

Departamento de Investigación
Hospital Municipal de Infecciosos
Sección de Inmunoquímica
Barcelona

Proteolisis de proteínas homólogas y heterólogas por extractos de bazo de conejo

por

J. Gras

(Recibido para publicar el 25 de enero de 1966)

La función de los anticuerpos en sentido bioquímico no se conoce, a pesar de haberse señalado fenómenos de proteolisis consecutivos a la reacción antígeno anticuerpo «in vivo», como la intervención de dichos fenómenos en la liberación de mediadores farmacológicos (1), la naturaleza de proenzimas proteolíticas de los componentes del complemento que serían activados por la unión con el complejo antígeno anticuerpo (2) y la activación por este complejo de otras enzimas proteolíticas, con el paso de plasminógeno a plasmina (4, 11, 12). Tampoco tenemos datos suficientes acerca de la mayor o menor proteolisis intracelular de determinada proteína y su relación con la capacidad antigénica de la misma. Por ello creímos de interés estudiar la proteolisis por proteinasas intracelulares de proteínas homólogas y heterólogas, para comprobar si se observa o no alguna diferencia entre las mismas. En este trabajo presentamos los primeros resultados obtenidos del estudio de extractos acuosos de bazo, órgano inmunológicamente activo.

Material y métodos

Los bazos han sido obtenidos de conejos recién muertos, limpios de grasa, y lavados con solución salina mediante jeringa, para eliminar la mayor parte de la sangre. Pesados conjuntamente en lotes de un mínimo de 6 bazos y homogeneizados con un homogeneizador MSE con 2,5 veces su peso de agua destilada fría, sumergiendo el matraz del aparato en agua fría. El homogeneizado se mantiene 24 horas a la refrigeradora con unas gotas de toluol y después centrifugado a 3.000 rev/minuto para separar los residuos tisulares groseros. Esta pauta corresponde a la primera fase descrita por TALLAN y cols. (10) para la purificación de las catepsinas de bazo de buey. Este extracto crudo se diluía a la mitad en agua bidestilada. Para el estudio de la autoproteolisis se utilizaban estos extractos, con una concentración de proteína total de 6,7 — 10,2 gr °/100. Para el estudio de la proteolisis de proteínas homólogas y heterólogas se diluían aproximadamente al 1/20 en sol. salina, de manera

a obtener una concentración proteica de 0,7 gr $^{\circ}/_{100}$. Se ha estudiado la proteolisis de albúmina humana comercial obtenida por el método de COHN y globulinas gamma humana y de conejo, obtenidas en ambos casos por precipitación alcohólica o bien por nuestro método con hiposulfito sódico (3) y su pureza controlada por la electroforesis en agar, aceptándola superior a un 90 %. La concentración de estas proteínas substrato se situaba siempre a 15 gr $^{\circ}/_{100}$.

Como tampón se ha utilizado el de veronal-acetato sódico de MICHAELIS (9) si bien únicamente en las diluciones finales en el momento de la reacción, ya que hemos visto, dado el elevado contenido proteico en que trabajamos, que era mejor situar directamente los extractos y las soluciones proteicas utilizadas al pH deseado con HCL 0.1 — 0.01 N o NAOH 0.1 — 0.01 N; en todos los casos el pH final de la mezcla se ha controlado con potenciómetro (Radiometer, pH-Meter 22).

En experiencias preliminares comprobamos que la máxima hidrólisis se obtiene a las 16 horas de incubación a 37°, por lo que éste ha sido el tiempo utilizado en todas las determinaciones. En todos los casos, el valor cero se ha obtenido con una serie duplicada mantenida en congeladora desde el inicio.

El grado de hidrólisis se ha determinado en los sobrenadantes obtenidos por centrifugación del precipitado con ácido tricloracético al 5 % y a 45°, mediante lectura a 280 m μ ; los resultados se han expresado en DO \times 100/mg de proteína, en el caso de la autoproteolisis, y en DO \times 100, correspondiente a la mayor o menor proteolisis de 15 mgr de proteína substrato.

Resultados

La autoproteolisis de los extractos de bazo de conejo investigados en estas con-

diciones se extienden de pH 3 a 6, con un óptimo de actividad amplio, que abarca de pH 3,5 a 5; la proteolisis a pH 6,5 es muy pequeña y a pH 7 nula (fig. 1 correspondiente al promedio de 9 experiencias duplicadas).

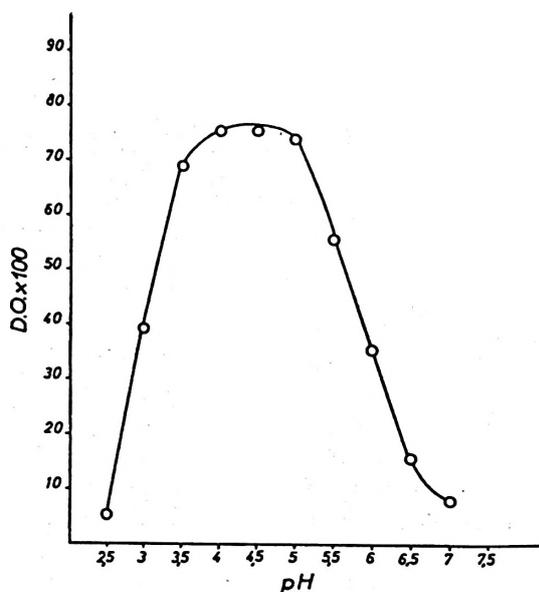


FIG. 1. Curva promedio de la autoproteolisis de extractos de bazo de conejo, correspondiente a 9 experiencias duplicadas.

El estudio de la proteolisis de la albúmina humana y de las globulinas gamma humana y de conejo se presenta en la figura 2, cada una de cuyas curvas representa el promedio de 6 experiencias duplicadas. En las tres se presenta un aumento brusco de la proteolisis a pH 2,5, con un óptimo muy delimitado de pH 3 - 3,5, que desciende también bastante rápidamente llegando a valores bajos a pH 4,5 y siendo casi nula a pH 5. No se observan diferencias valorables entre la globulina gamma humana y la de conejo y una mayor intensidad en la proteolisis de la albúmina humana en relación a las otras dos. Tanto en el caso de la globulina gamma humana como de

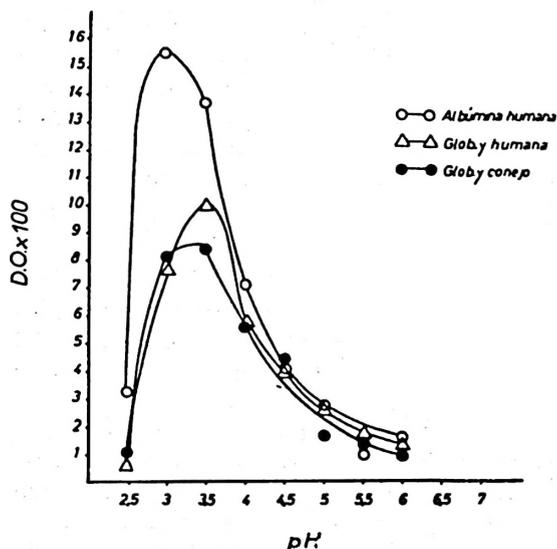


FIG. 2. Curvas promedio de la proteólisis por extractos de bazo de conejo, de globulina gamma de conejo (●), globulina gamma humana (Δ) y albúmina humana (O). Cada curva corresponde a 6 experiencias duplicadas. A la diferencia entre la proteólisis de la globulina gamma le corresponde una p entre 0,20-0,30, mientras que la diferencia entre éstas y la de la albúmina tiene una $p < 0,001$.

conejo la diferencia de su valor promedio máximo con el de la albúmina tiene una $P < 0,001$, o sea que es altamente significativa, mientras que la diferencia entre los valores promedio a pH 3,5 de las dos globulinas gamma tiene una P de 0,20-0,30, o sea que no es significativa.

Discusión

La curva de autoproteólisis cursa con una zona de pH óptimo muy ancha, ya que va de pH 3,5 a 5. En estas condiciones de estudio no se ha observado autoproteólisis de los extractos de bazo por encima de pH 6,5, o sea, que ésta sería producida por las proteinasas ácidas, o catepsinas, de las cuales se han descrito varias, por lo que cabe suponer que más de una de ellas actuaría en la autoproteólisis,

dando lugar a esta amplia zona de actividad óptima. Por el contrario, en el caso de la albúmina humana, globulina gamma de conejo y globulina humana, el óptimo de actividad está delimitado a pH 3-3,5, correspondiendo a los resultados obtenidos por LAPRESLE (7) para albúmina humana en los extractos de bazo de conejo. Esto puede hacer pensar que en su proteólisis intervendría una única catepsina o un número limitado de las mismas.

Como hemos señalado, no se observa diferencia valorable entre la proteólisis de las globulinas gamma humana y de conejo, lo que es un dato en favor de que no existiría ninguna diferencia entre la proteólisis de proteínas homólogas y heterólogas, por lo menos en lo que se refiere a la globulina gamma. El perfil de la curva de la proteólisis de albúmina no presenta diferencias en relación a las de la globulina gamma, aparte de su mayor intensidad, lo que parece debe interpretarse como consecuencia de una mayor intensidad de proteólisis de la albúmina en relación a la globulina gamma ($P < 0,001$). Esta observación es paralela a la de McMASTER y KRUSE (8) quienes comprobaron, con albúmina y globulina gamma bovina diazotadas, que la primera persistía intracelularmente mucho menos que la segunda, y también a la conocida diferencia de catabolización «in vivo» de ambas proteínas, que corresponde a un tiempo de vida mitad inferior para la albúmina que para la globulina gamma. Estas observaciones deben ampliarse con el examen, además de la albúmina humana, de albúmina de otras especies, como la seroalbúmina bovina y la de conejo, para poder establecer con mayor seguridad este hecho de la no diferencia de proteólisis entre proteínas homólogas y heterólogas y la diferencia entre albúmina y globulina gamma, conclusión de gran interés.

Los datos obtenidos en este trabajo

nos aportan una indicación en el sentido de que el complejo antígeno anticuerpo no jugaría ningún papel en la proteólisis intracelular, ya que por lo menos para las proteínas estudiadas y en estas condiciones, transcurre a un pH óptimo de 3,5 a cuyo pH los complejos antígeno anticuerpo no se forman o si se han formado se disocian (5,6).

Resumen

En este trabajo se estudia la curva de autoproteólisis de extractos de bazo de conejo y la proteólisis, por dichos extractos, de proteínas homólogas y heterólogas. La curva de autoproteólisis va de pH 3,5 a 5,0, lo que hace pensar que en la misma intervienen varias proteinasas ácidas. En el caso de la proteólisis de la albúmina humana, globulinas gamma humana y globulina gamma de conejo, presentan un óptimo muy delimitado a pH 3,0 - 3,5. No se observan diferencias significativas entre la proteólisis de la globulina gamma humana (prot. heteróloga) y la globulina gamma de conejo (prot. homóloga). La proteólisis de la albúmina humana es más intensa, lo cual concuerda con los datos de la literatura acerca de una más rápida desaparición de la albúmina intracelular en relación a la globulina gamma, inyectadas en animal entero. Se discute el valor de estos datos en relación al papel que pueden jugar los anticuerpos en la proteólisis intracelular y el valor inmunológico de la observación, que debe ampliarse, de que no parecen existir diferencias en la proteólisis de proteínas homólogas y heterólogas.

Summary

Proteolysis of homologous and heterologous proteins through rabbit spleen extracts

The function of antibodies in a biochemical way is not known, though phenomena of proteolysis consecutive to antigen antibody reaction in vivo have pointed out, like the intervention of these

phenomena in the release of pharmacologic mediators (1), the possible proteolytic proenzyme nature of complement components, which appear to be activated by the union with the antigen antibody complex (2), and the activation by this complex of other proteolytic enzymes (4, 11, 12). We don't have enough data about the intensity of intracellular proteolysis of a given protein and its relation with its antigenic capacity. So, we were interested in the study of the proteolysis by intracellular proteinases of homologous and heterologous proteins, in order to verify, if there is a difference or not among them. In this paper we present the first results obtained with aqueous rabbit spleen extracts, in connection with its autoproteolytic activity and its proteolytic activity in front of human and rabbit gamma globulin, and human albumin.

The autoproteolysis of rabbit spleen extracts investigated is active from pH 3 to 6, with a wide optimum of activity (pH 3,5 to 5). Autoproteolysis at pH 6,5 is very small and inappreciable at pH 7 or higher. This curve of autoproteolytic activity is shown in fig. 1, which corresponds to the average of 9 duplicate experiments. As we have not seen autoproteolytic activity beyond pH 7, this means that it is produced by the acid proteinases or cathepsins, and probably contributing various of them, in account of the wide zone of activity.

In fig. 2, we present the mean curves, corresponding each one to 6 duplicate experiments of the proteolysis by aqueous rabbit spleen extracts of human albumin and human and rabbit gamma globulins. In all three, a sharp increase of proteolysis at pH 2,5 is observed, with a well delimited optimum of activity at pH 3,0-3,5, which also decreases rapidly, reaching low values at pH 5. No significant difference exists between human and gamma globulins (p 0,20-0,30).

That fact favours the idea that no difference exists between the proteolysis homologous and heterologous protein, at least for gamma globulins. The curve of albumin proteolysis presents the same shape with a significative difference ($p < 0,001$) in its intensity; this may be interpreted as a consequence of a greater or more rapid proteolysis for albumin than for gamma globulin. This observation should be in line with that of McMASTER and KRUSE (8), which verified that azo-albumin persists intracellularly much less than azo-gamma globulin, and also with the known difference of catabolization in vivo of both proteins, which corresponds to a $T^{1/2}$ lower for albumin than for gamma globulina; nevertheless this observation must be extended to other albumins, as for example rabbit and bovine albumins in front of the rabbit spleen extract.

The data in this paper give us also an indication in the sense that the antigen antibody complex probably plays no role in intracellular proteolysis, at least for the proteins investigated and in the conditions of the experiments, in which it take place at an optimal pH of

3,5; at this pH, antigen antibody complexes do not form and if they were previously constituted, they dissociate (5, 6).

Bibliografía

- (1) AUSTEN, K. F. and BROCKLEHURST, W. E. : *J. Exp. Med.*, **113**, 521, 1961.
- (2) CUSHMAN, W. F., BECKER, E. L. and WIRTZ, G. : *J. Immunol.*, **79**, 80, 1957.
- (3) GRAS, J. y SALAZAR, M. : *Plasma*, **2**, 1, 1953.
- (4) HAYASHI, A., TOKUDA, A. and UDAKA, K. : *J. Exp. Med.*, **112**, 237, 1960.
- (5) HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F. F. : *J. Exp. Med.*, **62**, 467, 1938.
- (6) KLEINSCHMIDT, W. J. and BOYER, P. D. : *J. Immunol.*, **69**, 247, 1952.
- (7) LAPRESLE, C. : *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 654, 1955.
- (8) McMASTER, P. D. and KRUSE, H. : *J. Exp. Med.*, **94**, 323, 1951.
- (9) MICHAELIS, L. : *J. Biol. Chem.*, **87**, 33, 1930.
- (10) TALLAN, H. H., JONES, M. E. and FRUTON, J. S. : *J. Biol. Chem.*, **194**, 793, 1952.
- (11) UNGAR, G. and DAMGAARD, E. : *J. Exp. Med.*, **93**, 89, 1951.
- (12) UNGAR, G. and MIST, S. H. : *J. Exp. Med.*, **90**, 39, 1949.

