

Proteasas ácidas de hígado de pollo. Hidrólisis cooperativa de proteínas

F. Barceló, N. Vives y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona

(Recibido el 2 de julio de 1979)

F. BARCELO, N. VIVES and J. BOZAL. *Acid Proteases from Chicken Liver. Cooperative Hydrolysis of Proteins*. Rev. esp. Fisiol., 36, 139-146. 1980.

Purified preparations of cathepsin D, BANA-hydrolase activity and dipeptidil aminopeptidase I from chicken liver, show a cooperative effect in the protein hydrolysis (acid-denatured haemoglobin and bovine serum albumin and native bovine serum albumin) at pH 5.0. The nature of the protein substrates determines their sensitivity to enzymatic digestion. The action of cathepsin D on proteins, in contrast with the BANA-hydrolase activity, releases polypeptides with high molecular weight, with scant $-\text{NH}_2$ groups which can be valued by the ninhydrin method. These peptide fragments can then be further degraded by the protease BANA-hydrolase and the dipeptidil aminopeptidase I which is not active towards intact proteins.

Las proteasas intracelulares, que se consideran en su mayor parte como enzimas lisosómicos (2, 3, 8), degradan las proteínas hasta péptidos y aminoácidos a través de etapas que no están bien determinadas. Se ha sugerido que las endopeptidasas inician la hidrólisis proteica y los péptidos liberados son hidrolizados por las exopeptidasas, entre las que se encuentra la dipeptidil aminopeptidasa I (E.C. 3.4.14.1) (10). La catepsina D degrada las proteínas citosolubles nativas (4) y participa de modo destacado en el recambio proteico (5), pero se ha afirmado también que los enzimas de los que depende primordialmente la degradación proteica son

las tioproteasas (11). Por su parte, DEAN (6) puso de manifiesto que en la hidrólisis *in vitro* de proteínas citosolubles por extractos de lisosomas, la catepsina D (E.C. 3.4.23.5) y la catepsina B-tioproteasa (E.C. 3.4.22.1), desempeñan un papel similar.

Se describe comparativamente en este trabajo la hidrólisis de algunas proteínas características por preparados purificados con actividad de catepsina D, BANA-hidrolasa o dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo. Se determina, también, el efecto conjunto de las mezclas de las mencionadas proteasas sobre la hidrólisis de las proteínas *in vitro*.

Material y métodos

Todos los productos empleados han sido de calidad reactivo.

Los preparados enzimáticos son purificados de catepsina D, de BANA-hidrolasa y de dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo.

El tejido hepático se homogeneiza a 4° C (temperatura habitual de trabajo) en un triturador de cuchillas, en medio de tampón de fosfato sódico 10 mM de pH 6,0 (catepsina D y actividad BANA-hidrolasa) o de tampón acetato sódico 50 mM de pH 5,0 (dipeptidil aminopeptidasa I) y en la relación de 1 g de hígado por 10 ml de tampón. Se centrifuga a 39.000 $\times$ g, 60 min (centrifuga Beckman J 21B, rotor JA-20) y el sobrenadante obtenido constituye el extracto enzimático de partida.

Purificación de la actividad BANA-hidrolasa. El extracto enzimático se calienta a 50° C, 20 min; al final del intervalo la suspensión se enfría a 4° C por inmersión en un baño de hielo y se centrifuga a 6.000 $\times$ g, 30 min. El sobrenadante, a pH 5,0, se lleva hasta el 70 % de saturación en sulfato amónico. El residuo separado por centrifugación (15.000 $\times$ g, 10 min) se disuelve en tampón de acetato sódico 50 mM de pH 5,0, 0,1 M en NaCl y se dializa frente al mismo hasta eliminación del sulfato amónico. Se introduce, a continuación en una columna de Sephadex G-100, la elución se efectúa con el citado tampón y se recoge la fracción con actividad BANA-hidrolasa de $M \approx 23.000$ (volumen de elución de la tripsina cristalizada, $M = 23.300$ y del inhibidor triptico de la soja, $M = 21.700$).

El grado de purificación de los eluidos activos es de 23 veces y el rendimiento del 70 % respecto al extracto enzimático inicial.

Purificación de la catepsina D. Se ha purificado el enzima según el método propuesto por BARCELÓ *et al.* (1).

Purificación de la dipeptidil aminopeptidasa I. El extracto enzimático de pH 5,0 se calienta a 60° C, 20 min y se enfría seguidamente a 4° C. La suspensión se centrifuga (6.000 $\times$ g, 30 min) y al sobrenadante se adiciona acetona (—15° C) hasta el 47 % (v/v). El residuo obtenido por centrifugación (15.000 $\times$ g, 10 min) se disuelve en tampón de acetato sódico 50 mM de pH 5, 0,1 M en NaCl y 2 mM en 2-mercaptoetanol en la proporción 1/10 (p/v) y se dializa frente al mismo tampón 12 h. El dializado se cromatografía en una columna de Sephadex G-100 y se eluye con el citado tampón. La dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I) se separa en el volumen de exclusión, con lo que se eliminan la catepsina D ($M \approx 40.000$ -45.000) y la actividad BANA-hidrolasa ($M \approx 23.000$) contaminantes. Los eluidos se cromatografían, seguidamente, en una columna de DEAE-celulosa equilibrada con tampón de fosfato sódico 5 mM de pH 6,8. La elución se efectúa con un gradiente lineal de fosfatos entre 5 y 200 mM. La DAP I se separa a una concentración de 65 mM en fosfatos, con un grado de purificación de 42 veces y un rendimiento del 49 % respecto al extracto enzimático de partida.

Determinación de las actividades enzimáticas. La actividad de la catepsina D se determina frente a hemoglobina (SIGMA) al 1 %, desnaturalizada con urea (12), en medio de tampón citrato-fosfato 30 mM de pH 5,0 a $38 \pm 0,1$ ° C. La reacción se interrumpe a los 30 min por adición de un volumen de ácido tricloroacético 0,25 M igual al de la mezcla de incubación. En los blancos, de idéntica composición, se añade la disolución enzimática después del ácido tricloroacético. Las lecturas de los filtrados ácidos ($A_{280 \text{ nm}}$ se efectúan en un espectrofotó-

metro Beckman DU. La relación entre la concentración de enzima y $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ es lineal hasta 0,300. La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce una $\Delta A_{280 \text{ nm}} = 1,0$ en 60 min.

La actividad BANA-hidrolasa se determina frente a α -N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida (BANA, Sigma) 1,5 mM. La incubación se realiza a $40 \pm 0,1^\circ \text{C}$, en medio de tampón de fosfato sódico 80 mM de pH 6,0, 2 mM en cisteína y 1 mM en EDTA. La reacción se interrumpe a los 10 min por adición del reactivo de copulación (disolución acuosa de BRIJ-35 al 1 %, 12,5 mM en EDTA, 2,5 mM en PCMB y 0,125 mg/ml en Fast Garnet GBC) preparado según el método de BARRET (2). La extinción del complejo formado con la naftilamina liberada se lee a 520 nm en un colorímetro Spectronic-70 ($\epsilon = 25.000 \Delta A_{520 \text{ nm}} \times \text{mol}^{-1} \times 1$). La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por minuto. La actividad específica (A.E.) se expresa en unidades de enzima por mg de proteína.

La actividad de la dipeptidil aminopeptidasa I se determina por el método de GORTER y GRUBER (9), con glicil-L-fenilalanina-p-nitroanilida (GPNA, Merck) 0,5 mM como sustrato, disuelto en tampón de acetato sódico 80 mM de pH 5,0, que contiene NaCl 50 mM y cisteína 6 mM como activadores y Na_2SO_4 de modo que la fuerza iónica sea 0,25. El enzima y los activadores se preincuban 20 min a 25°C . La reacción se interrumpe 40 min después de la adición del sustrato mediante ácido monoiodoacético (IAA) de modo que su concentración final sea 10 mM. La p-nitroanilina liberada se lee a 410 nm. ($\epsilon = 8.000 \Delta A_{410 \text{ nm}} \times \text{mol}^{-1} \times 1$). La unidad enzimática se define del mismo modo que para la actividad BANA-hidrolasa.

La actividad proteásica de los purificados de BANA-hidrolasa se determina a pH 5,0, frente a hemoglobina al 1 %, desnaturizada con urea (12) y en presencia

de cisteína 2 mM y EDTA 1 mM como activadores; las demás condiciones de incubación son las descritas para la catepsina D. La unidad de actividad proteásica se define del mismo modo que para la catepsina D.

Hidrólisis de las proteínas por mezclas enzimáticas. Se utiliza como sustrato (1 %), seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) nativa y seroalbúmina bovina y hemoglobina desnaturizada en medio ácido ($\text{CH}_3\text{-COOH}$ 0,2 M, 2 h a 60°C). Las incubaciones (5 ml) se efectúan a 40°C , en medio de tampón de citrato-fosfato sódico 30 mM, pH 5,0 que contiene ditioneitol (DTT) 2 mM, EDTA 1 mM y NaCl 50 mM como activadores. El intervalo de digestión osciló entre 1 y 24 h; la reacción se interrumpe por adición de TCA 0,25 M en relación 1/1 (v/v). La extensión de la hidrólisis se determina en los filtrados ácidos mediante el método colorimétrico de la ninhidrina (13) y por lectura de éstos a 280 nm.

La concentración de proteína se determina por el método de WARBURG y CHRISTIAN (14).

Resultados

Se ha trabajado con los purificados de catepsina D (A.E. = 9,0) BANA-hidrolasa ($M \simeq 23.000$; A.E. = 0,023) y dipeptidil aminopeptidasa I (DAP I; A.E. = 0,027), obtenidos a partir de un extracto ácido de tejido hepático. La fracción BANA-hidrolasa presenta una ligera contaminación de catepsina D que no interfiere en los experimentos que se describirán a continuación dada su reducida actividad específica (A.E. = 0,28 en presencia de ácido monoiodoacético en el medio de incubación), cuando se compara con la del purificado de catepsina D y la de la fracción BANA-hidrolasa (A.E. = 0,62), todas ellas determinadas en condiciones similares frente a hemoglobina desnaturizada en medio de urea.

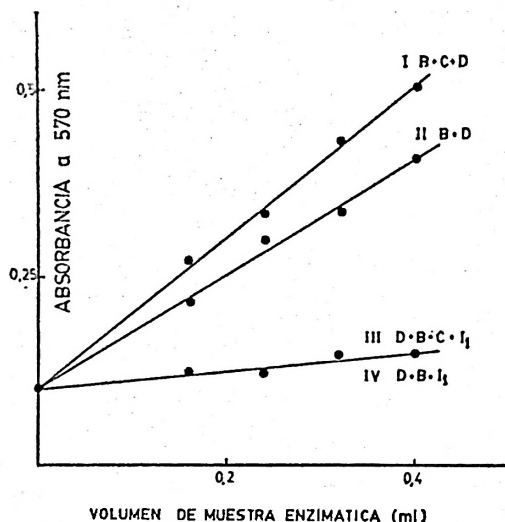


Fig. 1. Hidrólisis de la hemoglobina por cantidades variables de las muestras enzimáticas. Las incubaciones se realizan a 40° C durante 6 h (véase materiales y métodos), con una cantidad constante de catepsina D ($D = 0,24$ U) y cantidades crecientes de actividad BANA-hidrolasa ($B = 2,8; 2,2; 1,8; 1,1$ U) y de dipeptidil aminopeptidasa I ($C = 1,4; 1,1; 0,85; 0,56$ mU). III y IV: presencia de IAA (I_1) 1 mM en el medio de incubación. Método de la ninhidrina.

Se ha ensayado la acción hidrolítica concertada de las tres actividades purificadas a partir de tejido hepático, frente a la hemoglobina y a la seroalbúmina bovina. Todos los experimentos, excepto en los que se inhibe la acción de las tioproteasas, se han realizado en presencia de los activadores DTT 2 mM, EDTA 1 mM y NaCl 50 mM para estandarizar las condiciones de incubación. La acción del ácido monoiodoacético 1 mM, inhibe las tioproteasas (actividad BANA-hidrolasa y dipeptidil aminopeptidasa I) y sólo permite la actuación de la catepsina D. Se ha comprobado que las muestras enzimáticas son estables en las condiciones de incubación descritas (actividad residual de la catepsina D 70 %, de la BANA-hidrolasa 100 % y de la dipeptidil aminopep-

tidasa I 60 %, después de 24 h de incubación a 40° C en ausencia de sustrato).

La figura 1 muestra los resultados obtenidos en la digestión de la hemoglobina (1 %) por una cantidad constante de catepsina D y cantidades crecientes de BANA-hidrolasa y de dipeptidil aminopeptidasa I. El número de grupos $-NH_2$ liberados, valorables con ninhidrina, aumenta al incrementar las cantidades de estos enzimas en la incubación y es mayor cuando están presentes todos ellos.

La hidrólisis de la hemoglobina a lo largo del tiempo (fig. 2) es máxima cuando actúan conjuntamente las tres actividades y se observa un efecto cooperativo en la digestión *in vitro* del sustrato, más apreciable cuando los intervalos de incubación son prolongados (24 h).

La dipeptidil aminopeptidasa I, por sí sola, exhibe una actividad proteásica despreciable al cabo de 24 h de incubación, mientras que la catepsina D y la actividad BANA-hidrolasa hidrolizan a la hemoglo-

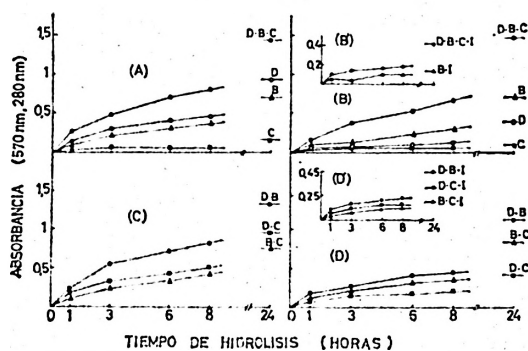


Fig. 2. Degradación de la hemoglobina por mezclas enzimáticas a lo largo del tiempo. Condiciones de incubación, véase materiales y métodos. Concentración de enzima en la mezcla de incubación: catepsina D, $D = 0,06$ U/ml; actividad BANA-hidrolasa, $B = 0,7$ U/ml; dipeptidil aminopeptidasa I, $C = 0,54$ mU/ml. I = presencia de IAA 1 mM en el medio de incubación. Lectura de los filtrados ácidos por el método de la ninhidrina (B), (B'), (D), (D') y por el método espectrofotométrico ($\lambda = 280$ nm) (A) y (C).

bina de manera notable. La mezcla binaria catepsina D-BANA-hidrolasa es la que muestra una mayor eficacia hidrolítica de todas las posibles combinaciones binarias de los tres enzimas.

Al comparar los resultados obtenidos con los filtrados ácidos por el método de la ninhidrina (figs. 2B y 2D) y por el método espectrofotométrico ($\lambda = 280$ nm) (figs. 2A y 2C), se pone de manifiesto la diferencia de actuación de la catepsina D y de la actividad BANA-hidrolasa sobre la hemoglobina. En efecto, la catepsina D en su actuación individual libera péptidos que producen variaciones elevadas de absorbancia a 280 nm y escasa aparición de grupos $-\text{NH}_2$ valorables con ninhidrina. La actividad BANA-hidrolasa, por

el contrario, libera gran número de grupos $-\text{NH}_2$ valorables, mientras que las diferencias de absorción obtenidas por el método espectrofotométrico son menores que las que resultan de la actuación de la catepsina D. Análogamente, la mezcla binaria catepsina D-DAP I se muestra menos activa frente a la hemoglobina, si la extensión de la hidrólisis se determina por el método de la ninhidrina. Sin embargo, con el método espectrofotométrico la mezcla con menor actividad es la BANA-hidrolasa-DAP I.

La catepsina D hidroliza escasamente a la seroalbúmina bovina (1 %) (tabla I); el grado de hidrólisis es aproximadamente un 10-17 % del de la hemoglobina a las 24 h de incubación. La actividad BANA-hidrolasa degrada apreciablemente al citado sustrato. Se pone de manifiesto el efecto cooperativo en la degradación de la seroalbúmina bovina cuando actúan conjuntamente la catepsina D y la actividad BANA-hidrolasa; la acción de la dipeptidil aminopeptidasa I es poco acusada en las condiciones experimentales ensayadas. La lectura de los filtrados ácidos a 280 nm confirma los resultados antes comentados acerca del distinto comportamiento de la actividad BANA-hidrolasa y de la catepsina D en su actuación como proteasas.

Discusión

Los resultados obtenidos en el estudio de la hidrólisis de la hemoglobina y de la seroalbúmina bovina ponen de manifiesto que la catepsina D y la actividad BANA-hidrolasa actúan como verdaderas proteasas sobre los sustratos proteicos intactos, mientras que la dipeptidil aminopeptidasa I sólo actúa sobre los péptidos liberados por aquéllas. La catepsina D cataliza eficazmente la hidrólisis de la hemoglobina, mientras que la actuación sobre la seroalbúmina bovina es muy limitada. Sobre esta última actúa de modo preferente la actividad BANA-hidrolasa.

Tabla I. *Degradación de la seroalbúmina bovina por mezclas enzimáticas.*

Incubación: 40° C, pH 5, 24 h (véase materiales y métodos). La concentración de enzima en la mezcla de incubación es la indicada en el pie de la figura 2. Inhibidor (I) = IAA 1 mM. Lectura de los filtrados ácidos por el método de la ninhidrina, expresados como $\Delta A_{280 \text{ nm}}$ frente a un blanco de proteína.

Composición de la mezcla ^a	Tiempo de incubación (h)	
	6	24
BSA nativa		
D	0,02	0,04
B	0,15	0,41
B + I	0,02	0,04
D + B	0,16	0,63
D + B + I	0,02	0,04
D + B + C	0,18	0,64
D + B + C + I	0,02	0,04
BSA desnaturalizada en medio ácido		
D	0,03	0,06
B	0,11	0,36
B + I	0,02	0,04
D + B	0,12	0,48
D + B + I	0,03	0,04
D + B + C	0,15	0,49
D + B + C + I	0,03	0,04

El hecho puede estar relacionado con la disyuntiva de si son las tioproteasas o la catepsina D los enzimas más importantes en la degradación proteica *in vivo* (4, 6, 11); los resultados ponen de manifiesto la importancia de la naturaleza del substrato proteico en su susceptibilidad frente a la acción de estas proteasas.

En las condiciones de experimentación reseñadas, no se puede afirmar que exista un efecto sinérgico en la degradación de los proteínas por la acción conjunta de las tres actividades enzimáticas del mismo origen; sin embargo, cuando los períodos de incubación son prolongados, se aprecia *in vitro* una potenciación de la hidrólisis, en comparación con la actuación de los enzimas aislados. Se supone que el efecto sinérgico *in vitro*, descrito por algunos autores (6, 7, 10), puede no ser observado en todos los casos (4) ya que las condiciones del sistema con el que se experimenta pueden no ser directamente extrapolables a las que predominan en el medio intracelular.

No se han observado diferencias importantes al trabajar con seroalbúmina bovina, nativa o desnaturalizada, a pH ácido. Ello pudiera ser debido a que la proteína sufra una rápida desnaturalización en las condiciones de pH y temperatura que prevalecen en el medio en que se efectúa la incubación.

Si se compara la extensión de la hidrólisis, determinada por el método de la ninhidrina o por el método espectrofotométrico, se observa que la catepsina D produce péptidos de elevado peso molecular que son los que provocan la absorbancia a 280 nm, pero es escaso el número de grupos $-\text{NH}_2$ valorables con ninhidrina. Por el contrario, la actividad BANA-hidrolasa libera péptidos de pequeño tamaño, con la aparición de gran número de grupos $-\text{NH}_2$, aunque la fracción de proteína hidrolizada sea menor, como lo demuestra la reducida absorbancia 280 nm. Por consiguiente, el modo de actuación de la catepsina D es distinto del

de las tioproteasas estudiadas. Se puede suponer que aquel enzima sería el que iniciaría la hidrólisis proteica, favoreciendo de este modo la intervención de las demás proteasas, tal como ha sido postulado (10). La acción de la catepsina D liberaría polipéptidos sobre los que actuarían posteriormente la actividad BANA-hidrolasa, dando lugar a péptidos de menor tamaño que serían el substrato de la dipeptidil aminopeptidasa I. Sin embargo, no se puede descartar la acción de la actividad BANA-hidrolasa sobre la proteína intacta. El mecanismo postulado puede ser representativo de una parte de la degradación proteica *in vivo* que, con la participación de otras proteasas y peptidasas no estudiadas, da por resultado la hidrólisis completa de las proteínas en sus aminoácidos constituyentes.

Resumen

Preparados purificados de catepsina D, actividad BANA-hidrolasa y dipeptidil aminopeptidasa I de hígado de pollo, muestran un efecto cooperativo en la hidrólisis proteica (hemoglobina y seroalbúmina bovina desnaturalizada en medio ácido y seroalbúmina bovina nativa) a pH 5,0. La susceptibilidad de los substratos proteicos frente a la digestión enzimática depende de su naturaleza. La acción de la catepsina D sobre las proteínas, a diferencia de la actividad BANA-hidrolasa, libera polipéptidos de peso molecular elevado, con escaso número de grupos $-\text{NH}_2$ valorables por el método de la ninhidrina. Estos fragmentos peptídicos pueden ser luego hidrolizados por la proteasa BANA-hidrolasa y la dipeptidil aminopeptidasa I, que no es activa frente a las proteínas intactas.

Bibliografía

1. BARCELÓ, F., VIVES, N. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **36**, 63-70, 1980.
2. BARRETT, A. J.: En «Lysosomes» (Dingle, J. T., ed.). North-Holland Pub. Co., Amsterdam, 1972, pp. 46-135.
3. COFFEY, J. W. y DE DUVE, Ch.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 3255-3263, 1968.

4. DEAN, R. T.: *Eur. J. Biochem.*, 58, 9-14, 1975.
5. DEAN, R. T.: *Nature*, 257, 414-416, 1975.
6. DEAN, R. T.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 68, 518-523, 1976.
7. GOETTLICH-RIEMANN, W., YOUNG, J. O. y TAPPEL, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 243, 137-146, 1971.
8. GOLDBERG, A. L. y ST. JOHN, A. C.: *Ann. Rev. Biochem.*, 45, 747-803, 1976.
9. GORTER, J. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 198, 546-555, 1970.
10. HUANG, F. L. y TAPPEL, A. L.: *Biochim. Biophys. Acta*, 236, 739-748, 1971.
11. HUISMAN, W., LANTING, L., DODDEMA, H. J., BOUMA, J. M. W. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 370, 297-307, 1974.
12. LASKOWSKY, M.: En «Methods in Enzymology», vol. 2 (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., eds). Academic Press, Nueva York, 1955, p. 34.
13. MOORE, S. y STEIN, W. H.: *J. Biol. Chem.*, 211, 907-913, 1954.
14. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, 310, 384-421, 1942.

