

Estudio comparativo de las isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper* *

Virginia Umaña

Facultad de Medicina, Universidad de Costa Rica

(Recibido para su publicación el 18 de enero de 1982)

Abstract: A comparative study was performed between the isozymes 1 and 2b of the L-amino acid oxidase (E.C. 1.4.3.2) from the venom of *Bothrops asper* snakes captured in Costa Rica. The amino acid composition differs slightly: L-amino acid oxidase-1 (the most anodal) shows more aspartic and glutamic acid residues than L-amino acid oxidase-2b, which was found to be richer in lysine and alanine residues. Both isozymes had subunits of 60,000 and 57,000 molecular weight, as shown by electrophoresis on SDS polyacrylamide gel. Results of peptide mapping studies are consistent with a high degree of homology between the compared isozymes, and the number of peptides obtained indicated homologous subunits.

En una publicación anterior se describe el proceso de purificación de la enzima L-aminoácido oxidasa (E.C.1.4.3.2), a partir del veneno de serpiente *Bothrops asper* de Costa Rica, y su separación en tres isoenzimas denominadas 1, 2a y 2b (Umaña, 1982).

El presente trabajo se realizó con el fin de determinar el grado de homología entre las isoenzimas 1 y 2b. Uno de los procedimientos más valiosos para lograr este objetivo es la comparación de los mapas peptídicos de sus hidrolizados por la tripsina. Para obtener mayor número de péptidos se utilizó etilenimina, la cual reacciona con los residuos de cisteína formando nuevos sitios básicos susceptibles a la acción de la tripsina (Lindly, 1956; Raftery y Cole, 1963 y 1966).

Se buscó en la composición de aminoácidos una explicación a la mayor movilidad electrofóretica hacia el ánodo de la L-aminoácido oxidasa-1.

La presencia de subunidades se investigó desnaturizando las isoenzimas y sometién-dolas posteriormente a electroforesis en gel de acrilamida, lo cual permite no solamente cono-

cer la presencia de subunidades sino también calcular sus pesos moleculares.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon sustancias químicas con calidad de reactivo analítico, de la siguiente procedencia: la ninhidrina y el Tris, de Sigma; la tripsina, tratada con L-(1-tosilamido 2-fenil) etil-clorometil-cetona (TPCK) para evitar el efecto de la quimotripsina (Koska y Carpenter, 1964), de Worthington; el clorhidrato de guanidina, de Heico; la etilenimina y el mercapto-etanol, de Coleman.

Las isoenzimas L-aminoácido oxidasa-1 y L-aminoácido oxidasa-2b fueron purificadas a partir del veneno crudo de serpientes *Bothrops asper* capturadas en Costa Rica (Umaña, 1982).

Análisis de la composición de aminoácidos: Para determinar la composición de aminoácidos, se colocó en tubos Pyrex de pared gruesa, 10 alícuotas de 1,5 mg de cada una de las isoenzimas 1 y 2b, a las cuales se agregó 1,0 ml de HCl 6 N. Los tubos fueron sellados al vacío

* Departamento de Bioquímica del Centro Médico de la Universidad de Duke, Carolina del Norte, y es parte de la Tesis presentada en el Instituto Politécnico Nacional de México como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Bioquímica).

siguiendo las instrucciones dadas por Moore y Stein (1963) y colocados en un bloque a 110 C. Fueron removidos a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas, y se les mantuvo congelados hasta el momento de ser analizados.

El análisis se realizó en un analizador automático de aminoácidos modelo 120 C de Beckman, según el método desarrollado por Spackman, Stein y Moore (1958).

Espetros de absorción: Los espectros de absorción de las isoenzimas 1 y 2b se obtuvieron en un espectrofotómetro Cary modelo 14. La concentración de proteína fue de 0,7 mg/ml en KCl 0,1 M.

Preparación de los mapas peptídicos: Los mapas peptídicos se obtuvieron de acuerdo con los siguientes pasos:

1. *Reducción y aminoetilación.* A cada una de las isoenzimas 1 y 2b (2 mg) se agregó una solución formada por un gramo de clorhidrato de guanidina en un ml de Tris/HCl 0,55 M, a pH 8,0, y mercaptoetanol a una concentración final de 0,1 M. El proceso se realizó bajo una atmósfera de N₂, a 25C. Después de una hora de incubación se agregó la etilenimina en tres alícuotas de 0,01 ml, a intervalos de 10 minutos, según el método de Raftery y Cole (1963 y 1966). Con el fin de detener la reacción y remover completamente las moléculas pequeñas se dializó contra agua, empleando volúmenes al menos 1.000 veces mayores que el líquido a dializar, con 4 cambios y tiempos de diálisis no menores de 3 horas.

2. *Digestión con tripsina.* El contenido de los sacos de diálisis fue colocado en tubos de ensayo y su pH ajustado a 8,0 con una solución de bicarbonato de amonio 0,1 M. Se preparó una solución de tripsina que contenía 2 mg/ml y de ella se agregó una alícuota de 20 µl a cada tubo. La relación entre el peso de la tripsina y el de su sustrato fue 1:50. La incubación se efectuó a 37 C durante 4 horas, y la reacción fue detenida por congelación (Smyth, 1967). El agua y sustancias volátiles fueron eliminados por evaporación al vacío.

3. *Cromatografía.* El producto, redisoluto en 0,2 ml de una solución acuosa de ácido acético al 50%, fue aplicado en una hoja de papel Whatman 3MM de 46 x 57 cm, siguiendo el esquema recomendado por Bennett (1967). La cromatografía de ambas isoenzimas se realizó simultáneamente en el mismo tanque, en

dirección descendente, con la mezcla formada por butanol: piridina: ácido acético y agua, en las proporciones volumétricas de 15:10:3:12.

A las 14 horas el frente alcanzó el límite. Los cromatogramas fueron secados al aire caliente (a temperatura no mayor de 70 C) durante varias horas.

4. *Electroforesis de alto voltaje.* La separación de los péptidos se continuó por electroforesis de alto voltaje hacia la segunda dimensión, en un tanque modelo D de Gibson Medical Electronics, con la solución formada por piridina: ácido acético y agua (25:1:225), a pH 6,5. Se aplicó una corriente de 1.000 voltios durante 2 horas.

5. *Revelado de los péptidos.* Los mapas, previamente secados al aire caliente durante varias horas, fueron cuidadosamente revelados con ninhidrina y la posición de las manchas se marcó con lápiz. A continuación se empleó el reactivo de Ehrlich para localizar el triptofano en algunos péptidos; fue preparado mezclando, instantes antes de usarse, 10 ml de ácido clorhídrico concentrado con una solución formada por 1 g de p-dimetilaminobenzaldehído en 90 ml de acetona. El triptofano puede ser localizado gracias al desarrollo de un color púrpura, persistente, mientras las manchas con ninhidrina se desvanecen. En el reverso del papel se aplicó el reactivo de Pauly preparado en la siguiente forma: dos volúmenes de la solución A (4,5 g de ácido sulfanílico en 5 ml de HCl concentrado, diluida con agua hasta 500 ml) fueron mezclados con un volumen de la solución B (Na NO₂ al 5%). Se atomizó ligeramente en los mapas y a continuación la solución C (Na₂ CO₃ al 10%). Los péptidos que contenían tirosina o histidina aparecieron de color rosado o anaranjado (Putnam y Easley, 1965; Easley, 1965).

Disociación en subunidades y determinación de su peso molecular. Existen datos en la literatura acerca de la disociación de la L-aminoácido oxidasa de *Crotalus adamanteus*, en presencia de urea 8 M, en dos subunidades del mismo peso molecular (de Kok y Rawitch, 1969). Con el objeto de observar si el mismo fenómeno se presenta en la de *Bothrops asper*, utilizamos el método de Dunker y Rueckert (1969). Las isoenzimas 1 y 2b fueron incubadas a 45 C durante 60 minutos en presencia de urea 4 M, 2-mercaptoetanol al 1% (v/v) y

dodecilsulfato de sodio al 1%. La concentración final de proteína fue de 2 mg/ml.

Para la preparación de los geles utilizamos acrilamida al 5%. La electroforesis se llevó a cabo durante 2,5 horas, con una corriente de 8 miliamperios por columna. Después de la electroforesis los geles fueron sumergidos durante 20 horas en ácido sulfosalicílico al 20% (Maizel, 1966), con el objeto de fijar las proteínas, y teñidos con el colorante azul Coomassie brillante R 250 al 0,02% en una solución de ácido tricloroacético al 12,5%, durante 5 horas. Después de decantar el colorante los geles fueron sumergidos en la citada solución de ácido tricloroacético. Las fotografías fueron tomadas 12 horas después.

Los controles de peso molecular conocido fueron transferrina, albúmina sérica bovina, catalasa, ovoalbúmina y pepsina; fueron sometidos al mismo proceso que los problemas. El peso molecular se determinó después de representar en una gráfica la migración relativa de cada proteína (considerando la de la albúmina sérica bovina como la unidad) en las abscisas y el logaritmo del peso molecular $\times 10^{-3}$ en las ordenadas. La migración relativa es inversamente proporcional al logaritmo del peso molecular $\times 10^{-3}$ (Shapiro, Vinuela y Maizel, 1967).

Los pesos moleculares $\times 10^{-3}$ de los controles usados, dados en el mismo orden que los nombres, fueron: 76, 68, 60, 45 y 35. Se obtuvo una línea recta (Fig. 3).

RESULTADOS

Composición de aminoácidos: El promedio de las determinaciones hechas con 5 tiempos diferentes de hidrólisis, y las excepciones señaladas en el Cuadro 1, nos permite observar algunas diferencias en la composición de aminoácidos entre las isoenzimas 1 y 2b. La primera tiene más ácidos aspártico y glutámico y la 2b tiene más lisina y alanina.

El triptofano no fue determinado empleando el método colorimétrico especial (Spies y Chambers, 1949). Sin embargo, al contar las manchas positivas al reactivo de Ehrlich, específico para el triptofano, en los mapas peptídicos, y multiplicar dicho número $\times 2$, se obtuvo valores de 12 para la 1 y 14 para la 2b. Estos valores indican el número aproximado de residuos por mol de enzima.

CUADRO 1

*Composición de aminoácidos de la L-aminoácido oxidasa del veneno de B. asper **

	Isoenzima 2b Residuos/mol	Isoenzima 1 Residuos/mol
Lisina	66	60
Histidina	21	21
Arginina	54	54
Acido aspártico	99	108
Treonina**	54	54
Serina**	63	63
Acido glutámico	120	123
Prolina	42	42
Glicina	75	75
Alanina	81	75
Valina ++	72	72
Metionina	12	12
Isoleucina ++	63	63
Leucina	81	81
Tirosina	58	58
Fenilalanina	39	39

La cisteína y el triptofano no fueron determinados.

* Los números representan el promedio de los valores obtenidos después de 24, 48, 72, 96 y 120 horas de hidrólisis.

** Valor extrapolado a 0.

++ Valor más alto (120 horas).

Mapas peptídicos de los hidrolizados trípticos: La ninhidrina reveló entre 65 y 70 péptidos en cada una de las isoenzimas analizadas (Figura 1). El número de residuos de lisina + arginina encontrados en el análisis de aminoácidos fue de 114 en la isoenzima 1 y 120 en la 2b. El número de residuos positivos al reactivo de Pauly fue de 11 en ambos mapas, y el número de péptidos conteniendo triptofano fue de 6 en la 1 y 7 en la 2b. Como puede observarse en la figura 1, existe un alto grado de homología entre los dos mapas peptídicos.

Espectros de absorción: Las dos isoenzimas presentan al espectrofotómetro máximos a 275, 385 y 460 nm. La relación entre la absorbancia a 275/absorbancia a 460 es igual a 7,6 (Figura 2).

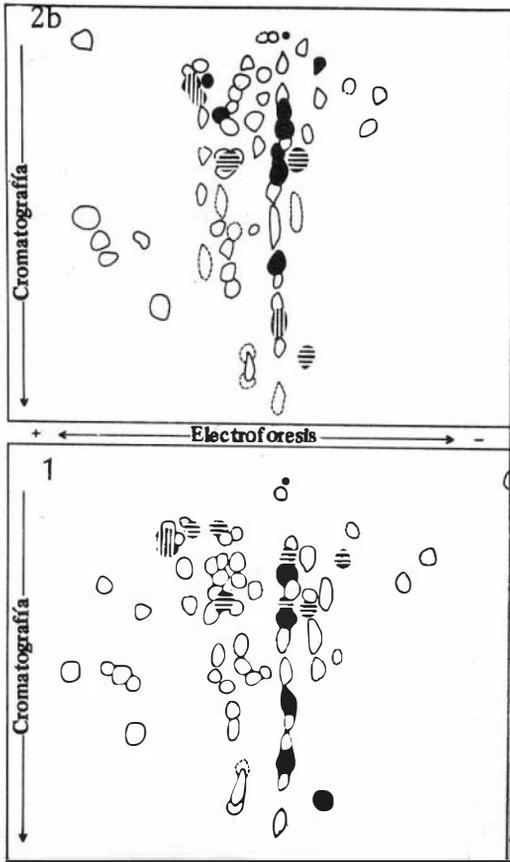


Fig. 1. Mapas peptídicos de los hidrolizados por digestión trípica de las isoenzimas 2b y 1 de la L-aminoácido oxidasa de *B. asper*, indicando los péptidos positivos al reactivo de Ehrlich ||||, al de Pauly ≡≡≡ y a ambos ■

Disociación en subunidades y determinación de sus pesos moleculares: Como puede observarse en la figura 4, el tratamiento con urea y mercaptoetanol causó la disociación de las isoenzimas 1 y 2b en subunidades cuyos pesos moleculares son 60.000 y 57.000. Estos fueron calculados empleando la gráfica de la figura 3, la cual fue construida con los controles adecuados.

DISCUSION

Las dos isoenzimas comparadas en el presente trabajo se muestran extraordinariamente semejantes entre sí. Ambas tienen el mismo peso molecular y dos subunidades. La composición de aminoácidos presenta ligeras diferen-

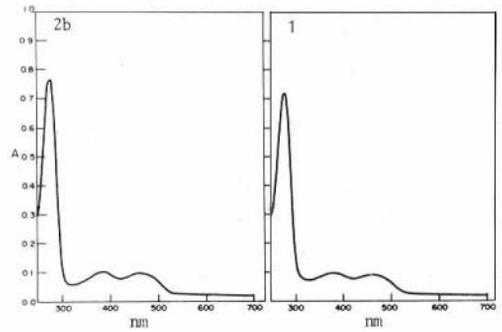


Fig. 2. Espectros de absorción de las isoenzimas 2b y 1 de la L-aminoácido oxidasa de *B. asper*. La concentración de proteína fue de 0.7 mg/ml, en una solución de KCl 0.1 M.

cias, y esto se refleja en los mapas peptídicos de sus hidrolizados tríplicos. El número de péptidos encontrados en cada uno de ellos es aproximadamente la mitad del número que debería encontrarse si las dos subunidades fuesen completamente diferentes en su estructura primaria. Esto indica que las dos subunidades presentes en cada isoenzima tienen gran homología en su secuencia de aminoácidos.

Sin embargo, es necesario hacer notar que el análisis de las isoenzimas disociadas en gel de acrilamida-dodecil-sulfato de sodio nos muestra pesos moleculares o número de cargas ligeramente diferentes entre las subunidades de cada una.

De Kok y Rawitch (1969) realizaron un fino estudio comparativo entre las dos isoenzimas de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente de cascabel (*Crotalus adamanteus*). Separaron, por medio de electroforesis preparativa en gel de acrilamida, una de las tres formas encontradas por Wellner y Meister (1960), y la compararon con una mezcla de ellas que la contenía. El resultado del análisis de la composición de aminoácidos y los mapas peptídicos les permitieron deducir que las tres isoenzimas de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *Crotalus adamanteus* están formadas por combinación, en diferentes proporciones, de dos subunidades casi idénticas entre sí. Por el método del equilibrio de sedimentación obtuvieron un peso de 135,000 para la enzima nativa y la mitad de éste para la desnaturalizada.

En el caso de las isoenzimas desnaturalizadas de la L-aminoácido oxidasa de *B. asper* comparadas en el presente trabajo, se obtuvo mayor

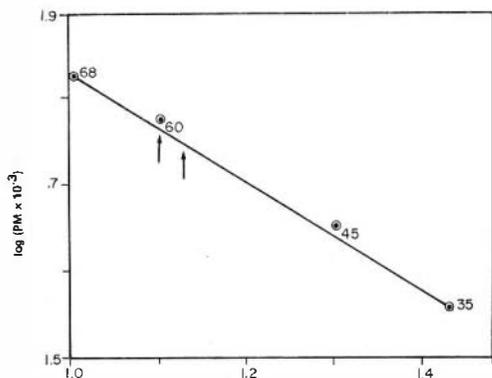


Fig. 3. Recta obtenida al graficar los logaritmos de los pesos moleculares $\times 10^{-3}$ de una serie de proteínas, contras sus migraciones relativas en gel de acrilamida al 5%, con dodecil-sulfato de sodio al 0,1%. Los números representan el PM $\times 10^{-3}$ de los controles usados y las flechas la posición de las subunidades de L-aminoácido oxidasa.

información por electroforesis en gel de acrilamida-dodecil-sulfato de sodio: el peso molecular de cada subunidad es aproximadamente la mitad del de la enzima nativa, pero hay ligeras diferencias en los pesos moleculares o número de cargas eléctricas de las subunidades de cada isoenzima, ya que se observan dos bandas proteicas en cada gel.

AGRADECIMIENTOS

La autora agradece al Profesor Philip Handler y al Dr. K.V. Rajagopalan, del Departamento de Bioquímica de la Universidad de Duke, por haber hecho posible esta investigación, con su guía, excelencia académica y total apoyo material.

RESUMEN

Se hizo un estudio comparativo entre las isoenzimas 1 y 2b de la L-aminoácido oxidasa (E.C.1.4.3.2) del veneno de serpientes *Bothrops asper* capturadas en Costa Rica.

La composición de aminoácidos de la L-aminoácido oxidasa-1 (la más anódica) mostró mayor número de residuos de los ácidos aspártico y glutámico, mientras la L-aminoácido oxidasa-2b resultó más rica en lisina y alanina. Ambas isoenzimas tienen subunidades con pesos moleculares de 60.000 y 57.000, según se

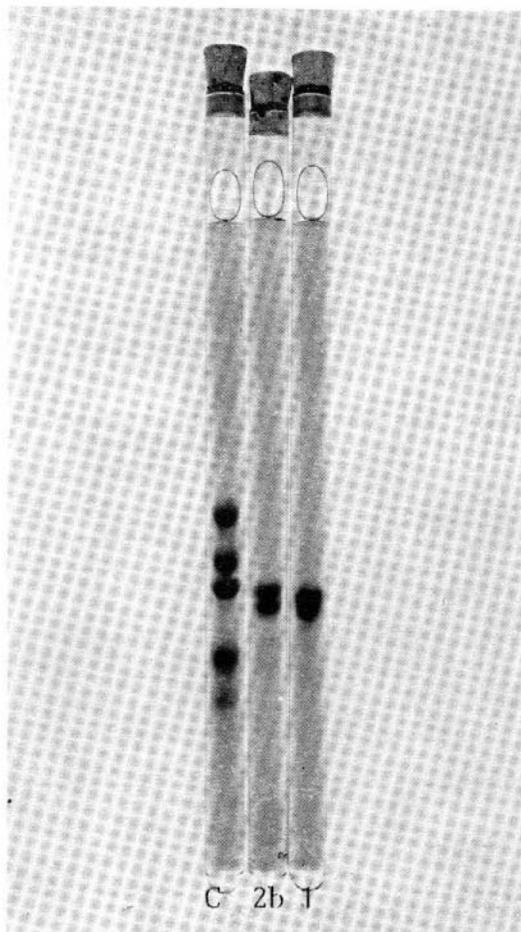


Fig. 4. Patrón electroforético de las isoenzimas 2b y 1 de la L-aminoácido oxidasa del veneno de *B. asper* en gel de acrilamida-dodecil-sulfato de sodio, previamente desnaturalizadas y reducidas con urea 4M y 2-mercaptoetanol al 1%. C es la columna con los siguientes controles: transferrina (76.000), albúmina sérica bovina (68.000), catalasa (50.000), ovoalbúmina (45.000) y pepsina (35.000).

determinó por electroforesis en gel de acrilamida-dodecil-sulfato de sodio. Los mapas peptídicos demostraron un alto grado de homología entre ambas isoenzimas, y el número de péptidos que se obtuvo indica que también las subunidades de cada isoenzima son homólogas.

REFERENCIAS

Bennett, J.C. 1967. Paper chromatography and electrophoresis. Special procedure for peptide maps, p. 330-339. In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. XI. Academic Press, New York.

- De Kok, A., & A.B. Rawitch. 1969. Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. *Biochemistry*, 8:1405-1411.
- Dunker, A.K. & R.R. Rueckert. 1969. Observations on molecular weight determinations on polyacrilamide gel. *J. Biol. Chem.*, 244:5074-5080.
- Easley, C.W. 1965. Combinations of specific color reactions useful in the peptide mapping technique. *Biochim. Biophys. Acta*, 107:386-388.
- Koska, V., & F.H. Carpenter. 1964. Inhibition of chymotrypsin activity in crystalline trypsin preparations. *J. Biol. Chem.*, 239: 1799-1803.
- Lindly, H.A. 1956. A new synthetic substrate for trypsin and its application to the determination of the amino acid sequence of proteins. *Nature*, 178:647-648.
- Maizel, J.V. 1966. Acrylamide gel electrophorograms by mechanical fractionation: radioactive adenovirus proteins. *Science*, 151:988-990.
- Moore, S., & W.H. Stein. 1963. Chromatographic determination of amino acids by the use of automatic recording equipment, p. 819-831. *In* S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, Vol. VI. Academic Press. New York.
- Putnam, F.W. & C.W. Easley. 1965. Structural studies of the immunoglobulins. I. The tryptic peptides of Bence-Jones proteins. *J. Biol. Chem.*, 240:1626-1638.
- Rafferty, M.A. & R.D. Cole. 1963. Tryptic cleavage at cysteinyl peptide bonds. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 10:467-472.
- Rafferty, M.A., & R.D. Cole. 1966. On the amino ethylation of proteins. *J. Biol. Chem.*, 241: 3457-3461.
- Shapiro, A.L., E. Vinuela & J.V. Maizel. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 28:815-820.
- Smyth, D.G. 1967. Techniques in enzymic hydrolysis, p. 214-231. *In* S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds.), *Methods in Enzymology*, vol. XI. Academic Press. New York.
- Spackman, D.H., W.H. Stein & S. Moore. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, 30:1190-1206.
- Spies, J.R. & D.C. Chambers. 1949. Chemical determination of tryptophan in proteins. *Anal. Chem.*, 21: 1249-1266.
- Umaña, V. 1982. Purificación y separación de isoenzimas de L-aminoácido oxidasa del veneno de *Bothrops asper*. *Rev. Biol. Trop.*, 30: 59-64.
- Wellner, D. & A. Meister. 1960. Crystalline L-amino acid oxidase of *Crotalus adamanteus*. *J. Biol. Chem.*, 235:2013-2018.