

Lisosomas de células FL 3. Distribución de enzimas marcadoras de células FL por centrifugación diferencial

E. RUBIO, P. LÓPEZ SAURA Y L. CARDELLÁ

*Lab. de Bioquímica, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Ciudad de La Habana, Cuba*

Recibido: 3 de marzo de 1975

Recibido: 7 de febrero de 1977

ABSTRACT. The distribution of several "marker" enzymes from subcellular particles of FL cells was studied by differential centrifugation. The following fractions were obtained: nuclear, heavy and light mitochondrial, microsomal and the final supernatant, which were used for chemical and enzymatic assays. The distribution patterns for each of the markers used are presented. DNA, Cytochrome: c: oxidase and acid hydrolases showed the most activity respectively in the nuclear, heavy and light mitochondrial fractions. Acid phosphatase showed a higher microsomal activity than the rest of the acid hydrolases. NADH: Cytochrome: c: reductase in the heavy and light mitochondrial and microsomal fractions. Catalase was mostly concentrated in the light mitochondrial and microsomal fractions. Alkaline phosphodiesterase, 5' nucleotidase and NADPH: Cytochrome: c: reductase in the microsomal fraction.

RESUMEN. Se estudió la distribución de enzimas marcadoras de partículas subcelulares de células FL por centrifugación diferencial. Se obtuvieron las siguientes fracciones: nuclear, mitocondrial ligera y pesada, microsomal y soluble, a las cuales se les hicieron las determinaciones químicas y enzimáticas correspondientes. Se presentan patrones de distribución para cada uno de los marcadores utilizados. El ADN, la Citocromo: c: oxidasa y las hidrolasas ácidas en la fracción nuclear, mitocondrial pesada y mitocondrial ligera respectivamente. La fosfatasa ácida mostró una actividad microsomal mayor que el resto de las hidrolasas ácidas. La NADH: Citocromo: c: reductasa en las fracciones mitocondriales y microsomal. La Catalasa se concentró predominantemente en las fracciones mitocondrial ligera y microsomal. La Fosfodiesterasa alcalina, la 5' nucleotidasa y la NADPH: Citocromo: c: reductasa en la fracción microsomal.

INTRODUCCION

El fraccionamiento por centrifugación diferencial se ha realizado en hígado de rata (*Appelman y cols.*, 1955; *de Duve y cols.*, 1955), en riñón de rata (*Shibko y Tappel*, 1965), en bazo de rata (*Bowers y de Duve*, 1967) y en otros tejidos. En distintas células de cultivo (*Gordis y Nitowsky*, 1965; *Flanagan*, 1966; *López Saura*, 1973).

Al ser un método analítico nos posibilita estudiar simultáneamente varios organelos y obtener la información necesaria para seleccionar las condiciones más precisas de separación.

Como primera etapa de una serie de trabajos cuyo objetivo en la purificación de los lisosomas de células FL de amnios humano, (*Fogh y Lund*, 1957) estas fueron estudiadas por la metodología del fraccionamiento celular, con el propósito de caracterizar dichas partículas subcelulares. En estas células (*Cardellá y cols.*, 1971), se encontró que el esquema de distribución mostraba algunas diferencias con respecto al de hígado de rata (*de Duve y cols.*, 1955). En el presente trabajo se han incluido otros marcadores, lo que nos permitirá deducir conclusiones más precisas sobre la distribución de las partículas subcelulares en el esquema de fraccionamiento estudiado y la composición de cada una de estas fracciones.

MATERIALES Y METODOS

Homogeneización.

La suspensión, de células enteras, fue colocada en un homogeneizador de vidrio (*Dounce y cols.*, 1955) y se procedió a la ruptura de las mismas. Este proceso se combinó con la obtención de la fracción nuclear, (ver más adelante) adaptándose el procedimiento descrito por de Duve (*de Duve y cols.*, 1955) al uso del Dounce, dando seis, dos y un golpe con el pistón B, en la homogeneización inicial y en cada uno de los dos lavados respectivamente.

El control se efectuó bajo el microscopio de contraste de fase tratando de romper la mayor cantidad de células y la menor cantidad de núcleos y partículas citoplasmáticas, (aproximadamente el 90% de las células rotas).

Determinaciones Químicas y Enzimáticas.

El ácido desoxirribonucleico (ADN) se determinó fluorimétricamente siguiendo a Kissane y Robins, (1958).

La Citocromo c:oxidasa (1.9.3.1) se midió usando la técnica descrita por Cooperstein y Lazarow (1951), modificada por Appelmans y cols., (1955) y Bowers y cols., (1967), pero pre-incubando 0.1 ml de enzima con 0.1 ml de digitonina al 2% antes de añadir la mezcla sustrato.

La NADH:Citocromo c:reductasa (1.6.2.1) y la NADPH:Citocromo c:reductasa (1.6.2.3) se determinaron siguiendo las técnicas descritas por de Duve y cols., (1955).

La catalasa (1.11.1.6) se midió utilizando el método de Chantrence, (1955), modificado por Baudhuin y cols., (1964), aunque reduciendo el volumen de incubación a 2.2 ml.

Las técnicas de Fosfatasa ácida, N-acetil- β -glucosaminidasa, β -galactosidasa, Catepsina D, Fosfodiesterasa alcalina, 5'nucleotidasa, proteínas y fósforo utilizadas están descritas en un trabajo anterior (Cardellá y cols., 1977).

Las unidades enzimáticas se refieren a micromoles de sustrato transformado o de producto formado, por minuto, en las condiciones de incubación de cada enzima. Esto es válido para todas las enzimas estudiadas excepto Citocromo c:oxidasa, Catalasa y Catepsina D, cuyas unidades están definidas, en cada caso, en las técnicas correspondientes.

Fraccionamiento por Centrifugación Diferencial.

Se siguió fundamentalmente el esquema descrito por de Duve y cols., (1955) para hígado de rata (Tabla I). Todo el procedimiento se llevó a cabo entre 0°C y 4°C. Para todos los lavados y resuspensiones se utilizó una solución de sacarosa 0.25 M, imidazol 3mM pH 7.4 a 4°C. Todas las fracciones se lavaron dos veces excepto la fracción microsomal que fue lavada una sola vez. En cada una de las fracciones se mezclaron el sobrenadante de la primera centrifugación y los sobrenadantes de los lavados.

El homogeneizado se centrifugó a $5\,300\text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ en el rotor de ángulo libre de una centrifuga MSE Super Minor. El sedimento, que consistió fundamentalmente en núcleos y células enteras, se resuspendió y rehomo-geneizó —descrito en homogeneización—, centrifugándolo a las mismas condiciones anteriores. Este procedimiento se repitió una vez más. El sedimento final constituyó la fracción nuclear (N) y la mezcla de los tres sobrenadantes, el extracto citoplasmático (E).

El extracto citoplasmático se centrifugó en el rotor No. 64181 de una centrifuga MSE High Speed 18, obteniéndose las fracciones mitocondrial pesada (M) y ligera (L) a $29\,500\text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ y $222\,000\text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$, respectivamente. La fracción microsomal (P) se obtuvo a $3.0 \times 10^6\text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ en el rotor 8×11 de una centrifuga Janeski modelo VAC 601. Se adoptó el método de cálculo descrito por de Duve y cols., (1955).

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó peróxido de hidrógeno (Analar) de la British Drug House Chemical Ltd.; digitonina y p-nitrofenil- β -D-galactopiranosido de la Koch Light Lab. Ltd.; nicotinamida-adenina-dinucleótido reducido (NADH), nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato reducido (NADPH) y citocromo c (tipo III) de la Sigma Chem. Comp. El resto de los materiales están descritos en un trabajo anterior (Cardellá y cols., 1977), al igual que el cultivo de las células y su obtención.

RESULTADOS

Como puede observarse en la Tabla II y en la Fig. 1 se obtuvieron varios patrones de distribución.

ADN: su localización predominante fue en la fracción nuclear, siendo esto expresión de la calidad obtenida durante el proceso de homogeneización.

Citocromo c:oxidasa: esta enzima mostró una distribución principalmente situada entre las fracciones M y L, estando su componente mayor

* Preferimos expresar las centrifugaciones en $\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ y no en "x" g durante "y" min, ya que de esa forma expresamos el campo centrífugo en forma integral incluyendo los tiempos de aceleración y desaceleración del rotor (de Duve y cols., 1955).

en la fracción mitocondrial pesada. Aunque tenemos una recuperación mala su distribución se corresponde con la reportada en otros tejidos.

TABLA I

Condiciones para el fraccionamiento por centrifugación diferencial

Fracción	s_m en S	Centrífuga	W ($\text{rad}^2 \text{ seg}^{-1}$)	Gav (g. min)
N	310 000	MSE (de mesa) Rotor: ángulo libre	2.83×10^7	5 300
M	17 300	MSE High Speed 18 Rotor: 8×50 de ángulo fijo	2.02×10^8	29 500
L	2 300	MSE High Speed 18 Rotor: 8×50 de ángulo fijo	1.52×10^9	222 000
P	190	JANETZKI VAC 601 Rotor: 8×11 de ángulo fijo	3.30×10^{10}	3 000 000

s = Coeficiente de sedimentación

t = tiempo

S = Unidad Svedverg

ω = velocidad angular

$$W = \int_0^t \omega^2 dt$$

Rav: es la distancia desde el punto de la centrífuga al punto medio de la columna de líquido durante la centrifugación.

$$Gav = \frac{W \text{ Rav}}{981 \times 60}$$

g: (gravidades) = 981 cm seg^{-2}

Hidrolasas ácidas: todas se concentran fundamentalmente en las fracciones M y L. La Fosfatasa ácida también presenta un hombro en la fracción microsomal (P).

TABLA II

Distribuciones intracelulares de enzimas y constituyentes químicos por centrifugación diferencial

CONSTITUYENTE	n	E + N Total	FRACCIONES					Recu- peración %
			N	M	L	P	S	
Proteínas	5	10.3(2.2)	17.5(4.9)	7.2(2.7)	8.2(1.2)	15.4(0.9)	51.7(5.5)	91.2(5.1)
ADN	4	662(226)	72.5(13.6)	9.7(7.1)	3.5(3.0)	7.1(6.0)	7.2(3.6)	99.4(1.4)
Citocromo c: Oxidasa	5	3.4(1.0)	12.1(9.4)	41.6(16.9)	42.2(16.5)	4.2(3.8)	0	90.3(59.8)
N-acetil- β -Glucosaminidasa	5	19.2(5.5)	9.9(7.4)	30.6(13.2)	42.7(4.1)	11.3(6.7)	5.4(1.8)	94.9(12.3)
Catepsina D	5	20.6(14.1)	9.9(5.7)	29.1(12.6)	38.2(7.2)	13.8(4.4)	9.1(2.3)	103.4(30.2)
β -Galactosidasa	5	3.0(1.2)	10.4(6.7)	26.7(12.8)	43.6(5.3)	12.0(7.8)	7.3(2.1)	105.2(28.6)
Fosfatasa Ácida	5	39.8(8.3)	12.3(9.4)	20.5(10.5)	32.8(1.7)	25.7(7.5)	8.9(2.6)	86.4(6.9)
NADH: Citocromo c: reduc- tasa	5	148(59)	14.6(7.6)	21.5(7.2)	27.3(3.8)	26.8(6.4)	9.8(7.3)	82.5(28.4)
Fosfodiesterasa alcalina	5	3.4(0.5)	8.3(3.2)	7.5(1.4)	14.8(4.5)	40.4(6.0)	29.1(10.2)	113.4(16.4)
5'Nucleolida	5	711(283)	8.8(4.1)	8.5(4.8)	19.4(2.0)	53.7(5.7)	9.6(5.5)	95.5(13.2)
Catalasa	4	5.7(0.6)	10.3(9.4)	2.2(1.9)	18.0(12.7)	60.0(12.5)	9.6(11.0)	69.2(14.5)
NADPH: Citocromo c: re- ductasa	1	4.8	9.7	5.8	8.5	43.8	32.2	131.9

E + N : Representan en todos los casos mU/mg. de proteínas excepto para las proteínas que es mg/Roux y el ADN que es μ g/Roux. Las cifras entre () son las desviaciones standards. Las otras cifras expresan porcentos. Las recuperaciones están calculadas con respecto a E + N y las distribuciones porcentuales entre las fracciones, con respecto a la suma de éstas. Las fracciones son: nuclear (N); mitocondrial pesada (M); mitocondrial ligera (L); microsomal (P); soluble (S); n: número de determinaciones.

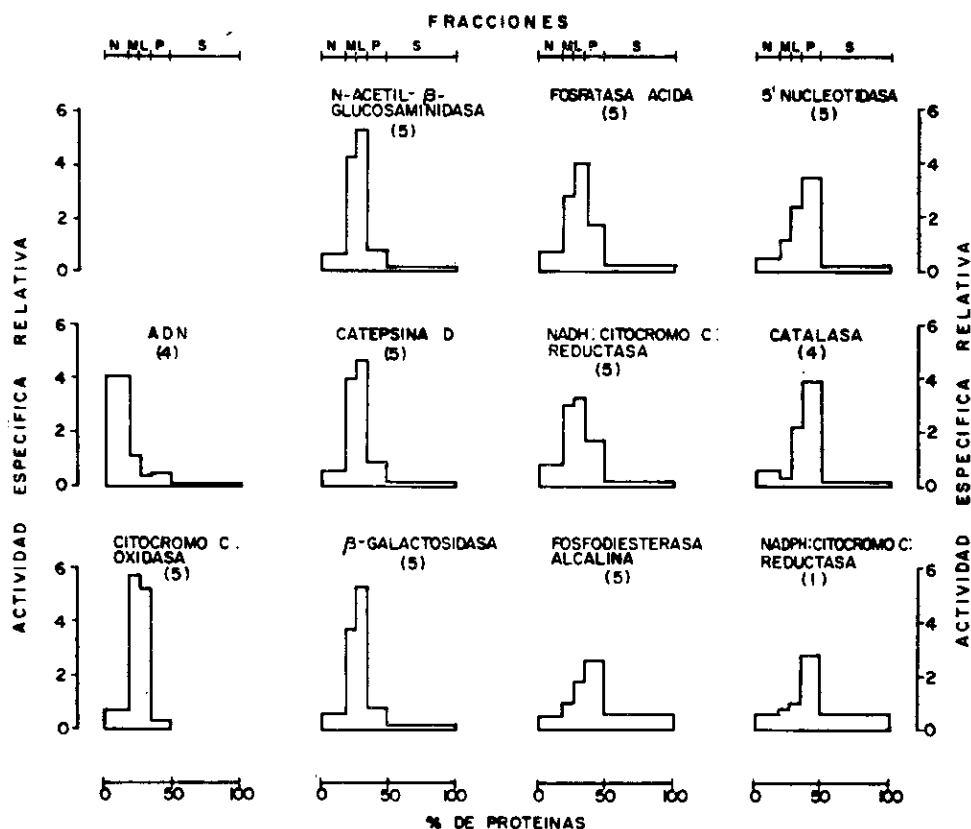


Fig. 1. Fraccionamiento por Centrifugación Diferencial. En ordenadas: la actividad específica relativa promedio (por ciento de la cantidad total del constituyente dividido por el porcentaje del total de proteínas). En abscisas: las cinco fracciones, nuclear (N), mitocondrial pesada (M), mitocondrial ligera (L), microsomal (P) y sobrenadante final (S) en el orden en que se obtuvieron y según su contenido en proteínas. Los números entre paréntesis indican el número de determinaciones.

NADPH:Citocromo c:reductasa: presentó un pico en la fracción P, lo que se corresponde con lo reportado en otros tejidos (*Phillips y Langdon, 1962; López Saura, 1973*). La Fosfodiesterasa alcalina y la 5'nucleotidasa, aunque presentan también una distribución microsomal, se diferencian de ésta en que mostraron un componente mayor en las fracciones M y L.

La NADH:Citocromo c:reductasa se localizó principalmente entre las fracciones M, L y P. En cuanto a la Catalasa el tener una distribución entre las fracciones L y P la hace diferente al resto de los marcadores.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En el caso de la ADN se obtuvo el patrón de distribución esperado. El porcentaje encontrado en la fracción M es interpretado como un cierto grado de contaminación nuclear y el de la fracción S como núcleos rotos durante la homogeneización.

El que la Citocromo c:oxidasa presentara una baja actividad pudiera deberse a que como las células FL son de cultivo, las mismas tienen un metabolismo prácticamente anaerobio. La baja recuperación obtenida podría explicarse de dos formas: una sería que la enzima durante el fraccionamiento sufra inactivación y la otra también posible, sería la de una mala activación de la misma en las fracciones por el detergente usado. A pesar de esto como la distribución obtenida se corresponde con la reportada en otros tejidos, existiendo más de un 70% en las fracciones M y L y concentrándose más en M, puede servirnos como marcadora de las mitocondrias.

El presentar las hidrolasas ácidas un componente importante en la fracción M sugiere que los lisosomas de estas células sedimentan a campos gravitacionales menores. En cuanto a la Fosfatasa ácida el presentar un hombro en la fracción microsomal sugiere una posible doble localización intracelular, hecho que no ocurre en hígado de rata (*de Duve y cols., 1955; Sellinger y cols., 1960*), ni en hepatoma de rata en cultivo de tejido (*López Saura, 1973*).

La distribución compleja presentada por la NADH:Citocromo c:reductasa pudiera deberse a que tuviese más de una localización intracelular, mitocondrial y microsomal, al igual que ocurre en hígado (*de Duve y cols., 1955; Ernster y cols., 1962; Sottocasa y cols., 1967; Amar-Costesec y cols., 1974*), en hepatoma de rata en cultivo de tejidos (*López Saura, 1973*) y en fibroblastos de rata en cultivo de tejidos (*Tulkens, 1970*). Se requieren estudios ulteriores para dilucidar el comportamiento de esta enzima.

La diferencia de distribución entre la NADPH:Citocromo c:reductasa y la Fosfodiesterasa alcalina y la 5'nucleotidasa sugiere que la primera es

componente de la membrana plasmática, lo cual se corresponde con los resultados obtenidos en hígado de rata (*Beaufay y cols., 1974; Amar-Costesec y cols., 1974*) donde forma parte del sistema redox microsomal y las otras lo serían del retículo endoplasmático al igual que ocurre en hígado (*Phillips y Landon, 1962; Wibo, 1970; Wibo y cols., 1971*).

Por último, el hecho de que la Catalasa sea particulada en un 90% nos inclina a pensar que estas partículas portadoras de la enzima pudieran corresponderse con los peroxisomas descritos en otros tejidos (*de Duve y Baudhuin, 1966; Muller y cols., 1968*).

REFERENCIAS

- AMAR-COSTESECA A., BEAUFAY H., WIBO M., THINÉS-SEMPoux D., FEYTMANS E., ROBBI M. AND BERTHET J. Analytical study of Microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. II.— Preparation and composition of the Microsomal Fraction. *J. Cell. Biol.* 61, 201, 1974.
- APPELMANS F., WATTIAUX R. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies 5. The association of acid Phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver." *Biochem. J.* 59, 438, 1955.
- BAUDHUIN P., BEAUFAY H., RAHMAN-LI Y., SELLINGER O. Z., WATTIAUX R., JACQUES P. AND DE DUVE C. "Tissue fractionation studies 17. Intracellular distribution of Monoamine Oxidase, Aspartate Aminotransferase, D-Aminoacid Oxidase and Catalase in rat liver tissue". *Biochem. J.* 92, 179, 1964.
- BEAUFAY H., AMAR-COSTESECA A., TRINÉS-SEMPoux F., WIBO M., ROBBI M. AND BERTHET J. Analytical study of Microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. III.— Subfractionation of the Microsomal Fraction by Isopycnic and Differential Centrifugation in Density Gradients. *J. Cell. Biol.* 61, 213, 1974.
- BOWERS W. E. AND DE DUVE C. "Lysosomes in Lymphoid Tissue. II.— Intracellular distribution of Acid Hydrolases". *J. Cell. Biol.* 32, 339, 1967.
- BOWERS W. E., FINKENSTAEDT J. T. AND DE DUVE C. Lysosomes in Lymphoid Tissue. I.— The measurement of Hydrolytic Activities in Whole Homogenates. *J. Cell. Biol.* 32, 325, 1967.
- CARDELLA L., LÓPEZ S. P. Y GONZÁLEZ MENCIO F. Centrifugación diferencial de células FL. *Revista CENIC*, 3, 69, 1971.
- CARDELLA L., RUBIO E. Y LÓPEZ SAURA P. Comportamiento cinético de seis hidrolasas ácidas de células FL. *Revista CENIC, Ciencias Biológicas*, 8, 85, 1977.
- CHANTRENNE H. "Effects d' un inhibiteur de la Catalase sur la formation induite de cet enzyme chez la Leuvre". *Biochem. Biophys. Acta.*, 16, 410, 1955.

- COOPERSTEIN S. J. AND LAZAROW A. A microspectrophotometric method for determination of Cytochrome Oxidase *J. Biol. Chem.*, 189, 665, 1951.
- DE DUVE C. AND BAUDHUIN P. Peroxisomes (Microbodies and related Particles). *Physiol. Rev.* 46, 323, 1966.
- DE DUVE F., PRESSMAN B. C., GIANETTO R., WATTIAUX R. AND APPELMANS F. Tissue fractionation studies 6. Intracellular Distribution Patterns of Enzymes in rat Liver Tissue. *Biochem. J.* 60, 604, 1955.
- DOUNCE A. L., WITTER R. F., MONTY K. J., PATE S. AND COTTONE M. A. A method for isolating intact Mitochondria and Nuclei from the same Homogenate, and the influence of Mitochondrial destruction on the properties of Cell Nuclei. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 1, 139, 1955.
- ERNSTER L. SIEKEVITS P. AND PALADE G. Enzyme-Structure Relationships. in the Endoplasmic Reticulum of Rat Liver. A Morphological and Biochemical. Study. *J. Cell. Biol.*, 15, 541, 1962.
- FLANNAGAN J. F., Hydrolitic enzymes in KB cells infected with poliovirus and herpes simplex virus. *J. Bact.*, 91, 789, 1966.
- FOGH J. AND LUND R. O., Continuous cultivation of epithelial cell strain (FL) from human amniotic membrane. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)* 94, 532, 1957.
- GORDIS Y. AND NITOWSKY H. M., Lysosomes in human cell cultures. *Expte. Cell. Research.*, 38, 536, 1965.
- KISSANE J. M. AND ROBBINS E., The Fluorimetric Measurement of Deoxyribonucleic acid in animal tissues with special reference to the Central Nervous System., *J. Biol. Chem.*, 233, 184, 1958.
- LÓPEZ SAURA P., Estudio bioquímico de los organelos subcelulares de Hepatoma de rata en cultivo de tejidos. Tesis de Maestría CENIC. La Habana. 1973.
- MULLER M., HOGG J. F. AND DE DUVE C. Distribution of Tricarboxylic Acid Cycle Enzymes and Glyoxalate Cycle Enzymes between Mitochondria and Peroxisomes in Tetrahymena Pyriformis. *J. Biol. Chem.*, 243, 5385, 1968.
- PHILLIPS A. H. AND LANGDON R. G. Hepatic Triphosphopyridine Nucleotide Cytochrome c Reductase: Isolation, Characterization and Kinetic Studies. *J. Biol. Chem.*, 237, 2652, 1962.
- SELLINGER O. Z. BEAUFAY H., JACQUES P., DOYEN A. AND DE DUVE C. Tissue fractionation studies 15. Intracellular Distribution and properties of β -N-Acetylglucosaminidase and β -galactosidase in Rat Liver. *Biochem. J.*, 74, 450, 1960.
- SHIBKO S. AND TAPPEL A. Rat-Kidney lysosomes: Isolation and properties. *Biochem. J.* 95, 731, 1965.
- SOTTOCASA G. L., KUYLENSTIERNA B., ERNSTER L. AND BERGSTRAND A. An Electrom Transport System associated with the outer membrane of Liver Mitochondria. *J. Cell. Biol.*, 32, 415, 1967.

- TULKENS P., Les lysosomes des Fibroblastes de rat en culture. Mémoire présenté au concours de Bourses de Voyages., Université Catholique de Louvain. 1970.
- WIBO M. Répartition des Ribosomes sur les membranes Microsomiales de Foie de Rat., *Arch. Intern. de Physiol. et Biochim.*, 8, 1019, 1970.
- WIBO M., AMAR-COSTESSEC A. BERTHET J. AND BEAUFAY H., Electron Microscope Examination of Subcellular Fractions., III. Quantitative Analysis of the Microsomal Fraction Isolated from Rat. Liver. *J. Cell. Biol.*, 51, 52, 1971