

Actividad α -N-benzoilarginina-2-naftilamidohidrolasa de hígado de pollo

F. Barceló, N. Vives y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona-28

(Recibido el 2 de enero de 1980)

F. BARCELO, N. VIVES and J. BOZAL. α -N-Benzoylarginine-2-naphthylamide-amidohydrolase Activity in Chicken Liver. Rev. esp. Fisiol., 36, 311-320. 1980.

The enzyme activity from chicken liver that hydrolizes α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA) has been separated into three active fractions by chromatography on Sephadex G-100 and DEAE-cellulose. The enzyme in Fraction FE_A has a molecular weight $\geq 100,000$. The other two enzymes in Fractions FE_{1B} and FE_{2B} have a molecular weight around 23,000 and are separated by DEAE-cellulose chromatography.

The BANA-hydrolase of fraction FE_{2B} is unstable at pH alkaline and activates trypsinogen, in contrast with the enzyme of fraction FE_{1B} . Both are thiol enzymes which behave analogously against activators (cysteine, dithiotreitol and 2-mercaptoethanol) and inhibitors (PCMB, IAA, N-ethylmaleimide, Cu^{2+} , Hg^{2+} and Zn^{2+}).

En los tejidos de mamíferos, entre ellos hígado de rata (2), se encuentran algunos tioenzimas cuya analogía de propiedades hace difícil su caracterización. Hidroliza a la α -N-benzoil-DL-arginina (BANA), pero son diferentes de la catepsina B

(E.C. 3.4.22.1) presente en el mencionado tejido (*loc. cit.*). Los homogeneizados de hígado de rata hidrolizan al substrato BANA y exhiben dos valores de pH óptimo (4,8 l 6,2) (5); su actividad BANA hidrolasa no inactiva a la aldolasa (9), criterio que se ha adoptado para identificar a la catepsina B (2).

De los lisosomas de hígado de rata se ha obtenido una BANA-hidrolasa ($P_m = 33.000$), diferente de la catepsina B, ya que no activa al tripsinógeno ni emplea como substrato a la benzoil-arginina-p-nitroanilida (8). DAVIDSON y POOLE (7) sugieren que la actividad BANA-hidrolasa de los homogeneizados de hígado de

Abreviaciones:

α -N-benzoilarginina-2-naftilamida amidohidrolasa o BANA-hidrolasa.

α -N-Benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide, Bz-Arg-NNap, o BANA.

Dipeptidil aminopeptidasa I, GPNA-hidrolasa o DAP I.

rata se debe, en su mayor parte, a dos enzimas ($M \approx 25.000$) que se separan por cromatografía en DEAE-celulosa de un extracto lisosómico crudo; sólo uno de ellos inactiva a la aldolasa y degrada a las proteínas nativas.

La catepsina H (15, 16) de hígado de rata es una endoaminopeptidasa que actúa sobre BANA y puede inactivar a la aldolasa y a la glucoquinasa del mismo modo que la catepsina B; se diferencia de ella en la inhibición por leupeptina y en la actividad amidásica. La catepsina L (15, 17), tioproteasa presente en el hígado de rata, es similar a las anteriores pero su actividad frente a BANA es reducida.

En este trabajo se estudia la actividad BANA-hidrolasa de hígado de pollo, cuya complejidad es semejante a la exhibida por el hígado de rata (*loc. cit.*), si bien algunos autores (3) al purificar la catepsina B de hígado de pollo no indican la existencia de actividad BANA-hidrolasa adicional. Se describe aquí la separación de tres fracciones que exhiben actividad BANA-hidrolasa y algunas de sus propiedades.

Material y métodos

El material de partida es hígado de pollo separado de animales recién sacrificados. Se homogeneiza el tejido en un triturador de cuchillas con tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 6,0, en la proporción 1/10 (p/v), a 4° C.

Los sustratos empleados son: α -benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA), hemoglobina bovina, seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma); ester etílico de la α -N-benzoil-L-arginina (BAEE), glicil-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GPNA) y Tripsinógeno bovino (Merck). Como inhibidores p-cloromercuribenzoato sódico (PCMB, Egea-Chemie), ácido monoiodoacético (IAA, UCB), ácido 5,5'-ditio-bis(2-nitrobenzoico) (DTNB, Calbiochem) y N-etilmaleimida (NEM, Aldrich) y como activadores, L-cisteína y 2-mercaptoetanol

(Merck) y ditioneitol (DTT, Sigma). Otros reactivos: Fast Garnet GBC, solución BRIJ 35, tripsina liofilizada y el inhibidor triptico de la soja (SBTI) (Sigma) las resinas de Sephadex G-100 (Pharmacia) y DEAE-celulosa (Watman DE-23).

La actividad BANA-hidrolasa se determina siguiendo el curso de la hidrólisis del sustrato α -N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida por el método de BARRETT (4). Las muestras se incuban 10 min a 40° C, en tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 6, con cisteína 2 mM y EDTA 1 mM como activadores y sustrato 1,5 mM. La reacción enzimática se interrumpe al añadir el reactivo de copulación a la mezcla en incubación. La naftilamina liberada se copula con una disolución de Fast Garnet (0,124 mg/ml) en presencia de EDTA (12,5 mM) y PCMB (2,5 mM) en una disolución acuosa de Brij 35 al 1 %, que disuelve el complejo formado, cuya absorbancia se mide a 520 nm. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ mol de sustrato por minuto.

La actividad de la catepsina D se determina frente a hemoglobina desnaturada, según el método de ANSON (1), al 1 % en tampón citrato-fosfato 30 mM, de pH 5,0 a $38 \pm 0,1^\circ$ C. La reacción se interrumpe a los 30 min por adición de un volumen de ácido tricloroacético 0,25 M igual al volumen de muestra en incubación. En los filtrados se determinan los incrementos de absorbancia a 280 nm ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) frente a un blanco del sustrato. La relación entre la concentración de enzima y $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ es lineal hasta 0,300; todos los ensayos se realizaron en estas condiciones. La unidad enzimática es la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de 1 unidad en 60 min.

La actividad de la dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) se mide por el método de GORTER y GRUBER (12), con GPNA 0,5 mM como sustrato. Las mezclas de

incubación se hallan en medio de tampón acetato sódico 80 mM de pH 5, que contiene NaCl 50 mM y cisteína 6 mM como activadores y Na_2SO_4 , de modo que la fuerza iónica sea 0,25. La incubación se efectúa a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$ y la reacción se interrumpe a los 40 min por adición de ácido monoiodoacético hasta una concentración 10 mM. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μmol de sustrato por min.

La actividad esterásica se determina por medida potenciométrica de la extensión de la hidrólisis de BAEE (2,2 mM) a 40°C y pH 6, en medio de KCl 0,1 M, con cisteína 2 mM y EDTA 1 mM como activadores; se valora con NaOH 10 mM. El curso de la reacción se sigue con un valorador Beckman adaptado como pH-stat.

La actividad proteolítica de las BANA-hidrolasas frente a BSA y caseína nativas y hemoglobina desnaturalizada, se determina por incubación del enzima con una disolución del sustrato al 1 % (p/v), en medio de tampón citrato-fosfato 0,1 M de pH 3,5-7,5, 2 mM en cisteína y 1 mM en EDTA, durante 3 h a $40 \pm 0,1^\circ \text{C}$. La reacción se interrumpe por adición de un volumen de TCA 0,25 M igual al de la mezcla en incubación; en los filtrados se determinan los incrementos de absorbancia a 280 nm frente a un blanco del sustrato. La actividad se expresa como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) de 1,0 unidad por min.

El tripsinógeno se activa por contacto (de 30 a 180 min) de las muestras enzimáticas con una disolución de tripsinógeno 0,9 mg/ml en tampón de acetato sódico 50 mM de pH 3,8, con cisteína 2 mM y EDTA 1 mM a 40°C . La reacción se interrumpe enfriando las muestras a 0°C . La actividad de la tripsina liberada se determina por el método potenciométrico (19) a 25°C con BAEE 0,5 mM como sustrato, a pH 8, en presencia de

KCl 0,1 M y CaCl_2 mM; se valora con NaOH 4 mM.

La concentración de proteína se determina por el método de WARBURG y CHRISTIAN (20).

Resultados

SEPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD BANA-HIDROLASA DE HÍGADO DE POLLO.

Extracción y precipitación con sulfato amónico. Los homogeneizados hepáticos se preparan en fosfato sódico 10 mM, de pH 6, en la relación 1 g de hígado/10 ml de tampón y se centrifugan a $39.000 \times g$, 60 min, 4°C . El sobrenadante se lleva a pH 5 (ácido acético 1 M) y se calienta a 50°C , 20 min, con agitación regular; la suspensión se enfría a 4°C y se centrifuga a $6.000 \times g$, 30 min, 4°C . El residuo contiene aproximadamente el 45 % de proteína inactiva y en el sobrenadante se encuentra el 90-100 % de la actividad BANA-hidrolasa.

El sobrenadante se lleva al 70 % de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y el precipitado, que retiene el 90 % de la actividad BANA-hidrolasa inicial, se separa por centrifugación a $6.000 \times g$, 15 min, a 4°C . Si el sobrenadante anterior se lleva al 47 % y 64 % (v/v) en acetona se obtienen dos fracciones con actividad BANA-hidrolasa, por lo que se ha desechado este procedimiento que ha sido propuesto por otros autores (3).

El residuo obtenido al 70 % de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ exhibe, además, actividad esterásica frente a BAEE a pH 6, actividad hemoglobinolítica (catepsina D), y actividad GPNA-hidrolasa (DAP I); se emplea para la separación cromatográfica de la actividad BANA-hidrolasa.

Filtración con gel de Sephadex G-100. El precipitado obtenido por saturación al 70 % con sulfato amónico, se disuelve en tampón de acetato sódico 50 mM, 0,1 M en NaCl, de pH 5, en relación 1/10 (p/v),

y se aplica a una columna de Sephadex G-100 (3×70 cm) equilibrada con el mismo tampón.

En el proceso se separan dos fracciones con actividad BANA-hidrolasa (fig. 1). La primera de ellas (FE_A), que representa el 15 % de la actividad total, coincide con la proteína que se separa en el volumen de exclusión ($M \geq 100.000$); contiene, además, a la DAP I (85 %) y el 47 % de la actividad esterásica presente en el residuo. La segunda fracción (FE_B) se separa en el volumen de elución correspondiente a proteínas de peso molecular aproximado 23.000 (volumen de elución de la tripsina cristalizada $P_m = 23.000$ y del inhibidor triptico de la soja, $P_m = 21.700$). Esta fracción retiene el 50-60 % de la actividad BANA-hidrolasa inicial, con un grado de purificación de 16 veces. El rendimiento no es muy elevado debido a que se intenta eliminar totalmente la catepsina D y se desprecia la zona de actividad que se solapa. Toda la actividad hemoglobinolítica y el 40 % de la actividad

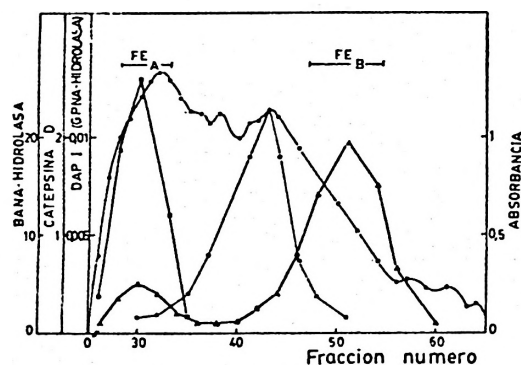


Fig. 1. Cromatografía en Sephadex G-100 del residuo precipitado al 70 % de saturación en sulfato amónico.

Tampón de elución: acetato sódico 50 mM (pH 5), 0,1 M en NaCl. Se recogen fracciones de 5 ml con una velocidad de 33 ml/h. Actividades determinadas según se especifica en métodos: BANA-hidrolasa (Δ — Δ); DAP I (GPNA-hidrolasa) ($\square$ — $\square$); catepsina D ($\circ$ — $\circ$); absorbancia a 280 nm ($\bullet$ — $\bullet$).

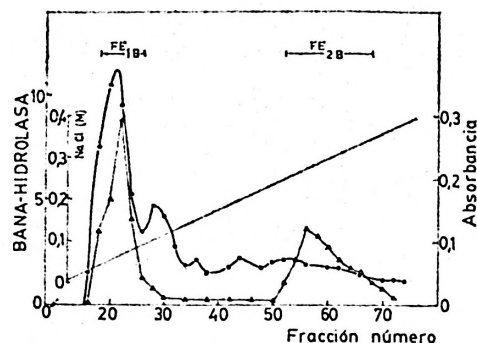


Fig. 2. Cromatografía en DEAE-celulosa de la fracción FE_B eluida en la columna de Sephadex G-100.

La fracción FE_B se dializó frente al tampón de elución antes de su aplicación a la columna. El eluyente es tampón de fosfato sódico 10 mM (pH 6,7), 2 mM en 2-mercaptoetanol, con un gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0,4 M. Se recogen fracciones de 5 ml con una velocidad de elución de 18 ml/h. Actividad BANA-hidrolasa (Δ — Δ); absorbancia a 280 nm ($\bullet$ — $\bullet$).

esterásica se separan en la zona intermedia.

Cromatografía en DEAE-celulosa. La fracción FE_B se somete a cromatografía en DEAE-celulosa (fig. 2). Se separan de nuevo dos fracciones con actividad BANA-hidrolasa; la primera de ellas, FE_{1B} , coincide prácticamente con toda la proteína y se eluye con una fuerza iónica 50 mM en NaCl. La fracción retiene un 24 % de la actividad BANA-hidrolasa presente en el extracto inicial con un grado de purificación de 19 veces. La fracción FE_{2B} se eluye con una fuerza iónica 0,27 M en NaCl y contiene muy poca proteína; la actividad es el 21 % de la inicial y el grado de purificación es de 38 veces.

El rendimiento global de las tres fracciones, FE_A , FE_{1B} y FE_{2B} , respecto al extracto hepático inicial es del 60 %. El proceso de obtención se resume en la tabla I.

Tabla 1. Separación de la actividad BANA-hidrolasa de hígado de pollo. Valores promedio de seis preparaciones a partir de 70 g de hígado. Actividades enzimáticas determinadas según métodos. La relación BANA-hidrolasa/catepsina D y BANA-hidrolasa/DAP I se ha calculado a partir de la de sus actividades específicas en cada etapa, referidas todas ellas al valor de dicha relación en el extracto enzimático.

Etapa	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica	Grado purificación	Rendimiento (%)	BANA-hidrolasa/catepsina D	BANA-hidrolasa/DAP I
Extracto	11,0	8.120	1,36	—	100	1	1
Sobrenadante-50	12,1	4.620	2,62	2	100	1	1
Fraccionamiento (NH ₄) ₂ SO ₄ (70 % satd.)	10,8	2.000	5,4	4	93	2	1,5
Sephadex G-100							
FE _A	1,6	360	4,5	3,4	15	2	0,2
FE _B	5,3	243	21,8	16	50	10	—
DEAE-celulosa							
FE _{1B}	2,7	100	27	19	24	—	—
FE _{2B}	2,3	45	51,5	38	21	—	—

PROPIEDADES ENZIMÁTICAS DE LAS BANA-HIDROLASAS AISLADAS.

Estabilidad. Los experimentos que se describen se han efectuado con las fracciones FE_{1B} (3,2 U/ml) y FE_{2B} (2,3 U/ml).

Las fracciones conservadas a 4° C, en tampón de fosfato sódico 10 mM de pH 6,7 y en ausencia de protectores, retienen el 68 % (FE_{1B}) y el 64 % (FE_{2B}) de su actividad BANA-hidrolasa inicial a los 25 días de su obtención. La presencia de cisteína 2 mM, EDTA 1 mM y cisteína 2 mM, o de HgCl 10⁻⁵ M, no afecta a la estabilidad de la muestra FE_{2B}, mientras que la muestra FE_{1B} pierde el 60 % de su actividad en el mismo intervalo de tiempo, aun en presencia de los citados efectos. Por calefacción a 40° C, 1 h, de las muestras en tampón de fosfato sódico 10 mM, de pH 6,7, desaparece la actividad BANA-hidrolasa de la fracción FE_{2B}, mientras que la fracción FE_{1B} sólo pierde el 10 % de la actividad inicial. La estabilidad a pH alcalino se determinó llevando las muestras a pH 8; una vez transcurrido el intervalo de tiempo adecuado se ajusta el pH a 6, antes de determinar la actividad. La fracción FE_{1B} retiene el 90 % de

la actividad inicial después de permanecer 2 h a pH 8, y a 4° C; la muestra FE_{2B} se inactiva (7 % de actividad residual) después de permanecer 10 min en idénticas condiciones.

Efecto del pH y de la concentración del sustrato. El efecto del pH sobre la actividad BANA-hidrolasa de las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 7,2, se efectúa en medio de tampón citrato-fosfato 0,1 M y se determina como se especifica en métodos. La actividad de las muestras es independiente del tampón, ya sea citrato-fosfato 0,1 M de pH 6 o tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 6.

El pH óptimo de la actividad BANA-hidrolasa de la fracción FE_{1B} está comprendido entre 6,3-6,4. La fracción FE_{2B} exhibe un pH óptimo entre 6,0-6,1 y desaparece la actividad a pH 7 (fig. 3). Se observa que ambas fracciones conservan su actividad en el intervalo de pH 5,0-6,4.

Al estudiar el efecto de la concentración del sustrato BANA sobre la actividad enzimática de la fracción FE_{1B}, a pH 6, K_m = 6,7 mM, no se produce inhibición por sustrato por BANA hasta

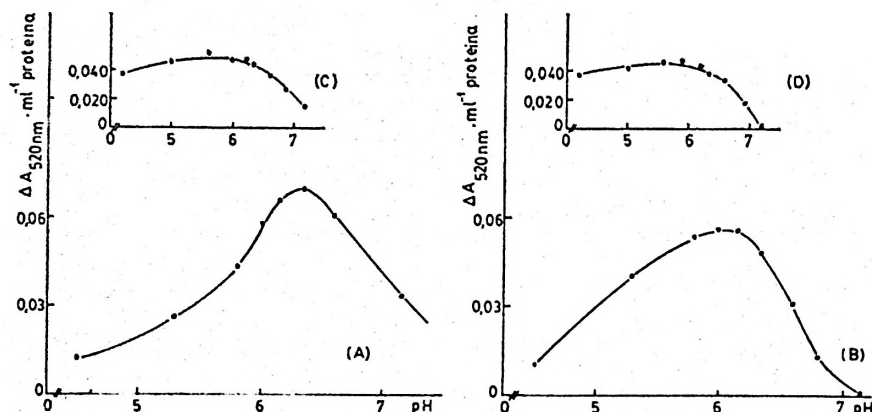


Fig. 3. Estabilidad y pH óptimo de la actividad BANA-hidrolasa de las fracciones: (A), (C) FE_{1B} y (B), (D) FE_{2B} .

(C), (D): las muestras se mantienen 30 min a cada uno de los valores de pH estudiados en el intervalo 4,5-7,2; posteriormente se ajustan a pH 6,0 antes de determinar su actividad (véase métodos). (A), (B): las condiciones experimentales se describen en métodos. La concentración enzimática en incubación fue: 0,34 U/ml de FE_{1B} y 0,26 U/ml de FE_{2B} .

10 mM. En la fracción FE_{2B} , $K_m = 16,6$ mM, aparece inhibición por sustrato cuando la concentración de BANA es superior a 7 mM.

Actividad proteolítica de las BANA-hidrolasas. La actividad proteolítica de las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} se determina frente a los sustratos BSA y caseína nativas y hemoglobina desnaturalizada, la concentración final de todos ellos es del 1%. Se trabaja en presencia de cisteína 2 mM y EDTA 1 mM, sin cuyo concurso no se observa actividad. La muestra enzimática en incubación contiene 0,68 U/ml para FE_{1B} y 0,52 U/ml para FE_{2B} .

Ambas fracciones exhiben una ligera actividad hidrolítica frente a la hemoglobina y a la caseína, cuyos valores de pH óptimo se hallan entre 6,0-6,5. Ninguna de las dos fracciones hidroliza apreciablemente a la BSA. La relación de las actividades BANA-hidrolasa y proteásica de las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} es idéntica.

Activadores e inhibidores. La actividad BANA-hidrolasa y proteásica de las

fracciones FE_{1B} y FE_{2B} sólo se manifiesta en presencia de compuestos tiólicos en el medio. La dependencia de las actividades con respecto a la concentración se ha estudiado empleando DTT (máx. 0,5 mM), cisteína y 2-mercaptoetanol (máx. 4 mM); concentraciones superiores producen interferencias en el método colorimétrico de determinación de la actividad. La activación máxima por DTT se consigue cuando la concentración del reactivo es 0,5-0,01 mM. La cisteína 4 mM se muestra como el activador más eficaz de ambas fracciones; el efecto activador del 2-mercaptoetanol (4 mM) es muy inferior al de los compuestos anteriormente mencionados. La presencia de EDTA, hasta 8 mM, en ausencia de compuestos tiólicos, apenas activa a las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} ; sin embargo, la acción conjunta del EDTA (1 mM) y de la cisteína (2 mM) induce una activación mayor que la que provoca la cisteína sola (tabla II).

La inhibición de la actividad BANA-hidrolasa en las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} , por acción de inhibidores de tiorreasas y por metales, se determinó estableciendo

Tabla II. *Activación de las BANA-hidrolasa.* La actividad se determinó en tampón de fosfato sódico 0,1 M (ph 6); el enzima y el activador se preincubaron previamente al mismo pH durante 5 min a 40° C. Las concentraciones de actividad BANA-hidrolasa en incubación fueron de 0,34 U/ml de FE_{1B} y 0,26 U/ml para FE_{2B}. Los porcentajes de actividad están referidos al valor obtenido con la muestra incubada en presencia de cisteína 2 mM y EDTA 1 mM.

Compuesto	Conc. final (mM)	% Actividad	
		FE _{1B}	FE _{2B}
EDTA	1	4	—
Cisteína	2	55	18
Cisteína	4	62	50
EDTA+Cisteína	1 + 2	100	100
EDTA+Cisteína	1 + 4	100	100

un contacto previo entre el reactivo en estudio y la muestra enzimática antes de proceder a determinar la actividad residual, según el modo habitual, en presencia de EDTA (1 mM) y cisteína (2 mM) (tabla III).

Los inhibidores característicos de los tioenzimas inhiben a la actividad BANA-hidrolasa presente en las fracciones FE_{1B} y FE_{2B}; IAA (0,1 mM; 1 h) inhibe el 100 % de la actividad en ambos casos, pero el PCMB (1 mM, 1 h) que inhibe totalmente a la FE_{2B}, sólo inhibe el 45 % a la FE_{1B}. El mayor porcentaje de inhibición producido por el IAA, respecto a los ejercidos por el PCMB y el DTNB, puede interpretarse al considerar que la acción de estos últimos se llega a eliminar por adición de compuestos tiólicos. Como la actividad BANA-hidrolasa se determina en presencia de cisteína, se favorece la recuperación de la actividad del enzima, de modo que se precisan concentraciones más elevadas de inhibidor para inhibir totalmente al enzima. Entre los iones metálicos que se han ensayado, el Hg²⁺ es el inhibidor más potente; por su parte, el Cu²⁺ inhibe más a la BANA-hidrolasa de la fracción FE_{2B} que a la de la FE_{1B}.

Tabla III. *Inhibición de la actividad BANA-hidrolasa.*

El contacto enzima-inhibidor se estableció a pH 6,7 y temperatura ambiente; la concentración enzimática en contacto fue de 3,2 U/ml para FE_{1B} y 2,3 U/ml para FE_{2B}. La actividad se determinó según el método habitual tomando una parte alícuota de la muestra en contacto. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición respecto de la actividad mostrada por la muestra control no tratada. El estudio de inhibición por metales se realizó con tampón tris-maleato 0,1 M; en los otros casos se utilizó tampón de fosfato sódico 0,1 M.

Reactivo	Concentración (mM)	Tiempo (h)	Inhibición (%)	
			FE _{1B}	FE _{2B}
PCMB	1	1	45	100
DTNB	0,1	1	34	8
DTNB	0,1	3	43	33
IAA	0,1	1	90	100
NEM	1	1	22	14
NEM	1	3	72	33
ZnSO ₄	1	1	50	46
ZnSO ₄	1	3	64	63
CuCl ₂	1	1	25	100
CuCl ₂	1	3	64	100
HgCl ₂	0,01	1	55	76
HgCl ₂	0,01	3	100	100

Los resultados comentados ponen de manifiesto el distinto comportamiento de las BANA-hidrolasas presentes en las fracciones estudiadas respecto a los diversos efectores ensayados.

Activación del tripsinógeno por FE_{2B}.

Una propiedad característica de la catepsina B es la de transformar el tripsinógeno en tripsina (13, 18). Se ha determinado, por ello, la acción de la actividad BANA-hidrolasa presente en las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} sobre el tripsinógeno en medio ácido. La tripsina liberada no interfiere en el proceso, ya que no activa a su zimógeno en medio ácido. Las muestras de FE_{1B} y FE_{2B} se mantienen en contacto con una disolución de tripsinógeno a 40° C, en medio ácido (fig. 4). Finalizado el con-

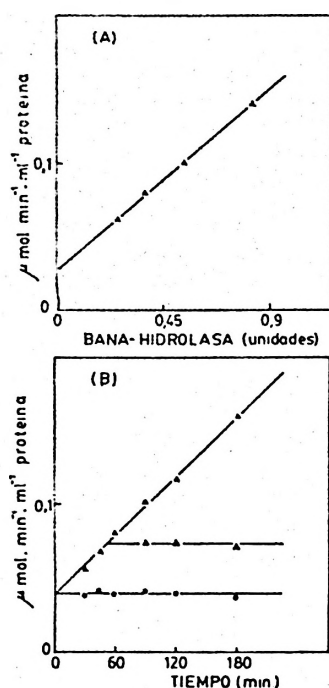


Fig. 4. Activación del tripsinógeno por la actividad BANA-hidrolasa de la fracción $\text{FE}_{2\text{B}}$. (A) Relación entre la concentración de BANA-hidrolasa $\text{FE}_{2\text{B}}$ en contacto con el tripsinógeno y la tripsina liberada. La disolución de tripsinógeno (0,9 mg/ml) se mantuvo en contacto 60 min con cantidades variables de $\text{FE}_{2\text{B}}$, a pH 3,8, en medio de tampón acetato sódico 50 mM, cisteína 2 mM y EDTA 1 mM a 40° C. Las cantidades de $\text{FE}_{2\text{B}}$ expresadas en unidades BANA-hidrolasa/ml en contacto estuvieron comprendidas entre 0,28-0,9. (B) Activación del tripsinógeno por $\text{FE}_{2\text{B}}$ a lo largo del tiempo; inhibición por IAA. Las condiciones de contacto tripsinógeno- $\text{FE}_{2\text{B}}$ son las ya indicadas, con 0,4 U BANA-hidrolasa/ml. El contacto se prolongó hasta tres horas y la tripsina liberada se determinó a distintos intervalos de tiempo, según se indica en métodos. La tripsina liberada se expresa en μmol s de sustrato transformado/min $\times$ ml. ($\blacktriangle$ — $\blacktriangle$) muestra sin inhibidor; ($\circ$ — $\circ$) muestra con IAA 10^{-3} M desde el inicio del contacto; ($\triangle$ — $\triangle$) muestras con IAA 10^{-3} M después de 60 min de contacto.

tacto se interrumpe la reacción y se determina la tripsina liberada.

El tripsinógeno sólo se activa en las condiciones descritas, por la fracción $\text{FE}_{2\text{B}}$ y precisa cisteína (2 mM), ya que en su ausencia no se observa activación a lo largo del tiempo. Como se aprecia en la figura 4, la relación entre la cantidad de tripsina liberada y la concentración de muestra $\text{FE}_{2\text{B}}$ en contacto, para una concentración fija de tripsinógeno es lineal y aumenta con el tiempo de contacto. La presencia de IAA (1 mM) en la muestra al iniciarse el intervalo de contacto, inhibe totalmente la liberación de tripsina: ésta se interrumpe, también, si el inhibidor se añade al cabo de un cierto tiempo (fig. 5).

Discusión

El proceso de purificación descrito en el presente trabajo ha permitido separar tres fracciones que hidrolizan a la Bz-Arg-NNap (BANA). Aunque el sustrato se consideró específico de la catepsina B (18), se han aislado diversos enzimas que son también capaces de hidrolizarlo, y se designan con el nombre de BANA-hidrolasas (5, 7-9, 15-17).

La catepsina B de hígado de pollo se ha purificado a partir de un extracto obtenido por autólisis a pH ácido y un posterior fraccionamiento entre el 47 y el 64 % de acetona (v/v) (3). Se ha observado que al fraccionar con acetona, en idénticas condiciones, los homogeneizados que no habían sido sometidos a autólisis, se produce una dispersión de la actividad BANA-hidrolasa. Al llevar los homogeneizados al 70 % de saturación en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la mayor parte de la actividad se recoge en el precipitado obtenido.

El precipitado se inserta en una columna de filtración molecular (Sephadex G-100), lo que permite su separación en dos fracciones. El enzima presente en la primera fracción podría estar relacionado con la BANA-hidrolasa minoritaria ($M =$

200.000), que ha sido separada por DAVIDSON y POOLE en hígado de rata (7). La fracción FE_B ($M \approx 23.000$) podría contener a la catepsina B de hígado de pollo citada por BARRET (3), además de otro enzima. Cuando esta última fracción se aplica a una columna de DEAE-celulosa se resuelve en otras dos, cuya elución se consigue con disoluciones de NaCl 50 y 270 mM, respectivamente. La aparición de las dos formas de BANA-hidrolasa, cuyos puntos isoelectricos son muy distintos, sugiere que se trata de isoenzimas de la catepsina B, como se ha descrito para el enzima de otras procedencias (3, 10, 11, 14), o bien que sean dos enzimas diferentes, ya que se postula la existencia de otras BANA-hidrolasas además de la catepsina (*loc. cit.*).

El estudio comparado de las propiedades de las fracciones con actividad BANA-hidrolasa, cuya separación se ha conseguido en este trabajo, permite suponer que se trata de enzimas distintos. En efecto, las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} muestran diferente estabilidad térmica y a pH alcalino; así, mientras la fracción FE_{1B} es estable a 60° C, 20 min, y a pH 8, la FE_{2B} se inactiva rápidamente. El hecho sugiere la posibilidad de que la fracción FE_{2B} contenga a la catepsina B, ya que el enzima de diversas procedencias se inactiva a pH superior a 7 (2).

El estudio de los activadores e inhibidores de las BANA-hidrolasas permite afirmar que la actividad enzimática presente en ambas fracciones se debe a tioenzimas. Se observa, sin embargo, una notable diferencia en la inhibición provocada por el Cu^{2+} y la NEM, sobre la actividad BANA-hidrolasa de las dos fracciones. La actividad proteásica de ambas fracciones frente a hemoglobina y a caseína es reducida y prácticamente nula con BSA, a diferencia de la catepsina B de otras procedencias (3, 6), o de la catepsina L de hígado de rata, que también hidroliza a la BANA (17). La afinidad por el sustrato BANA es ligeramente inferior

en la fracción FE_{2B} ($K_m = 16,6$ mM), que en la FE_{1B} ($K_m = 6,7$ mM). La actividad de la fracción FE_{2B} se inhibe notablemente cuando la concentración del sustrato es superior a 7 mM.

Solamente el enzima presente en FE_{2B} transforma el tripsinógeno en tripsina en medio ácido, lo que constituye una diferencia característica de las actividades enzimáticas de ambas fracciones y apoya la sugerencia de que se trata de dos tioproteasas diferentes. El que la catepsina B active al tripsinógeno (13, 18), al igual que el enzima presente en la fracción FE_{2B} y la pérdida de su actividad a pH alcalino, sugiere que el enzima de dicha fracción pueda identificarse con la catepsina B.

Los resultados descritos permiten suponer que las actividades presentes en las fracciones FE_A ($M = 100.000$) y FE_B ($M \approx 23.000$) podrían estar relacionadas con las actividades BANA-hidrolasa descritas por DAVIDSON y POOLE para hígado de rata (*loc. cit.*).

Resumen

La actividad enzimática de hígado de pollo que hidroliza a la α -N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA) se resuelve en tres fracciones activas mediante cromatografía en Sephadex G-100 y en DEAE-celulosa. El enzima presente en la fracción FE_A posee un peso molecular ≥ 100.000 . Los enzimas presentes en las fracciones FE_{1B} y FE_{2B} ($P_m \approx 23.000$) se separan por cromatografía en DEAE-celulosa.

La BANA-hidrolasa de la fracción FE_{2B} es inestable a pH alcalino y activa al tripsinógeno, a diferencia del enzima de la fracción FE_{1B} . Ambos son tioenzimas que se comportan de modo análogo frente a los activadores (cisteína, ditioneitol y 2-mercaptoetanol) e inhibidores (PCMB, IAA, N-etilmaleimida, Cu^{2+} , Hg^{2+} y Zn^{2+}).

Bibliografía

1. ANSON, M. L.: *J. Gen. Physiol.*, 20, 565-574, 1937.

2. BARRETT, A. J.: En «Proteinases in mammalian cells and tissues» (Barrett, A. J., ed.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 1977, pp. 181-208.
3. BARRETT, A. J.: *Biochem. J.*, **131**, 809-822, 1973.
4. BARRETT, A. J.: *Anal. Biochem.*, **47**, 208-293, 1972.
5. BLACKWOOD, C. y MANDL, I.: *Anal. Biochem.*, **2**, 370-379, 1961.
6. BURLEIGH, M. C., BARRETT, A. J. y LAZARUS, G. S.: *Biochem. J.*, **137**, 387-398, 1974.
7. DAVIDSON, E. y POOLE, B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **397**, 437-442, 1975.
8. DE LUMEN, B. O. y TAPPEL, A. L.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3552-3557, 1972.
9. DISTELMAIER, P., HÜBNER, H. y OTTO, K.: *Enzymologia*, **42**, 363-375, 1972.
10. ETHERINGTON, D. J.: *Biochem. J.*, **137**, 547-557, 1974.
11. FRANKLIN, S. G., METRIONE, R. N.: *Biochem. J.*, **127**, 207-213, 1972.
12. GORTER, J. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 546-555, 1970.
13. GREENBAUM, L. M., HIRSKOWITZ, A. y SHOIGHET, I.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 2885-2890, 1959.
14. KEILOVÁ, M. y TOMÀŠEK, V.: *FEBS Letters*, **29**, 335-338, 1973.
15. KIRSCH, H., LANGNER, J., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S., BOHLEY, P. y HANSON, H.: *Acta biol. Med. Germ.*, **35**, 285-299, 1976.
16. KIRSCH, H., LANGNER, J., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S., BOHLEY, P. y HANSON, H.: *Acta Biol. Med. Germ.*, **36**, 185-199, 1977.
17. KIRSCH, H., LANGNER, J., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S., BOHLEY, P. y HANSON, H.: *Eur. J. Biochem.*, **74**, 293-301, 1977.
18. OTTO, K. y RIESENKÖNING, H.: *Biochim. Biophys. Acta*, **379**, 462-475, 1975.
19. WALSH, K. A. y WILCOX, P. E.: En «Methods in Enzymology» (Perhmann, G. E. y Lorand, L., eds.), Vol. 19. Acad. Press, Nueva York, 1970, pp. 31-41.
20. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1942.