

## STUDII EXPERIMENTALE ȘI DE LABORATOR

Institutul de chimie fiziologică al Universității Ruhr din Bochum (R.F.G.) (director: prof. dr. H. Faillard) și Laboratorul de biochimie clinică a I.M.F. Tîrgu Mureș (cond. conf. dr. E. Mody, doctor în medicină)

### IZOLAREA ȘI CARACTERIZAREA MUCINEI SUBMAXILARE DE CAL. LEGĂTURILE GLUCIDO-PROTIDICE POSIBILE.

Nota I. Izolare, electroforeză discontinuă în gel de poliacrilamidă, determinarea greutateii moleculare \*

dr. H. Huser, dr. E. Mody, dr. H. Faillard

Numeroși cercetători tratează problema izolării și caracterizării mucinelor submaxilare provenite din diverse surse: oaie, cobai, bou (1—5). Aceste glicoproteine se obțin prin precipitare cu solvenți organici și sau acizi minerali (6—8). McCrea (9) a introdus precipitarea acestor molecule puternic electronegative cu etanol în prezența sărurilor. Tsuiki și colab. (10) purifică aceste substanțe cu ajutorul detergentilor, a soluțiilor saline și prin precipitare cu etanol. Metodele de izolare au fost ulterior îndreptate spre cromatografia cu schimbători de ioni (11—14).

Mucina submaxilară de cal a fost izolată de noi din glande salivare liofilizate și măcinate. Extractele apoase liofilizate le-am purificat prin cromatografie cu schimbători de ioni, pe coloană de DEAE-Sephadex și de hidroxilapatită. Produsul purificat l-am supus examinărilor enumerate mai jos.

#### Material și metodă

Glandele submaxilare de cal, congelate, primite de la abator, au fost lăsate să se topească la temperatura camerei, după care țesutul adipos a fost îndepărtat cu precauție. În tot timpul degresării glandele au fost ținute la gheață. Din cantitatea de 6391,8 g glandă submaxilară curățată de grăsimi, după măcinare și liofilizare s-a obținut un praf fin de 2795,0 g. Această cantitate a fost degresată într-un aparat Soxhlet, utilizându-se eter etilic lipsit de peroxizi. Materia restantă după degresare, de 2699,0 g a fost resuspendată în cca 30 l apă distilată și agitată timp de 3 zile la + 2°C. Soluția viscoasă obținută am centrifugat-o la - 2°C, timp de 30 de minute, la 13000 g. Supernatantul brun-roșu l-am liofilizat din nou, obținând o cantitate de 999,4 g substanță primară. Conținutul în acid neuraminic al acestui produs a fost de 1,7 g%, după metoda Aminoff (15), respectiv de 1,23 g%, după Stennerholm (16).

#### Purificarea substanței pe DEAE-Sephadex

S-a utilizat produsul DEAE-Sephadex al firmei „Pharmacia” (Suedia), prepararea s-a efectuat cu metodele uzuale (17,18)

Am dizolvat 10 g de substanță crudă în 200 ml de tampon fosfat (0,05 M, pH=7,0 - 0,02%, acid de Na). Soluția viscoasă a fost aplicată pe coloană DEAE-Sephadex (A-50, formă de acetat, 40 X 8 cm). Pentru gradient s-a adăugat în vasul de amestecare 0,1 M clorură de potasiu, iar în rezervor 0,4 M KCL. Rata de flux a fost de cca 40—50 ml pe oră, fiind colectate fracțiuni de 12 ml.

\*) Lucrarea a fost efectuată cu sprijinul Fundației Humboldt din R.F. a Germaniei.

Pentru determinarea acidului neuraminic am utilizat un ml din fiecare a cincea fracțiune, după metoda Svennerholm (16). Frațiunile cu o valoare de extincție de peste 0,2, măsurate în cuve de 1,0 cm la 580 nm, au fost adunate (800—1100 ml/coloană), dializate la + 2°C, față de apă distilată și apoi liofilizate. Am determinat valorile de absorbție ale proteinelor la 280 nm, în cuve de cvart de 1,0 cm.

#### *Purificarea substanței pe coloană de hidroxilapatită*

Hidroxilapatita am preparat-o după metoda descrisă de Levin (19). 1 g glicoproteină submaxilară de cal (GSC), purificată pe DEAE-Sephadex, a fost dizolvată în 50 ml tampon fosfat (0,002 M, pH=6,8 + 0,09% NaNO<sub>3</sub>), soluția fiind aplicată pe o coloană de hidroxilapatită (18,3 × 4,6 cm). Am ridicat treptat molaritatea soluției tampon în vederea eluării proteinelor. Absorbția a fost citită la fiecare a cincea probă în cuve de cvart de 1,0 cm, la 280 nm. Dozarea acidului neuraminic s-a efectuat utilizând cite 0,5 ml din fiecare fracțiune, după metoda lui Svennerholm (16). Frațiunile cu o valoare de extincție de peste 0,1 la 580 nm au fost adunate, dializate față de apă distilată la + 2°C și liofilizate.

#### *Electroforeza discontinuă a GSC în gel de acrilamidă*

Disc-electroforeza în gel de acrilamidă am efectuat-o după metoda Maurer (20). Din cauza dificultății colorării glicoproteinelor cu multe glucide (21), metoda de colorare descrisă de Caldwell și Pigman (22), respectiv de Keyser (23) a fost modificată după cum urmează:

1. fixare cu acid acetic 5,5% ,
2. oxidare timp de 1 oră cu acid periodic 0,2% la temperatura camerei;
3. reducere cu o soluție etanolică de metabisulfid de K. pînă la dispariția culorii galbene a iodului molecular (20);
4. tratament cu reactivul Schiff. Gelurile le-am depozitat în această soluție, la + 2°C (20).

Este binecunoscut că, mucina submaxilară de porc nu migrează în gel de poli-acrilamidă (14). Acest fenomen l-am observat și noi în cazul GSC. Din această cauză am redus concentrația gelului pînă la 2,8%, pentru a crea condiții favorabile pătrunderii GSC în gel.

#### *Determinarea greutății moleculare a GSC, purificate pe hidroxilapatită*

Coloana de Sephadex G-200 (22—24), precum și coloanele de Sepharose-4 B și 2 B (25) au fost preparate în mod obișnuit, utilizînd aceeași soluție de tampon fosfat ca la filtrările în gel.

#### *Rezultate*

##### *Purificarea GSC pe coloane de DEAE-Sephadex și de hidroxilapatită*

Primele experiențe, cu ajutorul cărora s-a încercat izolarea GSC după metoda lui Tsuike și colab. (10), au arătat că glicoproteina precipitată cu etanol are o solubilitate redusă. O observație similară raportează Hashimoto (26) în cazul glicoproteinei submaxilare de porc. Din această cauză s-a recurs la izolarea GSC prin cromatografie schimbătoare de ioni, pe DEAE-Sephadex A-50 (fig. nr. 1).

Eluția colectată am dializat-o față de apă distilată, la + 2°C și apoi am liofilizat-o, obținînd 800—1100 mg de GSC purificată, cu un conținut de acid neuraminic de 5—7 g%, după Svennerholm (16). 1 g din această substanță a fost diluată în 50 ml tampon fosfat și purificată ulterior pe coloană de hidroxilapatită. Din eluțiile de pe coloana de hidroxilapatită, după dializare față de apă distilată și liofilizare, am obținut cca 150—200 mg de GSC

pe coloană. Conținutul în acid neuraminic al acestei substanțe este de 8,4 g% după Svennerholm (16) și de  $11,5 \pm 1,5$  g% după Aminoff (15).

#### Disc-electroforeza în gel de poliacrilamidă

Cu ocazia primelor experiențe s-a observat că GSC nu migrează în gelul de 7,5% și nici în cel de 5,0%. Utilizând un gel de poliacrilamidă 2,8%, cu concentrația cea mai mică posibilă, am observat că GSC abia pătrunde în gel, chiar dacă timpul electroforezei se prelungeste până la 12 ore.

Cantitatea GSC aplicată a fost ridicată treptat de la 20 până la 200  $\mu$ g, în vederea punerii în evidență a eventualelor impurități. Substanța s-a colorat foarte greu cu amidoschwarz (20), de aceea am utilizat metoda oxidării cu acid periodic și tratarea cu reactivul Schiff (22, 23).

Efectul ureei asupra comportării electroforetice a GSC este redat în figura nr. 2.

Se poate observa că GSC nu pătrunde mai mult în gel nici în prezența ureei, totuși prezintă o bandă mai largă. Totodată s-a constatat că GSC desialinizată pătrunde mai bine în gel, ceea ce se explică prin faptul că îndepărtarea acidului neuraminic duce la scăderea moleculară a GSC cu cca 10%. GSC desialinizată se colorează de asemenea greu cu amidoschwarz, ceea ce pledează pentru prezența unei cantități mari de glucide legate covalent.

#### Determinarea greutății moleculare a GSC prin filtrare în gel pe Sephadex G-200

Primele experiențe cu filtrare în gel au arătat că GSC se eluează în volumul indicat pentru utilizarea albastrului de dextran. Moleculele care se exclud de gelul Sephadex G-200 au o greutate moleculară de  $8 \cdot 10^5$  în cazul proteinelor globulare și de  $2 \cdot 10^7$  în cazul moleculelor de dextran (22).

#### Filtrarea în gel a GSC pe Sepharose-4 B și 2 B

Volumul exclusional ( $V_e$ ) al acestor tipuri de gel este considerabil mai mare (25), după cum reiese și din tabelul nr. 1 și 2

Tabelul nr. 1

Determinarea greutății moleculare a GSC pe coloană de Sepharose-4 B

Nr. crt.	Substanță test:	$V_e$	$V_o$	$\frac{V_e}{V_o}$	GM	log. GM
	Albastru de dextran	302	302	1	volum de excludere	
1.	Dehidrogenaza glutamică	653	302	2.16	$2 \times 10^6$	6.301
2.	Apoferitina	573	302	2.23	$4.8 \times 10^5$	5.684
3.	Gama-globulina	719	302	2.38	$1.6 \times 10^5$	5.204
4.	Albumina serică de bou	752	302	2.49	$6.7 \times 10^4$	5.826
5.	Ovalbumina	765	302	2.54	$4.5 \times 10^4$	4.653
6.	Chimotripsinogen-A	815	302	2.70	$2.5 \times 10^4$	4.063
7.	Citocrom-C	840	302	2.78	$1.2 \times 10^4$	4.093
	GSC (limitele a 7 filtrări)	342	302	1.132	$10^9$	9.075
		481	302	1.592	$4.5 \times 10^7$	7.650
	G.S.C. desialinizată	750	302	2.483	$10^5$	5.000

H. HUSER SI COLAB.: IZOLAREA SI CARACTERIZAREA MUCINEI SUB-MAXILARE DE CAL. LEGATURILE GLUCIDO-PROTIDICE POSIBILE. NOTA I.

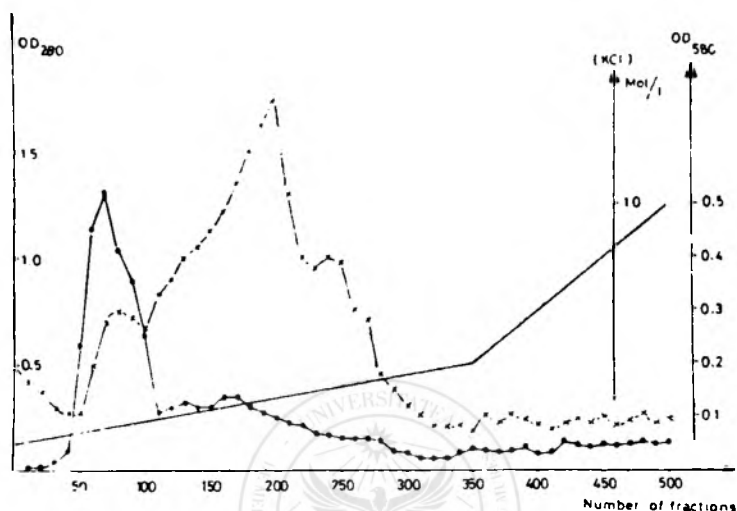


Fig. nr. 1: Diagrama de eluție a GSC de pe coloana de DEAE-Sephadex A-50. Coloană: 40 × 8 cm. rata de flux: 45 ml oră, volumul fracțiunilor: cca 12 ml. -X-X-X-: Absorbția proteinelor la 280 nm, - - - - -: Absorbția pentru acid neuraminic la 580 nm

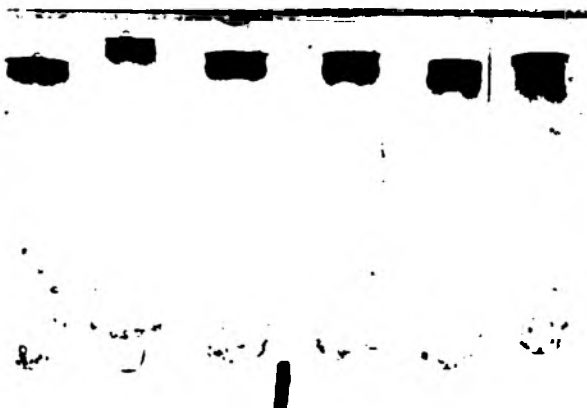


Fig. nr. 2: Electroforeza discontinuă a GSC în gel de poliacrilamidă, în prezența ureei 8 M. Concentrația de gel: 2,8 %. Cantitatea de GSC aplicată de la stînga spre dreapta: 20, 40, 60, 100, 200 μg de GSC pro gel

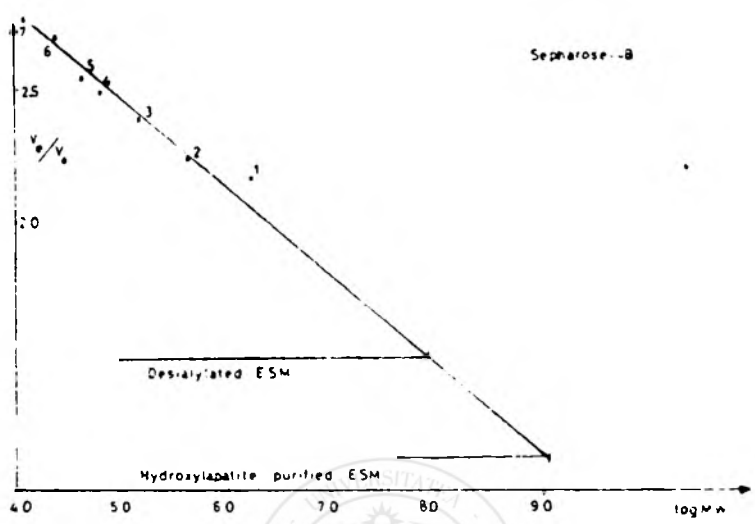


Fig. nr. 3: Determinarea greutateii moleculare a GSC pe coloană de Sepharose-4B. Ordinată:  $V_e/V_0$ . Abscisă:  $\log$  greutateii moleculare. 1—7: vezi tabelul nr. 1 și 2. Desialylated ESM: GSC desialinizată. Hydroxylapatite purified ESM: GSC purificată pe coloană de hidroxilapatită

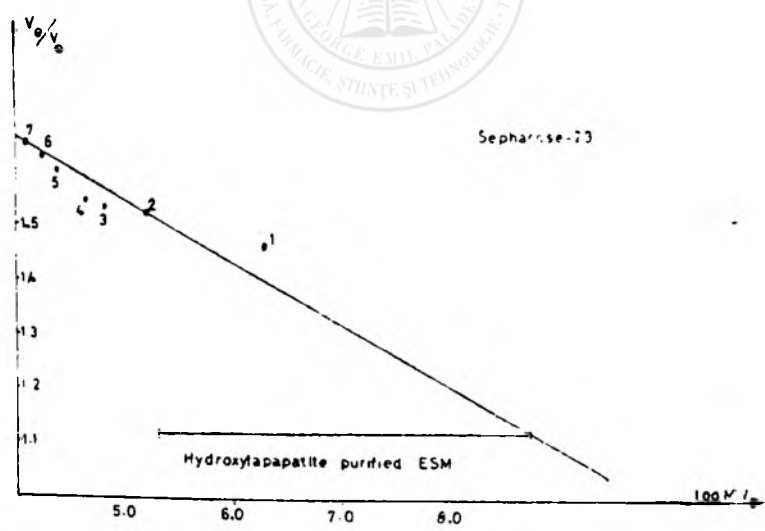


Fig. nr. 4: Determinarea greutateii moleculare a GSC pe coloană de Sepharose-2B. Explicații: vezi fig. nr. 3

Tabelul nr. 2

Determinarea greutatei moleculare a GSC pe coloană de Sepharose-2 B

Nr. crt.	Substanța test:	Ve	Vo	$\frac{Ve}{Vo}$	GM	log GM
	Albastru de dextran	518	518	1	volum de excludere	
1.	Dehidrogenaza glutamică	756	518	1.4601	$2 \times 10^6$	6.301
2.	Gamaglobulina umană	787	518	1.5193	$1.6 \times 10^5$	5.204
3.	Albumina serică de bou	793	518	1.5308	$6.7 \times 10^4$	4.826
4.	Ovalbumina	799	518	1.5422	$4.5 \times 10^4$	4.653
5.	Chimotripsinogen-A	828	518	1.5982	$1.78 \times 10^4$	4.398
6.	Mioglobina de cal	841	518	1.6223	$1.24 \times 10^4$	4.250
7.	Citocrom-C	853	518	1.6467	$5.31 \times 10^3$	4.093
	GSC (limitele a 7 filtrări)	580	518	1.1190	$2.5 \times 10^4$	8.775
		782	518	1.5090	$2 \times 10^5$	5.300

Rezultatele filtrării în gel pot fi redată grafic după Whitaker (32). Toate substanțele de testare au fost obținute de la firma Serva, Heidelberg, R.F. a Germaniei (fig. nr. 3).

Toate substanțele de test se eluează sub forma unor „peak”-uri simetrice și bine delimitate. GSC prezintă însă o curbă de eluție foarte lată, aspect care apare și mai accentuat în cazul GSC desialinizate: greutatea moleculară a acestor fracțiuni devenind mai mică, ele se eluează mai târziu decât glicoproteina intactă. GSC are deci o greutate moleculară destul de mare, prezentând o valoare de peste  $10^6$ , din care cauză ea nu poate fi determinată exact cu ajutorul filtrării în gel. Rezultate similare au fost obținute și cu ajutorul coloanei de Sepharose-2 B (figura nr. 4).

#### Discutarea rezultatelor

Pe baza considerentelor discutate anterior, metoda cea mai utilă pentru purificarea GSC pare să fie cromatografia schimbătoare de ioni. Marea viscozitate și buna solubilitate a produsului obținut prin cromatografie pe coloană de hidroxilapatită, pledează pentru valabilitatea acestei afirmații. S-a constatat că, în cazul în care concentrația gelului de acrilamidă este suficient de redusă, GSC poate pătrunde în gel, prezentând însă o singură fracțiune. Luând în considerare faptul că, în condiții obișnuite, substanța purificată rămâne la punctul de start și după 12 ore de electroforeză, presupunem că este compusă din molecule fibriliforme, cu o greutate moleculară foarte mare. Bettelheim și colab. (34, 35) au examinat mucinele submaxilare de porc și de bou cu ajutorul diferitelor metode fizice și au constatat că aceste substanțe sînt alcătuite din molecule asimetrice, cu o încărcare electrică puternic negativă la valori de pH fiziologice.

Benziile de disc-electroforeză devin mai late și mai difuze dacă se aplică cantități mai mari de GSC (pînă la 200  $\mu$ g). Ureea nu are nici un efect vizibil asupra capacității de pătrundere a GSC în gel. În urma scindării hidrolitice a acidului neuraminic, GSC desialinizată migrează mai departe. În acest caz ureea rămîne de asemenea fără efect. GSC desialinizată pătrunde într-o măsură mai mare în gelul de poli(acril)amidă, din cauza greutății moleculare mai reduse.

Toate aceste observații pot fi interpretate în felul următor: GSC reprezintă un amestec de molecule cu dimensiuni diferite, în sensul noțiunii unei substanțe polidisperse date de Gibbons (1). Forma moleculară poate fi foarte

similară cu cea descrisă la mucina submaxilară de porc și de bou (34, 35). Scindarea parțială a acidului neuraminic duce la scăderea greutatei moleculare: GSC desialinizată pătrunde mai mult în gelul de poliacrilamidă, ea se eluează mai târziu de pe coloana de Sepharose-4 B. Polidispersitatea GSC poate fi constatată și pe baza curbei de eluție foarte largi. *Bettelheim* și *Laurent* (36) au observat o curbă de eluție la fel de lată la mucina submaxilară de oaie pe coloană de Sephadex G-200 atit în prezența, cit și în absența ureei.

Dat fiind faptul că, GSC pătrunde doar într-o foarte redusă măsură în gelul de poliacrilamidă în cursul electroforezei discontinue, această metodă poate fi utilizată cel mult pentru studierea prezenței unor eventuale impurități normo- sau micromoleculare.

### Concluzii

Glicoproteina submaxilară de cal obținută prin extracție apoasă am purificat-o cu ajutorul cromatografiei schimbătoare de ioni pe coloană de DEAE-Sephadex și hidroxilapatită. Substanța pură are o molecularitate de peste  $10^6$ , conține 11,5% acid neuraminic și se prezintă sub forma unei fracțiuni omogene în cursul electroforezei discontinue în gel de poliacrilamidă.

Sosit la redacție: 27 iunie 1972

### Bibliografie

1. GOTTSCHALK A.: Glycoproteins, their composition, structure and function Elsevier, Amsterdam, 1966, 434; 2. ROSSI E., STOLL E.: Biochemistry of glycoproteins and related substances. Ed. Krager, Basel, 1968; 3. SPIRO R. G.: Ann Rev. Biochem. (1970), 39, 599; 4. PIGMAN W., HORTON D.: The carbohydrates. Vol. 11. B. Academic Press N. Y., 1970. cap. 43; 5. TIPSON R. S., HORTON D.: Adv. Carbohydr. Chem. (1970), 25, 407; 6. HEIMER R., MAYER K.: PNAS (1956), 42, 728; 7. CURTAIN C. V., PYE J.: Austr. J. exp. Biol. med. Sci. (1955), 33, 315; 8. GRAHAM E. R. B., GOTTSCHALK A.: Biochem. Biophys. Acta (1955), 38, 315; 9. MCCREA J. F.: Biochem. J. (1953), 55, 132; 10. TSUIKI S., HASHIMOTO Y., PIGMAN W.: Abstr. Fed. Proc. (1966), 25, 745; 11. TETTAMANTI G., DE SALEGUI M., PIGMAN W.: J. Biol. Chem. (1961), 236, 2172; 12. TETTAMANTI G., PIGMAN W.: Arch. Biochem. Biophys. (1968), 127, 641; 13. KATZMANN R., EYLAR E.: Arch. Biochem. Biophys. (1963), 117, 523; 14. DE SALEGUI M., PLONSKA H.: Arch. Biochem. Biophys. (1969), 129, 49; 15. AMINOFF D.: Biochem. J. (1961), 81, 384; 16. SVENNERHOLM L.: Biochim. Biophys. Acta (1957), 24, 604; 17. DORFNER K.: Ionenaustauscher, Ed. Walter de Gruyter, Berlin, 1964; 18. \*\*\* Sephadex-Ionenaustauscher, Ed. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, 19. LEVIN O.: Methods of Enzymology (1966), 5, 27; 20. MAURER H. R.: Disk-Elektrophorese. Walter De Gruyter, Berlin, 1968; 21. MARCAIS J., NICOL C., MORETTI J.: Bull. Soc. Chim. Biol. (1970), 52, 751; 22. DETERMANN H.: Gas Chromatography. Ed. Springer, Berlin, 1968; 23. ANDREWS P.: Biochem. J. (1964), 91, 292; 24. ANDREWS P.: Biochem. J. (1965), 96, 595; 25. \*\*\* Sepharose -2B, -4B, -6B in Perflorm, Ed. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala; 26. HASHIMOTO Y., HASHIMOTO S., PIGMAN W.: Arch. Biochem. Biophys. (1964), 104, 282; 27. ERICSON T.: Arkiv for Kemi (1968), 29, 75; 28. BRUNGABER E. G., AGUILAR V., ARO A.: Arch. Biochem. Biophys. (1969), 129, 131; 29. SCHEINTHAL B. M., BETTELHEIM F. A.: Carbohydr. Res. (1968), 6, 257; 30. LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J.: J. Biol. Chem. (1951), 193, 265; 31. DUBOIS M., GILLES K. A., HAMILTON J. K., REBERS P. A., SMITH D.: Anal. Chem. (1956), 28, 350; 32. WHITAKER J. R.: Anal. Chem. (1963), 35, 1950; 33. PIGMAN W., TETTAMANTI G.: Biochemistry of glycoproteins and related substances, Ed. Rossi-Stoll-Krager, Basel, 1968; 34. BETTELHEIM F. A., HASHIMOTO Y., PIGMAN W.: Biochem. Biophys. Acta (1962), 62, 235; 35. BETTELHEIM F. A., DEY S. K.: Arch. Biochem. Biophys. (1965), 109, 259; 36. BETTELHEIM F. A., LAURENT T. C.: Carbohydr. Res. (1966), 2, 81.