
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

FRANCESCO DE LORENZO, GUIDO MOLEA

Riattivazione enzimatica del pepsinogeno ridotto

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 42 (1967), n.1, p. 65–68.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1967_8_42_1_65_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)*

SIMAI & UMI

<http://www.bdim.eu/>

Chimica biologica. — *Riattivazione enzimatica del pepsinogeno ridotto* (*). Nota di FRANCESCO DE LORENZO e GUIDO MOLEA, presentata (**) dal Socio F. CEDRANGOLO.

SUMMARY. — An enzyme purified from beef liver microsomes has been shown to catalyze sulfhydryl-disulfide interchange in proteins containing unnatural disulfide bonds, deliberately introduced in the molecules. As previously described fully reduced and randomly crosslinked bovine pancreatic ribonuclease, egg white lysozyme and soy bean trypsin inhibitor can be used as substrates for the disulfide interchange enzyme.

The present experiments deal with the enzymic reactivation of fully reduced pepsinogen. The purified microsomal disulfide interchange enzyme catalyzes 45% and 75% reactivation of fully reduced pepsinogen respectively in 10 and 20 minutes, in the presence of 5×10^{-4} M dehydroascorbic acid. These results give further strong evidence for the generalized function of the enzyme.

In questi ultimi anni è stata pressoché definitivamente stabilita la validità dell'ipotesi avanzata da Anfinsen [1] secondo cui l'informazione per la struttura terziaria delle proteine è presente nella sequenza degli aminoacidi. Si è dimostrato, infatti, che diverse proteine, private di ogni struttura secondaria e terziaria (dopo riduzione in presenza di agenti denaturanti) e quindi di attività biologica, sono in grado di riacquistare in pieno, spontaneamente, la loro struttura nativa con tutte le originali caratteristiche chimico-fisiche e biologiche [2, 6].

Recentemente è stato isolato dai microsomi di fegato di ratto e di bue [7, 8] e dal pancreas di pollo, piccione e cavia [9] un enzima che catalizza in un tempo molto minore rispetto al processo spontaneo ed in condizioni di temperatura e pH fisiologiche, la riattivazione della ribonucleasi ridotta (in presenza di un fattore ossidante) o contenenti ponti disolfuro incorretti deliberatamente introdotti nella molecola (in presenza di piccole quantità di agenti riducenti) [10]. Lo stesso enzima ottenuto in forma pura dai microsomi di fegato di bue [11] catalizza anche la riattivazione del lisozima [8] e dell'inibitore della tripsina presente nella soia [12].

È stato dimostrato che il suddetto enzima catalizza un processo di interscambio sulfidril-disolfuro facilitando così il riordinamento dei ponti disolfuro incorretti introdotti nelle proteine o che si formano *in vitro* durante l'ossidazione dei residui di cisteina a cistina [10]. La reazione catalizzata dall'enzima sembra essere guidata dall'energia libera prodotta da una proteina, che da una struttura disorganizzata (con ponti disolfuro incorretti),

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Chimica Biologica della Università di Napoli con l'ausilio di contributi del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Impresa Enzimologia).

(**) Nella seduta del 14 gennaio 1967.

passa alla struttura dello stato nativo che è quella termodinamicamente più stabile [2, 13].

I dati riportati in questa Nota riguardano la riattivazione, ad opera dell'enzima microsomiale puro, del pepsinogeno ridotto.

PARTE SPERIMENTALE.

Materiali: Il pepsinogeno (2 volte cristallizzato) è stato fornito dalla Worthington Biochemical Corporation. L'enzima microsomiale è stato purificato seguendo la tecnica descritta in precedenza [11], e la sua concentrazione è stata determinata con il metodo di Lowry [14]. L'emoglobina umana (2 volte cristallizzata) è stata ottenuta dalla Calbiochem. Il β -mercaptoetanololo è stato fornito dalla Eastman Kodak; il Sephadex G-25 « fines » dalla Pharmacia Fine Chemicals, Inc.; l'acido deidroascorbico dalla Mann Research Laboratories, Inc. L'urea è stata ricristallizzata da etanolo subito prima dell'uso.

Riduzione del pepsinogeno: 15 mg. di pepsinogeno erano sciolti in 1 ml. di una soluzione di urea 8M il cui solvente era costituito da Tris-HCl 0,02 M e KCl 0,1 M pH 8,5 contenente anche 80 μ l di β -mercaptoetanololo. La soluzione era incubata a 37° per 4 ore [5].

Separazione del pepsinogeno ridotto dagli agenti denaturanti: Al termine dell'incubazione la miscela era filtrata attraverso una colonna di Sephadex G-25 (30 \times 1,5 cm.) ed eluita con puffer di fosfati 0,02 M e KCl 0,1 M pH 6,0 a +4°C. La concentrazione si calcolava sulla base dell'assorbimento a 280 m μ [15].

Riattivazione del pepsinogeno e dosaggio dell'attività peptica: Al termine dell'incubazione per la riattivazione enzimatica del pepsinogeno (vedi. fig. 1) 0,5 ml di HCl 0,1 N venivano aggiunti alla miscela enzimatica in modo tale da ottenere un valore finale di pH pari a 2,0. Le prove erano tenute a 25° per 10 min. allo scopo di ottenere la conversione totale del pepsinogeno a pepsina. Per il saggio dell'attività peptica si usava la procedura descritta da Anson che si basa sul grado di idrolisi dell'emoglobina determinata dalla quantità di materiale insolubile presente dopo precipitazione con acido tricloroacetico [16]. Ad ogni prova si aggiungevano 2 ml di una soluzione di emoglobina al 2,5% portata a pH 2 con HCl e si incubava a 37° per 10 min. Al termine si deproteinizzava con 2 ml di acido tricloroacetico (10%) e si centrifugava a 2000 r.p.m. per 5 min. Aliquote di sopranatante erano diluite con 4 ml di H₂O e si determinava l'assorbimento a 280 m μ . Il percento di attività veniva determinato dal raffronto con una curva standard ottenuta con pepsinogeno nativo.

RISULTATI E DISCUSSIONE.

Precedenti ricerche hanno dimostrato che il pepsinogeno ridotto, contenente 6 gruppi sulfidrilici per mole ed inattivo, spontaneamente riacquista all'incirca il 52% dell'attività iniziale in 20 ore [5]. Il processo di riattiva-

zione delle proteine ridotte consiste di due tappe successive [10]: la prima è costituita da un'ossidazione a caso dei residui di cisteina a cistina operata da diversi accettori di idrogeno con formazione di numerosi isomeri inattivi della stessa proteina. La seconda parte del processo è rappresentata dalla scomparsa dei ponti S-S incorretti e la trasformazioni di essi in quelli propri della proteina nativa.

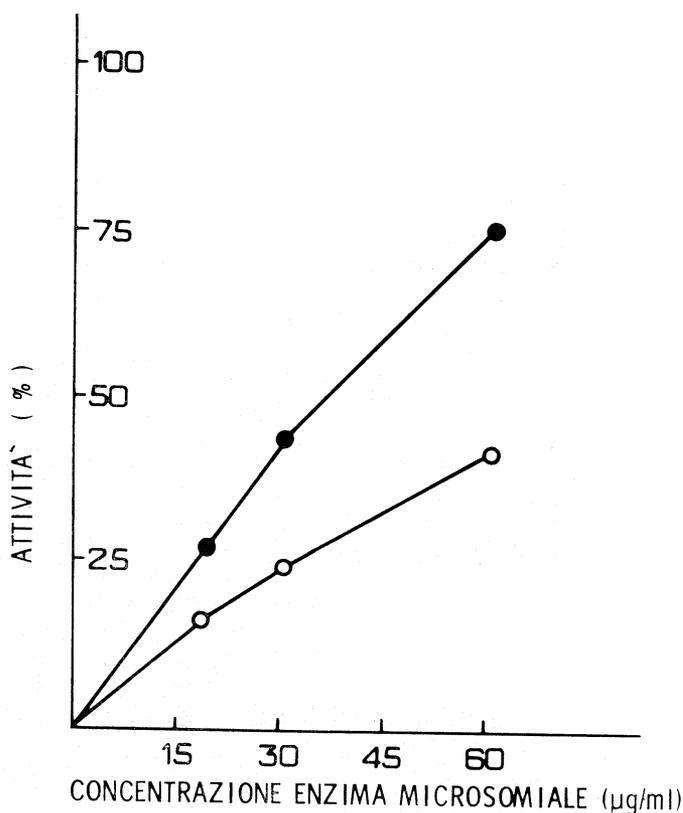


Fig. 1. - Riattivazione a 37° del pepsinogeno ridotto in presenza dell'enzima microsomiale. ○—○ 10 min.; ●—● 20 min.

La miscela d'incubazione era così composta: Tris-HCl 1×10^{-1} M, pH 7,8 EDTA 1×10^{-3} M, acido deidroascorbico 5×10^{-4} M, pepsinogeno ridotto 20 µg, enzima microsomiale come riportato in fig. 1.

Nella fig. 1 sono riportati i risultati riguardanti la riattivazione della forma ridotta del pepsinogeno catalizzata dall'enzima microsomiale. Si osserva che dopo 10 min. si ha già una riattivazione del 45% che arriva al 75% dopo 20 min.

La riattivazione della forma ridotta del pepsinogeno da parte dell'enzima microsomiale rappresenta un'ulteriore conferma della generalità d'azione di questo enzima.

La localizzazione dell'enzima nella frazione microsomiale di diversi tessuti ed il suo largo spettro d'azione suggeriscono che *in vivo* esso giuochi

un ruolo importante nella tappa finale della biosintesi delle proteine contenenti residui di cistina (cioè nella conversione della catena polipeptidica lineare, appena sintetizzata, nella proteina nativa avente una complessa struttura terziaria) determinando la corretta formazione dei ponti disolfuro.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. B. ANFENSEN, « Brookhaven Symposia in Biol. », 15, 194 (1962).
- [2] M. SELA, F. H. WHITE e C. B. ANFENSEN, « Science », 125, 691 (1957).
- [3] C. J. EPSTEIN, R. F. GOLDBERGER, D. M. YOUNG e C. B. ANFENSEN, « Arch. Biochem. Biophys. », Suppl. 1, 223 (1962).
- [4] K. IMAI, T. TAKAGI e R. ISEMURA, « J. Biochem. », 53, 1 (1963).
- [5] R. F. STEINER, V. FRATTALI e H. EDELHOCH, « J. Biol. Chem. », 240, 128 (1965).
- [6] F. A. ANDERER e S. HORNLE, « J. Biol. Chem. », 241, 1568 (1966).
- [7] R. F. GOLDBERGER, C. J. EPSTEIN e C. B. ANFENSEN, « J. Biol. Chem. », 238, 628 (1963).
- [8] R. F. GOLDBERGER, C. J. EPSTEIN e C. B. ANFENSEN, « J. Biol. Chem. », 239, 1406 (1964).
- [9] P. VENETIANER e F. B. STRAUB, « Acta Physiol. Hung. », 24, 41 (1963).
- [10] D. GIVOL, R. F. GOLDBERGER e C. B. ANFENSEN, « J. Biol. Chem. », 239, PC 3114, (1964).
- [11] F. DE LORENZO, R. F. GOLDBERGER, E. STEERS, D. GIVOL e C. B. ANFENSEN, « J. Biol. Chem. », 241, 1562 (1962).
- [12] R. F. STEINER, F. DE LORENZO e C. B. ANFENSEN, « J. Biol. Chem. », 240, 4648 (1965).
- [13] D. GIVOL, F. DE LORENZO, R. F. GOLDBERGER e C. B. ANFENSEN, « Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. », 53, 676 (1965).
- [14] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR e R. J. RANDALL, « J. Biol. Chem. », 193, 265 (1951).
- [15] V. FRATTALI, R. F. STEINER e H. EDELHOCH, « J. Biol. Chem. », 240, 112 (1965).
- [16] M. ANSON, in J. H. NORTHROP, M. KUNITZ e R. M. HERRIOT (Editors), *Crystalline enzymes*, Ed. 2, Columbia University Press, New York, 205 (1948).