

114750000

AG ISSN 0020-0867

CNEA 389

Fisicoquímica de la Incorporación de Iodo a la Hormona de Crecimiento Bovina por el Método Electrolítico

R. A. Caro	H. Kurcbart
V. A. Ciccato	S. Quiroga
S. M. V. de Giacomini	R. Radice

Comisión
Nacional
de Energía
Atómica

República Argentina

Buenos Aires, 1975

Caro, R.A.

Fisicoquímica de la incorporación de iodo a la hormona de crecimiento bovina por el método electrolítico. Buenos Aires, Comisión Nacional de Energía Atómica, 1975.

16 p. 27 cm. (CNEA-389).

Trazadores radiactivos; Yodo—Isótopos. Ciscato, V.A.; Giacomini, S.M.V. de; Kurchart, H.; Quiroga, S.; Radice-lla, R.

621.039.85

546.15.02

CNEA 389

**Fisicoquímica de la
Incorporación de Iodo a la
Hormona de Crecimiento Bovina
por el Método Electrolítico**

R. A. Caro

V. A. Ciscato

S. M. V. de Giacomini

H. Kurcbart

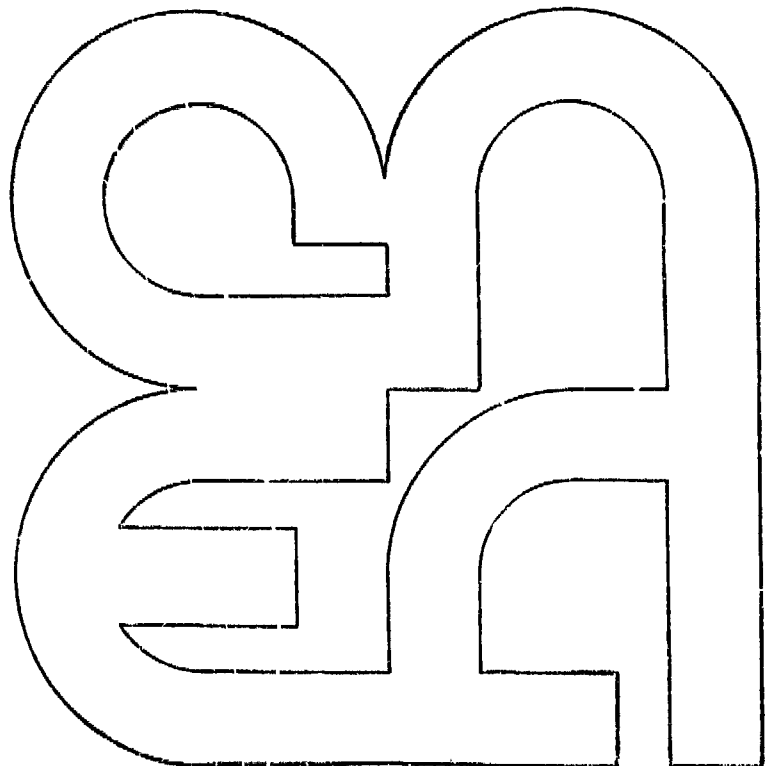
S. Quiroga

R. Radicella

**Comisión
Nacional
de Energía
Atómica**

República Argentina

Buenos Aires, 1975



INIS CLASSIFICATION AND KEYWORDS

B13

LABELLED COMPOUNDS

LABELLING

STM

CATTLE

IODINATION

PROTEINS

ELECTROPHORESIS

HYDROLYSIS

TYROSINE

ORGANIC IODINE COMPOUNDS

DIIODOTYROSINE

IODINE 125

ELECTROLYSIS

FISICOQUIMICA DE LA INCORPORACION DE IODO A LA HORMONA
DE CRECIMIENTO BOVINA POR EL METODO ELECTROLITICO

R.A. Caro*, V.A. Cascato*, S.M.V. de Giacomini*,
H. Kutobani**, S. Quiroga* y R. Radice**

RESUMEN

Con el objeto de estudiar el mecanismo de incorporación de yodo a la molécula de somatotrofina bovina se han realizado marcaciones por el método electrolítico a pH 7,4 y a una intensidad de corriente de 20μ A, en función del tiempo, para distintas relaciones de yoduro total a proteína.

En todos los casos se determinaron los rendimientos de marcación mediante electroforesis sobre papel. A partir de estos valores y conociendo la cantidad de proteína reaccionante se calcularon los grados de iodación correspondientes, alcanzándose en muchos casos valores superiores a 12.

Se hizo la hidrólisis enzimática de todas las muestras obtenidas. Se observó en los hidrolizados un incremento de yoduro libre, que se hace más notorio a medida que aumenta la relación molar yoduro a proteína. A partir de los cromatogramas de los hidrolizados se determinó el porcentaje de radiactividad de monoiodotirosina y diiodotirosina para distintos grados de iodación. Para grado de iodación 12 se obtiene una radiactividad de diiodotirosina del 70%.

* Cátedra de Física, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

** Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, Argentina.

Si se calcula el grado de iodación relativo para cada relación molar de yoduro a proteína a partir de los resultados de las hidrólisis, se demuestra que, del total de lugares disponibles en los residuos tirosínicos, solo el 75% admite la incorporación de iodo. Este hecho permite deducir que no todos los residuos tirosínicos son accesibles con la misma facilidad.

SUMMARY

Physico-chemical aspects of the bovine growth hormone iodination by the electrolytic method

The mechanism of iodination of Bovine Growth Hormone (BGH) was studied by means of the electrolytic method - at pH 7.4, with a current intensity of 20 mA, as a function of time and for different total iodide to protein ratios.

The yield of each labeling process was determined by paper electrophoresis. From these values and from the amount of protein present in the reaction, the iodination degrees were calculated. frequently, iodination degrees higher than 12 (the maximum theoretically possible), were obtained.

When the enzymatic hydrolysis of the samples was carried out, an increase of free iodide was observed, which was more significant at high iodide to protein molar ratios. The quantitative analysis of the chromatograms of the hydrolyzed samples, allowed us to determine the relative amount of monoiodo-tyrosine (MIT) and diiodotyrosine (DIT) for different iodination degrees. It could be shown that for a iodination degree of 12, only a 70 per cent of the radioactivity appeared as DIT.

The calculation of the relative iodination degree for each iodide to protein molar ratio from the results of the hydrolysis, demonstrated that only a 75 per cent of the total available tyrosine residues admits the incorporation of iodine. Thus, it can be deduced that not all the tyrosine residues are equally accesible for the iodine atom.

INTRODUCCION

Se ha puesto a punto el método de marcación por vía electrolítica, propuesto por Rosa y col. (1), que consiste en provocar la electrólisis en una solución de yoduro de potasio radiactivo en presencia de la proteína en estudio. Ello permite la liberación de cantidades de iodo perfectamente controlables mediante una corriente electrolítica constante, lo que hace posible estudiar la incorporación gradual de iodo a la proteína.

El agente oxidante específico es el I^+ , cuya concentración en la solución en cada instante puede ser regulada por un sencillo control de la intensidad de corriente y el tiempo, evitándose así la presencia de un oxidante químico, que puede dar lugar por sí mismo a la desnaturalización de la molécula proteica. Manteniendo el pH y la relación yodo total a proteína constantes, es posible establecer un compromiso entre la corriente de electrolisis aplicada al medio y el tiempo necesario para obtener distintos grados de iodación.

Cuando se trabaja con una relación yodo total a proteína pequeña la iodación se efectúa predominantemente en los residuos tirosínicos más accesibles de la molécula proteica.

Además de poner a punto el método electrolítico para la marcación de proteínas, con el fin de disponer de una técnica alternativa respecto de la cloramina T, el objeto de este trabajo consiste en el estudio del mecanismo de la incorporación de yodo a la molécula de somatotrofina bovina. El análisis de los resultados obtenidos ha permitido demostrar que el yodo no se incorpora a todos los residuos tirosínicos con la misma facilidad.

PARTE EXPERIMENTAL

APARATOS

- a) Radiocromatógrafo bidimensional Berthold*.
- b) Espectrofotometro Perkin Elmer**.
- c) Celda electrolítica.

La celda electrolítica que se utilizó en las marcaciones consiste, como se observa en la figura 1, en un recipiente de vidrio que contiene un crisol de platino donde se colocan los reactivos, que sirve como ánodo y un soporte de lucite que permite fijar el crisol. El recipiente de vidrio está cerrado por una tapa esmerilada, con una boca también esmerilada que permite el pasaje del cátodo y dos orificios que permiten el pasaje del ánodo y de los reactivos. El cátodo está constituido por un alambre, protegido por un tubo de vidrio cerrado en su extremo inferior por una membrana de diálisis. Ambos electrodos se conectan a una fuente de corriente continua.

* Este equipo fue adquirido mediante un subsidio del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (Legajo N° 4090/69 Fondo de Farmacología).

** Gentilmente cedido por la Orientación Fitoquímica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

REACTIVOS

- a) Hormona de crecimiento bovina cedida gentilmente por el Dr. A.C. Paladini, Centro de Estudio de las hormonas hipofisarias, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- b) ^{125}I sin portador y sin reductor en HONa, provisto por la Atomic Energy of Canada, Limited.
- c) Solución de IK (0,4 M de I⁻) en H₂O bidestilada.
- d) Ringer fosfato salino a pH 7,4 (0,1 M ClNa, 0,04 M ClK, 0,55 mM SO₄ Mg, 0,017 M PO₄³⁻).
- e) Solución reguladora de veronal-acetato de sodio-ácido acético 0,1 N pH 8,5.
- f) Solución de pronase al 5% p/v en solución reguladora de tris-hidróxido de sodio-ácido maleico pH 8,2.
- g) Solución de metil mercapto imidazol al 22% p/v en solución reguladora de tris-hidróxido de sodio-ácido maleico pH 8,2.
- h) Butanol saturado en acético 2 N.

METODO

a) Preparación de la solución de hormona.

Se disolvió la somatotrofina bovina en el Ringer fosfato salino. Dado su escasa solubilidad en el pH al cual se trabaja, se determinó la concentración de proteína en la solución por un método espectrofotométrico, corrigiéndose el efecto de dispersión óptica. Para ello se procedió de la siguiente forma: se disolvió la proteína en exceso con respecto a la cantidad con la cual se deseaba trabajar. Se centrifugó a 1250 revoluciones por minuto durante cinco minutos. Se calculó la concentración proteica del sobrenadante, determinando su absorbencia a 278 nm, teniendo en cuenta que a esta longitud de onda y a pH 7,4, el coeficiente de extinción específica de la hormona es de 0,630 (ml/mg) (2).

b) Marcación.

Se colocó en el crisol de platino la cantidad de proteína e yoduro portador necesaria para obtener una relación yoduro total a proteína prefijada.

La masa de hormona utilizada osciló entre 30 y 50 nanomoles en todas las marcaciones.

Se agregó aproximadamente 200 μ Ci de $^{125}\text{I}^-$ y se completó con Ringer fosfato salino a un volumen final de 5 ml.

Se aplicó una corriente continua de 20 μ A durante 120 minutos.

Se extrajeron alícuotas de aproximadamente 0,3 ml de la celda electrofórica a distintos intervalos de tiempo, con el objeto de determinar mediante electroforesis sobre papel el porcentaje de incorporación de todo a la proteína.

c) Determinación del porcentaje de incorporación de todo a la proteína.

Se sembraron las alícuotas en papel Whatman Nº 1 y se efectuó una electroforesis en solución reguladora de voronal-acetato de sodio-ácido acético 0,1 N a pH 9,5, durante 40 minutos a 12,5 V/cm. A partir de la integración automática del registro radioelectroforético se calculó el porcentaje de incorporación de todo a la proteína y los grados de iodación obtenidos en los distintos tiempos (ver punto e).

d) Determinación de los porcentajes de radiactividad de moniodotirosina y diiodotirosina.

Se realizó una hidrólisis enzimática de cada alícuota, incubando 200 μ l de la misma a 37° C durante 24 horas en presencia de 100 μ l de la solución de pronase y 50 μ l de la solución de metil mercapto imidazol.

Se realizó una cromatografía descendente de cada hidrolizado en papel Whatman Nº 1 durante 16 horas, utilizando butanol saturado en acético como solvente.

A partir de los registros de los radiocromatogramas, se determinó el porcentaje de residuos tirosínicos mono y diiodados formados, cuyos Rf se compararon con los de los patrones respectivos desarrollados en las mismas condiciones y revelados químicamente.

e) Cálculos

El rendimiento de marcación se puede calcular a partir de los resultados de la electroforesis de la proteína marcada o de la hidrólisis enzimática de la misma. En el primer caso se utiliza la ecuación que sigue:

$$R\% = \frac{A_p}{A_p + A_l} \cdot 100 \quad (1)$$

donde:

$R\%$: rendimiento de marcación porcentual.

A_p : actividad correspondiente al ^{125}I unido a la proteína.

A_l : actividad correspondiente al ^{125}I libre.

En el segundo caso se utiliza la ecuación siguiente:

$$R\% = \frac{A_p \cdot A_{MIT} \cdot A_{DIT}}{A_p \cdot A_{MIT} \cdot A_{DIT} + A_l} \cdot 100 \quad (2)$$

donde:

$R\%$: rendimiento de marcación porcentual.

A_p : actividad correspondiente al ^{125}I unido a la proteína que puede haber quedado sin hidrolizar.

A_{MIT} : actividad correspondiente a la monoiodotirosina - ^{125}I .

A_{DIT} : actividad correspondiente a la diiodotirosina - ^{125}I .

A_l : actividad correspondiente al ^{125}I libre.

El grado de iodación (G.I.) se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$G.I. = \frac{I_t \cdot R\%}{100 \cdot P} \quad (3)$$

donde:

I_t : cantidad de yoduro total reaccionante, expresada en nanomoles.
rendimiento de marcación porcentual, calculado según la ecuación (1) ó (2), según el caso.

P : cantidad de proteínas reaccionante, expresada en nanomoles. Para ello se considera un peso molecular de 20700 (3).

RESULTADOS

Analizando los grados de iodación calculados con los datos de rendimiento de marcación en función del tiempo, obtenidos mediante electroforesis sobre papel, se observó que trabajando con una relación molar de yoduro total a proteína de 10 se obtienen muestras con distintos grados de iodación.

Como se observa en la figura 2 se obtuvo una curva sigmoidea, que presenta un plateau que corresponde a un grado de iodación aproximadamente 10, para una relación molar de yoduro-proteína de 10. Cuando se trabaja con una relación yoduro total a proteína de 5, se obtiene un plateau para un grado de iodación de aproximadamente 5. En cambio, cuando la relación yoduro total a proteína es de 15, el grado de iodación correspondiente al plateau de la curva generalísima o supera el valor de 12.

La figura 3 permite apreciar la diferencia entre una recta teórica en la cual todo el yodo liberado en el anodo se incorporaría a la proteína y la curva experimental correspondiente.

Analizando los radiocromatogramas de los hidrolizados se observó un incremento de yoduro libre lo que implicaría una disminución en el rendimiento de marcación con respecto a los datos obtenidos a partir de las electroforesas sobre papel. El incremento de yoduro libre se hace más notorio a medida que aumenta la relación molar de yoduro a proteína.

Se determinó el porcentaje de monodotirosina (MIT) y diiodotirosina (DIT) presentes en todas las muestras hidrolizadas. En la figura 4 se observa que la MIT disminuye y la DIT aumenta, a medida que aumenta el GI.

En las condiciones en las cuales se trabajó no se detectó en los radiocromatogramas de los hidrolizados ningún otro aminoácido marcado. Sin embargo se observa que el porcentaje máximo de DIT alcanzado, es sólo 70 % para un GI de aproximadamente 12.

Con el objeto de estudiar la incorporación de yodo a los residuos tirosínicos de la molécula, se recalcularon los GI a partir de los resultados de la hidrólisis. En la figura 5 se observa que los GI calculados son marcadamente menores que los determinados a partir de las electroforesis, debido al incremento del yoduro libre. Se alcanzó como máximo un GI = 9.

En la figura 6 se analizaron los resultados obtenidos a partir de las hidrólisis mediante un gráfico de GI relativo en función de la relación molar I⁷/p. El GI relativo se define como la relación entre el GI máximo experimental y el GI máximo teórico que es igual a 12.

Los GI utilizados en la representación gráfica fueron los valores máximos obtenidos para cada relación molar de I⁷/p, calculados a partir de los resultados de la hidrólisis.

DISCUSION

El análisis de los resultados obtenidos indica que la incorporación de iodo a la molécula de somatotrofina bovina está parcialmente dificultada, como se demuestra por la discrepancia entre la primera parte de la curva experimental y la recta teórica de la figura 3.

El análisis de los cromatogramas de los hidrolizados indica que un porcentaje de iodo incorporado a la molécula proteica, se libera durante el proceso de hidrólisis. Esta liberación podría deberse a algunas de las causas que analizaremos en lo que sigue.

En primer lugar podría suponerse una posible incorporación de iodo a otros aminoácidos distintos de la tirosina, los que perderían iodo durante la hidrólisis, o una adsorción del iodo a la molécula y su posterior liberación de la misma durante la hidrólisis.

En este sentido debe señalarse que en todas las experiencias realizadas con relaciones molares de I⁻/p igual a 15, se han determinado grados de iodación superior a 12 en el "plateau" de las curvas de incorporación de iodo. Ello avalaría la posibilidad de que el iodo se incorpore a otros aminoácidos además de la tirosina. Por otra parte, existe una diferencia altamente significativa entre la cantidad relativa de iodo inorgánico detectado en las corridas electroforéticas (8 %) y en las cromatografías de los hidrolizados (37 %). Este hecho permite suponer la liberación de iodo durante el proceso de hidrólisis. Los mismos razonamientos permitirían explicar la hipótesis de la eventual adsorción de iodo a la molécula.

También existiría la posibilidad de que en el caso de iodarse únicamente los residuos tirosínicos, la liberación del iodo se produjera a partir de los residuos tirosínicos iodados, fundamentalmente los diiodados, ya que para un GI superior a 12 todos los residuos tirosínicos debieran contener dos átomos de iodo. Dado que la máxima radiactividad correspondiente a DIT es de solamente 70% en los cromatogramas de los hidrolizados, se puede suponer que la liberación de iodo se debería preponderantemente a una deiodación de los residuos tirosínicos diiodados. Si esta hipótesis fuera verdadera, la liberación de iodo debería aumentar en función del tiempo y del grado de iodación. Experimentalmente no se ha observado esta correlación en ningún caso. Además, en experiencias preliminares con angiotensina (4) se demostró que, a pesar de que la estabilidad de la hormona es satisfactoria, existen diferencias de aproximadamente 10 % entre los GI determinados por electroforesis y por cromatografía de los hidrolizados.

En el estado actual de nuestras experiencias no es posible inclinarnos por ninguna de las dos hipótesis señaladas anteriormente. Es posible que

ambas ocurran simultáneamente. Sin embargo en base a que la liberación del yodo no es proporcional al tiempo ni el grado de iodación, la primera hipótesis, que implica la iodación de aminoácidos distintos de la tirosina, parece más probable.

De todas maneras debe concluirse, en base al gráfico de la figura 6, que del total de los lugares disponibles en los residuos tirosínicos, sólo el 75% admite la incorporación de yodo. Estos hechos permiten deducir que no todos los residuos tirosínicos son accesibles con la misma facilidad.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al Profesor Dr. A.C. Paladini, al Profesor Dr. J.M. Dellacha y a la Dra. L. Retegui del Centro de Estudio de Hormonas Hipofisiarias, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, por haber facilitado la Somatotrofina Bovina y por sus útiles consejos durante la realización del presente trabajo. Asimismo agradecen la colaboración del Sr. Victor H. Rizzo durante la labor experimental.

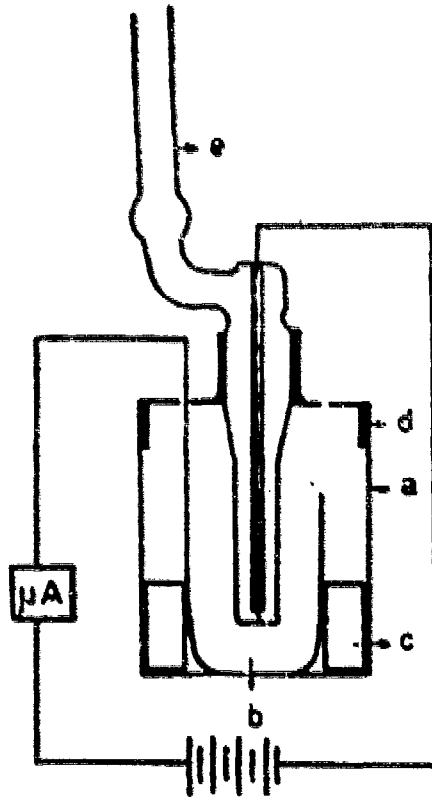


FIGURA 1
Esquema de la celda electrolítica

- a: recipiente de vidrio
- b: cristal de platino
- c: soporte de lucite
- d: tapa esmerilada
- e: cátodo

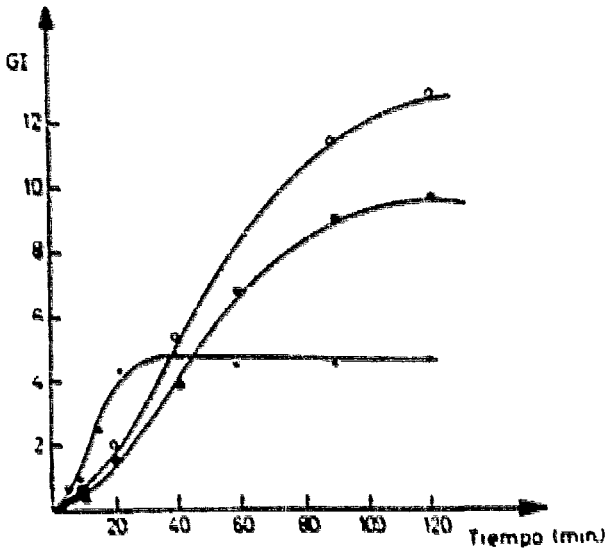


FIGURA 2

Grado de iodación (GI) en función del tiempo para distintas relaciones molares de yoduro a proteína (I^-/p).
(\blacktriangle) $I^-/p = 5$; (\bullet) $I^-/p = 10$, (\square) $I^-/p = 15$.

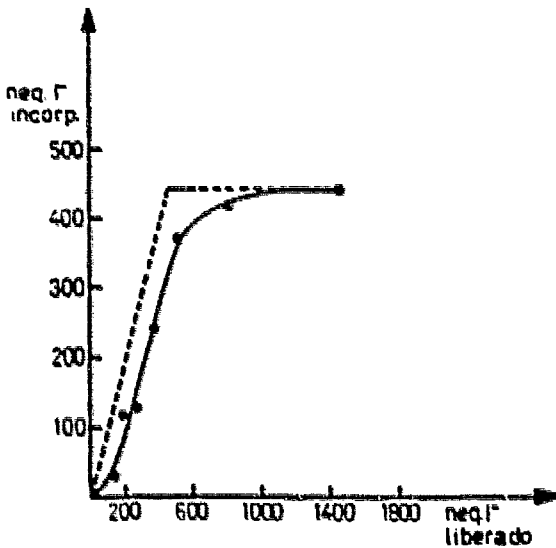


FIGURA 3

neq de I^- incorporado a la proteína en función de los neq de I^- liberados.
(—) recta teórica. (\bullet) curva experimental. (I^-/p) = 10.
La porción horizontal de la recta teórica corresponde a un grado de iodación igual a 10, que es el máximo para las condiciones de la experiencia.

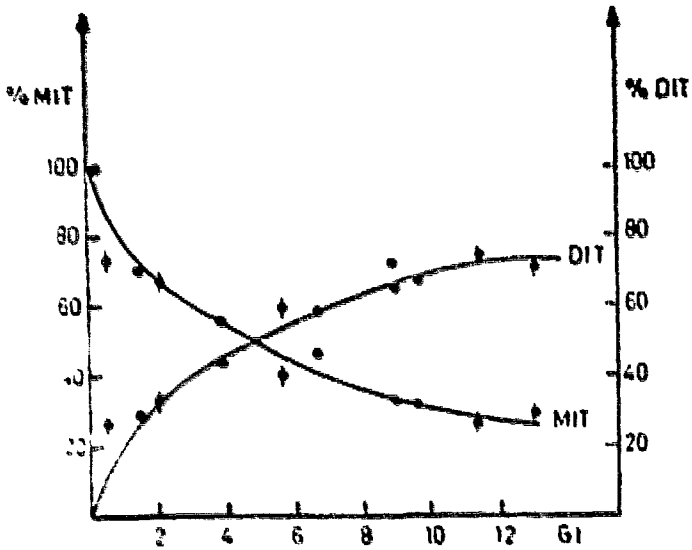


FIGURA 4

% de MIT y DIT en función del GI

- Δ datos correspondientes a una marcación con $I^-/p = 10$.
- datos correspondientes a una marcación con $I^-/p = 15$.

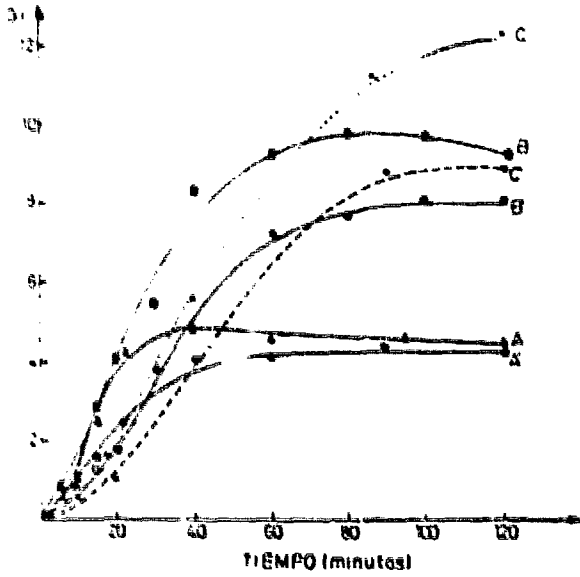


FIGURA 5

Grado de iodación (GI) en función del tiempo

- A GI obtenido a partir de la electroforesis para $I^-/p = 5$
- A' GI obtenido a partir de las hidrólisis para $I^-/p = 5$
- B GI obtenido a partir de las electroforesis para $I^-/p = 10$
- B' GI obtenido a partir de las hidrólisis para $I^-/p = 10$
- C GI obtenido a partir de las electroforesis para $I^-/p = 15$
- C' GI obtenido a partir de las hidrólisis para $I^-/p = 15$.

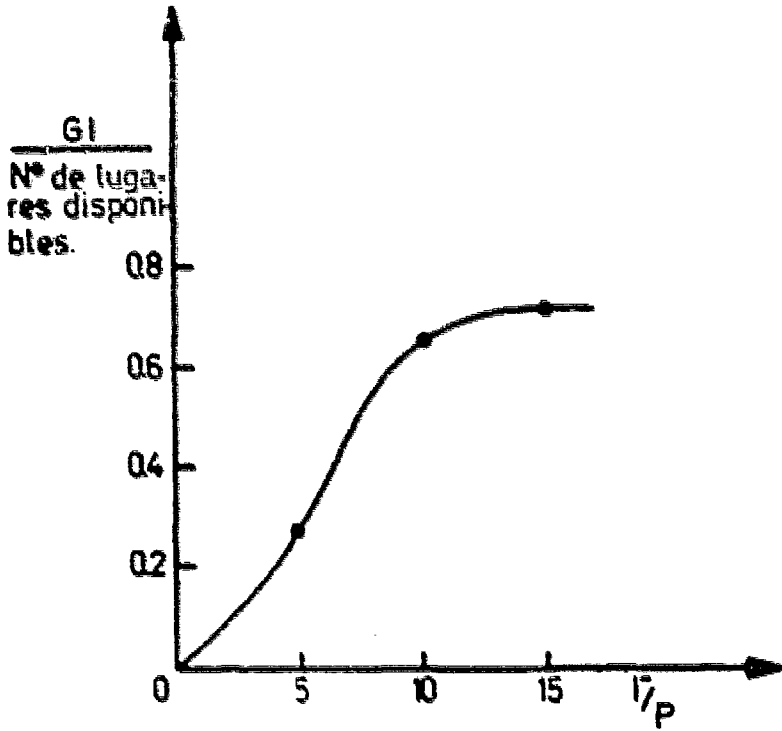


FIGURA 6

El grado de iodación / número de lugares disponibles (grado de iodación relativo) en función de la relación molar de yoduro / proteína.

BIBLIOGRAFIA

1. ROSA, U., SCASSELATI, G. A., PENNISI, F., GIAGNONI, P., RICCIONI, N. and GIORDANI, R. *Biochim. Biophys. Acta*: 86, 519, 1964.
2. CAMBIASO, C. L. "Medida del Intercambio de Hidrógeno en distintas hormonas de crecimiento: relacion entre la especificidad de especie y la conformacion de estas proteínas." Tesis, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, 1971.
3. DELL'ACQUA, J. M., FENERO, M. A. and FEIFFERMAN, I. *Experimentia* 22, 19, 1966.
4. KIRCHBART, H.: Resultados no publicados.



