

Purificación y propiedades de la dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo

F. Barceló, N. Vives y J. Bozal

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

(Recibido el 8 de enero de 1980)

F. BARCELO, N. VIVES and J. BOZAL. *Purification and Properties of Dipeptidyl Aminopeptidase I from Chicken Liver*. Rev. esp. Fisiol., 36, 321-330. 1980.

Dipeptidyl aminopeptidase I (E.S. 3.4.14.1) from chicken liver was purified by the following steps: homogenization at pH 5, thermic precipitation, acetone fractionation and Sephadex G-100, DEAE-cellulose and organomercurial-Sepharose column fractionations. The purified enzyme appears to be homogeneous by polyacrylamide gel electrophoresis at both pH 4.5 and 8.3 and has an isoelectric point of 5.7 ± 0.05 . The molecular weight of the enzyme reale $167,000 \pm 17,000$ on the Sephadex G-150 column chromatography. The optimum pH for hydrolysis of Gly-Phe-p-nitroanilide (GPNA) and Gly-Phe-B-naphthylamide was 5.8. The value of K_m for the hydrolysis of GPNA was estimated at 3.3 mM.

The enzyme required halide ions for activity and was activated by thiol reagents (dithiothreitol, cysteine and 2-mercaptoethanol). Accordingly, DAP I was inhibited by thiol-blocking reagents (PCMB, IAA, Hg^{2+}). The enzyme oxidation with oxygen current was fostered by chloride anion (50 mM); nevertheless the activity was recovered when cysteine was present in the incubation mixture; the latter, besides, seems to perform as enzyme protector.

La degradación de las proteínas citoplasmáticas hasta aminoácidos ocurre por la actuación coordinada de las proteasas y de las peptidasas intracelulares, siendo esencial el papel de las exopeptidasas (13, 15, 32). En la actuación conjunta de las hidrolasas lisosómicas sobre las proteínas aparecen gran cantidad de dipéptidos originados por la acción de las dipeptidil aminopeptidasas (5), a las que también puede atribuirse la degradación de los péptidos hormonales (19, 22-24).

La dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I), inicialmente designada como catepsina C (E.C. 3.4.14.1) es una dipeptidasa intracelular, de amplia especificidad de sustrato (24) y que se activa por compuestos tiólicos (9). La presencia de iones haluros es indispensable para su actividad (20), y se ha postulado que el ion cloruro es un modulador alostérico del enzima de bazo bovino (10). La DAP I cataliza la hidrólisis del resto N-terminal de los sustratos polipeptídicos (24) y la liberación suce-

siva de dipéptidos en medio ácido; pero si el pH del medio es mayor que 7, el enzima actúa como transferasa (12, 34). Al trabajar con preparados purificados de DAP I de bazo bovino (7, 25) y de hígado de rata (14, 24), se ha establecido que el enzima de ambas procedencias es un oligómero, con un número elevado de subunidades (24-26). Sus pesos moleculares están comprendidos entre 197.000 y 230.000 (7, 24-26, 28).

El enzima se halla ampliamente distribuido en los tejidos, aunque su abundancia relativa en aquéllos varía en las distintas especies de mamíferos (19, 33); el tejido hepático, cuyo recambio proteico es alto, posee en algunos mamíferos niveles elevados del enzima (4, 19).

La dipeptidil aminopeptidasa I y las dipeptidasas tisulares de los mamíferos han sido bastante estudiadas (21), pero es muy limitado el conocimiento de las peptidasas de otros orígenes. Se aborda en este trabajo el estudio de la dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo y se propone un método para la purificación del enzima que permite obtenerlo con el grado de pureza necesario para establecer algunas de sus características.

Material y métodos

Los sustratos empleados han sido: Glicil-L-fenilalanina-4-nitroanilida (GPNA) (Merck); Glicil-L-fenilalanina- β -naftilamida (Gly-Phe- β NA), α -N-benzoilarginina-2-naftilamida (BANA) y hemoglobina bovina liofilizada (Sigma). Se han utilizado como activadores: L-cisteína, 2-mercaptoetanol, NaCl, NaBr, NaI, NaSCN, NaNO₃ (Merck) y ditiotretol (DTT) (Sigma). Los inhibidores empleados han sido: p-cloromercuribenzoato sódico (PCMB) (Egea-Chemie); ácido moniodoacético (IAA) (UCB); HgCl₂ y ZnCl₂ (Merck). La disolución de BRIJ-35 y el colorante Fast Garnet GBC son de procedencia Sigma. En las separaciones cromatográficas se

han empleado las resinas de Sephadex G-100 y G-150 (Pharmacia) y DEAE-celulosa (Whatman DE-23). La sal sódica del ácido etilendiaminotetracético (EDTA) es de calidad Merck.

Ensayos enzimáticos. La actividad GPNA-hidrolasa de la dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) se ha determinado por el método de GORTER y GRUBER (10) con GPNA 0,5 mM, en medio de tampón de acetato sódico 80 mM, de pH 5 que contiene NaCl 50 mM y cisteína 6 mM como activadores, y Na₂SO₄ hasta una fuerza iónica total de 0,25. El enzima y los activadores se preincubaban 20 min a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$; la reacción se prolonga 40 min después de la adición del sustrato y se interrumpe por la adición de ácido moniodoacético hasta que su concentración sea 10 mM. La p-nitroanilina liberada se lee a 410 nm ($\epsilon = 8.000 \Delta A_{410 \text{ nm}} \times 1^{-1} \times \text{mol}^{-1}$).

La hidrólisis de la Gly-Phe- β -naftilamida (Gly-Phe- β NA) 0,16 mM por la DAP I se efectúa en el medio tamponado ya descrito para la hidrólisis del sustrato GPNA. El enzima y los activadores se preincubaban 10 min a $25 \pm 0,1^\circ \text{C}$, se añade el sustrato y la reacción se prolonga 10 min; finalizados los cuales se interrumpe por adición del reactivo de copulación (disolución acuosa de BRIJ-35 al 1%, 12,5 mM en EDTA, 2,5 mM en PCMB y 0,124 mg/ml de Fast Garnet GBC a pH 6), preparado según el método de BARRETT

Abreviaciones:

Dipeptidil aminopeptidasa I, GPNA-hidrolasa o DAP I.

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

Glicil-I-fenilalanina-4-nitroanilida, Gly-Phe-4-nitroanilida o GPNA.

Glicil-L-fenilalanina- β -naftilamida o Gly-Phe- β NA.

α -N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida o BANA.

(2). Las coloraciones se leen a 520 nm ($\epsilon = 25.000 \Delta A_{520 \text{ nm}} \times 1^{-1} \times \text{mol}^{-1}$) frente a un blanco de la misma composición pero que carece de iones cloruro, sin cuya presencia el enzima es inactivo.

La actividad BANA-hidrolasa se determina por el método descrito por BARRETT (2) para la catepsina B (E.C. 3.4.22.1). Las muestras se incuban 10 min a $40 \pm 0,1^\circ \text{C}$ en medio de fosfato sódico 0,1 M, pH 6, 2 mM en cisteína y 1 mM en EDTA, con una concentración de sustrato BANA 1,5 mM. La reacción enzimática se interrumpe por adición del reactivo de copulación de modo idéntico al descrito para la actividad Gly-Phe- β -naftilamida hidrolasa y se determina la naftilamina liberada a 520 nm.

La unidad enzimática se define en todos los casos como μmoles de sustrato liberados por min.

La catepsina D (E.C. 3.4.23.5) se determina frente a hemoglobina al 1 %, desnaturizada con urea (18), en medio de tampón citrato-fosfato sódico 30 mM de pH 5, a $38 \pm 0,1^\circ \text{C}$. La reacción se interrumpe a los 30 min por adición de un volumen de TCA 0,25 M, igual al de la mezcla de incubación. En los filtrados ácidos se determina la absorbancia a $\lambda = 280 \text{ nm}$ frente a un blanco del sustrato; las muestras se diluyen de modo que los incrementos de absorbancia sean $\leq 0,3$. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de 1 unidad en 60 min.

Determinación de proteína. La concentración de proteína por el método de WARBURG y CHRISTIAN (35).

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Se efectúan en geles de poliacrilamida (Eastman-Kodak) del 7,5 %, a pH 8,3 (6) y a pH 4,5 (29), con una intensidad de corriente de 4 mA/gel a 4°C , hasta que el colorante marcador (azul de bromofenol o verde de metilo) alcanza la

zona inferior del gel. La tinción de la proteína se efectúa con una disolución de Coomassie blue del 0,25 %.

En el revelado específico de la actividad Gly-Phe- β NA hidrolasa se sumergen los geles 30 min a 40°C , en una disolución de Gly-Phe- β -naftilamida 4 mM en tampón de acetato sódico 80 mM (pH 5), 50 mM en NaCl, 6 mM en cisteína y de fuerza iónica 0,25, obtenida por adición de Na_2SO_4 . A continuación se introducen los geles en una disolución de Fast Garnet GBC (1 mg/ml), con PCMB 6,25 mM y EDTA 31,2 mM, a temperatura ambiente, hasta que aparecen bandas rojas sobre un fondo amarillo. Si se incuban los geles en ausencia de Cl^- las bandas que aparecen corresponden a las arilamidasa acompañantes.

Determinación del punto isoelectrico. El punto isoelectrico se ha determinado midiendo la movilidad electroforética de la DAP I purificada en el intervalo de pH 5,8-8,2, sobre tiras de acetato de celulosa (Poliphor) a 200 V, 90 min a 4°C , en tampón de fosfato sódico 50 mM con adición de la cantidad de NaCl necesaria para conseguir una fuerza iónica de 0,1. Las tiras se revelaron por tinción con una disolución de Negro amido 10 B (0,5 %).

Determinación del peso molecular. El peso molecular de la DAP I purificada se ha determinado por el método de ANDREWS (1), empleando una columna de Sephadex G-150 ($2,6 \times 62 \text{ cm}$), con tampón tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 0,1 M en NaCl como eluyente. El calibrado de la columna se realizó con proteínas (Sigma o Boheringer) de peso molecular conocido: azul de dextrano, mioglobina (17.800), inhibidor triptico de la soja (SBTI, 21.700), adenosindesaminasa (35.000), fosfatasa alcalina de buey (115.000), γ -globulina (160.000) y xantinoxidasa (290.000). Las actividades enzimáticas del inhibidor triptico de la soja, la adenosindesaminasa, la alcoholato des-

hidrogenasa, la fosfatasa alcalina de buey y la xantinoxidasa se determinaron según los métodos de SCHWERT y TAKENAKA (30), KALCKAR (16), MORELL (27), BERGMAYER *et al.* (3) y HART *et al.* (11), respectivamente.

Resina de afinidad. La resina organomercurial-Sepharosa 4B se preparó por copulación de CNBr-Sepharosa 4B (Pharmacia) con acetato de p-aminofenilmercurio (Egea-Chemie), según el método de SLUYTERMAN and WIJDENES (31). La capacidad de la resina organomercurial se estableció empaquetando 2 g de la misma en una columna (0,8 × 18 cm); se dejó fluir tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 8, que era a su vez 5 mM en ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) y 15 mM en Na₂SO₃ hasta que el absorbente se saturó en el ácido; seguidamente se lavó con tampón de acetato sódico 50 mM de pH 5. El ácido 2-nitro-5-tiobenzoico se eluyó con HgCl₂ 2 mM en el tampón de acetato. 1 ml de eluido se adicionó a 4 ml de cisteína 0,1 M, previamente ajustada a pH 9, y se determinó su absorbancia a 412 nm ($\Delta A_{412 \text{ nm}}$). La capacidad del absorbente

(2,1-2,5 $\mu\text{moles/g}$) se calculó mediante la expresión:

$$\text{Capacidad } (\mu\text{moles/g}) = \frac{V \times 5 \times A_{(412 \text{ nm})}}{13.600 \times P}$$

en la que: V = volumen de elución (ml); P = g gel; $\epsilon = 13.600 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (8).

Resultados

PURIFICACIÓN DE LA DIPEPTIDIL AMINOPEPTIDASA I DE HÍGADO DE POLLO.

Extracción y precipitación con acetona. El material de partida es hígado de pollo, separado de animales recién sacrificados. El tejido se homogeneiza en un triturador de cuchillas con tampón de acetato sódico 50 mM, de pH 5, a 4° C, en la relación 1/10 (p/v) y a continuación se centrifuga a 39.000 × g, 60 min a 4° C. El sobrenadante se calienta (60° C, 20 min) y se centrifuga a 6.000 × g, 30 min a 4° C; se elimina así el 45-50 % de la proteína.

A la fracción activa (90 % de la acti-

Tabla I. Purificación de la dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo.

Valores promedio de 5 purificaciones a partir de 40 g de tejido. Actividades enzimáticas determinadas según métodos. La relación GPNA-hidrolasa/catepsina D y GPNA-hidrolasa/BANA-hidrolasa 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.

Etapas	Proteína total (mg)	Actividad total (U)	Act. específica (U/mg) × 10 ⁻³	Grado purific.	Rendimiento (%)	GPNA-hidrolasa/catepsina D	GPNA-hidrolasa/BANA-hidrolasa
Extracto-S _c	4.080	2,6	0,6	—	100	1	1
Sobrenadante-60	2.680	2,3	0,9	1,4	87	1	1
Fraccionamiento con acetona 47 % (v/v)	267	2,0	7,7	12	78	21	4
Sephadex G-100	175	1,9	10,5	16	71	—	12
DEAE-celulosa	48	1,3	27	42	49	—	17
Organomercurial-Sepharosa	16,6	0,8	46	72	29	—	—

vidad inicial) se le añade a 0° C acetona fría (—15° C) hasta el 47 % (v/v); el precipitado se separa por centrifugación a $15.000 \times g$, 10 min, 0° C y se disuelve en tampón de acetato sódico 50 mM (pH 5), 2 mM en 2-mercaptoetanol, 1 mM

en EDTA, en la relación 1/10 (p/v). A continuación se dializa frente al mismo tampón (20 h, 4° C) y el residuo inactivo se separa por centrifugación a $15.000 \times g$, 10 min 0° C. El sobrenadante (P_{47}) retiene el 78 % de la actividad GPNA-hidrolasa inicial. Contiene, además, actividad BANA-hidrolasa (24 %) y catepsina D (7 %).

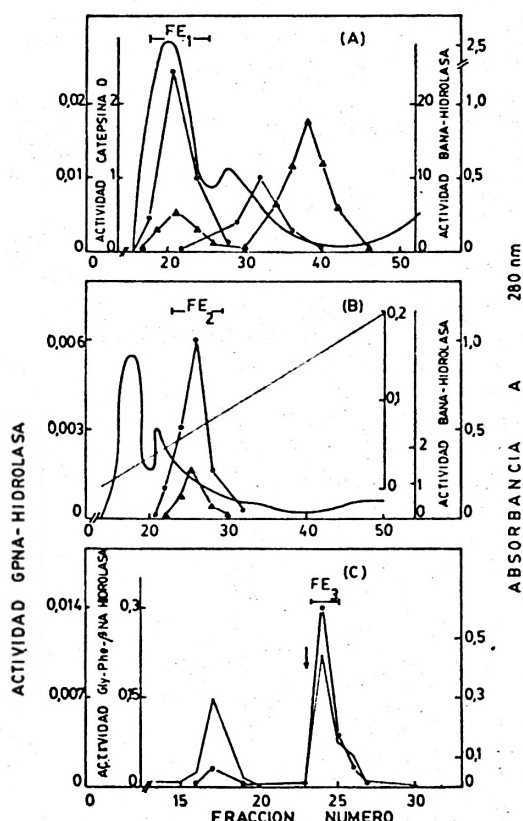


Fig. 1. Procesos cromatográficos en la purificación de la dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) de hígado de pollo.

(A) Cromatografía en una columna de Sephadex G-100 (3×70 cm) de la fracción al 47 % en acetona (P_{47}). Tampón de elución: acetato sódico 50 mM (pH 5), 0,1 M NaCl, 2 mM 2-mercaptoetanol. Velocidad de elución = 33 ml/h, recogidos en fracciones de 5 ml. (B) Cromatografía en una columna de DEAE-celulosa (2×30 cm) de la fracción de Sephadex G-100 (FE_1). Elución con un gradiente lineal de tampón de fosfato sódico 5-200 mM (pH 6,8). Velocidad de elución = 18 ml/h, recogidos en

Filtración con gel de Sephadex. El sobrenadante P_{47} se cromatografía en una columna de Sephadex G-100; la actividad DAP I se eluye en el volumen de exclusión (Fracción FE_1), separada de la catepsina D ($M \approx 45.000$) y de la mayor parte de la actividad BANA-hidrolasa ($M \approx 23.000$) (fig. 1 A).

Cromatografía en DEAE-celulosa. La fracción FE_1 se dializa frente a tampón de fosfato sódico 5 mM, de pH 6,8, se cromatografía a través de una columna de DEAE-celulosa equilibrada con el mismo tampón (fig. 1 B). Por elución con disolución de tampón de fosfatos 65 mM se recoge la fracción FE_2 que retiene el 49 % de la actividad GPNA-hidrolasa y el 5 % de la actividad BANA-hidrolasa del extracto inicial.

Cromatografía de afinidad. En la etapa final del proceso de purificación se

fracciones de 5 ml. (C) Cromatografía en una columna organomercurial Sepharosa ($0,8 \times 18$ cm) de la fracción activa de DEAE-celulosa (FE_2). La proteína no unida al lecho se eluye con tampón acetato sódico 50 mM (pH 5), 0,1 M NaCl; la posición de la flecha señala el inicio de la elución de la proteína retenida con cisteína 10 mM en el citado tampón. Velocidad de elución = 20 ml/h, recogidos en fracciones de 3 ml. Actividades enzimáticas: dipeptidil aminopeptidasa I (GPNA y Gly-Phe- β NA como sustratos) (○—○), BANA-hidrolasa (▲—▲) y catepsina D (●—●). Absorbancia a 280 nm (—).

efectúa una cromatografía sobre gel organomercurial-Sepharosa 4B, cuyo objetivo primordial es el de concentrar la actividad DAP I; se consigue, también, incrementar el grado de purificación.

La muestra FE_2 recién obtenida se dializa frente a tampón de acetato sódico 50 mM, pH 5, 0,1 M en NaCl y se inserta en la columna de afinidad, equilibrada con el tampón; la elución de la proteína retenida se efectúa con cisteína 10 mM (fig. 1 C). El perfil de actividad de los eluidos depende del grado de envejecimiento de la muestra enzimática; si se utiliza la fracción FE_2 recién obtenida, el 80 % de la actividad DAP I aplicada se une a la resina organomercurial. Al trabajar con muestras de FE_2 , después de transcurridos 15 días de su obtención, se observa que el enzima sólo queda parcialmente retenido en el soporte, ya que el 35-45 % de la actividad enzimática inicial se eluye con la proteína no retenida. Sin embargo, si las muestras de enzima envejecido se tratan, antes de su inserción en la columna, con Na_2SO_3 1 mM, ésta retiene entre el 80-90 % de la actividad aplicada.

La fracción activa FE_3 (rendimiento = 29 %, grado de purificación = 72 veces respecto al extracto ácido del tejido) es homogénea por electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8,3 y 4,5 (fig. 2 A y 2 B). El revelado específico de los ferogramas demuestra que está exenta de las arilamidasa presentes en el extracto inicial (fig. 2 C y 2 D).

Peso molecular y punto isoelectrico del enzima purificado. El peso molecular de una muestra de FE_3 (0,35 mg/ml), determinado por el método de ANDREWS es de 167.000 ± 17.000 (fig. 3). Al representar la movilidad de la fracción FE_3 sobre tiras de acetato de celulosa frente a los valores de pH correspondientes se obtiene una línea recta, que por extrapolación, proporciona el valor de $5,7 \pm 0,05$ para

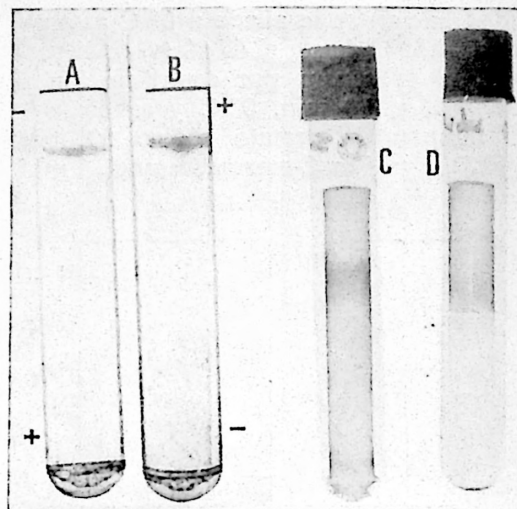


Fig. 2. Electroforesis en geles de poliacrilamida a pH 8,3 (geles A, C, D) y pH 4,5 (gel B).

Los geles (C) y (D) muestran actividad Gly-Phe- β -naftilamida hidrolasa. Muestras de enzima (200-500 μ g de proteína) aplicadas: el sobrenadante ácido S_e (gel C) y la fracción FE_2 (geles A, B, D).

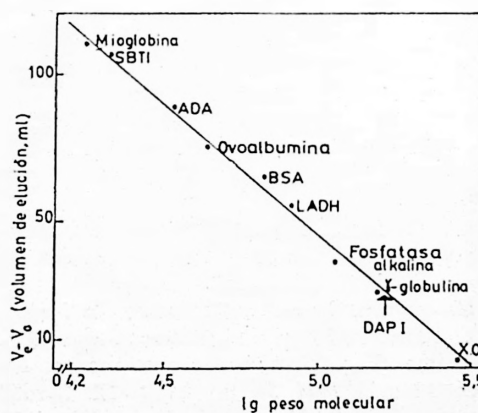


Fig. 3. Peso molecular del enzima purificado. El volumen de elución de las proteínas patrón se determinó por medida de su actividad enzimática o de su absorbancia a 230 nm, como se especifica en métodos.

el punto isoelectrico de la DAP I de hígado de pollo.

Efecto del pH y de la concentración de sustrato. El pH óptimo de la DAP I, frente a los sustratos Gly-Phe-p-nitroanilina (0,5 mM) y Gly-Phe- β -naftilamida (0,16 mM), está comprendido entre 5,8-5,9 (fig. 4); el enzima es estable en el intervalo de pH 4-7,5, a que se experimenta. La actividad de la fracción P₁₇ es independiente del tampón empleado, ya sea éste citrato-fosfato o el habitual de acetato-sódico, ambos 80 mM de pH 5.

En el sistema GPNA (0,36 mM-1 mM) — DAP I, $K_m = 3,3$ mM. La velocidad de hidrólisis del GPNA (0,27-0,5 mM) en presencia de concentraciones no saturantes de Cl^- (1 mM, 20 mM), no se altera

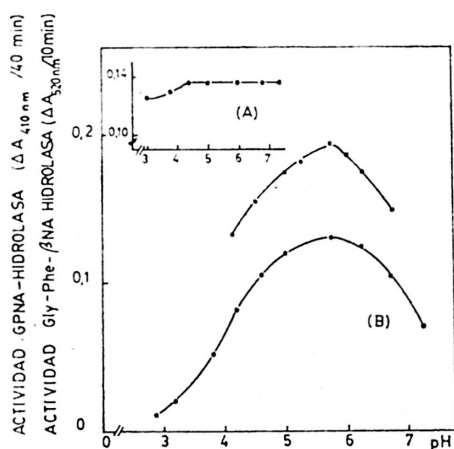


Fig. 4. Estabilidad y pH óptimo. (A) Las muestras se mantuvieron durante 60 min a cada uno de los pH estudiados, en el intervalo de valores 2,8-7,5. Seguidamente se ajustaron a pH 5,0 antes de determinar su actividad (véase métodos). (B) Se ha utilizado tampón citrato-fosfato de molaridad variable, que contenía NaCl 50 mM, cisteína 6 mM y Na_2SO_4 hasta fuerza iónica 0,25. La concentración de muestra enzimática en incubación es de 0,004 U/ml. Actividad frente a los sustratos: GPNA 0,5 mM (○—○) y Gly-Phe- β -naftilamida 0,16 mM (●—●).

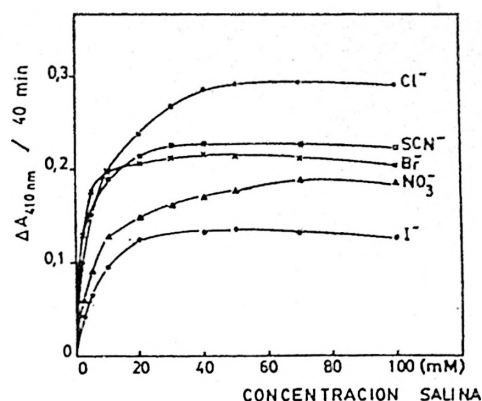


Fig. 5. Activadores de la DAP I de hígado de pollo.

La actividad de la muestra (0,005 U/ml) se determina frente a GPNA 0,5 mM en presencia de tampón acetato 80 mM (pH 5), cisteína 6 mM y concentraciones variables de haluro. La fuerza iónica es constante (0,25) y se consigue por adición de Na_2SO_4 . Los resultados se expresan como $\Delta A_{410 \text{ nm}}$ en 40 min de incubación. (●) NaCl; (×) NaBr; (○) NaI; (□) NaSCN; (△) NaNO_3 .

por adición de un segundo sustrato (glyphe- β -naftilamida 0,02-0,05 mM) y en ello se diferencia del enzima de bazo bovino (10).

Activadores. La actividad de la DAP I de hígado de pollo sólo se pone de manifiesto en presencia de ion cloruro o de sus análogos. Se ha determinado el efecto activador provocado por las sales sódicas de los iones Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , acetato y citrato, cuyas concentraciones oscilaron entre 0 y 100 mM (fig. 5). El ion Cl^- (40 mM) provoca la máxima activación, y es nulo el efecto de los iones SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , acetato y citrato.

La actividad enzimática frente a GPNA 0,5 mM es constante en el intervalo de fuerza iónica 0,13-0,50, que se obtiene al variar la concentración de Na_2SO_4 del tampón de acetato sódico 80 mM, 50 mM en NaCl de pH 5, en el que se efectúa la incubación.

Las muestras enzimáticas dializadas con objeto de eliminar cualquier compuesto tiólico se activan al ser incubadas con DTT, cisteína o 2-mercaptoetanol. En todos los casos, la actividad se determina frente a GPNA (0,5 mM), según se especifica en métodos, con concentraciones variables de reactivo tiólico (0-20 mM). El DTT es el activador más destacado (1-4 mM), aunque si la concentración de los tres compuestos es elevada (16-20 mM) todos llegan a provocar la máxima activación del enzima. Si las incubaciones se realizan en ausencia de los compuestos mencionados, se observa que la actividad enzimática residual (40-30 %) disminuye al aumentar el intervalo de conservación del enzima; ello sugiere que los compuestos tiólicos reducen al enzima parcialmente oxidado.

Inhibidores. El enzima (0,005 U/ml de incubado) es inhibido por el PCMB (10^{-6} - 10^{-5} M) en un 58-100 % y el IAA (10^{-4} - 10^{-3} M) en un 72-100 %; el Hg^{2+} (10^{-6} - 10^{-5} M) provoca una inhibición del 29-100 % y el Zn^{2+} (0,3-1 mM) es el menos eficaz, ya que los porcentajes de inhibición oscilan entre 53-68 %. La actividad se determina frente a GPNA 0,5 mM y en ausencia de cisteína en el medio de incubación; el enzima se preincuba 20 min y posteriormente se añaden el inhibidor y el sustrato.

Estabilidad. La variación de la actividad GPNA-hidrolasa de los preparados enzimáticos (7 mg/ml) se ha establecido manteniendo las muestras a 4° C en ausencia de protectores tiólicos, durante intervalos de tiempo prolongados (hasta 30 días). La actividad enzimática se ha determinado en presencia de cisteína 6 mM y en ausencia de la misma, respetando en lo demás las condiciones habituales de incubación. La actividad se mantiene invariable a lo largo del intervalo cuando se determina en presencia de cisteína (6 mM); en las muestras incubadas en ausencia del

activador tiólico se observa una pérdida gradual de la actividad, que llega a ser del 45 % respecto a la de la muestra recién preparada, incubada sin cisteína. Se deduce de ello que la alteración enzimática inducida a lo largo del tiempo puede anularse por completo por la acción de la cisteína, la cual mantiene un medio reductor propicio para la actuación óptima del enzima.

Se ha determinado el efecto del ion Cl^{-} (50 mM) en la oxidación inducida del enzima mediante una corriente de oxígeno (a 20° C, durante 3 h). La actividad de las muestras se determina frente a GPNA (0,5 mM) del modo habitual (véase métodos), en presencia y en ausencia de cisteína en el medio de incubación. La presencia de NaCl 50 mM favorece la oxidación gradual de los grupos $-SH$ (40 % de pérdida de actividad en 3 h de contacto), pero ésta puede anularse por la adición de cisteína al medio de incubación. En ausencia del ion haluro, la oxidación no aumenta con el tiempo y se recupera de nuevo la actividad inicial al incubar la muestra enzimática en presencia de cisteína (6 mM).

Discusión

El método propuesto para la obtención de dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo, parte de un homogeneizado a pH 5, sin aplicar el proceso de autólisis propuesto por otros autores (25). Por calefacción (60° C, 30 min), precipitación con acetona (47 % v/v) a 4° C y cromatografías sucesivas en Sephadex G-100, DEAE-celulosa y resina organomercurial, se obtiene DAP I homogénea electroforéticamente, de $P_m = 167.000$ -17.000, pH $5,7 \pm 0,1$ y pH óptimo de 5,8, valores que son comparables a los de los enzimas de bazo bovino y de hígado de rata (24, 26). El preparado está exento de actividad de catepsina D y de BANA-hidrolasa.

La DAP I es un enzima tiólico, se in-

hibe por Hg^{2+} y por los reactivos de los grupos $-\text{SH}$, pero recupera su actividad tratado por DTT, cisteína y beta-mercaptoetanol. Con cisteína 6 mM se consigue restablecer la actividad de las muestras que han sido conservadas 30 días a 4° C. Por otra parte, el enzima inactivado no se une a la resina de afinidad organomercurial empleada, pero tratado con N_2SO_3 1 mM recupera la actividad y la capacidad de unión a aquélla. Puede sugerirse que los grupos $-\text{SH}$ son esenciales para la actividad del enzima pero que su óxido-reducción no afecta irreversiblemente a la estructura de la DAP I.

Los haluros son necesarios para la actividad del enzima; el Cl^- (40 mM o superior) es el activador más eficaz pero no provoca variación en la cinética michaeliana de aquél, a diferencia de lo que ocurre con el enzima de bazo bovino frente al que actúa como modulador alostérico positivo (10). Además, la presencia del Cl^- facilita la inactivación del enzima por el oxígeno.

Los hechos comentados sugieren que el Cl^- induce cambios en la conformación del enzima que hacen más asequibles a la oxidación a los grupos $-\text{SH}$ esenciales para la actividad.

Resumen

Se ha purificado a la dipeptidil aminopeptidasa I (E.C. 3.4.14.1) de hígado de pollo mediante las siguientes etapas: homogeneización a pH 5, precipitación térmica, fraccionamiento con acetona y en columnas de Sephadex G-100, DEAE-celulosa y organomercurial-Sepharosa. El enzima purificado es homogéneo por electroforesis en geles de poliacrilamida a los valores de pH 4,5 y 8,3 y tiene un punto isoeléctrico de $5,7 \pm 0,05$. El peso molecular del enzima determinado por cromatografía en una columna de Sephadex G-150 es 167.000 ± 17.000 . El pH óptimo de la hidrólisis de los substratos Gly-Phe-p-nitroanilida (GPNA) y Gly-Phe- β -naftilamida es 5,8. El valor de K_m para la hidrólisis de GPNA es 3,3 mM.

El enzima requiere la presencia de iones ha-

luro para poner de manifiesto su actividad y es activado por los reactivos tiólicos (ditiotreitól cisteína y 2-mercaptoetanol). Asimismo, la DAP I es inhibida por los reactivos de grupos $-\text{SH}$ (PCMB, IAA Hg^{2+}). La oxidación del enzima mediante una corriente de oxígeno se favorece por la presencia del ion Cl^- (50 mM); pero se recupera la actividad cuando la cisteína está presente en el medio de incubación: ésta parece actuar, además, como protector del enzima.

Bibliografía

1. ANDREWS, P.: *Biochem. J.*, **91**, 222-233, 1964.
2. BARRETT, A. J.: En «Lysosomes» (Dingle, J. T., ed.). North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1972, pp. 47-135.
3. BERGMAYER, H. U., GAWHEHN, K. y GRASSL, M.: En «Methods of Enzymatic Analysis» (Bergmeyer, H. U., ed.), Vol. 2. Academic Press, Inc., Nueva York, 1974, pp. 496-497.
4. BOUMA, J. M. W. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **113**, 350-358, 1966.
5. COFFEY, J. W. y DE DUVE, C.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3255-3263, 1968.
6. DAVIS, B. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121**, 404-427, 1964.
7. DE LA HABA, G., GAMMARATA, P. S. y TIMASHEFF, S. N.: *J. Biol. Chem.*, **234**, 316-319, 1959.
8. ELLMAN, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77, 1959.
9. FRUTON, J. S. y MYCEK, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **65**, 11-20, 1956.
10. GORTER, J. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **198**, 546-555, 1970.
11. HART, L. I., MCGARTOLL, M. A., CHAPMAN, H. R. y BRAY, R. C.: *Biochem. J.*, **116**, 851-864, 1970.
12. HEINRICH, C. P. y FRUTON, J. S.: *Biochemistry*, **7**, 3556-3565, 1968.
13. HUANG, F. L. y TAPPEL, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **236**, 739-748, 1971.
14. HUANG, F. L. y TAPPEL, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 527-538, 1972.
15. IODICE, A. A., LEONG, V. y WEINSTOCK, I. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 477-486, 1966.
16. KALCKAR, H. H.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445-459, 1947.

17. KEILOVÁ, H. y TOMÁŠEK, V.: *Collection Czechoslov. Commun.*, **40**, 218-224, 1975.
18. LASKOWSKY, M.: En «Methods in Enzymology» (Colowick, S. P. y Kaplan, N. O., eds.), Vol. 2. Academic Press, Nueva York, 1955, p. 34.
19. McDONALD, J. K., CALLAHAN, P. X., SMITH, R. E. y ELLIS, S.: En «Tissue Proteinases» (Barrett, A. J. y Dingle, J. T., eds.). North-Holland, Publ. Co., Amsterdam, 1971, pp. 69-107.
20. McDONALD, J. K., REILLY, T. J., ZEITMAN, B. B. y ELLIS, S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **24**, 771-775, 1956.
21. McDONALD, J. K. y SCHWABE, C.: En «Proteinases in mammalian cells and tissue» (Barrett, A. J., ed.). Elsevier, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 1977, pp. 311-391.
22. McDONALD, J. K., ZEITMAN, B. B., CALLAHAN, P. X. y ELLIS, S.: *J. Biol. Chem.*, **249**, 234-240, 1974.
23. McDONALD, J. K., ZEITMAN, B. B. y ELLIS, S.: *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **46**, 62-70, 1972.
24. McDONALD, J. K., ZEITMAN, B. B., REILLY, T. J. y ELLIS, S.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 2693-2709, 1969.
25. METRIONE, R. M., NEVES, A. G. y FRUTON, J. S.: *Biochemistry*, **5**, 1597-1604, 1966.
26. METRIONE, R. M., OKUDA, Y. y FAIRCLOUGH, G. F.: *Biochemistry*, **9**, 2427-2432, 1970.
27. MORELL, D. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 221-227, 1955.
28. PLANTA, R. J. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **89**, 503-510, 1964.
29. REISFELD, R. A., LEWIS, U. J. y WILLIAMS, D. E.: *Nature*, **195**, 281-283, 1962.
30. SCHWERT, G. W. y TAKENAKA, Y.: *Biochim. Biophys. Acta*, **16**, 570-574, 1955.
31. SLUYTERMAN, L. A. y WIJDENES, J.: *Biochim. Biophys. Acta* **200**, 593-595, 1970.
32. TAPPEL, A. L.: En «Lysosomes in Biology and Pathology» (Dingle, J. T. y Fell, H. B., eds.), Vol. 2. North-Holland, Amsterdam, 1969, p. 167.
33. VAHNA-PERTTULA, T. y KALLIOMÄKI, J. L.: *Clin. Chim. Acta*, **44**, 249-258, 1973.
34. VOYNICK, I. M. y FRUTON, J. S.: *Biochemistry*, **7**, 40-44, 1968.
35. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1942.