

Proteasa ácida de hígado de pollo. Purificación y propiedades

F. Barceló, N. Vives y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona. Barcelona

(Recibido el 21 de mayo de 1979)

F. BARCELO, N. VIVES and J. BOZAL. *Acid Proteinase of Chicken Liver. Purification and Properties*. Rev. esp. Fisiol., 36, 63-70. 1980.

A method for purifying the haemoglobinolytic activity to acid pH in chicken liver is described. The purified preparation contains cathepsin D activity since it is inhibited by diazoacetyl-DL-norleucine methylester in the presence of cupric ions, while thiol-enzyme reagents do not affect it. The molecular weight of the enzyme is approximately 40 000-45 000 and the pH optimum against haemoglobin and bovine serum albumin is 3.5-3.7. The rate of degradation of albumin and casein is much less than that of haemoglobin.

Cathepsin D preparations with different purification degrees, exhibit a similar percentage of activation at acid pH; the highest activation is observed at pH 3.1-3.3.

La actuación de las proteasas ácidas intracelulares frente a la hemoglobina, la caseína y la seroalbúmina ha constituido objeto de numerosos trabajos (1, 3, 11, 16, 20, 27) en los que se señala la localización de aquéllas en los lisosomas, aunque no puede afirmarse que sean estos orgánulos el centro exclusivo de la degradación proteica (10). Sin embargo, el conocimiento acerca de la naturaleza de estas proteasas ácidas y de su importancia en el recambio proteico es limitado.

La catepsina D (E.C.3.4.23.5) es una carboxil-proteasa muy difundida en los tejidos de los vertebrados (6) y se ha demostrado su participación en el recambio proteico celular (8). Su actividad se determina, habitualmente, frente a los mencio-

nados substratos proteicos, siendo 2,8 — 4 su pH óptimo (1, 3, 12, 26). Al purificar el enzima de diversa procedencia (3, 5, 7), se ha aplicado una etapa de autólisis en medio ácido (pH 3,0 — 4,0), en la que pudieran aparecer formas enzimáticas como consecuencia del método de purificación; aspecto que no ha sido confirmado en la catepsina D (6). No obstante, se ha descrito la presencia de numerosas formas moleculares, de naturaleza poco conocida, que se diferencian en su pI (3, 7, 18, 21) y en los pesos moleculares que oscilan entre 12.000 (21) y 58.000 (19). Asimismo, se ha sugerido que la catepsina D y la pepsina son enzimas homólogos, y, por ello, la posible existencia de una forma zimógena del enzima (9) que

se destruiría al aplicar una etapa de autólisis en el proceso de purificación.

En el presente trabajo se describe la purificación de la actividad proteásica ácida de hígado de pollo, activa frente a hemoglobina, mediante un proceso en el que se evita la autólisis del homogeneizado. Se comparan, además, las propiedades mostradas por el enzima purificado con las descritas para la catepsina D de diversas procedencias.

Material y métodos

Todos los productos empleados han sido de calidad reactivo.

Determinación de las actividades enzimáticas. La actividad de la catepsina D se determina frente a hemoglobina (SIGMA) desnaturalizada con urea (17) al 1 %, en medio de tampón citrato-fosfato sódico 30 mM, de pH 5,0 a $38 \pm 0,1^\circ \text{C}$. 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 ($\Delta A_{280 \text{ nm}}$) se efectúan en un espectrofotómetro 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 minutos.

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 de

Fast Garnet GBC) preparado según el método de BARRETT (4). La extinción del complejo formado con la naftilamina liberada se lee a 520 nm en un colorímetro Spectronic-70 ($E = 25.000 \Delta A_{520 \text{ nm}} \times \text{mol}^{-1} \times 1$). La unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que transforma un μmol de sustrato por min.

La concentración de proteína se ha determinado por el método de WARBURG y CHRISTIAN (25).

Resultados

Proceso de purificación. 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 (1 g de hígado/10 ml de tampón). Se centrifuga a $39.000 \times g$, 60 min en una centrífuga modelo Beckman J21B (rotor JA-20) y se desecha el residuo. El sobrenadante (S_n) se suspende en gel de fosfato cálcico, preparado según el método de KEILIN y HARTREE (14), (1 g de gel/10 ml de disolución). El conjunto se agita 15 min y se centrifuga ($6.000 \times g$, 30 min). El sobrenadante activo (S_o) se fracciona, a pH 5,0, con acetona (-15°C) entre el 40-70 % en volumen. El precipitado separado al centrifugar a $15.000 \times g$, 10 min a 0°C se disuelve en tampón de fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, 10 mM en EDTA y se dializa frente al mismo tampón 12 horas hasta eliminar la acetona. El dializado se centrifuga ($15.000 \times g$, 10 min, 0°C) y el sobrenadante activo y claro (P_{70D}) se emplea para la separación cromatográfica.

El sobrenadante P_{70D} se cromatografía en gel de Sephadex G-75 (fig. 1A). La fracción activa se separa en el mismo volumen de elución que la ovoalbúmina (SIGMA) ($M = 45.000$); en esta etapa se consigue la separación de la actividad BANA-hidrolasa (tíoenzimas). Los eluidos activos (FE_{1D}) se insertan en una columna de DEAE-celulosa (fig. 1B). La

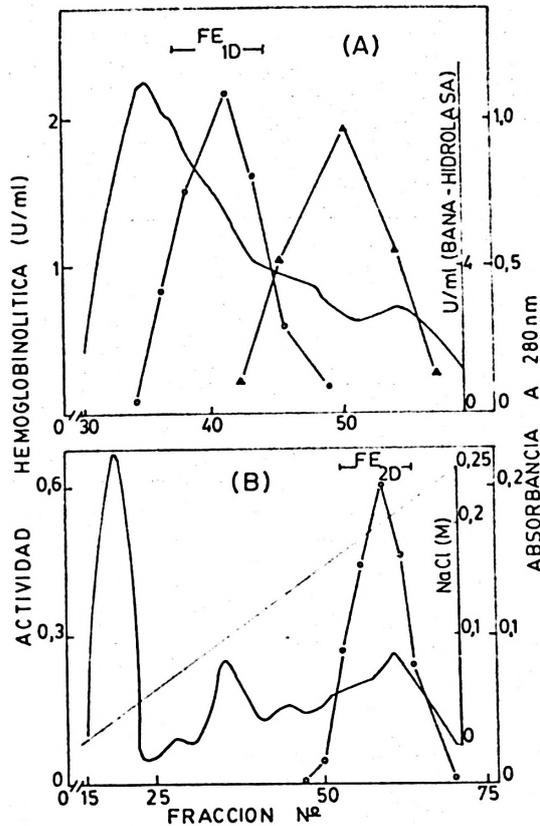


Fig. 1. Separaciones cromatográficas en la purificación de la actividad proteásica ácida de hígado de pollo.

(A) Cromatografía en columna (3 × 70 cm) de Sephadex G-75 (Pharmacia) de la fracción P_{10D} . Tampón elución Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) 0,1 M en NaCl. Velocidad elución = 33 ml/h, fracciones de 5 ml.

(B) Cromatografía en columna (2 × 30 cm) de DEAE-celulosa (Whatman DE-23) de la fracción FE_{2D} eluida en la anterior columna. Resina equilibrada con tampón Tris-HCl (14,4 mM en Tris y 10 mM en HCl) de pH 7,8. Elución con gradiente lineal de NaCl en idéntico tampón, hasta 0,25 M. Velocidad de elución = 20 ml/h, fracciones de 5 ml.

Actividades determinadas según se especifica en métodos: Catepsina D (○—○), BANA-hidrolasa (△—△), absorbancia a 280 nm (—).

fracción activa (FE_{2D}) se separa mediante gradiente de NaCl cuando la fuerza iónica es de 198 mM y no es homogénea electroforéticamente. Los resultados de la purificación se resumen en la tabla I.

pH óptimo. Se ha determinado frente a hemoglobina (1%), en presencia y en ausencia de cisteína 4 mM, en el margen de valores de pH 2,6-6,0 (fig. 2). El valor de máxima actividad se ha confirmado utilizando seroalbúmina bovina nativa (SIGMA) al 1% (fig. 2), pero el grado de hidrólisis es inferior respecto del de la hemoglobina. La actividad del enzima con caseína (SIGMA) al 1%, se ha determinado en el intervalo de valores de pH 5,5-6,5; la máxima actividad aparece

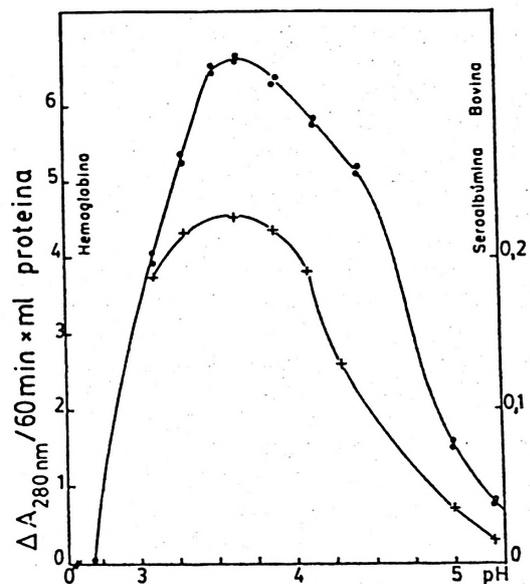


Fig. 2. pH óptimo de la actividad proteásica ácida.

Incubación en medio de tampón citrato-fosfato sódico de molaridad variable, que contenía KCl hasta fuerza iónica 0,1. Concentración del enzima en la incubación 0,08 U/ml. Actividad frente a: hemoglobina en presencia de Cys 4 mM (●—●); hemoglobina en ausencia de Cys (○—○); seroalbúmina bovina (+—+).

Tabla I. Purificación de la actividad proteásica ácida de hígado de pollo.

Valores promedio de 4 preparaciones a partir de 37 g de tejido. Actividades enzimáticas determinadas según métodos. La relación Catepsina D/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.

| Etapa | Proteína total (mg) | Actividad total (U) | Act. específica U/mg $\times 10^2$ | Grado purificación | Rendimiento (%) | Catepsina D/BANA-hidrolasa |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|------------------------------------|--------------------|-----------------|----------------------------|
| Extracto-S _D | 4012 | 480 | 12 | 1 | — | 1 |
| Sobrenadante-gel fosfato cálcico | 2962 | 383 | 13 | 1 | 80 | 1 |
| Fraccionamiento con acetona: | | | | | | |
| 40 % (v/v) | 183 | 34 | 18 | 1 | 7 | 2 |
| 40-70 % (v/v) | 200 | 251 | 125 | 10 | 53 | 23 |
| Sephadex G-75 | 75 | 231 | 314 | 26 | 48 | — |
| DEAE-celulosa | 17 | 154 | 900 | 76 | 32 | — |

a pH 5,5. La velocidad de hidrólisis ($\Delta A_{280 \text{ nm}}/60 \text{ min}$ a pH 5,5) de la caseína es un 25 % de la hemoglobinolítica.

Inhibidores. El enzima purificado se inhibe por el éster metílico de la diazoacetil-DL-norleucina (DAN) (SIGMA) en presencia de Cu^{2+} , en medio de tampón de fosfato sódico 0,1 M de pH 5,4 (fig. 3). El verdadero inhibidor lo constituye el complejo DAN— Cu^{2+} , que se forma al mantener en contacto el reactivo DAN (30 mM) con CuCl_2 (0,2M ó 60 mM), 15 min, a pH 5,4 y 25° C. La inhibición es progresiva con el tiempo (95 % de inhibición a las 3 h de contacto a 25° C) y los resultados obtenidos son idénticos con las dos concentraciones de iones Cu^{2+} , con las que se ha ensayado. Si se determina la inhibición sin establecer contacto previo del reactivo DAN con el Cu^{2+} , el porcentaje de inhibición es menor (54 % frente a un 78 % a los 15 min de contacto Enzima-DAN- Cu^{2+}).

La presencia de ácido 3-fenilpirúvico (1 mM), p-cloromercuribenzoato sódico (0,1 mM) o HcCl_2 (1 mM) en el medio de incubación, inhiben al enzima en un 20 %. El DTT (1 mM) y la cisteína (4 mM) no afectan a la actividad enzimática.

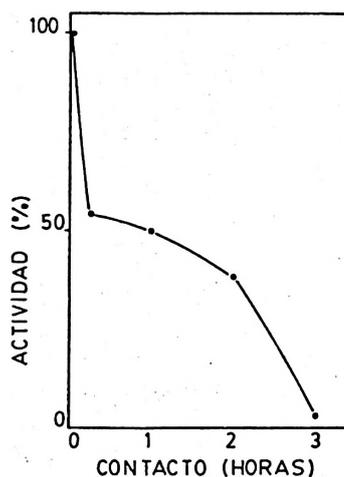


Fig. 3. Inhibición del enzima purificado por DAN.

[DAN] = 0,3 mM; [Cu^{2+}] = 0,6 mM ó 2 mM. La concentración de enzima en contacto fue: 0,5 U/ml.

Activación en medio ácido. Al determinar la estabilidad de las muestras del enzima parcialmente purificado (eluidos Sephadex G-75 de pH 7,4; 0,3 mg proteína/ml) se observa un máximo de activación a pH 3,1-3,3 (fig. 4), que difiere del valor de pH óptimo. El fenómeno se ha-

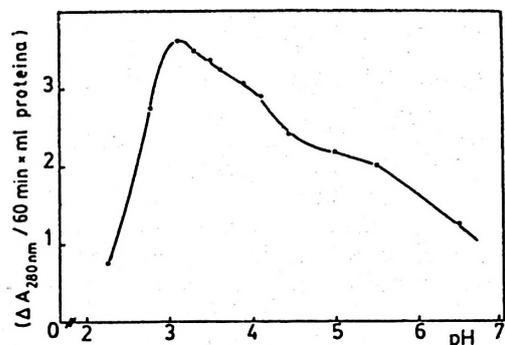


Fig. 4. Activación del enzima purificado con el pH.

Las muestras enzimáticas (eluidos de Sephadex G-75, en tampón Tris-HCl 50 mM, de pH 7,4, 0,1 M en NaCl) se diluyen con el tampón citrato-fosfato de $\mu = 0,1$ apropiado en cada caso en la proporción 1/2 (v/v); se ajustan al pH de cada experimento y se mantienen en estas condiciones 60 min a 38° C. Antes de determinar la actividad hemoglobinolítica en las condiciones habituales de ensayo (ver métodos) se ajusta a 5,0 el pH de cada una de las muestras.

lla en discusión, pues si bien ha sido observado por algunos autores (16), no se percibe cuando en el proceso de purificación se introduce la etapa de autólisis del homogeneizado.

Los porcentajes de activación, a pH 3,5-4,5, de diversos purificados parciales son análogos al mismo pH (tabla II). La determinación de la activación tal como se ha practicado, no excluye la posibilidad de que durante el período de preincubación a los correspondientes valores de pH, el enzima experimente una destrucción parcial, por ello el significado de los valores constituye una indicación cualitativa del fenómeno de activación. El efecto se induce únicamente por acción del pH ácido y no por alteraciones del enzima al permanecer en disolución. La muestra S₁ (9,6 mg proteína/ml) es estable durante 20 h a 4° C o a 20° C, en medio de tampón de fosfato sódico 10 mM de pH 6, pero a pH 3,5 el enzima incrementa su actividad hasta un 15 % de la inicial y

Tabla II. Activación a pH ácido de preparados enzimáticos con distinto grado de purificación.

Condiciones experimentales análogas a las indicadas en la figura 4. Los preparados enzimáticos han sido: S₁ = sobrenadante obtenido en el tratamiento con gel de fosfato cálcico (9 mg P/ml); FE_{1,D} = eluidos de Sephadex G-75 (0,3 g P/ml); FE_{2,D} = eluidos de DEAE-celulosa (0,05 mg P/ml) el grado de pureza de los preparados aparece en la tabla I. Los porcentajes están referidos al valor de 100 asignado a cada muestra control que no ha sido sometida al tratamiento.

| pH-contacto | Actividad (%) | | |
|-------------|----------------|-------------------|-------------------|
| | S ₁ | FE _{1,D} | FE _{2,D} |
| 3,5 | 163 | 158 | 130 |
| 4,5 | 115 | 112 | 110 |

el efecto persiste después de permanecer la muestra 20 h a 4° C o a 20° C (130 % de actividad residual).

Las disoluciones del enzima conservadas a 4° C en medio ligeramente ácido (pH $\geq 5,0$) o alcalino, mantienen su actividad plena hasta 20 días.

Discusión

Entre las proteasas ácidas intracelulares, la catepsina D es la que muestra una mayor capacidad de hidrólisis de la hemoglobina (2), pero la catepsina B (E.C. 3.4.22.1) y la catepsina E (E.C. 3.4.23) también la degradan, aunque se muestran menos activas (11, 16, 27). En el presente trabajo, se ha intentado identificar la actividad proteásica de hígado de pollo purificada con uno de los mencionados enzimas. El complejo DAN-Cu²⁺ inhibe a la catepsina D (7, 22, 23), mientras que los reactivos capaces de bloquear a los grupos —SH son potentes inhibidores de la tioproteasa. La actividad que se caracteriza es fuertemente inhibida por el complejo DAN-Cu²⁺ y su actividad específica es idéntica en presencia y en ausen-

cia de reactivos tiólicos, lo que indica que el purificado final contiene mayoritariamente a la catepsina D. El reducido porcentaje de inhibición (20 %) provocado por los reactivos de grupos —SH no es significativo, ya que es comparable con el descrito para la catepsina D de bazo bovino (7). El efecto observado podría ser debido, también, a alguna tíoproteasa contaminante.

La elución de la actividad hemoglobínica en una columna de Sephadex G-75, en el mismo volumen que la ovoalbúmina bovina ($M = 45.000$), indica que su peso molecular aproximado es 40.000-45.000, valor que coincide con el asignado a la catepsina D de diversas procedencias (3, 13, 15). Aunque las propiedades de la catepsina E son similares a las de la catepsina D (2), es posible descartar que la actividad purificada sea aquélla, dado que se le adscriben pesos moleculares entre 90.000 y 305.000 (24, 27).

El pH óptimo (3,5-3,7) del purificado es ligeramente superior al descrito (2,8-3,0) para la catepsina D de hígado de pollo (3); la diferencia observada podría atribuirse a la distinta preparación de los sustratos proteicos, ya que se ha postulado que el valor del pH óptimo puede estar influido por la fuerza iónica del medio (7). La curva de actividad obtenida no es simétrica, pero no presenta el segundo máximo de actividad en el intervalo de pH 4-5, que describen algunos autores como característica de la catepsina D (3,7).

El proceso de purificación que se ha descrito, suprime la etapa de autólisis propuesta por otros autores para la catepsina D (3, 5, 7), permite la obtención de un preparado enzimático compuesto mayoritariamente por catepsina D, con un grado de purificación de 76 veces y un rendimiento del 32 % respecto al extracto del tejido obtenido a pH 6,0.

La activación de las muestras enzimáticas cuando el pH es inferior a 5,0, cons-

tituye una característica del enzima, ya que se manifiesta con preparados de diferente grado de pureza. Se obtienen porcentajes de activación semejantes y sólo depende del pH ácido del medio. Los resultados comentados concuerdan con los descritos por FIRFAROVA y OREKOVICH (9) con un purificado parcial del enzima de la misma procedencia que no fue sometido a autólisis y podrían confirmar la hipótesis formulada por los citados autores acerca de la existencia de un precursor inactivo que se activaría durante el proceso de autólisis a pH ácido. Ello explicaría los diferentes resultados descritos por otros autores (3).

Resumen

Se describe un método de purificación de la actividad hemoglobínica a pH ácido de hígado de pollo. El purificado contiene catepsina D, ya que se inhibe por el éster metílico de la diazoacetil-DL-norleucina en presencia de iones cúpricos, mientras que los reactivos de los tioenzimas no afectan a su actividad. El peso molecular aproximado es de 40 000-45 000 y el pH óptimo frente a hemoglobina y seroalbúmina bovina es 3,5-3,7. Hidroliza a la seroalbúmina bovina y a la caseína en menor extensión que a la hemoglobina.

Los preparados de catepsina D, de diferente grado de pureza, experimentan a pH ácido porcentajes de activación semejantes; el máximo se observa a pH 3,1-3,3.

Bibliografía

1. BARRETT, A. J.: *Biochem. J.*, **104**, 601-608, 1967.
2. BARRETT, A. J.: En «Lysosomes in Biology and Pathology» (J. T. Dingle y F. B. Fell, eds). Vol. 2. North-Holland, Amsterdam, 1969, pp. 245-312.
3. BARRETT, A. J.: *Biochem. J.*, **117**, 601-607, 1970.
4. BARRETT, A. J.: *Anal Biochem.*, **47**, 280-293, 1972.
5. BARRETT, A. J.: *Biochem. J.*, **131**, 809-822, 1973.
6. BARRETT, A. J.: En «Proteinases in mam-

- malian cells and tissues» (J. A. Barrett, ed.). North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977, pp. 209-248.
7. CUNNINGHAM, M. y TANG, J.: *J. Biol. Chem.*, **251**, 4528-4536, 1976.
 8. DEAN, R. T.: *Nature*, **257**, 414-416, 1975.
 9. FIRFAROVA, K. F. y OREKHOVICH, V. N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **45**, 911-916, 1971.
 10. GOLBERG, A. L. y JOHN, A. C. ST.: *Ann. Rev. Biochem.*, **45**, 747-803, 1976.
 11. HUISMAN, W., LANTING, L., DODDEMA, J. M., BOUMA, J. M. W. y GRUBER, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 297-307, 1974.
 12. IODICE, A. A., LEONG, V. y WEINSTOCK, I. M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **117**, 477-486, 1966.
 13. ISHIKAWA, I. y CIMASONI, G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **480**, 228-240, 1977.
 14. KEILIN, D. y HARTREE, E. F.: *Proc. Roy. Soc. (London)*, **B124**, 397, 1938.
 15. KNIGHT, C. G. y BARRETT, A. J.: *Biochem. J.*, **155**, 117-125, 1976.
 16. LAPRESLE, C. y WEBB, T.: *Biochem. J.*, **84**, 455-462, 1962.
 17. LASKOWSKY, M.: En «Methods in Enzymology» (S. P. Colowick y N. O. Kaplan, eds.). Vol. 2, Academic Press, Nueva York, 1955, p. 34.
 18. LIN T. Y. y FLETCHER, D. S.: *Int. Union Biochem., Abstracts*, 1973. p. 97.
 19. PRESS, E. M., PORTER, R. R. y CEBRA, J.: *Biochem. J.*, **74**, 502-514, 1960.
 20. SAKAI, J. y HORIUCHI, SH.: *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 269-273, 1979.
 21. SAPOLSKY, A. I. y WOESSNER, J. F.: *J. Biol. Chem.*, **247**, 2069-2076, 1972.
 22. SMITH, G. D., MURRAY, M. A., NICHOL, L. W. y TRIKOJUS, V. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 288-298, 1969.
 23. TAKAHASHI, K., CHANG, W. J. y KO, J. S.: *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 897-899, 1974.
 24. TURK, W., KREGAR, I. y LEBEZ, D.: *Enzymologia*, **34**, 89-100, 1968.
 25. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-421, 1942.
 26. WOESSNER, J. F. Jr. y SHAMBERGER, R. J. Jr.: *J. Biol. Chem.*, **246**, 1951-1960, 1971.
 27. YAMAMOTO, K., KATSUDA, N. y KATO, K.: *Eur. J. Biochem.*, **92**, 499-508, 1978.

