

UAM-I

CBI

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEINAS
DE ORIGEN VEGETAL. CRISTALIZACION DE
LA HEVEINA.

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

TESIS QUE PRESENTA

ADELA RODRIGUEZ ROMERO

PARA LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN QUIMICA

SEPTIEMBRE 1986

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

2801916

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL INSTITUTO DE
QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO Y EN EL DEPARTAMENTO DE QUIMICA
DE LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA-IZ
TAPALAPA, BAJO LA DIRECCION DEL DR. MANUEL
SORIANO GARCIA Y EL M. C. ANDRES HERNANDEZ
ARANA.

070088

AGRADECIMIENTOS

A LOS DOCTORES MANUEL SORIANO GARCIA Y
BARBARIN ARREGUIN LOZANO Y AL M. C.
ANDRES HERNANDEZ ARANA QUIERO MANIFES-
TARLES MI SINCERO AGRADECIMIENTO POR
SUS CONSEJOS, APOYO Y VALIOSA AYUDA PA
RA LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO.

I N D I C E

	Pág.
1. INTRODUCCION	1
2. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1 Materiales	6
2.2 Extracción de la proteína	6
2.3 Purificación de la heveína y criterios de pureza	7
2.4 Análisis de aminoácidos	9
2.5 Determinación del peso molecular	10
2.6 Pruebas de inhibición de papaína por heveína	11
2.7 Espectroscopía en solución	11
2.8 Cristalización	12
2.9 Montado del cristal	16
2.10 Determinación de la calidad de los monocristales	16
3. RESULTADOS Y DISCUSION	21
4. CONCLUSIONES	39
5. BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUCCION

La heveína es una proteína pequeña obtenida del sedimento del látex de *Hevea brasiliensis* (árbol del hule) centrifugado a altas velocidades y representa el 70% de la proteína soluble en agua. Este sedimento consiste principalmente de los lutoides.

Archer (1960) aisló por vez primera a esta proteína a partir del sedimento de látex liofilizado y obtuvo un producto homogéneo con un peso molecular de alrededor de 10,000 daltons. El ~~deter~~minó la composición de aminoácidos por cromatografía en papel de hidrolizados de heveína y demostró la ausencia de isoleucina, metionina y fenilalanina y un alto contenido de cisteína (16 residuos para un peso molecular de 10,000). Este autor no encontró grupos sulfhidrilo libres por lo que concluyó que la molécula de heveína contenía ocho puentes disulfuro, lo que la hacía ~~sme~~jeante a algunos inhibidores naturales. También observó que ~~esta~~ proteína en solución no es coagulada por calor.

Posteriormente dos grupos de investigación reportan otros resultados con respecto a esta proteína. Tata (1975) la purificó por cromatografía de intercambio iónico y obtuvo un peso molecular de 5,000 daltons determinado por cromatografía en capa fina. Simultáneamente Walujono y Beintema (1975) purificaron a la heveína de acuerdo a Archer y utilizaron esta preparación para determinar la secuencia de aminoácidos a partir del residuo N-terminal. La cadena polipeptídica resultante consistió de 43 aminoácidos y calcularon un peso molecular de 4729

daltons; además intentaron determinar su peso molecular utilizando una columna de Sephadex G-25, sin embargo, la heveína era retardada mucho en la columna. Beintema *et al.* sugieren que la diferencia entre los pesos moleculares obtenidos por él y Tata y el valor de 10,000 daltons obtenido por Archer puede deberse a que este último hubiera trabajado con un dímero.

Por otra parte Walujono y Beintema demuestran que esta proteína no tiene actividad inhibitoria sobre tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa, a pesar de que se asemeja a inhibidores de proteinasas en cuanto a características estructurales y localización intracelular.

A pesar de que la función de la heveína en el látex es todavía desconocida, su bajo peso molecular, su relativa abundancia y sus peculiares propiedades invitan a determinar su estructura tridimensional. El objetivo del presente trabajo es el de purificar a la heveína para obtener una preparación homogénea, y preparar cristales con la calidad adecuada para llevar a cabo la determinación de la estructura tridimensional por difracción de rayos X. La información estructural de la heveína, así como una comparación con otras proteínas de bajo peso molecular y ricas en cisteína puede ser de gran importancia para el entendimiento de su función, así como para la relación entre la secuencia de aminoácidos y la estructura terciaria. Por otra parte, también se estudiarán algunas propiedades de esta proteína en solución utilizando técnicas espectrofotométricas.

Es importante señalar que la elucidación de la estructura de una macromolécula por análisis de difracción requiere que la molécula sea aislada del organismo de interés, sea purificada a un alto grado de homogeneidad y sea cristalizada en forma adecuada para la obtención de datos. En algunos casos esta etapa puede constituir la mitad o más del tiempo y esfuerzo que se invierte en un análisis estructural. Las características esenciales que debe reunir un cristal para un estudio por difracción de rayos X son: ser únicos, tener un tamaño mayor a 0.2 mm y ser estables a la radiación de rayos X.

La cristalización de macromoléculas biológicas no es una técnica analítica, sino contiene una parte sustancial de ensayo y error. Asimismo, la cristalización es un fenómeno de equilibrio reversible, y los parámetros cinéticos y termodinámicos específicos para lograrla dependerán de las propiedades físicas y químicas del disolvente y el soluto involucrados. En general, la estrategia utilizada para inducir la cristalización de macromoléculas es llevar muy lentamente el sistema soluto-disolvente a un estado de solubilidad mínima y así alcanzar un grado limitado de supersaturación (McPherson, 1976). Esto puede ser logrado alterando gradualmente la fuerza iónica, el pH, la temperatura y las concentraciones de proteína y/o agente precipitante. Los precipitantes para cristalizar proteínas caen en tres categorías: (1) las sales, tales como el sulfato de amonio o citrato de sodio; (2) precipitantes orgánicos de volatilidad baja como el 2-metil-2,4-pentanodiol (MPD), 1-3 propanodiol y

(3) polietilenglicoles (PEG) de diversos grados de polimerización. En algunas ocasiones se añaden cantidades micromolares de sales de metales mono y divalentes, o bien cofactores e inhibidores que han demostrado ser necesarios para lograr cristales o mejorar la calidad de los mismos.

En la práctica, la búsqueda de las condiciones de supersaturación para inducir la cristalización puede ser lograda en una "micro" escala (McPherson, 1976, 1982; Blundell, 1976). Algunos métodos se han utilizado con éxito para crecer cristales de proteínas, y éstos son:

a) Diálisis. Tradicionalmente, la diálisis a través de una membrana semipermeable ha sido una técnica muy usada, aplicable a proteínas que cristalizan a fuerzas iónicas bajas. El método más favorecido es el de Zeppezauer, *et al.* (1968, 1971) que consiste en llevar a cabo una microdiálisis usando un capilar. Este método tiene la ventaja de que se requiere poco material proteico, sin embargo, es un método difícil de montar y los cristales no pueden observarse con facilidad.

b) Difusión de vapor. Este método es quizás el más popular y ha demostrado ser útil para el examen de numerosas condiciones con cantidades mínimas de proteína. Existen dos técnicas que utilizan la difusión de vapor, la de la "caja de sandwich" (McPherson, 1976; Blundell, 1976) y la de "gota suspendida" (McPherson, 1976; Wlodawer, 1975). Esta última es la más usada y consiste en suspender gotas de proteína y precipitante sobre una solución más concentrada del agente precipitante. A

medida que el vapor difunde de la gota al recipiente inferior, la solución proteica se concentra al punto de supersaturación. Con esta técnica pueden probarse alrededor de 20 condiciones diferentes con sólo 1 mg de proteína.

c) Cristalización por concentración. Este método se utiliza poco y consiste en concentrar gradualmente la solución de proteína para producir cristales (Camerman, *et al.* 1969).

d) Cristalización por variación de temperatura. Este es otro procedimiento poco utilizado en donde se disminuye la solubilidad de la proteína por aumento o disminución gradual de la temperatura (Baker, *et al.* 1970).

Una vez que se ha obtenido un cristal adecuado, es necesario llevar a cabo un análisis preliminar de la calidad del mismo, esto puede realizarse, ya sea por métodos fotográficos o mediante el uso del difractómetro automático. Si se utiliza una cámara de precesión, los rayos X dispersados por el cristal inciden sobre una placa fotográfica colocada detrás de él. Las manchas en la fotografía forman una red bidimensional, existiendo una marcada simetría en los cuatro cuadrantes de la misma. A partir de una serie de fotografías se puede determinar la calidad del cristal, obtener las longitudes y ángulos de la celda unitaria y junto con las medidas de las intensidades es posible establecer la estructura tridimensional de la macromolécula.

La calidad de los cristales es un factor muy importante para obtener datos de intensidades (amplitudes) con buena resolución.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiales

Látex de *Hevea brasiliensis*. Este fue colectado de varios individuos de los clones HV-42 y IAN-710, del Campo Experimental "El Palmar" (CAEPAL), situado en el municipio de Tezónapa, Ver. El látex se recolectó en frascos de plástico y se transportó al laboratorio en un refrigerador con hielo. Allí se centrifugó en una ultracentrífuga Beckman L-2-HV a 70,000 g durante 50 min y el sedimento fue inmediatamente almacenado a -20°C .

Reactivos. Todos los reactivos y disolventes utilizados fueron de grado analítico.

2.2 Extracción de la proteína

Los pasos experimentales subsecuentes se llevaron a cabo a 4°C y las condiciones de centrifugación fueron, en todos los casos, las siguientes: 20,000 rpm, 20 min a 10°C .

El sedimento del látex de *Hevea* congelado fue homogeneizado en una solución de NaCl 0.1 M en una proporción de 1g: 30 ml de solución a 4°C por 3 min en un homogeneizador Ultra-Turrax. Después de centrifugar, el sedimento fue nuevamente homogeneizado con otra porción de la misma solución y centrifugado. Los sobrenadantes fueron combinados, se ajustó el pH a 6.0 (Archer, 1960) y se llevó a cabo una precipitación fraccionada con sulfato de amonio sólido. Primero, la saturación se

llevó a 65% (para eliminar otras proteínas presentes en el sedimento), y se almacenó a 4° C durante 12 hrs. Después de centrifugar, el sedimento se desechó y la heveína se precipitó del sobrenadante elevando la saturación a 100% con más sulfato de amonio. Este precipitado, después de separado por centrifugación, fue redissuelto en una solución de sulfato de amonio al 65%, eliminándose el material insoluble. El sobrenadante nuevamente se llevó a saturación del 100%, dejándolo en reposo 12 h a 4° C. La heveína precipitada y separada por centrifugación fue disuelta en regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.0.

2.3 Purificación de la heveína y criterios de pureza.

a) Cromatografía por filtración en gel

Esta se llevó a cabo en un refrigerador Minicold Lab a 6° C, contándose con un colector de fracciones Ultrorac II, una bomba peristáltica Varioperpex, un monitor de absorbancia con filtro para 280 nm, Unicord S y un registrador de doble canal, todo marca LKB.

La solución de proteína fue aplicada a una columna de Ultrogel ACA 54 (LKB) (77 x 1.6 cm) equilibrada con regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.0. La velocidad de flujo se ajustó a 10 ml/h, registrándose la absorbancia a 280 nm y colectándose fracciones de 5 ml.

La fracción correspondiente a la heveína fue recirculada en la misma columna.

b) Desalinización de la muestra

Se llevó a cabo utilizando una columna de Sephadex G-10 (Pharmacia) (88 x 1.4 cm) utilizando agua como eluyente.

c) Concentración de la muestra

La fracción conteniendo a la heveína fue concentrada por liofilización o por ultrafiltración utilizando el miniconcentrador Amicon modelo 8MC, con membrana YM-2 (retiene moléculas con peso molecular mayor a 1000 daltons).

La concentración de proteína fue medida por absorción a 280 nm usando un coeficiente de extinción $\epsilon_{1\%}^{1\text{cm}} = 2.56$ (Archer, 1960).

d) Electroforesis en gel de poliacrilamida - SDS

En general, el procedimiento utilizado fue el presentado en la nota de aplicación No. 306 de LKB. La separación de la proteína fue llevada a cabo en geles de poliacrilamida al 10% en placas horizontales.

La muestra para electroforesis se preparó de la siguiente manera: a 200 μl de la solución protéica (2 mg/ml) se le adicionó un volumen igual de regulador de fosfatos 0.01 M pH 7.1 conteniendo mercaptoetanol al 1% y SDS al 0.1%, esta solución se incubó a 98° C en baño maría durante 2 min, se enfrió y se le añadieron 10 μl de azul de bromofenol como marcador del frente.

Antes de colocar las muestras se llevó a cabo una preelectroforesis a 5° C, 150 mA durante 30 min, después de co-

locar las muestras se ajustó la corriente a 190 mA y se efectuó la electroforesis en 4 h a 5° C. Los geles se tiñeron de acuerdo al método de Blakesley, *et al.* (1977), utilizando una solución de azul de Coomasie G-250 al 0.2% P/V en H₂SO₄ 2N, 1/9 volumen de KOH 10 N y ácido tricloroacético al 12% P/V, durante 8 h y se conservaron en agua.

e) Cromatografía de Intercambio Iónico de Alta Resolución

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Marca Varian Modelo 5020 B y una columna TSK-CM-35 W (7.5 x 75 mm) equilibrada con regulador de fosfatos 0.1 M ph 7.0. El volumen de inyección fue de 10 µl de una solución de heveína de 10 mg/ml. Para la elución de la muestra se usó un gradiente de NaCl de 0 a 1.0 M en el mismo Regulador. La velocidad de flujo se ajustó a 0.5 ml/min, detectándose las fracciones por absorción a 280 nm.

2.4 Análisis de Aminoácidos

La composición de aminoácidos fue determinada después de la hidrólisis ácida en HCl 6M a 110° C durante 20 y 48 hrs. (Moore, *et al.* 1963), y 20 hrs. en ácido per fórmico 4 N para la determinación de cisteína, como ácido cistéico. También se llevó a cabo un hidrólisis a 20 hrs. con ácido metanosulfónico 4N a 110° C, para la determinación de Triptofano (Simpson, *et al.* 1976). El análisis se realizó en un analizador de aminoácidos Durrum Modelo 5000. Se hicieron correcciones por destrucción parcial de hidroxiaminoácidos.

2.5 Determinación del Peso Molecular

a) Filtración en gel

Este método fue descrito por Andrews (1965). La determinación se llevó a cabo en una columna de Sephadex G-50 (94.5 x 1 cm), equilibrada con regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.0 y 0.1 M de NaCl. Se utilizaron marcadores de bajo peso molecular (3,500 a 14,000 daltons) de Sigma. La elución se llevó a cabo a una velocidad de 3.1 ml/h y se colectaron fracciones de 3.3 ml.

b) Filtración en gel usando clorhidrato de guanidina 6M (Fish, *et al.* 1969).

Se preparó una columna de Sephadex G-50 superfino (94.3 x 1 cm) la cual se equilibró con guanidina 6M en regulador de fosfatos 0.05 M pH 7.0. Tanto la heveína como las proteínas tipo de bajo peso molecular fueron disueltas a una concentración del 1%, en guanidina 6M y mercaptoetanol 0.1 M, ajustando el pH a 8.6. Las muestras permanecieron bajo estas condiciones reductoras 18 hrs a 25° C. Posteriormente se llevó a cabo una carboximetilación de los grupos sulfhidrilos reducidos por adición de yodoacetamida al 0.15 M ajustando el pH a 8.6 con NaOH 5M. Esta reacción se completó en 1 h a temperatura ambiente. El volumen total fue en todos los casos de 0.5 ml. En la misma columna y bajo condiciones idénticas primero se realizó la curva de calibración con las proteínas tipo y posteriormente se llevó a cabo la elución de la heveína.

La velocidad de flujo se ajustó a 2.5 ml/h y se colectaron fracciones de 1.7 ml, registrándose la absorción a 280 nm.

2.6 Pruebas de inhibición de papaína por heveína

Se utilizó papaína de Sigma 2 veces cristalizada como proteinasa a inhibir, siguiéndose el método de Kunitz modificado (Del Castillo, *et al.* 1966) para determinar la actividad proteolítica. Este método consistió en añadir 0.1 ml de la solución enzimática sola y en presencia de heveína en concentraciones equimolares (1.02×10^{-4} moles/l) a 1.9 ml de caseína tipo Hammers-ten al 1% en regulador de fosfatos 0.05M pH 7.6. La reacción se llevó a cabo a 35 °C durante 20 min, después de los cuales se añadieron 3 ml de ácido tricloroacético al 5% y se centrifugó a 2000 rpm 30 min. La actividad se expresa como la diferencia de absorción entre el problema y el testigo, el cual se preparó agregando la solución enzimática después del ácido tricloroacético.

2.7 Espectroscopia en solución

a) Se determinó el espectro de absorción de la heveína pura disuelta en agua, a una concentración de 0.086 mg/ml, de 400 nm a 250 nm usando un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552.

b) Espectro diferencial por efecto de la temperatura

Este espectro (320 - 250 nm) fue obtenido en un espectrofotómetro Varian modelo DMS - 80 equipado con chaquetas térmicas para las celdas. La temperatura de las celdas de referencia y muestra podían ser controladas en forma independiente mediante el uso de baños circulantes separados.

La solución de heveína (0.1 mg/ml) en regulador de glicina pH 2.6 fue filtrada a través de membranas de Millipore, y se colocaron 3 ml de esta solución en ambas celdas. La línea base del espectro diferencial, esto es el espectro de las 2 soluciones a la misma temperatura (15.2° C), fue obtenida y restada de los espectros subsecuentes.

La temperatura de la celda de referencia se mantuvo constante a 15.2° C durante el experimento y la de la celda de muestra se elevó a 77.2° C con incrementos de 3 ó 4° C, permitiendo que se alcanzará el equilibrio a cada temperatura antes de obtener el correspondiente espectro diferencial.

2.8 Cristalización

Se utilizó el método de difusión de vapor de gota suspendida (McPherson, 1976, 1982). Para las pruebas preliminares se utilizaron cajas de Petri, cuyas tapas, ligeramente engrasadas con grasa de silicones, fueron usadas para colocar las gotas de la muestra; al colocar las tapas sobre los recipientes, estas gotas quedaron suspendidas, Fig. 1. En estos experimentos iniciales se probaron los siguientes agentes precipitantes: 2-metil-2, 4-pentanodiol (MPD) en regulador de Tris 40 mM, pH 8 y MES 40 mM, pH 6.0; PEG 6000 en regulador de Tris 40 mM pH 8.0, sulfato de amonio y algunas sales como LiCl, NaCl, KCl, CaCl₂, CdCl₂ y MgCl₂.

Posteriormente para las pruebas más finas se siguió el siguiente procedimiento: se usaron cajas tipo Linbro, Fig. 2, con 20 "pozos" ó recipientes individuales (ø 2.0 cm y 1.5 cm de

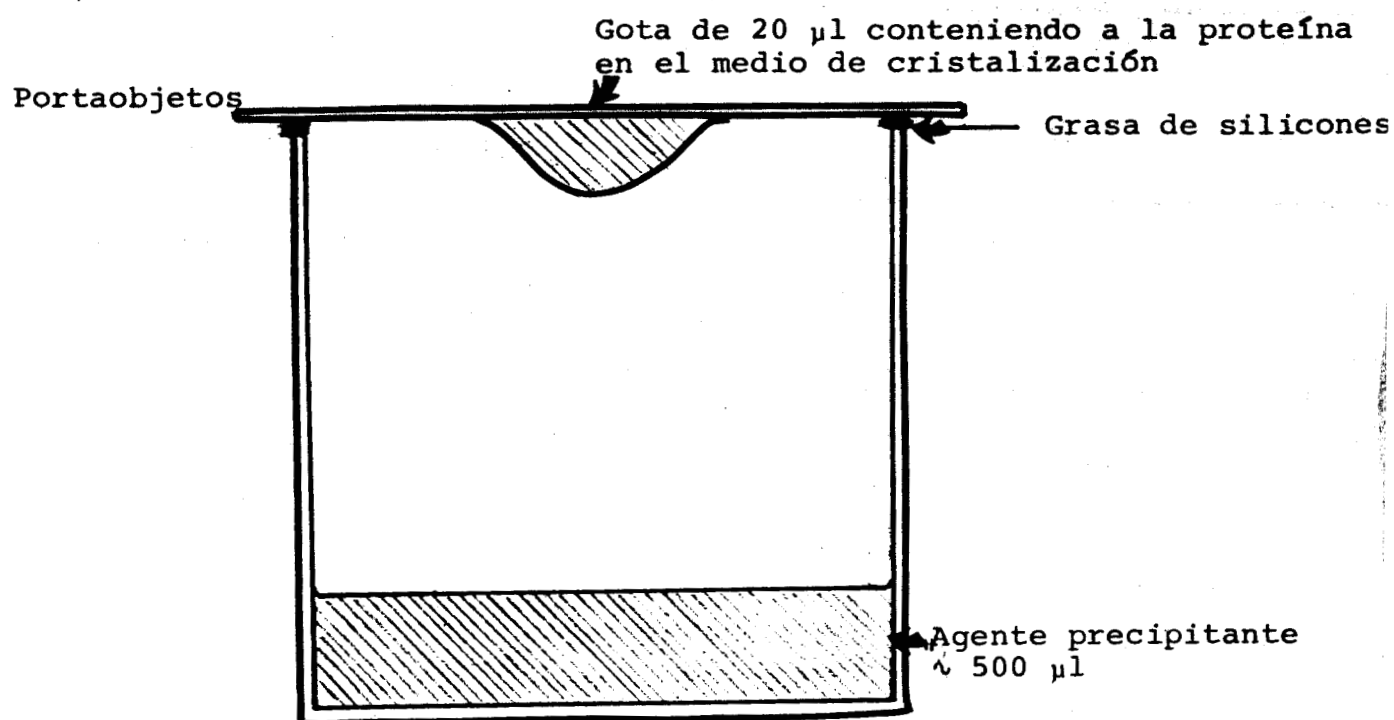


Figura 1. Recipiente para cristalizar proteínas por difusión de vapor en microescala. Técnica de gota suspendida.

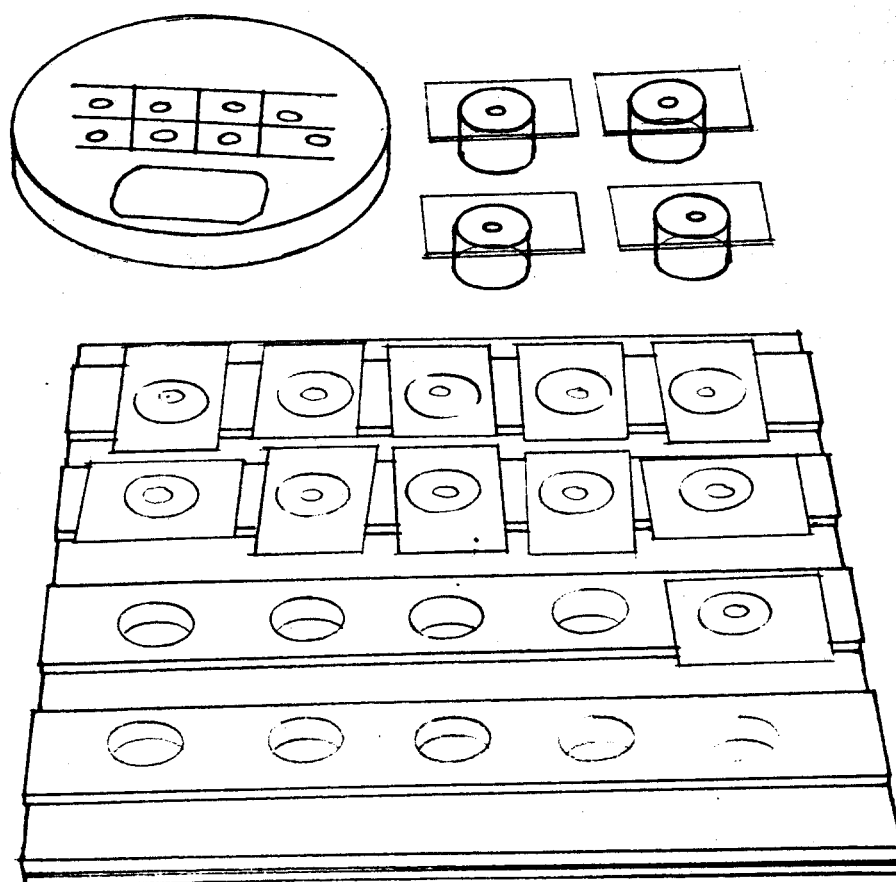


Figura 2. Recipientes utilizados para cristalizar proteínas por el método de difusión de vapor de gota suspendida.

altura). Como tapas se usaron portaobjetos ligeramente engrasados con grasa de silicones. Se aplicó grasa en los bordes de los "pozos" y recipientes y se colocó 1 ml de la solución precipitante apropiada en cada uno. Posteriormente, sobre el portaobjetos engrasado se colocaron 10 μ l de la solución de proteína, en concentración de 5-20 mg/ml, previamente centrifugada para eliminar cualquier partícula de polvo. Entonces se invirtió el portaobjetos sobre el recipiente adecuado sellando con la grasa de silicones. Finalmente se almacenaron los recipientes en un refrigerador a 6° C.

Los agentes precipitantes en estos casos fueron :

- a) MPD desde 35-60% con intervalos de 5% en regulador de Tris 40 mM pH 8.06.
- b) MPD desde 35-60% en regulador Tris 40 mM pH 8.06 y LiCl 0.1 M.
- c) MPD desde 35-60% en regulador Tris 40 mM pH 8.06 y CaCl_2 0.1 M.
- d) MPD desde 35-60% en regulador Tris 40 mM pH 8.06 y NaCl 0.1 M.

Las gotas fueron equilibradas contra las correspondientes soluciones precipitantes, pero usando NaCl 0.2 M en todos los casos.

La formación de los cristales en las gotas y su crecimiento se observó al microscopio polarizado a intervalos de tiempo.

2.9 Montado del Cristal

Se utilizaron capilares de vidrio Mark-Röhrchen de 0.5 y 0.7 mm de diámetro, los cuales se sumergieron en solución diluida de HCl toda la noche, posteriormente se enjuagaron y secaron.

El cristal seleccionado en alguna gota se succionó conectando una manguera de Tygon en el extremo ancho del capilar. Después se eliminó el exceso de líquido del capilar usando papel filtro recortado finamente; estas operaciones se realizaron bajo el microscopio polarizado. En un extremo se dejó un poco del líquido madre para evitar que el cristal se secara. Finalmente se cortó el capilar a una longitud de 1.5-2.0 cm y se sellaron ambos extremos, primero con grasa de silicones y después con cera dental.

2.10 Determinación de la Calidad de los Monocristales

El capilar conteniendo el cristal de heveína adecuado se colocó en un alfiler metálico y después en una cabeza de goniómetro y éste a su vez en un difractómetro de rayos X automático de cuatro círculos (2θ , w , ϕ , x) Figura 3, con radiación monocromática de $\text{CuK}\alpha$, con un filtro de Ni y equipado con un detector de área, Figura 4.

Dentro de los métodos experimentales que se utilizan para obtener un diagrama de difracción, se encuentran los métodos fotográficos y difractométricos. Los métodos fotográficos, particularmente el de precesión, nos proporciona toda la infor-

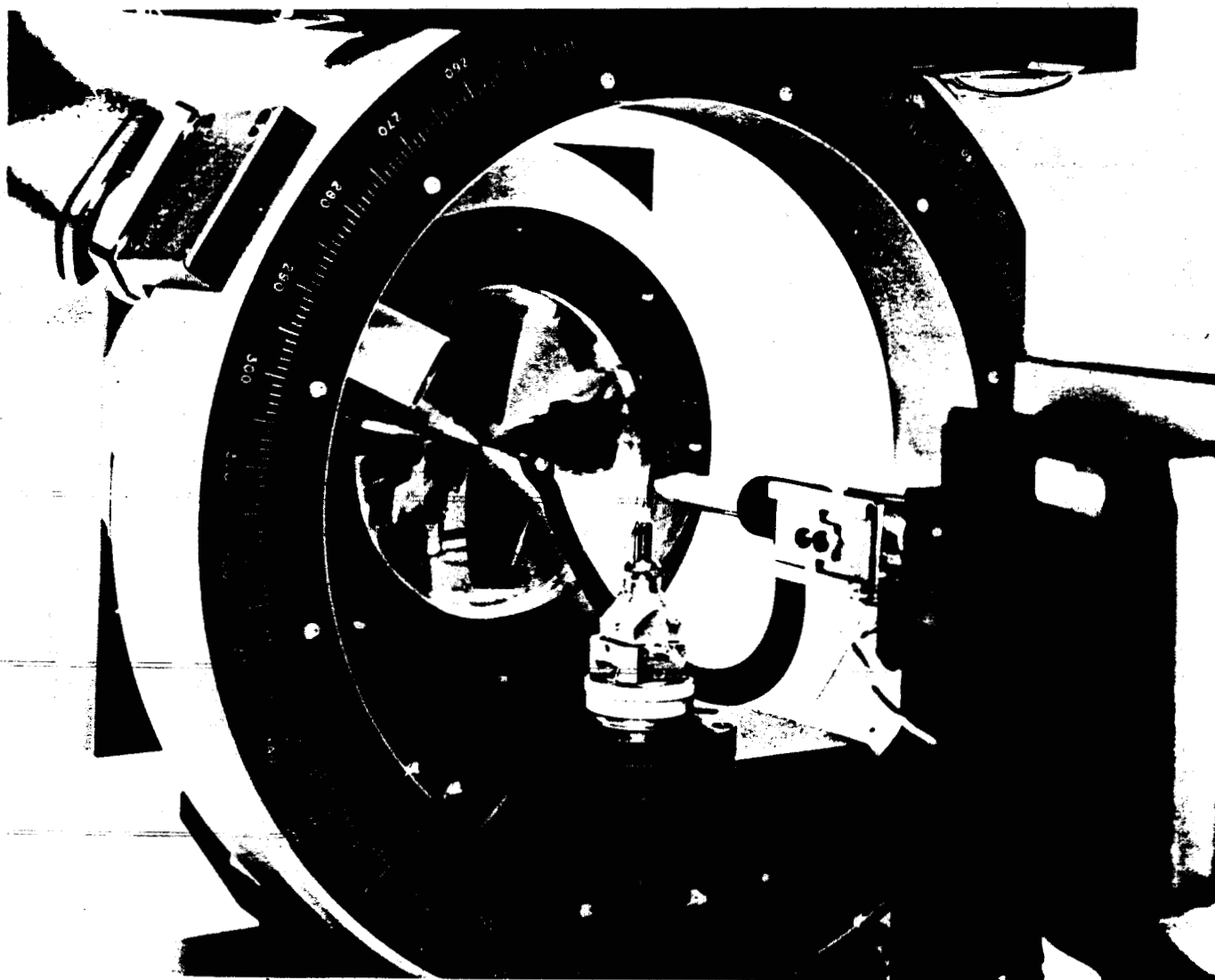


Figura 3. Difractómetro de cuatro círculos equipado con detector de área

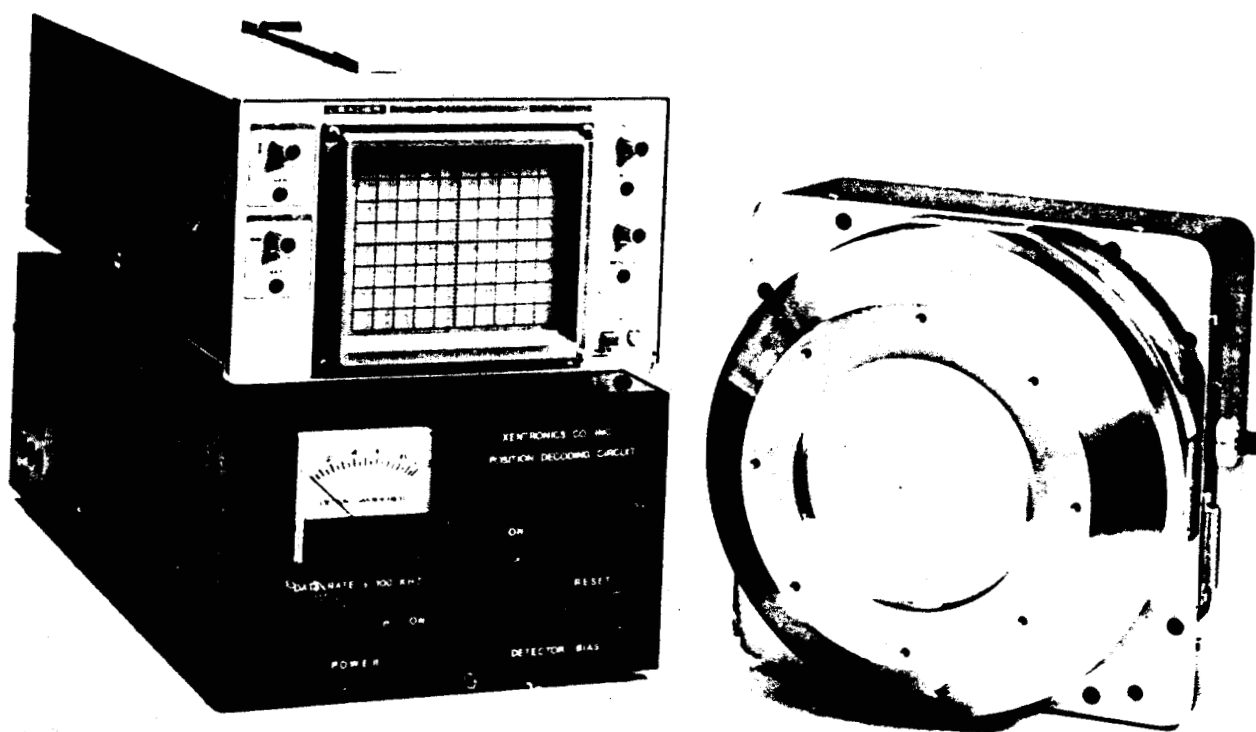


Figura 4. Osciloscopio y detector de área

nación necesaria para la determinación del sistema cristalino, dimensiones de la celda unitaria, grupo espacial y establecer el contenido electrónico de la celda unitaria. Desafortunadamente, los métodos fotográficos requieren de tiempos de exposición de la muestra a la radiación muy prolongados (~ 24 hrs), con la consecuencia de un daño muy grande en los cristales. Los métodos difractométricos tienen una mayor precisión en las medidas de las intensidades, pero la desventaja de poder medir solamente una reflexión en un tiempo dado.

En el detector de área (Cork *et al*, 1974) se han conjuntado las excelencias de ambos métodos fotográficos y difractométricos e incorporando un densitómetro, obteniéndose en esta forma, un dispositivo fotográfico electrónico (Figura 4).

La utilidad del detector de área en la determinación de la estructura tridimensional de macromoléculas frente a los métodos convencionales es la de poder medir un mayor número de intensidades en tiempos cortos de exposición, sin causar daño a los cristales. Además, este método nos permite medir celdas unitarias de gran tamaño $100 \sim 150 \text{ \AA}$ sin dificultad alguna.

Los cristales de proteínas tienen celdas unitarias grandes, existe un desorden molecular en el cristal debido a su alto contenido de moléculas de agua dentro de la celda unitaria, decaen con relativa facilidad cuando son irradiados con rayos X y finalmente dispersan la radiación de rayos X débilmente. Debido a estas características especiales de los cristales de proteína, se recomienda que toda la información necesaria para la

determinación de la estructura tridimensional se obtenga de inmediato.

Una vez montada la cabeza de goniómetro dentro del equipo de difracción se procedió a alinear ópticamente el cristal de heveína, de tal forma que fuera bañado en su totalidad por la radiación, independientemente de su orientación; esto se realizó con la ayuda de un microscopio graduado. La distancia entre el detector y el cristal fue de 10 cm de longitud, en donde se obtuvo el mayor número y la mayor intensidad de los rayos difractados por el cristal. El cristal de heveína fue irradiado con radiación Cu K α , durante 3-5 min y se obtuvo una fotografía del diagrama de difracción.

070088

3. RESULTADOS Y DISCUSION

Purificación de la Proteína

En el último paso de la extracción de la heveína, el precipitado final fue disuelto en regulador de fosfatos 0.05 M, pH 7.0 y se aplicó a una columna de Ultragel ACA-54. El patrón de elución se muestra en la Fig. 5, en donde se observa un pico predominante que corresponde a la heveína, detectada por su espectro de absorción en la región del ultravioleta (Archer, 1960). Esta fracción fue recirculada en la misma columna obteniéndose un pico muy agudo, el cual fue desalinizado en una columna de Sephadex G-10, utilizando agua como eluyente. Finalmente la proteína se concentró por liofilización hasta alcanzar una concentración mayor a 10 mg/ml; otra porción de la solución proteica fue concentrada por ultrafiltración.

Criterios de Pureza

Cuando una porción de esta proteína fue sometida a electroforesis en geles de SDS poliacrilamida se observó una sola banda para todos los lotes de heveína obtenidos. También se obtuvo el espectro de absorción (Fig. 6) en el ultravioleta, que resultó ser idéntico al reportado por Archer (1960).

El intercambio iónico, por HPLC, de la preparación de heveína (Fig. 7) mostró un solo pico muy agudo, indicando que la proteína estaba adecuadamente purificada.

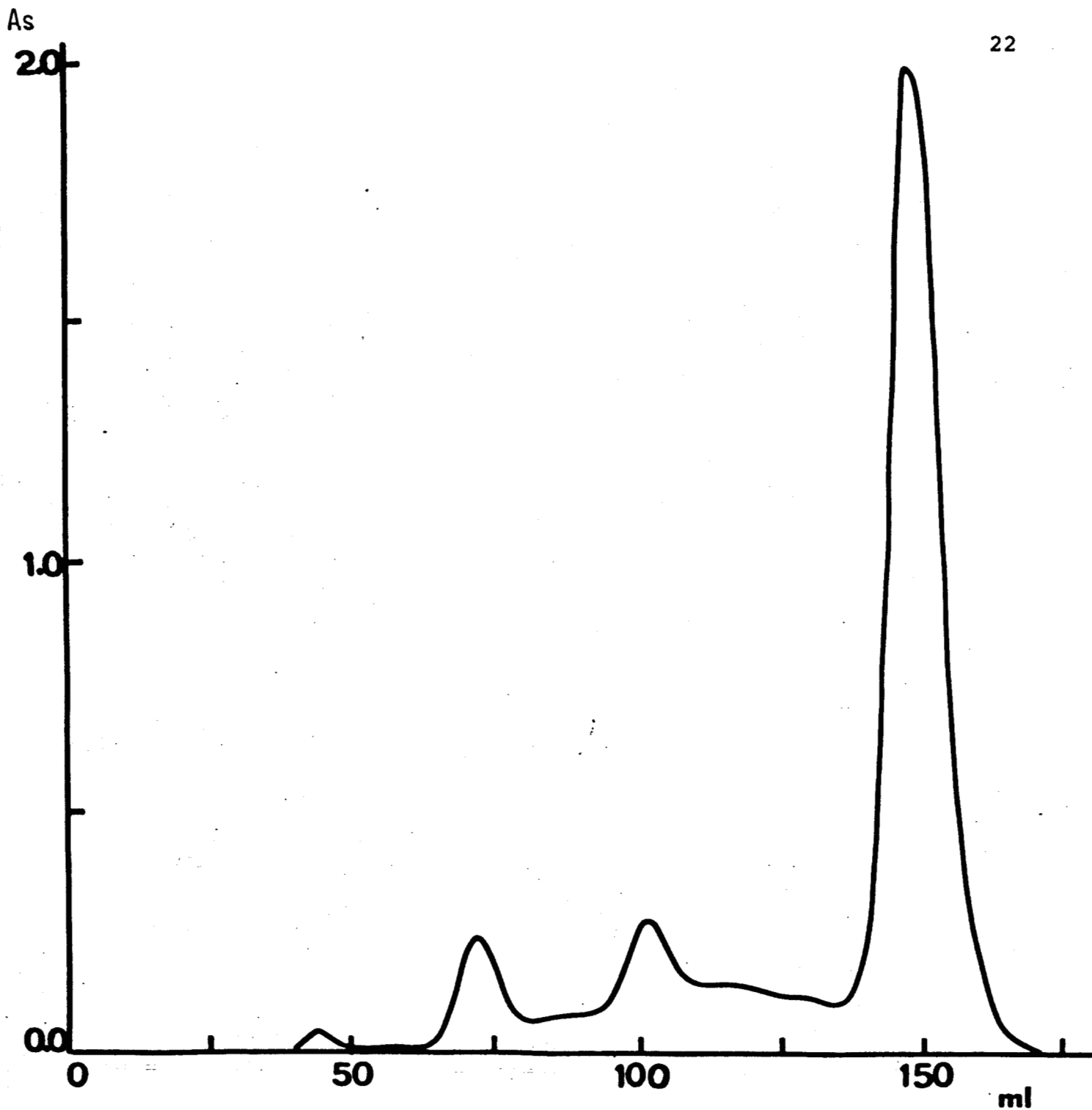


Figura 5. Diagrama de elución de la fracción precipitada con sulfato de amonio saturado. El pico predominante corresponde a la heveína.

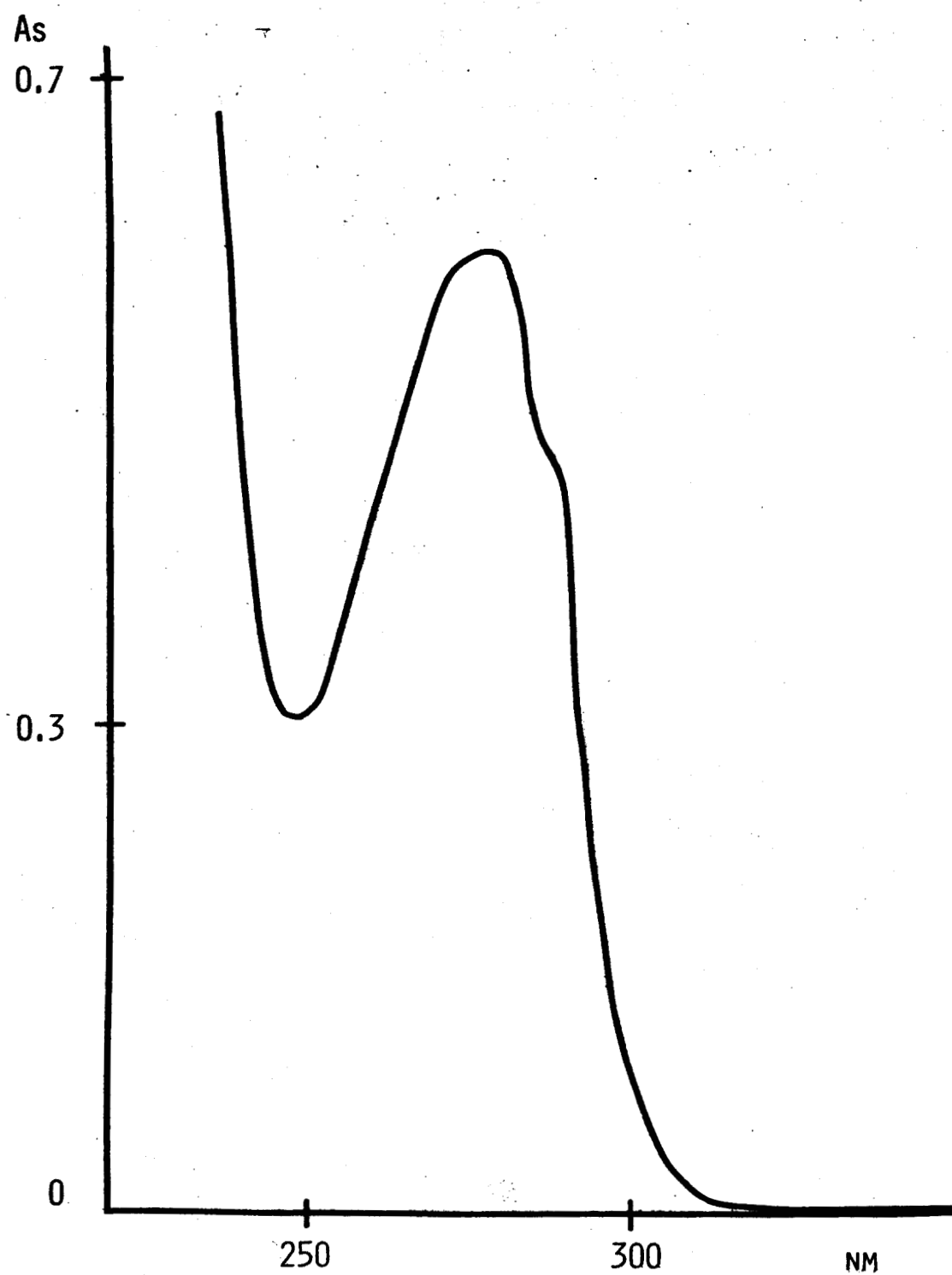


Figura 6. Espectro de absorción de la heveína.

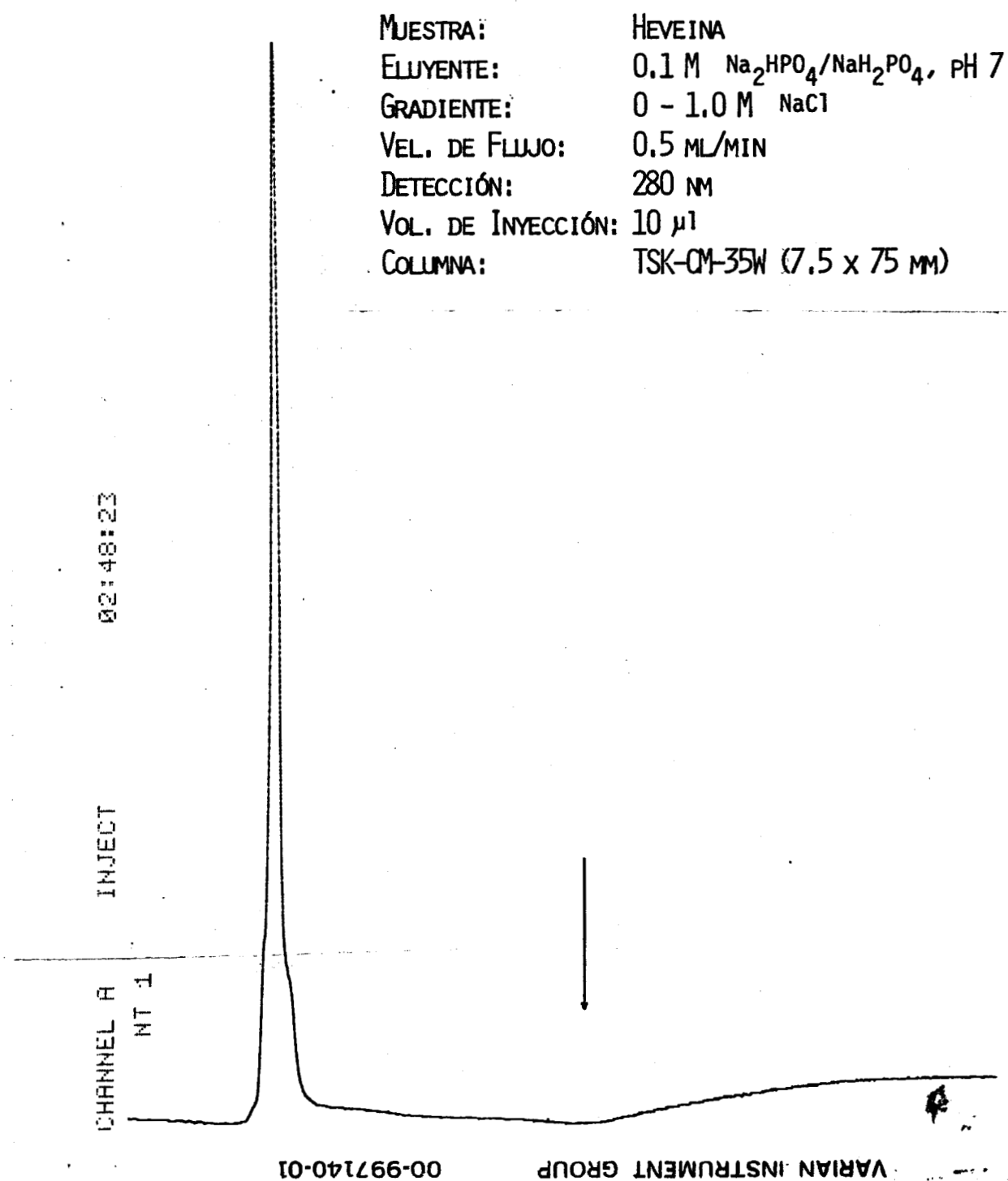


Figura 7. Diagrama de elución de la heveína utilizando una columna de intercambio iónico, por HPLC.

Determinación del Peso Molecular

Al determinar el peso molecular de la heveína, utilizando una columna de Sephadex G-50 superfino, esta proteína fue retardada en la columna y eluida en un volumen que correspondería a un peso molecular de 2,000 daltons. Este resultado concuerda con el reportado por Walujono; *et al.* (1975) quienes sugirieron que la retención en la columna era debida a un alto contenido en aminoácidos aromáticos, sin embargo, esta proteína solo contiene 2 residuos de triptofano y uno de tirosina.

Cuando se usó el método de filtración en gel en presencia de guanidina 6 M, se estimó un peso molecular de 4750 daltons para la heveína. En este caso todas las proteínas se encuentran desnaturalizadas por lo que se comportan como cadenas aleatorias. Este resultado concuerda con el valor de 4729 daltons determinado por Walujono, *et al.* (1975) a partir de la secuencia de aminoácidos.

Análisis de Aminoácidos

Los resultados de la composición de aminoácidos para la heveína se muestran en la Tabla I, donde se expresan como residuos de aminoácidos por 4750 daltons. Se observó una gran concordancia entre nuestros datos y los reportados por Walujano, *et al.* (1975) a excepción de la prolina, en donde obtuvimos el doble que el valor reportado por ellos.

Espectroscopía en Solución

a) El espectro de absorción en la región ultravioleta de la heveína pura se ilustra en la Fig. 6. La curva de absor-

TABLA I. COMPOSICION DE AMINOACIDOS DE LA HEVEINA

Valores expresados en residuos por mol. Los valores corregidos se calcularon tomando el número de residuos por mol de aspártico, glutámico y glicina como 6, 6 y 5 respectivamente.

Aminoácido	Hidrólisis 20 H	HCl 6N 48 H	Valores corregidos	Entero más cercano
Acido Aspártico	6.37	6.22	6.36	6
Treonina	0.85	0.91	0.85	1
Serina	4.72	5.10	4.70	5
Acido glutámico	5.98	6.21	5.98	6
Prolina	3.76	3.52	3.75	4
Glicina	5.44	5.31	5.43	5
Alanina	1.36	1.19	1.40	1
Cisteína ^a	7.64	--	7.63	8
Leucina	2.06	2.35	2.05	2
Tirosina	1.44	1.5	1.43	1
Histidina	0.97	0.876	0.97	1
Lisina	2.28	2.26	2.27	2
Arginina	1.19	0.90	1.02	1
Triptofano ^b	1.5	--	1.5	2

^a Determinada como ácido cistéico. Oxidación con ácido perfrómico.

^b Hidrolizado preparado con ácido metanosulfónico.

ción es la típica de una proteína, con un hombro en 288 nm, característico de los residuos de triptofano.

b) Espectroscopía diferencial por efecto de la temperatura. Debido a que la heveína en solución no es coagulada por calor y tampoco precipita en presencia de ácido tricloroacético, se pensó en realizar un estudio sobre los cambios conformacionales que sufre esta proteína por aumento en la temperatura.

En general, cuando una proteína sufre un cambio conformacional por el desdoblamiento de la cadena, los grupos cromóforos (aminoácidos aromáticos) son transferidos del interior de la proteína al disolvente. La alteración en su ambiente está acompañada por pequeñas variaciones en su espectro de absorción, el cual es desplazado tanto en longitud de onda ($\Delta\lambda$) como en intensidad (ΔA_s). Cada cambio en el ambiente produce un espectro diferencial de los cromóforos encontrados más comunmente en las proteínas.

El espectro diferencial de la heveína a 77.2° C y pH 2.6 se muestra en la Fig. 8. Las bandas obtenidas a 293 y 285.3 nm son de signo positivo, mientras que en otras proteínas estudiadas anteriormente (Ghéllis, *et al.*, 1982) se ha demostrado que el proceso de desnaturalización se acompaña de bandas negativas, originadas por la transferencia de residuos aromáticos del interior hidrofóbico de la proteína, al disolvente acuoso.

En la Fig. 9 se muestra la variación del ΔA_s de las bandas obtenidas a 293 y 285.3 nm en función de la temperatura. Aunque la curvatura que aparece en la zona de baja temperatura

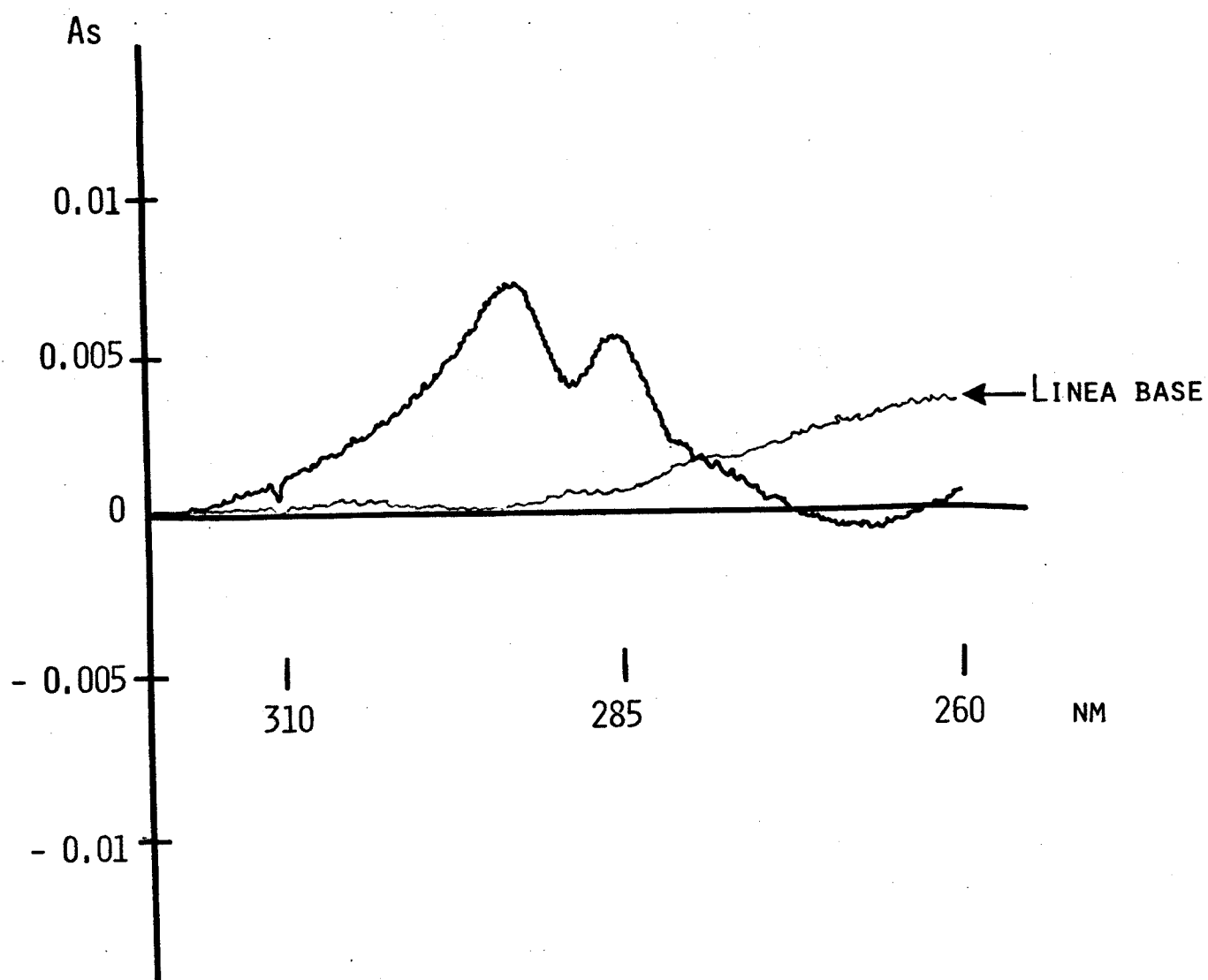


FIGURA 8. ESPECTRO DIFERENCIAL DE LA HEVEÍNA A 77.2 °C.

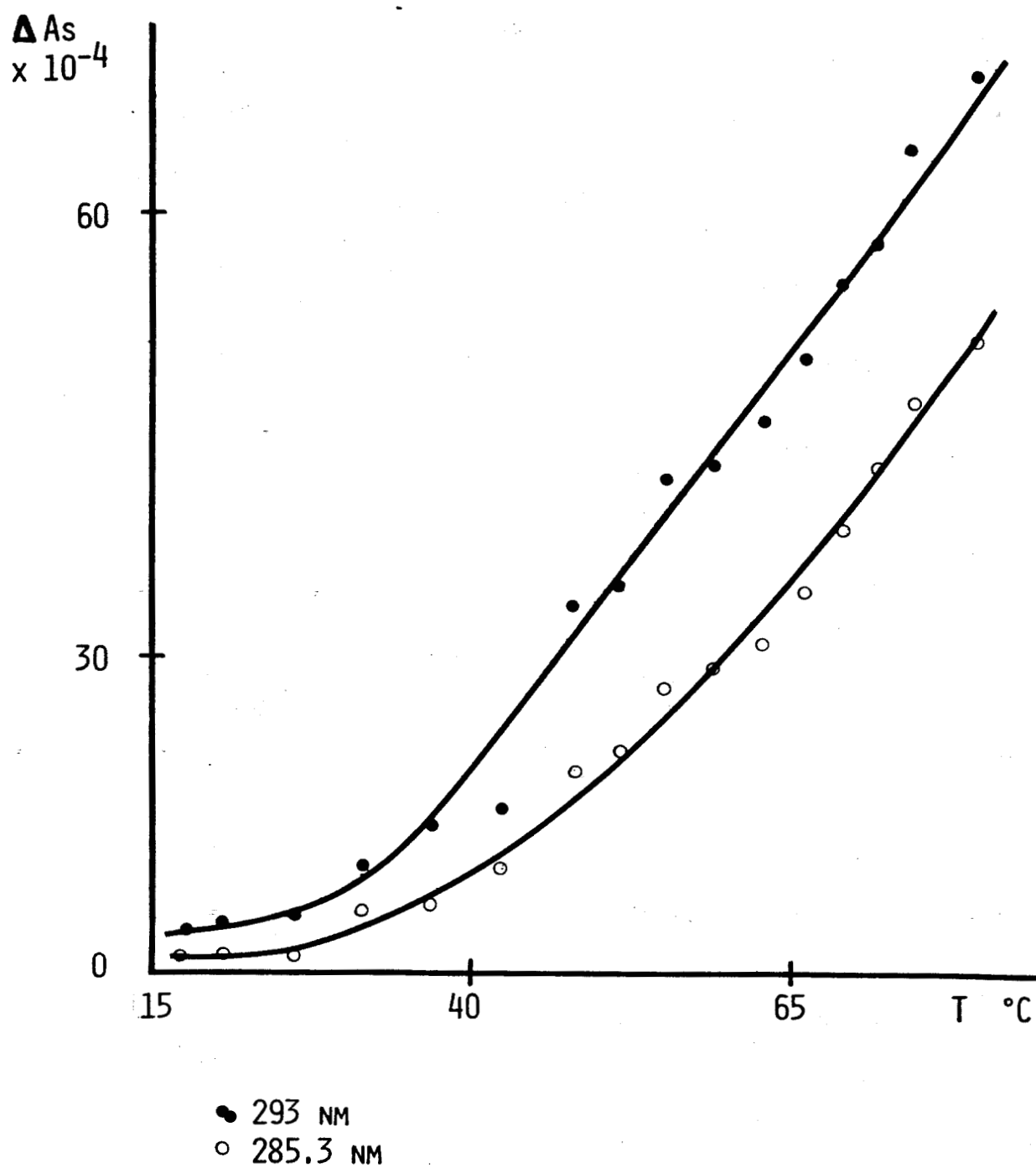


Figura 9. Variación de ΔAs en función de la temperatura.

puede indicar la presencia de un cambio conformacional, en general la tendencia de la curva no muestra la forma sigmoideal característica de un fenómeno cooperativo. Aún más, a partir de los 32°C la dependencia de ΔA_s con la temperatura es más bien lineal, lo cual indica que el efecto observado es debido a la simple perturbación térmica de los residuos de triptofano y tirosina de la proteína (Lehrer y Barker, 1971). De acuerdo a lo anterior puede pensarse que los residuos aromáticos de la molécula de la heveína se encuentran, en su mayoría, expuestos al disolvente. Este resultado explicaría el hecho de que la proteína sea retardada en la columna de Sephadex, no siendo la cantidad de aminoácidos aromáticos presentes la responsable de este fenómeno, sino la posición de los mismos. Al estar expuestos al disolvente pueden interaccionar con estos soportes.

Inhibición de Papaína por Heveína

Debido a las similitudes en cuanto a peso molecular y alto contenido de puentes disulfuro entre la heveína y los inhibidores de proteinasas, tales como el inhibidor de tripsina del frijol (Tan, *et al.*, 1971), Walujono, *et al.* (1975) probaron si la heveína mostraba propiedades de inhibidor sobre proteinasas de tipo serénico, como son la tripsina y la quimotripsina y observaron que no inhibía a estas enzimas.

En nuestro caso realizamos algunas pruebas sobre papaína, que es una proteinasa de tipo cisteínico, observando que la heveína tampoco inhibe a esta enzima.

070088

Cristalización

La cristalización de la heveína fue lograda después de una exploración y un estudio sistemáticos de algunos parámetros que controlan este proceso, como son el pH, la temperatura, la presencia de agentes precipitantes, etc., utilizando el método de difusión de vapor de gota suspendida para un control fino de los contenidos del medio de cristalización. En la Tabla II se muestran los resultados de aquellas pruebas en donde se obtuvieron monocristales con un tamaño mayor a los 0.2 mm.

Como puede observarse, en todos estos casos, el agente precipitante ideal fue el 2-metil-2,4-pentanodiol en concentraciones mayores al 25% en la gota suspendida y a un pH de 8.06, tanto en presencia de sales (LiCl y CaCl_2), como en ausencia de ellas. El tiempo promedio de crecimiento de los cristales fue de 3 semanas.

Las Figuras 10 a 13 muestran los cristales obtenidos, siendo los crecidos en presencia de sales como LiCl (Fig. 10) y CaCl_2 (Fig. 13) los de mayor tamaño. Estos cristales fueron estables a 6°C de 3 a 4 meses, y en experimentos posteriores se ha logrado reproducir su obtención.

Los cristales obtenidos por aumento en la temperatura (Fig. 11) mostraron una morfología diferente; eran hexágonos de aproximadamente 0.2 mm a lo largo del eje mayor. Sin embargo, estos cristales resultaron demasiado frágiles.

T A B L A II
CRISTALIZACION DE HEVEINA

AGENTE PRECIPITANTE	CONC. PROTEÍNA MG/ML	T (SEMANAS) APARICIÓN DE CRISTALES 6°C	FORMA DEL CRISTAL	FIG.
MPD 60 % EN TRIS 40 MM PH 8.06, 0.1 M LiCl, vs MPD 60 %, 0.2 M NaCl.	10.7	2 - 3	PLACAS LARGAS	10
MPD 55 % EN TRIS 40 MM PH 8.06, 0.1 M LiCl, vs MPD 55 %, 0.2 M NaCl, 2 SEMANAS A 6°C, DESPUÉS SE ELEVÓ LA TEMPERATURA A 40°C DURANTE 24 HS, COLOCÁNDOSE DE NUEVO A 6°C.	10.7	6	HEXAGONAL	11
MPD 55 % EN TRIS 40 MM PH 8.06, vs MPD 55 %, NaCl 0.2 M.	16.0	3 - 4	PLACAS LARGAS	12
MPD 60 % EN TRIS 40 MM PH 8.06, CaCl ₂ 0.01 M vs MPD 60 %, NaCl 0.2 M.	10.01	4 - 5	PLACAS LARGAS, 13 GRUESAS.	

LAS GOTAS SUSPENDIDAS CONTENÍAN 10 μ l DE LA SOLUCIÓN PROTEÍCA Y 10 μ l DEL AGENTE PRECIPITANTE.

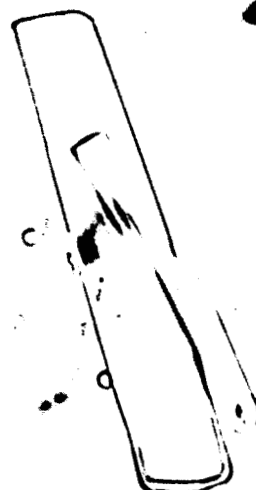


Figura 10. Cristales de heveína obtenidos a 6 °C usando MPD 60% en Tris 40 mM pH 8.06; 0.1M LiCl, como agente precipitante. Longitud aproximada de 0.3 mm.

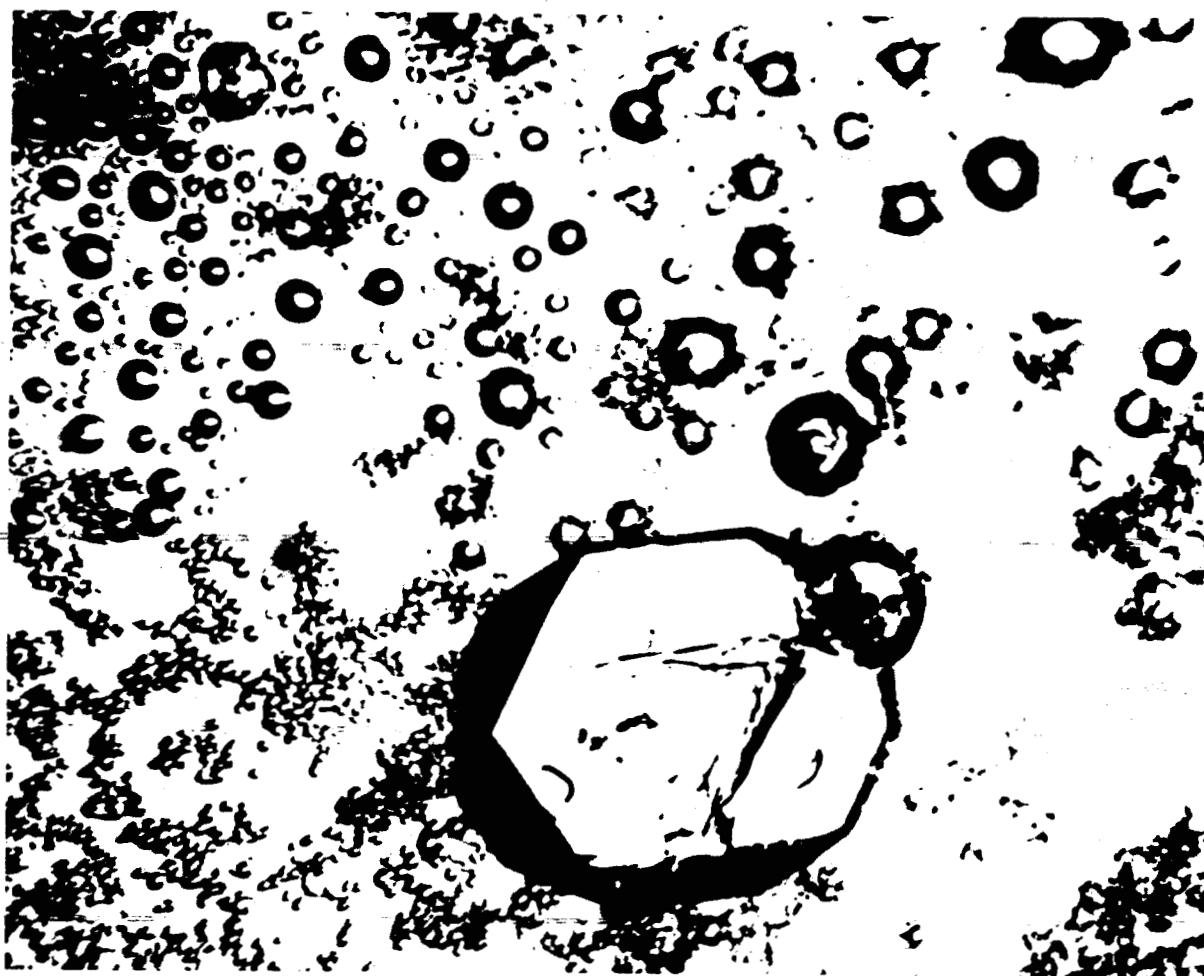


Figura 11. Cristal de heveína obtenido con MPD 55% en Tris 40 mM pH 8.06; LiCl 0.1M. El experimento primero se dejó dos semanas a 6 °C, después se elevó la temperatura a 40 °C durante 24 hrs. llevando nuevamente a 6 °C. Longitud aproximada de 0.25 mm.

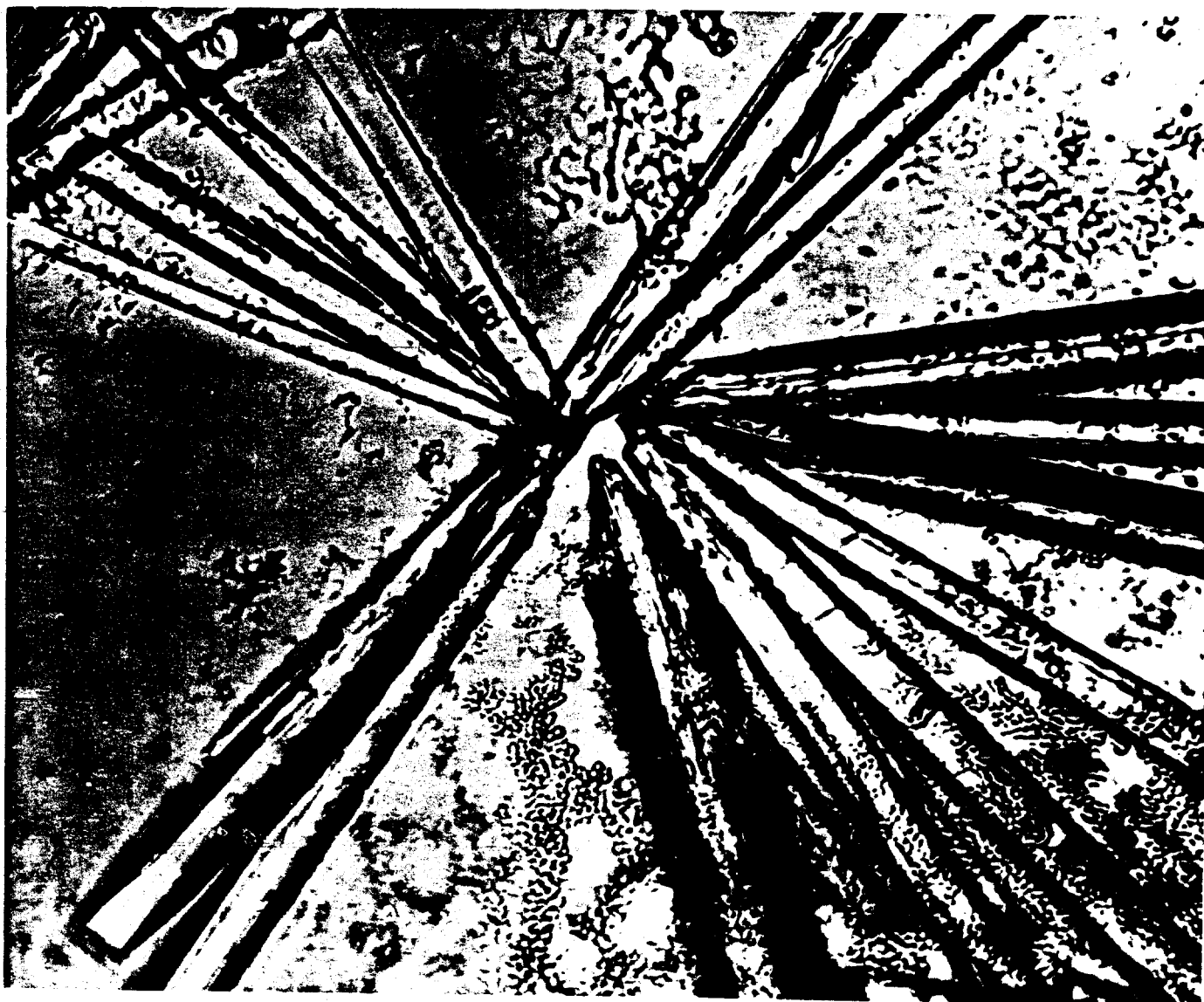


Figura 12. Cristales de heveína obtenidos a 6 °C usando MPD al 55% en Tris 40 mM pH 8.06. Longitud aproximada de 0.4 mm.

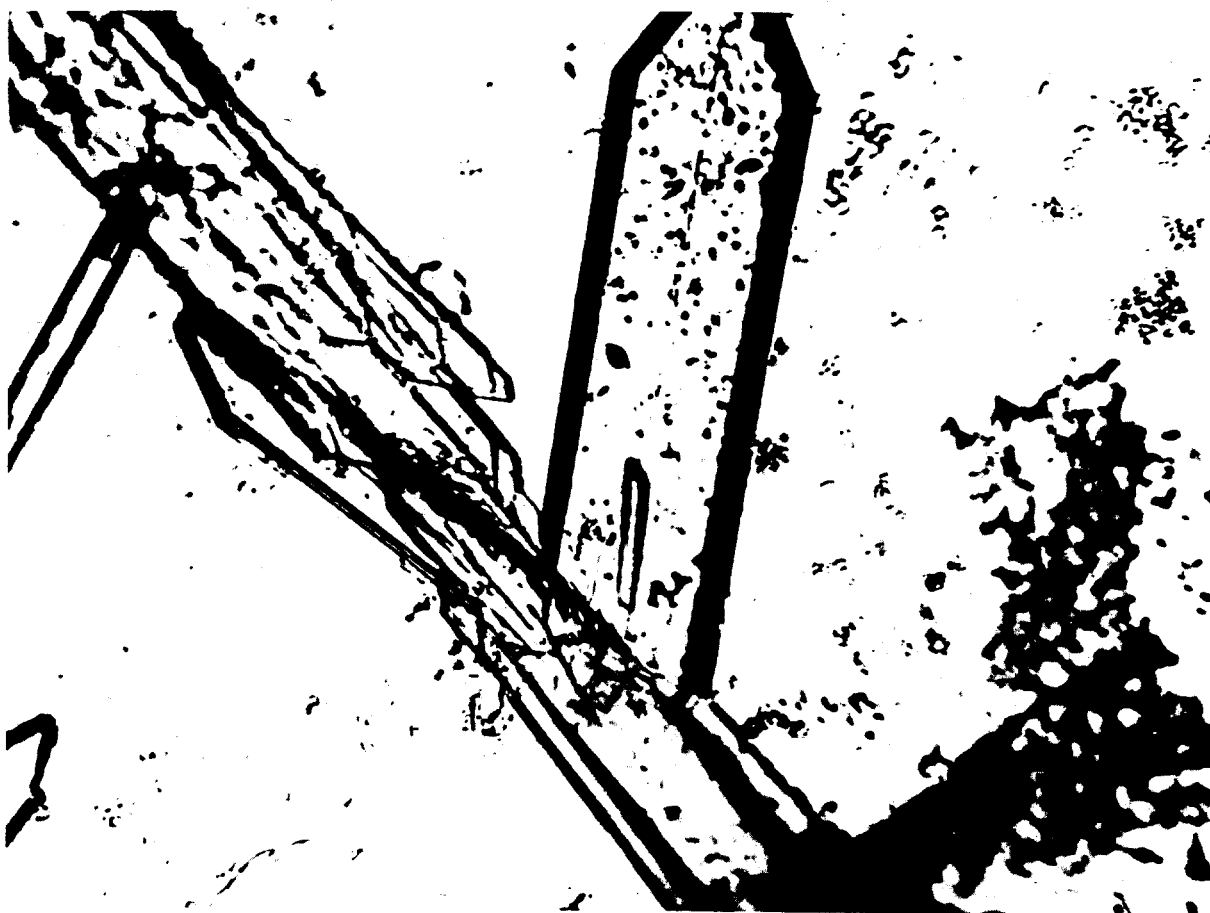


Figura 13. Cristales de heveína crecidos a 6 °C utilizando MPD 60%, 0.01M CaCl_2 en Tris 40 mM pH 8.06. Longitud aproximada de 0.6 mm.

Determinación de la calidad de los monocristales

Para este análisis preliminar se seleccionó un cristal de heveína, el cual creció en un medio conteniendo MPD al 60% en regulador de fosfatos 40 mM , pH 8.06 y 0.01 M de CaCl_2 (Fig. 13). Este cristal se montó en un capilar de vidrio de 0.7 mm de diámetro interno; esta operación se realizó con mucho cuidado ya que los cristales protéicos contienen alrededor de un 50% de agua y por lo tanto son muy frágiles.

La fotografía del diagrama de difracción de este cristal se presenta en la Fig. 14. El diagrama nos muestra que el material cristalino es una proteína, con dimensiones de la celda unitaria de $\sim 50 \text{ \AA}$ de longitud.



Figura 14. Fotografía del diagrama de difracción de un cristal de heveína (Fig. 13).

4. CONCLUSIONES

Como se enfatizó en la Introducción el primer paso para un estudio estructural por difracción de rayos X consiste en tener cristales adecuados. En el caso de las proteínas esta etapa es especialmente crítica, debido a las dificultades que se presentan para lograr un cristal como para crecerlo.

Este trabajo forma parte del primer proyecto en nuestro país en el que se pretende obtener la estructura tridimensional de una proteína por difracción de rayos X, por lo que se investigaron sistemáticamente las condiciones más adecuadas para cristalizar a la proteína. Como se señala en la sección de Resultados, de los agentes precipitantes que se probaron para cristalizar a la heveína el mejor fue el 2-metil-2,4-pentanodiol, en concentraciones iniciales mayores a un 25% en la gota suspendida y a pH de 8.06. La presencia de sales parece tener un efecto positivo en el crecimiento de los cristales, siendo el obtenido en MPD y CaCl_2 el que mostró un diagrama de difracción de un cristal protéico de buena calidad; por lo tanto, estos últimos se utilizarán para la obtención de derivados metálicos y para la determinación de la estructura tridimensional, que será el objetivo de un trabajo posterior.

Ya se mencionó que la heveína se encuentra en el sedimento del látex, el cual consiste principalmente de las partículas lutoideas. Estos lutoideos contienen compartamentalizada proteína, que al ser liberadas interrumpen el flujo de látex

en los cortes efectuados para su recolección (Southorn, 1968). Muy poco se sabe de la función y mecanismos de control que efectúan las proteínas del látex, algunas son enzimas que participan en ciclos metabólicos, sin embargo, existen otras con alta concentración en el sedimento, cuya función es desconocida. Tal es el caso de la heveína, por lo que la información estructural de la misma, así como una comparación con proteínas similares, puede ser de gran importancia para el entendimiento de su acción fisiológica en el látex.

070088

5. BIBLIOGRAFIA

- Andrews, P. (1965). The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.*, 96 (3), 595.
- Archer, B. L. (1960). The proteins of *Hevea brasiliensis* latex 4. *Biochem. J.*, 75 (2), 236.
- Baker, E. N. y Dodson, G. (1970). X Ray diffraction data on some crystalline varieties of insuline. *J. Mol. Biol.* 54, 605.
- Blakesley, R. W. y Boezi, J. A. (1977). A new staining technique for proteins in poliacrilamide gels using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.* 82, 580.
- Blundell, T. L. y Johnson, L. N. (1976). *Protein Crystallography* Academic Press. New York.
- Camerman, N., Hofmann, T., Jones, S. y Nyburg, S. C. (1969). Crystalline proteinase from *Penicillium janthinellum*, preliminary X Ray data. *J. Mol. Biol.* 44, 569.
- Cork, C., Hamlin, R., Vernon, W., Xuong, Ng. h y Perez-Mendez, V. (1975). *Acta Cryst.* A31, 702.
- Fish, W. W., Kenneth, G. M., and Tanford, Ch. (1969). The estimation of polypeptide chain molecular weights by gel filtration in 6 M guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.* 244, 4989.
- Ghélis, Ch., Yon, J. (1982). *Protein Folding*. Academic Press, Inc. 298-338.
- Lehrer, G. M. y Barker, R. (1971). Conformational changes in rabbit muscle aldolase. Ultraviolet spectroscopic studies. *Bio-*

chem. 10 (9), 1705.

- LKB. Nota de Aplicación No. 306.
- Mc. Pherson, A. Jr. (1976). The analysis of biological structure with X Ray diffraction. *Methdos. Biochem. Anal.* 23, 249-345.
- Mc. Pherson, A. Jr. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. H. Wiley and Sons, New York (1982).
- Ortega, M. L. y Del Castillo L. M. (1965). Actividad de la mexicaina en presencia de altas concentraciones de urea. *Ciencia (Mex.)* 24, 247.
- Simpson, J. R., Reiberger, R. M. y Liu, T. Y. (1976). Complete amino acid analysis of proteins from a single hydrolysate. *J. Biol. Chem.* 251 (7), 1936.
- Southorn, W. A. (1969). Studies of composition of latex serum and bottom fraction particles. *J. Rubb. Res. Inst. Malaya*, 21 (4), 560.
- Tan, C. G. y Stevens, F.C. (1971). Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV. *Eur. J. Biochem.* 18, 515.
- Tata, S. J. (1975). Hevein: its isolation and purification. *Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur*, 499.
- Walujono, K. Scholma, R. A., Beintema, J. J., Mariano, A. y Hahn, A. M. (1975). Amino acid sequence of hevein. *Proceedings of the International Rubber Conference, Kuala Lumpur*, 518.

- Wlodawer, A. y Hodgson, K. O. (1975). Crystallization of nerve growth factor from mause submaxillary glands. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 72, 398.
- Zeppezauer, M., Eklund, H. and Zeppezauer, E. S. (1968). Microdiffusion cells for the growth of single protein crystals by means of equilibrium dialysis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 564.
- Zeppezauer, M., (1971). Formation of large crystals. Methods in Enzymology, 22, 253. Academic Press, New York.