

## ESTUDIOS SOBRE INMOVILIZACION DE UREASA

HAINÉ MIRABELLA, ANA YEMINI,  
FRANCISCO BATISTA\*

### RESUMEN

Se ha reportado la inmovilización de ureasa por métodos que involucran la formación de enlaces covalentes, como son los métodos por intercambio tiol-disulfuro [2] y por reacción con agarosa-CNBr [1], que involucra grupos SH y NH<sub>2</sub> de la enzima respectivamente.

En nuestro laboratorio se logró inmovilizar ureasa por dos metodologías diferentes que involucran otras propiedades de la enzima.

Se logró inmovilizar ureasa por cromatografía de interacción hidrofóbica sobre octil agarosa y se constató conservación de la actividad enzimática.

También se logró inmovilizar ureasa en geles de poliacrilamida insolubilizando la matriz en presencia de la enzima.

Se prepararon ureasa inmovilizada por intercambio tiol-disulfuro y por reacción con agarosa-CNBr.

Se realizó el estudio comparativo de la estabilidad a la temperatura de la enzima en solución y los cuatro derivados insolubles obtenidos en nuestro laboratorio.

También se estudió el efecto del dodecilsulfato de sodio.

### SUMMARY

The immobilization of urease by methods that involve the formation of covalent bonds is known. They include thiol-disulfide exchange [2], and reaction with agarose-CNBr [1]; these involve the SH and NH<sub>2</sub> groups in the enzyme.

\*Cátedra de Bioquímica, Facultad de Química.

We have succeeded in immobilizing the enzyme by two other methods related to different properties in the enzyme:

- a. - by hydrophobic interaction chromatography on octil-agarose, with conservation of enzymatic activity;
- b. - by retention in matrixes of polyacrilamide gels.

The thermal stability of solutions of urease was compared against the four insoluble derivatives. The effect of sodium dodecylsulphate was also studied.

## INTRODUCCION

La ureasa (urea amidohidrolasa, enzima 3.5.1.5) es una proteína de elevado peso molecular, 485000 según Fishbein y col. [4], que posee estructura cuaternaria.

Se destaca por su elevado contenido de residuos cisteína, entre 64 y 82 grupos tiol titulables, aunque sólo unos pocos de ellos son fácilmente reactivos según Carlsson y col. [2].

La molécula presenta zonas hidrofóbicas que han sido demostradas por titulación con 2-p-toluidinilnaftalensulfonato de potasio [7, 9].

En nuestro laboratorio, se logró inmovilizar ureasa en base a sus zonas hidrofóbicas (inmovilización por octil agarosa) y a su elevado peso molecular (entrampe en poliacrilamida).

Se compararon estos derivados insolubles con los obtenidos por dos métodos ya reportados que se basan en otras propiedades (presencia de grupos SH y NH<sub>2</sub>).

Estos últimos derivados insolubles de ureasa, se obtuvieron por intercambio tiol disulfuro sobre agarosa tiol activada [2] y por reacción de grupos amino primarios con agarosa-CNBr [1].

El mecanismo de inmovilización en geles de poliacrilamida es una retención física de la ureasa en una red insoluble, a través de la cual puede difundir libremente el sustrato de bajo peso molecular.

En los otros tres métodos de inmovilización hay una interacción química, entre la enzima y las matrices modificadas.

Se realizó un estudio comparativo entre la enzima en solución y los derivados insolubles, comprobándose una correlación entre el aumento de estabilidad y el método de inmovilización.

## Materiales y Métodos

### Reactivos

Sepharose 6B (agarosa), Sepharose-CNBr (agarosa-CNBr) y Sepharose tiol activada (agarosa-tiol activada) fueron de Pharmacia Fine Chemicals; acrilamida, N,N'-metilenediacrilamida y N,N,N',N'-tetrametiletildiamina (TEMED) de Eastman Chem. Co.; epiclorhidrina, bromuro de octilo y 2,2' dipiridildisulfuro (PDS) de Fluka, y riboflavina de Sigma Chemical Company.

Todos los demás productos fueron de grado reactivo.

### Determinación de proteínas.

Fueron determinadas espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 280 nm con celdas de cuarzo de 1 cm.

Una solución proteica con una lectura a 280 nm de 1,000 se definió que poseía una concentración de 1 UA/ml.

### Determinación de actividad ureásica

Se ensayó la actividad ureásica por incubación con urea 0.2M en buffer fosfato (sódico o potásico), pH 7.2 durante un tiempo adecuado, determinándose el amoníaco formado (por la hidrólisis de la urea) colorimétricamente por métodos de Nessler o Berthelot.

Se definió la actividad ureásica como la absorbancia medida a 436 nm (método de Nessler) o 655 nm (método de Berthelot).

Para la enzima inmovilizada, se realizaron tomas mediante pipetas automáticas (Centaur), de 0.5 y 1.0 ml de suspensión de los geles respectivos, mantenidos bajo agitación por medio de microagitador magnético (Micro V Stirrer) a 800 rpm.

Las alícuotas fueron transferidas a tubos de ensayo, realizándose la determinación de la actividad ureásica ligada a dichos geles.

## Parte experimental

### Preparación del extracto

Se realizó extracción de ureasa de Jack Bean meal según método de Carlsson et al. [3], modificado.

Se mezclaron 12 g. de harina con 60 ml de buffer tris 0.1M pH 7.2, 1 mM en EDTA, 36% en etanol, y se incubaron con agitación esporádica a 30° C durante 30 minutos. Se filtró por Buchner y se ajustó el pH a 7.2 con Na OH 1N. El extracto fue diluido con buffer de modo de ajustar el grado alcohólico a 25%, y centrifugado a 5.000 rpm por 30 minutos.

Este extracto fue usado directamente para la inmovilización de ureasa por intercambio tiol-disulfuro (agarosa tiol activada), o sometido a cambio de buffer por ultrafiltración. Para realizar dicho cambio de buffer, el extracto original fue concentrado hasta 10 ml mediante ultrafiltro Amicon de 50 ml de capacidad, con membrana XM100, y diluido hasta 50 ml con buffer fosfato potásico pH 7.2 1 mM en EDTA (0.1 ó 1 M según el caso) El procedimiento fue repetido varias veces.

Este extracto en buffer fosfato fue usado para entrapar en geles de poliacrilamida, inmovilización en agarosa-CNBr y cromatografía de interacción hidrofóbica.

#### Inmovilización

a) Entrampe en geles de poliacrilamida. [5], [8].

En columna de 10 × 180 mm, tapada en un extremo, se agregan 10 ml de extracto de ureasa, en buffer fosfato potásico 0.1 M pH 7.2 y 1 mM en EDTA; 0.475 g. de acrilamida; 0.025 g. de metilbisacrilamida.

Se desaerea, se agrega 0.2 ml de riboflavina (5 mg % en agua) y una gota de Temed. Se dejó gelificar durante una hora, con exposición a luz fluorescente.

El gel fue removido, pasado por tamiz de malla 0.63 mm y lavado repetidas veces en tubos de centrifuga con buffer hasta que dichos lavados daban negativo el ensayo de actividad ureásica (tiempo de reacción 30 minutos). En general, cinco o seis lavados fueron suficientes. Se determinó entonces la actividad ureásica atrapada en las partículas de poliacrilamida, transfiriendo alícuotas de 1.0 ml de suspensión a tubos de ensayo e incubando con 2.0 ml de urea 0.2M en buffer indicado arriba.

Se determinó el amoníaco formado por método de Nessler o Berthelot (este último método se usó de preferencia en vez de Nessler durante los lavados, ya que los monómeros libres interferían con la reacción de este último).

b) Por cromatografía de interacción hidrofóbica.

Preparación de la matriz. Se trató Sepharose 6B con epíclorhidrina en Na OH diluida, de acuerdo al método de Porath, a los efectos de aumentar el entrecruzamiento del gel y así hacerlo resistente a tratamientos a altas temperaturas y a pH muy alcalinos.

Finalmente la E.C. Sepharose es alquilada con bromuro de octilo, a 95° C y pH 13, por tratamiento prolongado y bajo enérgica agitación para evitar la separación de fases.

El gel de octil agarosa así preparado fue entonces lavado con exceso de buffer fosfato potásico 0.1 M pH 7.2 y luego empaquetado en columna (10 × 80 mm) y equilibrado con el mismo buffer pero 1M.

El extracto de ureasa en buffer fosfato potásico 1M pH 7.2, fue bombeado a través del gel (equilibrado y empaquetado como se indicó anteriormente) mediante bomba peristáltica P-3 (Farmacia) a una velocidad de 20 ml por hora.

El contenido en proteínas de los eluidos fue registrado mediante espectrofotómetro Beckman 25 equipado con celda de flujo a 280 nm.

Los eluidos se recogieron en fracciones de 3 ml mediante recolector de fracciones SMI, determinándose la actividad ureásica en los mismos.

La retención de actividad era de un 70%, no llegándose a saturar el gel luego del pasaje de 50 ml de extracto.

El gel fue lavado entonces con buffer fosfato potásico 1M, pH 7.2 hasta que la absorbancia a 280 nm fue nula, removido de la columna, suspendido en el mismo buffer (30 ml), mediante agitación por rotación durante dos horas.

Sobre este gel se hicieron ensayos de actividad ureásica, como se indicó anteriormente.

Se constató la presencia de enzima activada ligada al gel así como ausencia de la misma en el sobrenadante.

c) Por intercambio tiol-disulfuro

Preparación del gel: se regeneró la Sepharosa tiol activada (usada en experimentos anteriores), a partir de glutation-agarosa, de acuerdo al método de Carlsson et al. [1], por activación con 2,2' dipiridil-disulfuro en buffer tris 0.1M, pH 7.2.

El derivado PDS-agarosa así obtenido fue lavado y equilibrado con buffer tris 0.1M, pH 7.2., 1 mM en EDTA.

Se empaquetó el gel en columna (10 × 80 mm) y se aplicaron 15 ml de extracto en el mismo buffer con una velocidad de flujo de 20 ml/h, controlándose en los eluidos: actividad ureásica,  $A_{280}$  y  $A_{343}$  (liberación de tiopiridona).

Se lavó con el buffer antes indicado hasta que la  $A_{280}$  fue nula, y se ensayó actividad ureásica sobre el gel previamente removido de la columna y suspendido por agitación magnética.

Se comprobó la presencia de una buena actividad ureásica ligada al gel.

d) Por reacción con agarosa-CNBr.

Se trabajó con dos gramos de agarosa-CNBr, que previo tratamiento con ácido clorhídrico 1 mM, se sometieron a un rápido lavado con buffer de acoplamiento (fosfato de potasio, 0,1 M, pH 8, 0,5 M en Na Cl). Los lavados se hicieron en placa porosa.

Inmediatamente se agregaron unos 20 ml de extracto diluido al cuarto en el buffer de acoplamiento. Se dejó la mezcla de proteína-gel, en agitación a temperatura ambiente durante veinticuatro horas. Se filtró, y se lavó el gel-ureasa, en placa de vidrio, con el mismo buffer.

Se determinó en el filtrado y lavados,  $A_{280}$  y actividad ureásica por Nessler, siendo esta última no significativa.

El porcentaje de pegado fue de un 80%.

Se bloquearon, posteriormente, los grupos activos residuales de la matriz con buffer tris, pH 8, 0.1 M durante veinticuatro horas a temperatura ambiente.

Se lavó el gel con buffer de actividad (fosfato sódico 0.02 M, pH 7,2) hasta absorbancia nula a 280 nm.

El gel-ureasa quedó suspendido en una vez y media su volumen, en buffer de actividad. Sobre esta suspensión se realizaron los ensayos de actividad ureásica, constatándose la presencia de enzima activa.

Estudios de estabilidad

a) Efecto de la temperatura.

Se determinó la actividad ureásica para la enzima en solución e inmovilizada en los cuatro geles con y sin tratamiento térmico.

Este consistió en la exposición del extracto y los geles a distintas temperaturas durante una hora.

De este experimento se observó una disminución importante de la actividad ureásica a partir de los 65° C, lo cual determinó que se eligiese 75° C, como temperatura del ensayo comparativo.

A los efectos de probar el posible efecto protector de los geles sobre la ureasa, se incubaron fracciones de 1.0 ml de suspensiones adecuadas de cada gel portando la enzima, en tubos de ensayo tapados en baño de agua a 75° C durante una hora. Luego fueron rápidamente enfriados a temperatura ambiente y se determinó la actividad ureásica (para cada tipo de gel y para la enzima en solución) por quintuplicado y promediando valores. Tiempo de reacción: veinte minutos.

Se determinó paralelamente la actividad para los geles sin calentamiento.

Los resultados se resumen en la tabla I.

Se realizó un experimento complementario para los geles de ureasa-poliacrilamida, a los efectos de controlar la posible liberación de enzima por efecto del tratamiento térmico. Para ello se incubaron en tubos de centrifuga, alícuotas de 3.0 ml de suspensión de ureasa-poliacrilamida, durante una hora a 75° C, se enfriaron rápidamente a temperatura ambiente y se centrifugaron a 5.000 rpm durante diez minutos.

En el sobrenadante se buscó actividad ureásica, en las mismas condiciones que para el gel.

Se comprobó ausencia de actividad, probando así que el efecto medido era sobre la enzima inmovilizada.

b) Efecto del SDS al 0.5 %.

Se usó una solución de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1% en buffer fosfato sódico 0.02 M pH 7.2. La concentración final de SDS en el tubo de incubación fue de 0.5 %.

El extracto enzimático fue diluido veinticinco veces en buffer fosfato potásico 0.1 M. pH 7.2 tomándose alícuotas de 0.5 ml.

Se ensayó el efecto del SDS por incubación del mismo con el extracto y los geles, a distintos tiempos.

A partir de los resultados obtenidos se concluyó que un período de una hora era adecuado para el ensayo.

Se tomaron seis fracciones de cada gel de 0.5 ml (bajo agitación con Micro V Stirrer aproximadamente 800 rpm) con pipeta automática. A tres de las fracciones se les agregó 0.5 ml de buffer fosfato sódico pH 7.2, 0.02 M y a las otras tres, 0.5 ml de SDS al 1%. Se incubó durante una hora.

A cada tubo se le agregó entonces dos ml de urea 0.2 M en buffer fosfato sódico 0.02 M, pH 7.2.

Se dejó reaccionar durante 30 minutos y se nesslerizó.

Los resultados se resumen en la tabla II.

Se verificó que el tratamiento con SDS no liberaba enzima ligada al gel hidrofóbico, incubando durante una hora tres alícuotas de la suspensión del gel con volúmenes iguales de SDS al 1% en buffer fosfato sódico pH 7.2, 0.02 M. Los incubados fueron centrifugados y se ensayó actividad ureásica en los sobrenadantes libres de gel. No se encontró ureasa activa en dichos sobrenadantes.

## Resultados y discusión

Los derivados insolubles de la ureasa obtenidos por los cuatro métodos mencionados presentan diferencias en el comportamiento frente a la temperatura y al efecto del SDS.

De los resultados expuestos en la Tabla I, se pone de manifiesto, una mayor estabilidad de la ureasa inmovilizada comparada con la enzima en solución.

El efecto estabilizante tiene distinta magnitud según el método de inmovilización utilizado.

Estos resultados están relacionados con la distinta naturaleza y magnitud de las interacciones involucradas en cada uno de los métodos.

En la inmovilización por entrapamiento en geles de poliacrilamida, la enzima está retenida físicamente en una red tridimensional insoluble, que favorece el mantenimiento de los cuatro niveles de organización de la molécula enzimática.

En los otros tres métodos de inmovilización, hay una interacción química directa de la matriz con la enzima, de distinta naturaleza en cada caso: enlaces imidocarbamato, disulfuro y por interacción hidrofóbica.

En la inmovilización por intercambio tiol disulfuro, la enzima estaría unida a la matriz por una sola subunidad, a través de grupos disulfuro [2], quedando entonces la enzima relativamente libre (sus otras tres subunidades).

En la inmovilización por reacción con agarosa-CNBr, la enzima se une a la matriz activada por múltiples enlaces involucrando grupos amino primarios (del extremo  $\text{NH}_2$  terminal y de las cadenas laterales básicas). La enzima queda así unida a la matriz por un mayor número de enlaces que en otros métodos.

En la inmovilización por interacción hidrofóbica, las cadenas hidrofóbicas del gel se unen a regiones de ese mismo carácter de la molécula enzimática, formando un complejo estable insoluble, por múltiples uniones hidrofóbicas.

La necesidad de estas uniones múltiples para inmovilizar por el mecanismo de interacción hidrofóbica ha sido reportado por Hjertén y col. [6; 10] en estudios realizados con polipéptidos hidrofóbicos.

Los datos de la Tabla I, muestran que la octil agarosa-ureasa es el derivado más estable al tratamiento térmico, siguiéndole el derivado ureasa-agarosa.

La poliacrilamida presenta cierto efecto protector, aunque menor que los geles mencionados arriba, mientras que el derivado ureasa-agarosa tiol activada es el más susceptible a la acción de la temperatura.

Se esperaba que la red de poliacrilamida al atrapar la enzima ejerciera un mayor efecto protector sobre la misma, al preservar su estructura cuaternaria frente a la acción de fuerzas distorsionantes. Sin embargo la Tabla II muestra que la poliacrilamida-ureasa es más sensible al SDS al 0.5% que la propia enzima libre.

Pensamos que esta sensibilización de la ureasa podría deberse a una distorsión parcial por efecto de la red.

La Tabla II también muestra que el derivado de octil agarosa-ureasa es el más resistente frente a la acción disociante del SDS.

Una posible explicación sería que el gel ocupa sitios hidrofóbicos de la enzima, sin afectar la actividad; al agregar el SDS, se establece una competencia por tales sitios. El complejo formado por el gel hidrofílico-ligando hidrofóbico y la enzima es más estable que el complejo enzima-SDS, y así permite la

retención de un considerable porcentaje de actividad. En efecto, los experimentos demostraron que con una incubación con SDS al 0.5% durante una hora, la actividad enzimática aparece ligada al gel y se conserva en un 94%.

La Tabla II también muestra que en forma similar a la Tabla I, el derivado ureasa-agarosa le sigue en estabilidad al derivado anteriormente mencionado, siendo la estabilidad del derivado ureasa-agarosa tiol activada menor aún.

De los resultados obtenidos, nosotros concluimos que aquellos derivados insolubles de ureasa que involucran mayor número de enlaces (ureasa-octil agarosa y ureasa-agarosa), son los que presentan mayor estabilidad frente a agentes desnaturizantes como la temperatura y el lauril sulfato de sodio.

TABLA I

Efecto de la temperatura sobre la actividad ureásica

Fracción: (Enzima en)	Actividad ureásica		% pérdida de activ.
	Sin calentar	Calent. 75° C	
Solución	0.462	0.082	82
Poliacrilamida	0.260	0.093	64
Octil agarosa	0.644	0.369	44
Agarosa Tiol activada	0.488	0.128	74
Agarosa-CNBr	0.144	0.071	51

Se incubaron fracciones de 1.0 ml de suspensiones adecuadas de cada gel portando la enzima, en tubos de ensayo tapados en baño de agua a 75° C durante una hora. Luego fueron rápidamente enfriados a temperatura ambiente y se determinó la actividad ureásica (para cada tipo de gel y para la enzima en solución), por quintuplicado y promediándose estos valores.

Se determinó paralelamente la actividad para los geles sin calentar.

TABLA II

Efecto del SDS sobre la actividad ureásica

Fracción: (Enzima en)	Actividad ureásica		% pérdida de activ.
	Sin SDS	Con SDS 0.5%	
Solución	0.448	0.271	40
Poliacrilamida	0.514	0.157	69
Octil agarosa	0.613	0.578	6
Agarosa Tiol activada	0.351	0.275	22
Agarosa-CNBr	0.741	0.654	12

Se incubaron 0.5 ml de cada tipo de gel y de la enzima en solución, con 0.5 ml de SDS al 1% durante una hora y se determinó actividad ureásica. Se realizó un ensayo comparativo sustituyendo 0.5 ml de SDS por buffer fosfato sódico, pH 7.2, 0.02 M.

Las determinaciones se hicieron por triplicado, considerándose en la tabla valores promedios.

## BIBLIOGRAFIA

1. - Axén, R.; Porath, J. y Erback, S. (1967) Nature (London), 214: 1.302-1.304.
2. - Carlsson, J.; Axén, R.; Brocklehurst y Crook, M. (1974) Eur. J. Biochem. 44: 189-194.
3. - Carlsson, J.; Olsson, I.; Axén, R. y Dravin, H. (1976) Acta Chem. Scand. 30: 180-182.
4. - Fishbein, W.N.; Nagarajan, K. y Scurzi, W. (1970) J. Biol. Chem. 245: 5.985-5.992.
5. - Hicks, G.P. y Updike, S.J. (1966) Anal. Chem. 38: 726-730.
6. - Hjertén, S.; Rosengren, J. y Pahlman, S. (1974) J. Chromatogr. 101: 281-288.
7. - Mc. Clure, W.O. y Edelman, G.M. (1966) Biochemistry 5: 1.908-1.919.
8. - Mosback, K. y Mosback, R. (1966) Acta Chem. Scand. 20: 2.807-2.810.
9. - Ostrovskii, Yu, M. (1975) Ukr. Biokhim. Zh. 47(6), 701-7 (Russ). (Citado en Chem. Abstracts, 84: 70541 k. 1976).
10. - Rosengren, J.; Pahlman, S.; Glad, M. y Hjertén, S. (1975) Biochimica et Biophysica Acta, 412: 51-61.