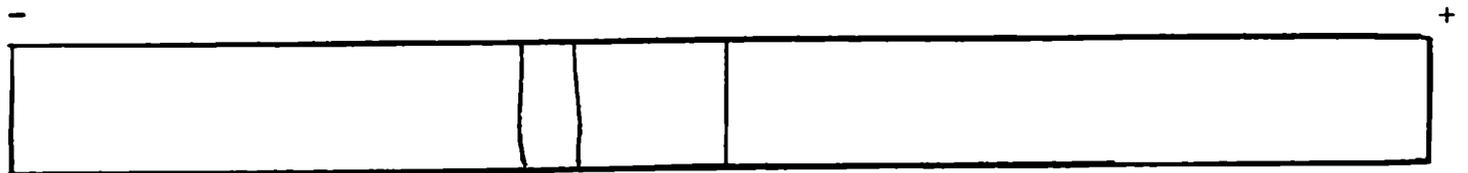


Fig. 2d (triptofano)

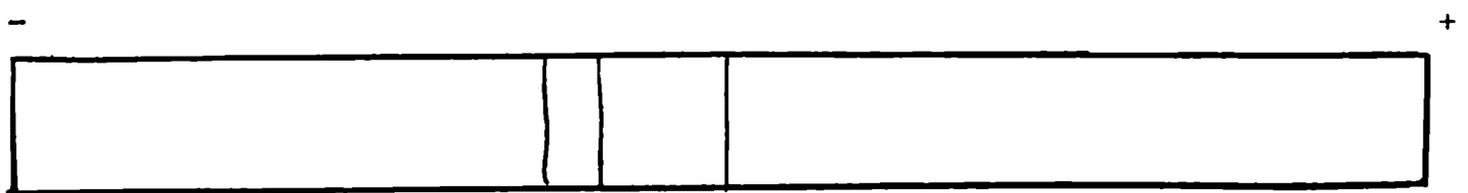
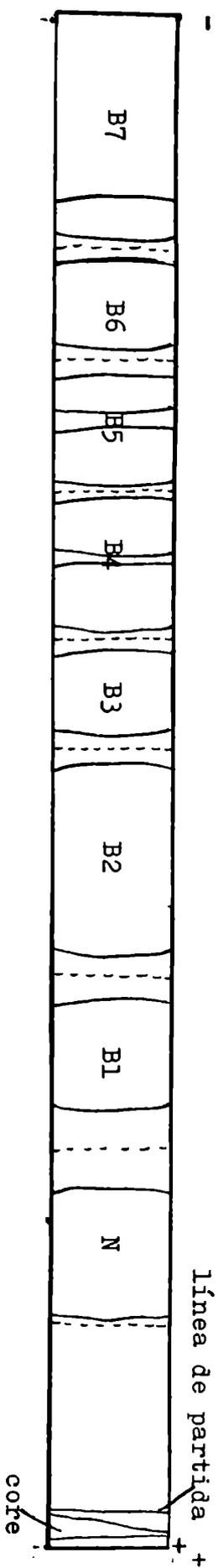


Fig. 2e (tirosina)

Figura 3

Electroforesis del hidrolizado tripsínico de citocromo c

Papel: 3MM. pH: 6,5. Voltaje: 520 volt. Intensidad: 16-32 miliampere. Tiempo: 7 horas.



Los trazos llenos indican los límites de las manchas; los trazos punteados corresponden a los cortes hechos en el papel para la elución.

Figura 4

Cromatograma de la fracción A1 (Ver fig.2)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

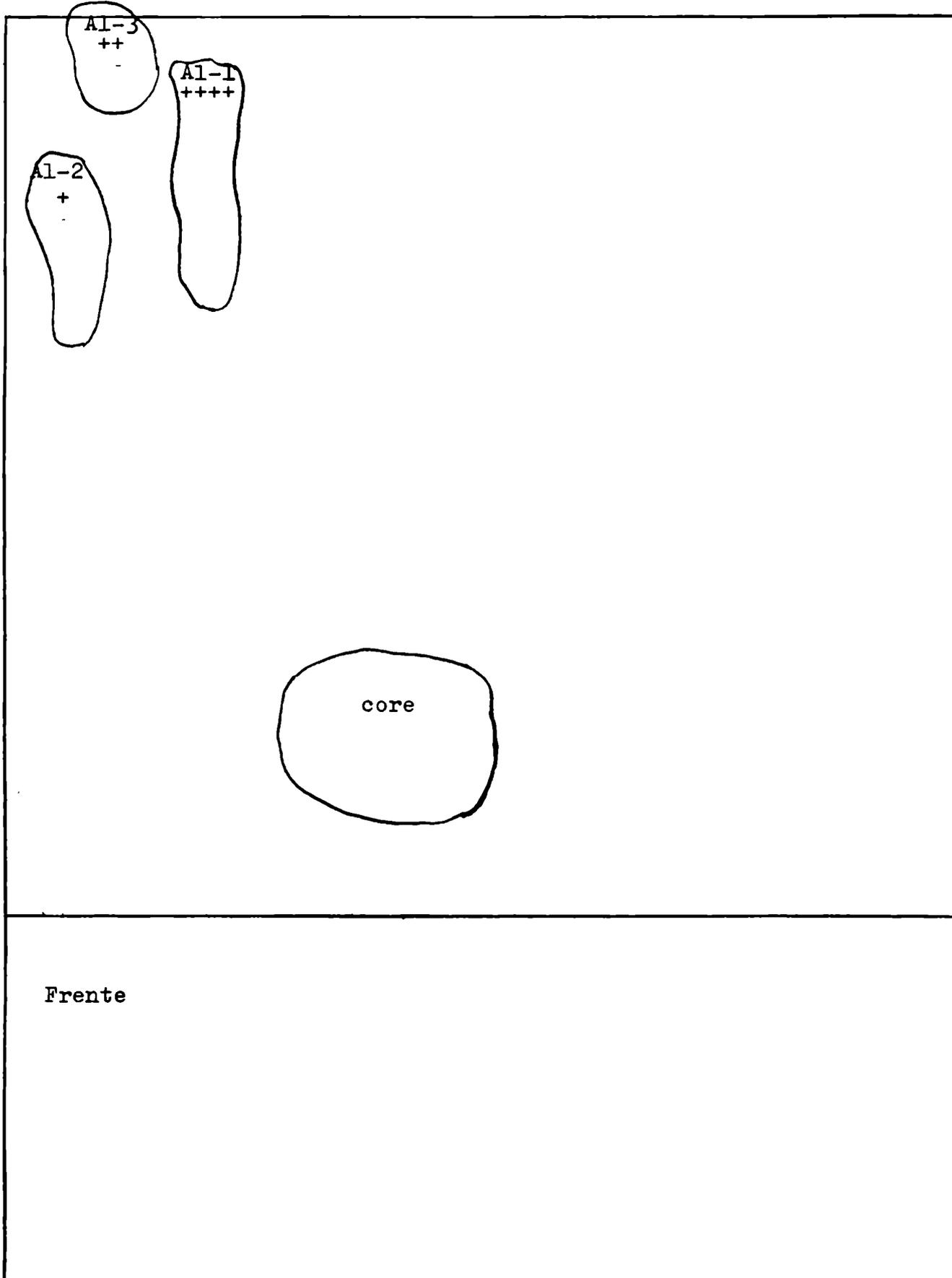
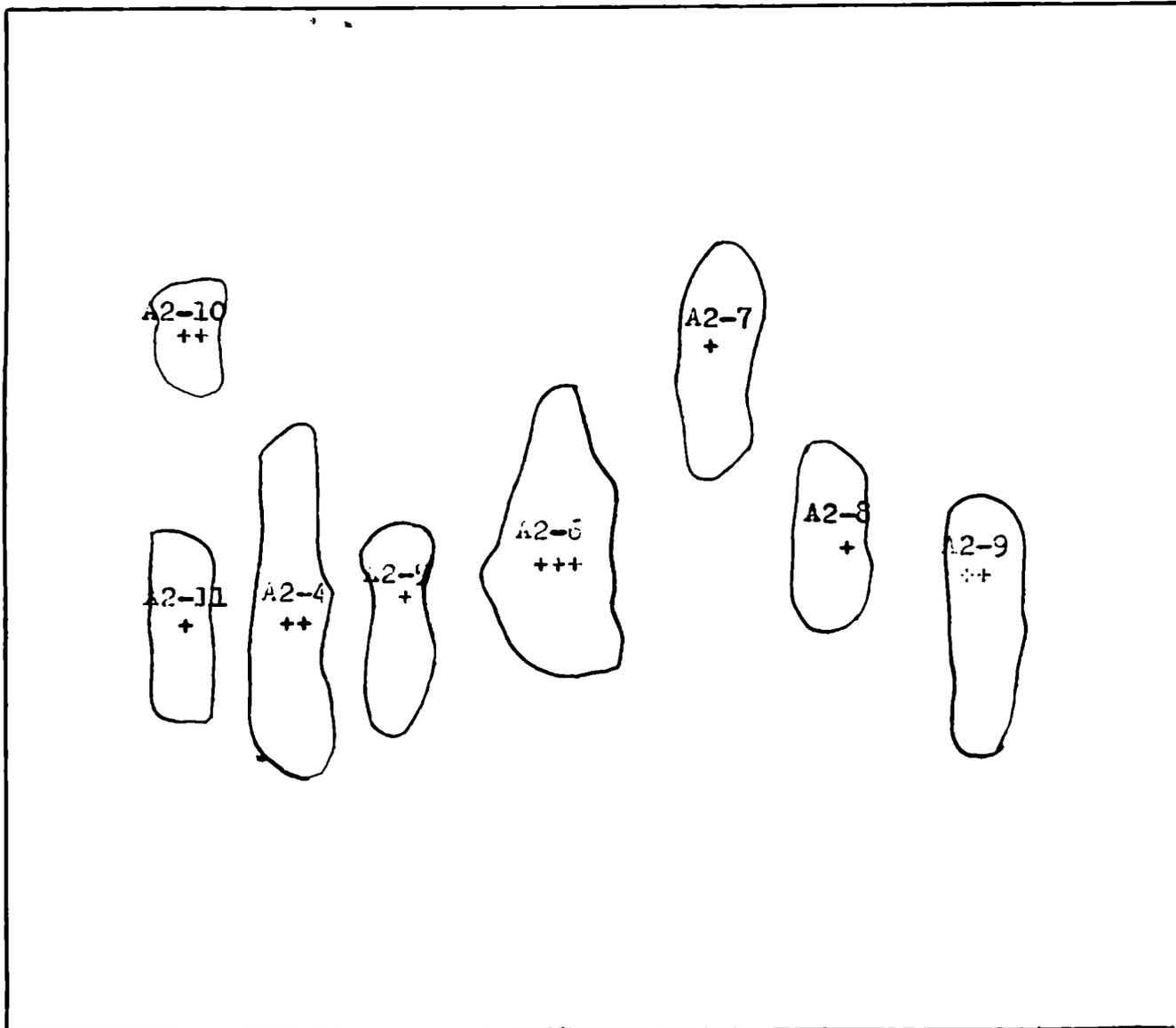


Figura 5
Cromatograma de la fracción A2 (Ver fig.2)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃



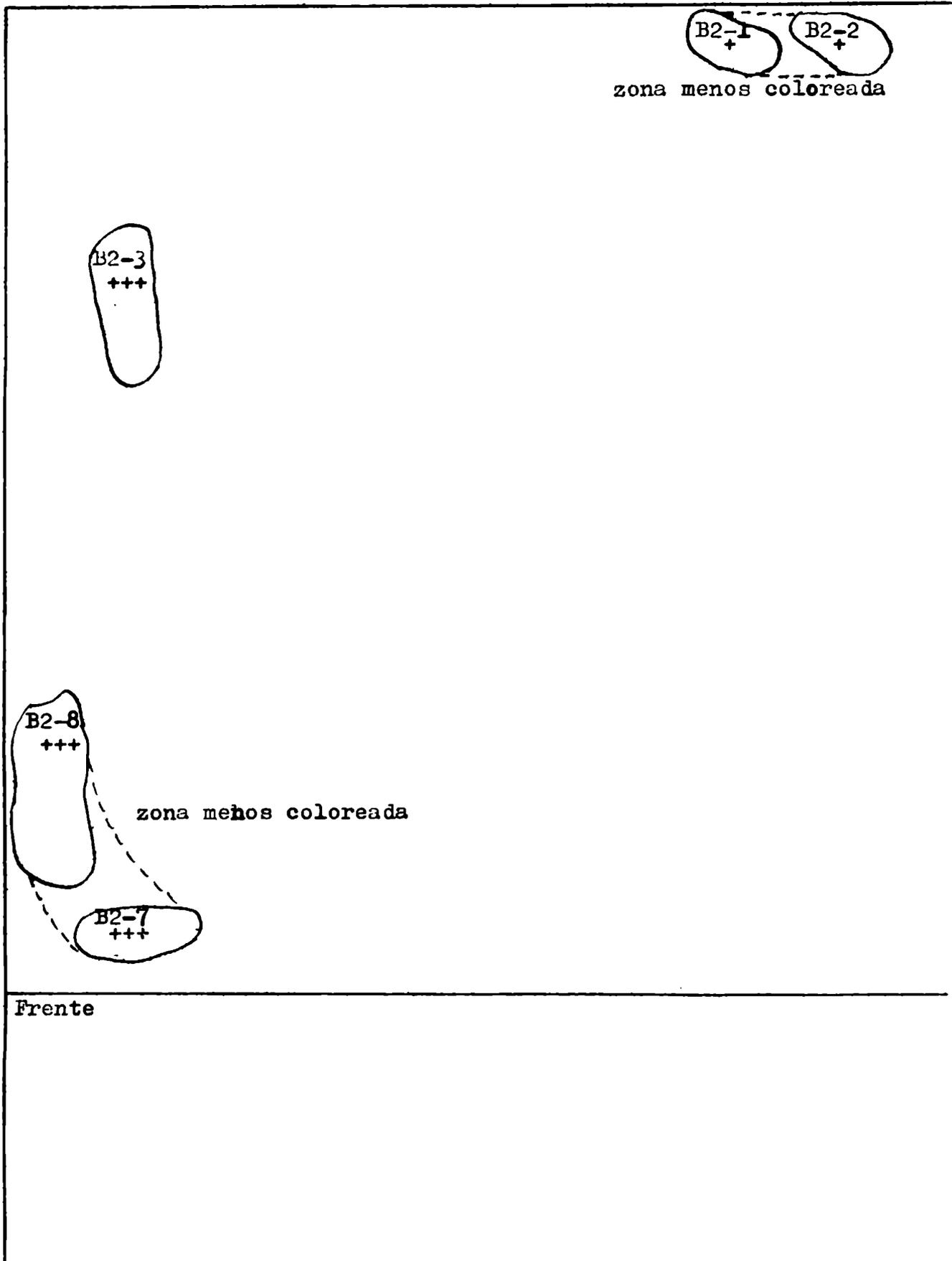
Frente

Figura 6

Cromatograma de la fracción B2 (Ver fig.3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃



B2-1
+

B2-2
+

zona menos coloreada

B2-3
+++

B2-8
+++

zona menos coloreada

B2-7
+++

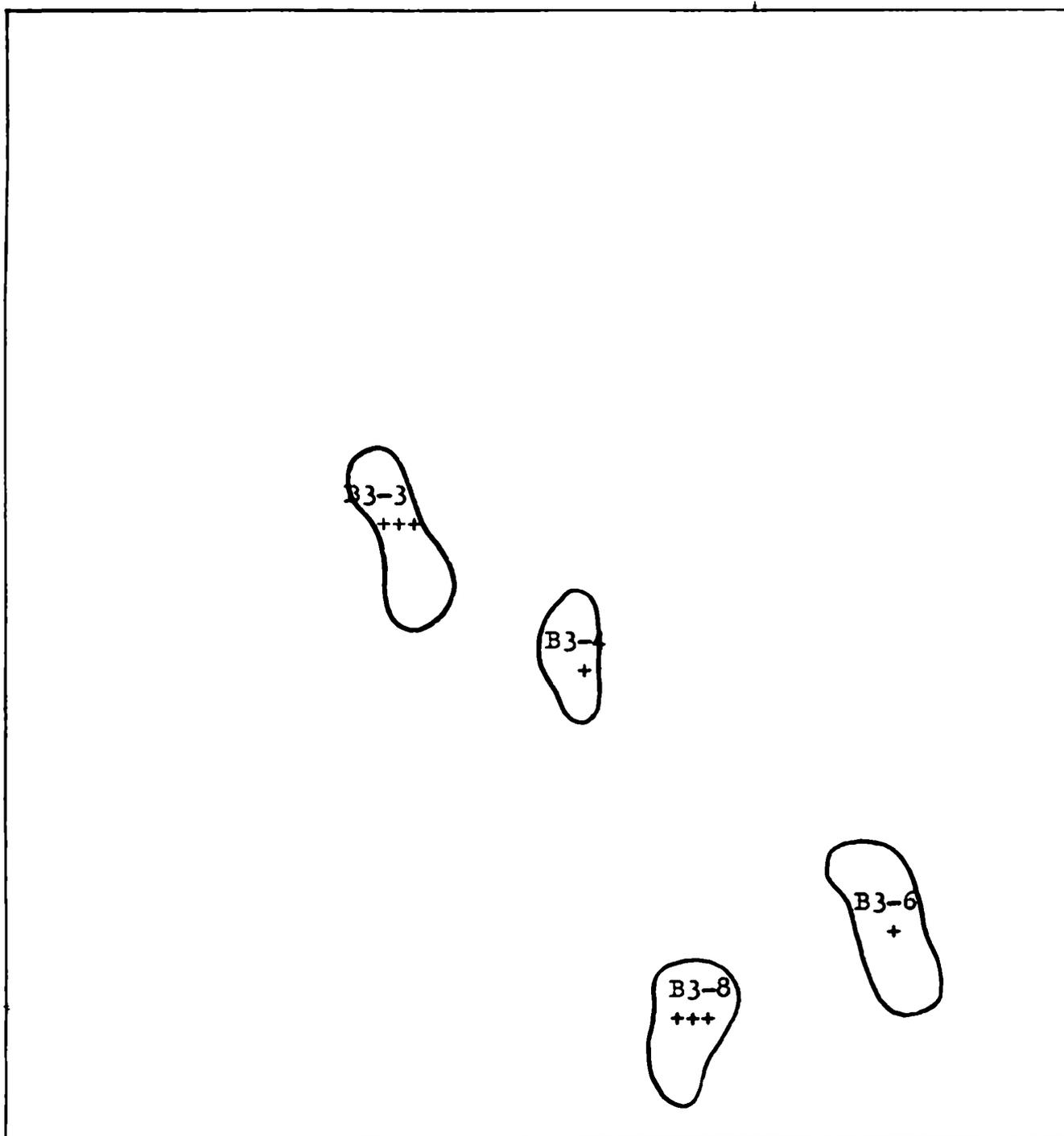
Frente

Figura 7

Cromatograma de la fracción B3 (Ver fig. 3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃



Frente

Figura 8

Cromatograma de la fracción B4 (Ver fig.3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

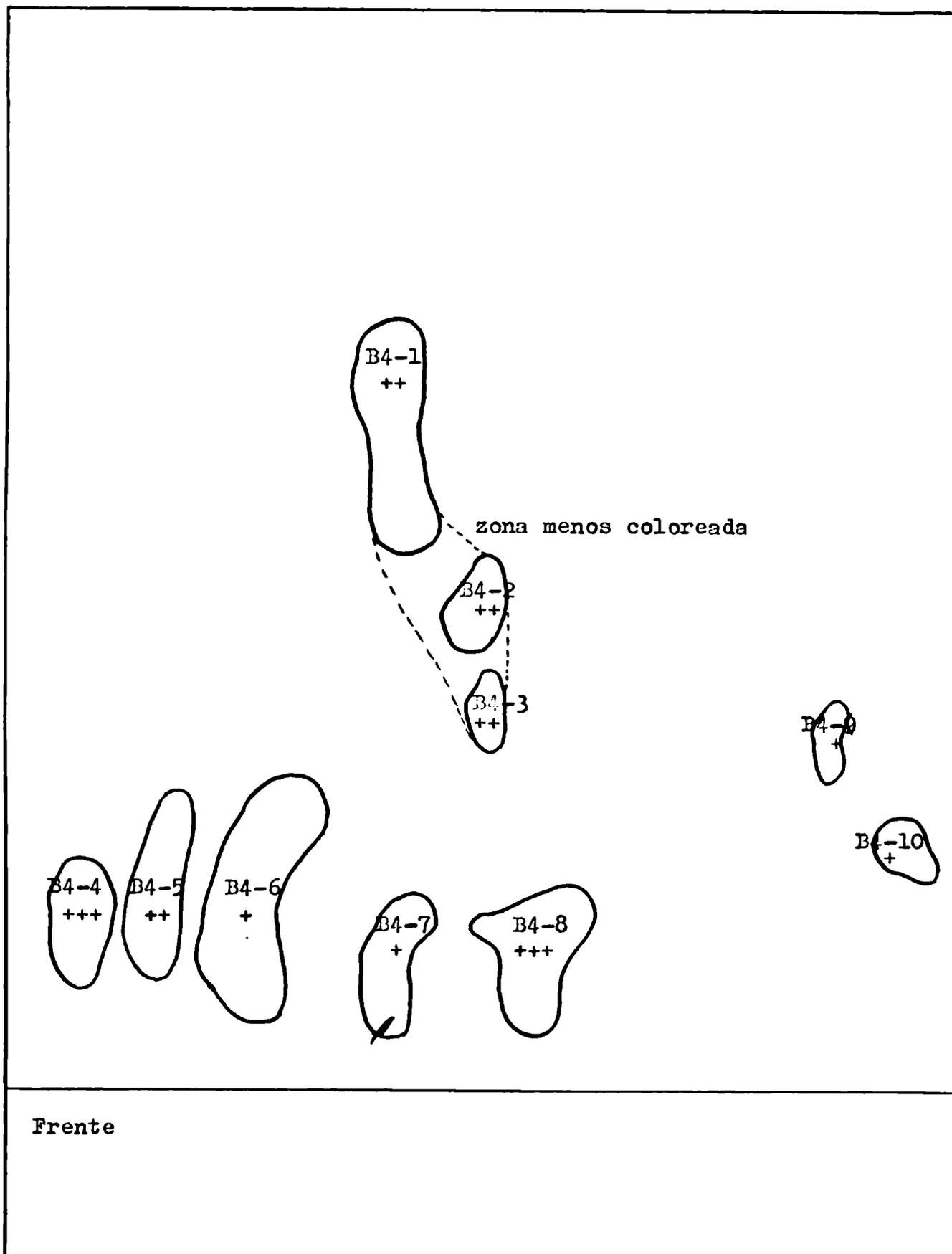


Figura 9
Cromatograma de la fracción B5 (Ver fig.3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

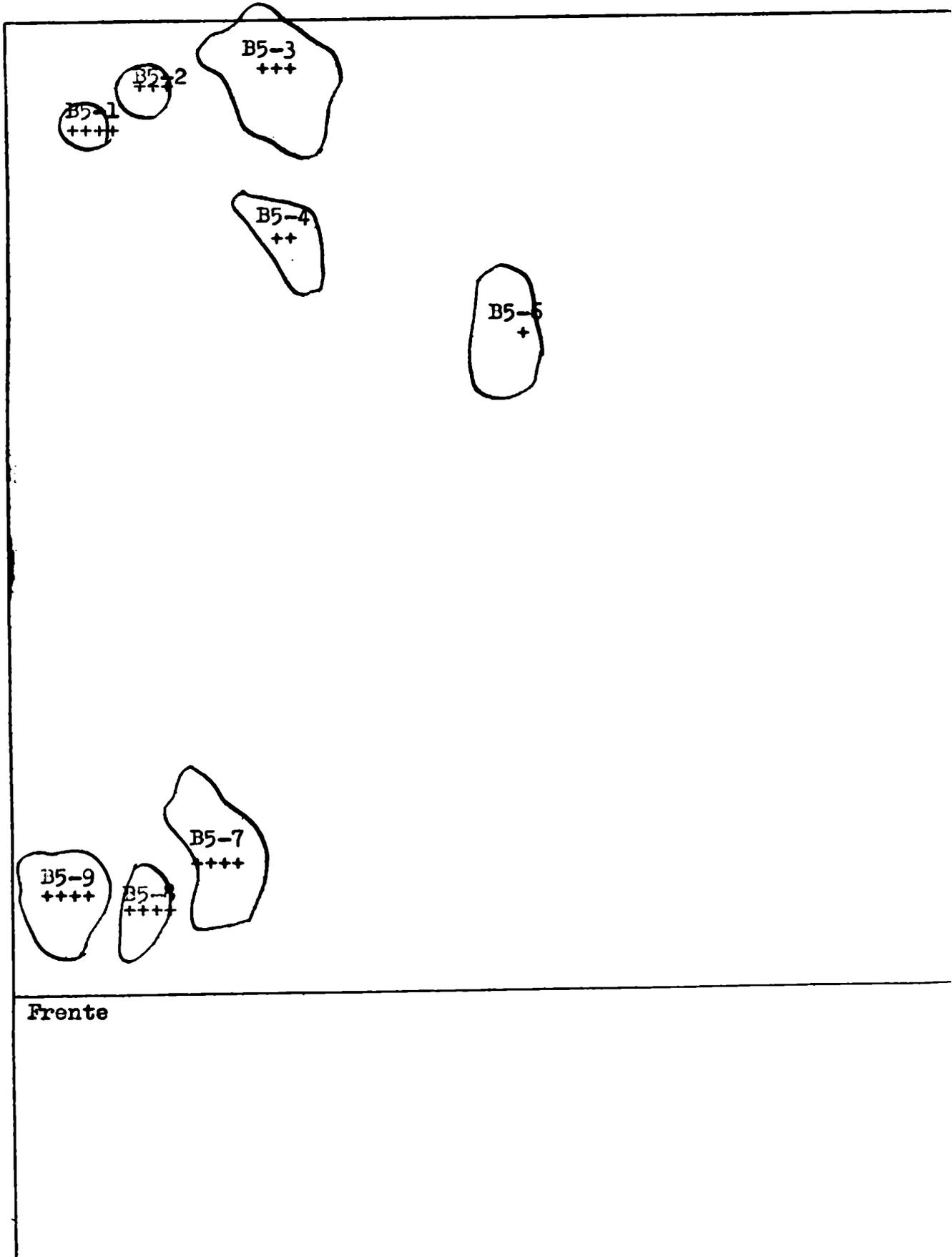


Figura 10

Cromatograma de la fracción B6 (Ver fig.3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

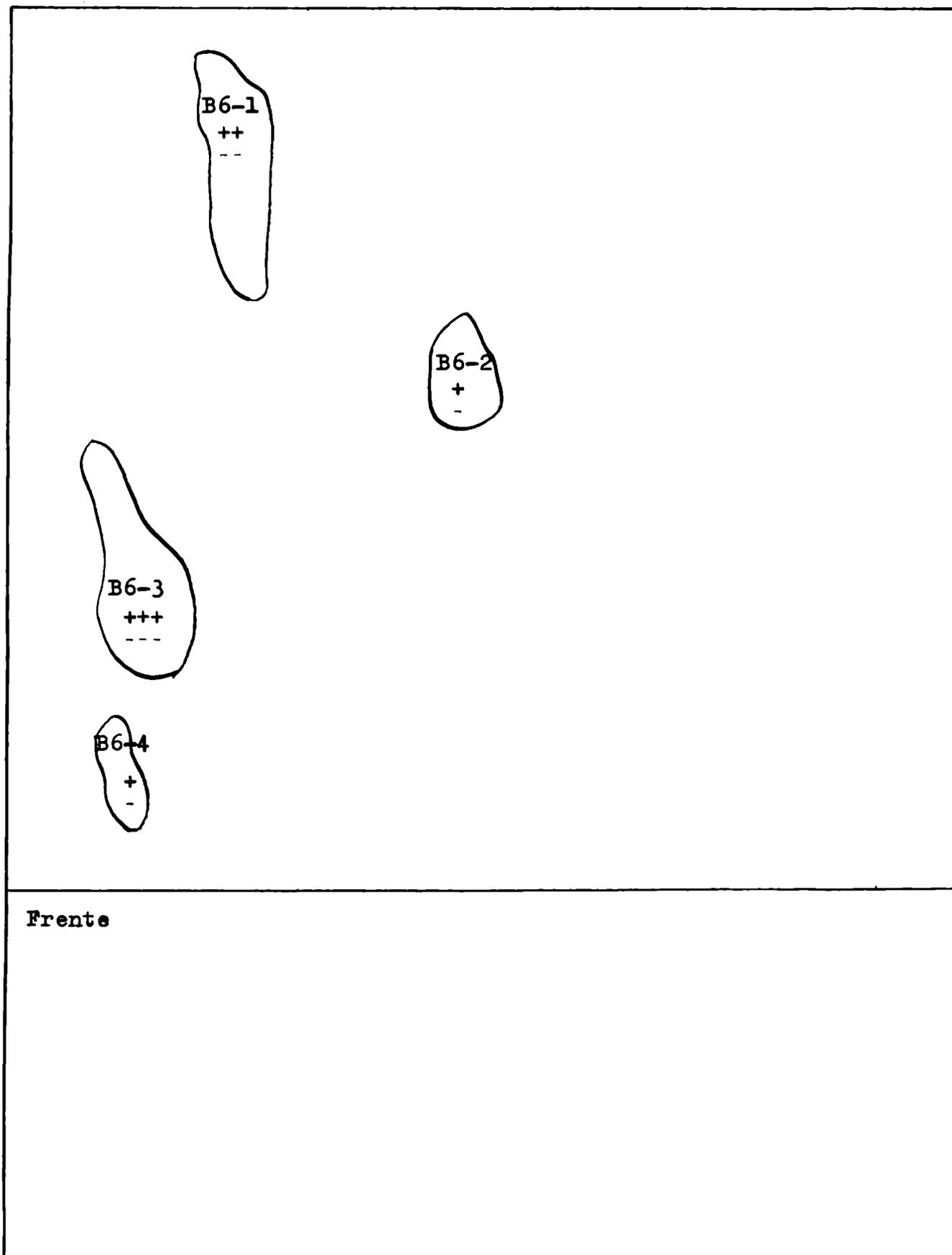


Figura 11
Cromatograma de la fracción B7 (Ver fig.3)

Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

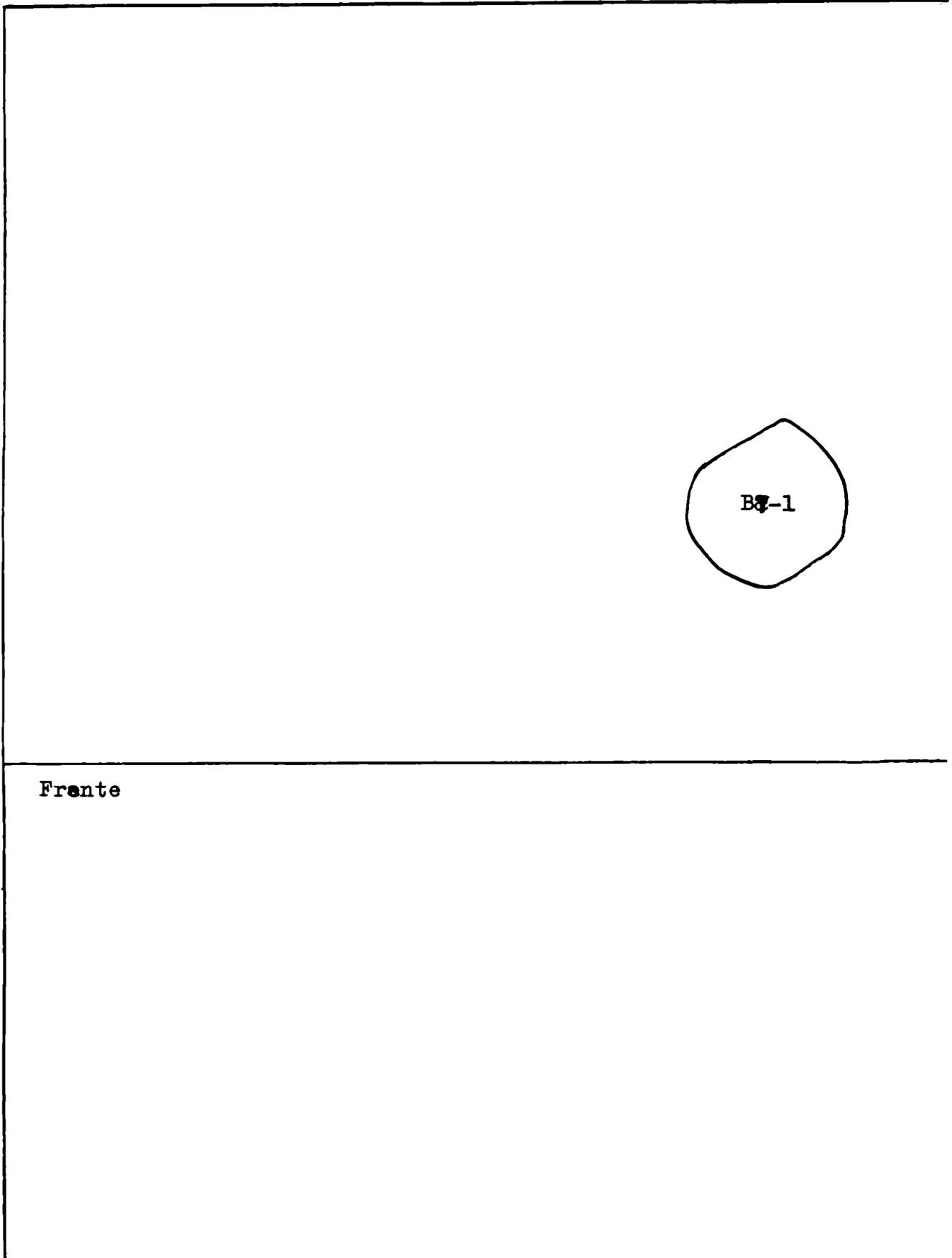
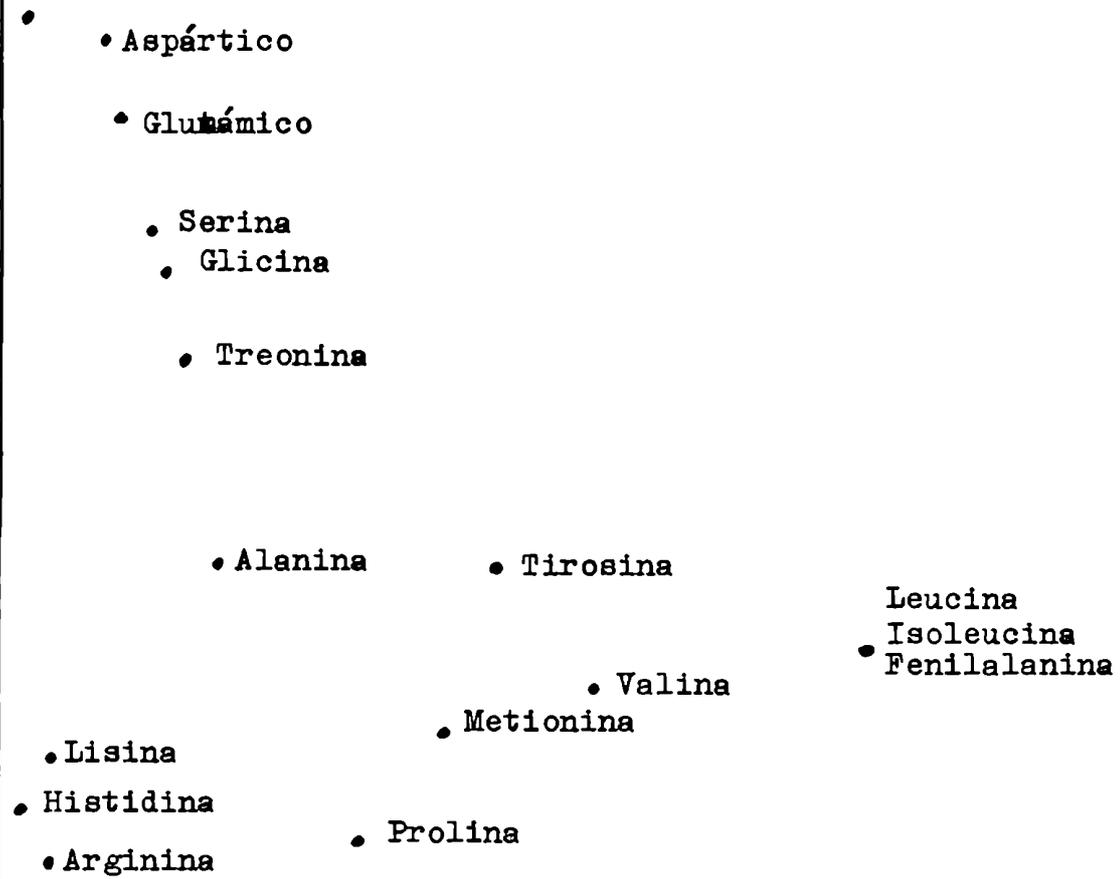


Figura 12

Cromatograma tipo de los aminoácidos presentes en el
citocromo c.
Butanol-acético (36 horas, 23°C)

Fenol
NH₃

Cisteína



Frente

Detalles de la cromatografía del hidrolizado
tripsínico en columna de Dowex-50

Composición del buffer ácido: $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,2M.....500ml
 BO_2Na 0,1N.....1000ml
 CH_3COOH glacial..... 12ml
Agua destilada hasta 2 litros

Composición del buffer alcalino: HONa 1N..... 200ml
 BO_2Na 0,1N..... 500ml
 $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ 0,2M..... 250ml
 CH_3COOH glacial..... 6ml
Agua destilada hasta 1 litro

La columna tiene 100 cm de largo por 2,5 cm de diámetro; el Dowex-50 tiene un "cross-linking" de 4%. 50 miligramos de péptidos disueltos en 2-3 ml de buffer ácido se colocan en la columna; durante la experiencia el pH se cambia de modo de obtener un gradiente continuo, mezclando en un frasco intermediario las dos soluciones por medio de un agitador magnético. Las ordenadas de la curva cromatográfica representan la densidad óptica para la reacción de la ninhidrina ejecutada según Moore y Stein (1949). Las abscisas representan fracciones sucesivas; cada fracción equivale a cinco gotas de eluato.

Figura 13 FCFNA.

Cromatografía sobre columna de Dowex 50 de un hidrolizado tripsínico de citocromo c de corazón de caballo

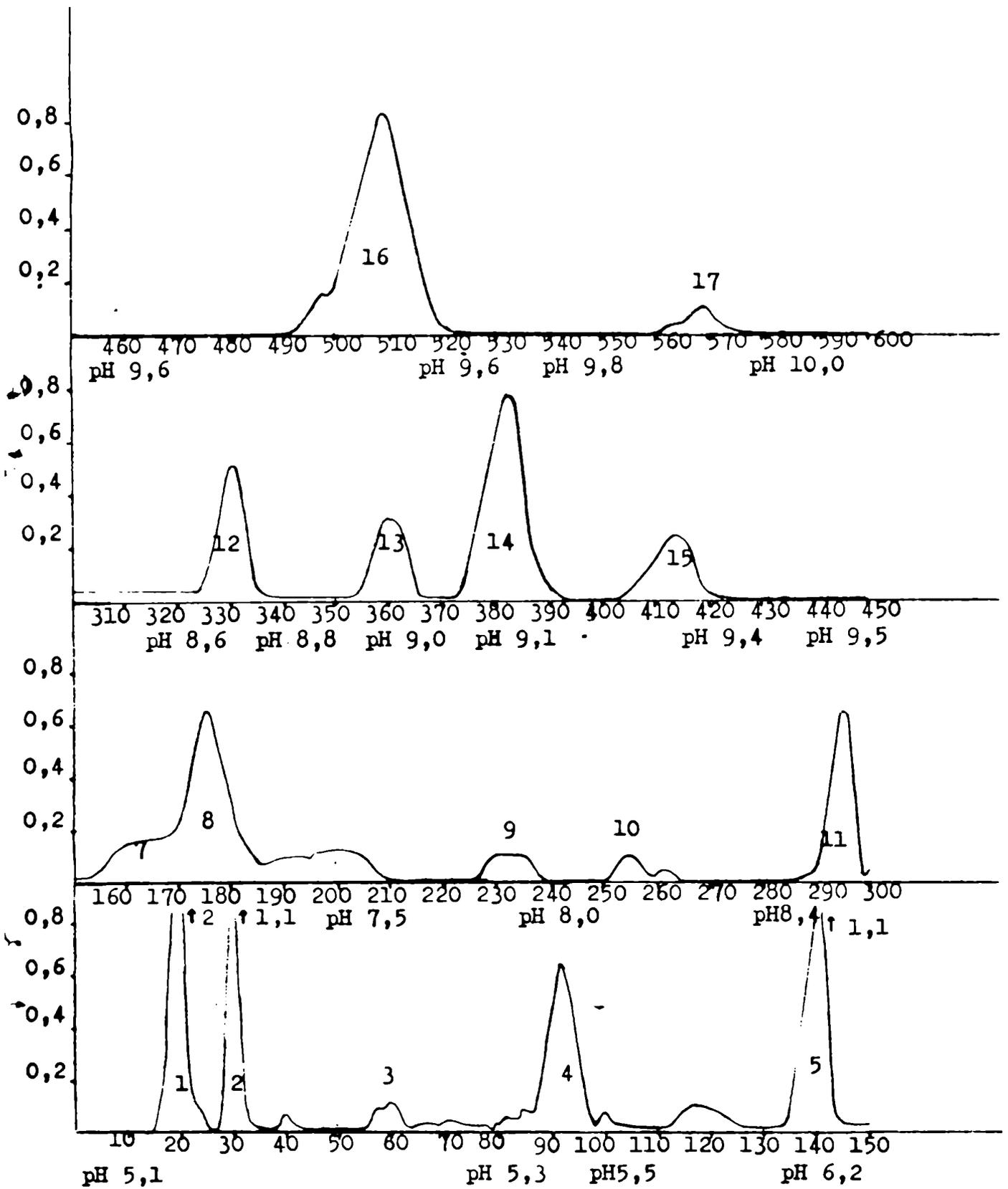


Figura 14

FOFNA

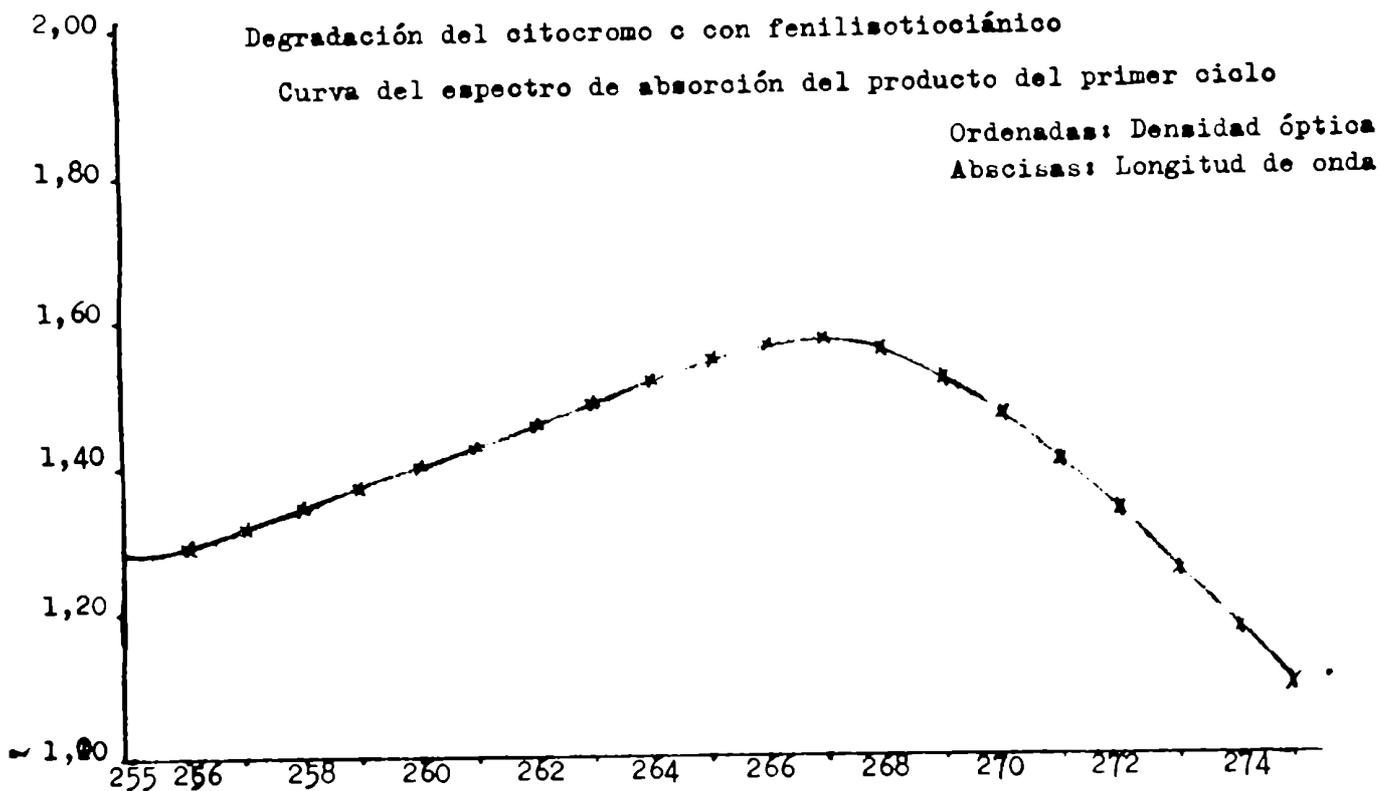


Figura 15

Curva del espectro de absorción del producto del segundo ciclo

