

Departamento de Investigación. Sección Inmunológica
Hospital Municipal de Infecciosos
Barcelona

Curvas de actividad autoproteolítica en distintos órganos de conejo

por

M. A. Fonalledas * y J. Gras

(Recibido para publicar el 8 de marzo de 1967)

Dentro del grupo de las proteinasas intracelulares, son ampliamente conocidas las que actúan a pH ácido o catepsinas. En estos últimos años van apareciendo trabajos sobre proteinasas intracelulares con actividad en la zona neutra. Así, ADAMS y SMITH (1) encontraron en la hipófisis de carnero dos familias de proteinasas a pH óptimo 3,8 y 8,2. En eritrocitos humanos, MORRISON y NEURATH (10) hallaron actividad proteinásica a pH óptimo 3,2 y 7,3. DANNENBERG y SMITH (2) en pulmón de rata y buey encontraron también proteinasas con pH óptimo a 3,8 y 8,4. WALEY y HEYNINGEN (14) encontraron actividad proteinásica neutra a pH óptimo 7,5 en la lente del ojo de ternero. También MARKS y LAJTHA (9) identificaron proteinasas a pH óptimo 3,8 y 7,6, en cerebro de rata. En 1966, HASCHEN y KRUG (4) hallaron variaciones cuantitativas de las actividades proteinásicas a pH 3,5 y 7,5 entre leucocitos normales y leucémicos en el hombre.

El estudio de las proteinasas intracelulares puede tener gran interés en la

comprensión de los mecanismos inmunológicos. En nuestro laboratorio se está investigando la proteólisis de proteínas homólogas y heterólogas por estas proteinasas, algunos de cuyos primeros resultados han sido ya publicados (3).

Dentro de esta temática, nos ha parecido interesante estudiar la proteólisis de los propios extractos de los órganos, con el objeto de investigar si ésta se produce únicamente por la acción de las proteinasas ácidas o también por las neutras y, además, su distinta intensidad dentro de los diversos órganos. Los fenómenos de liberación o activación de proteinasas, adquieren en la actualidad interés, no tan sólo en inmunología, sino también en múltiples procesos de fisiopatología.

Material y métodos

Se emplearon órganos de conejo, recién muerto: hígado, riñón, bazo, ce-

* Realizó este trabajo con la ayuda de una beca de Iniciación a la Investigación, concedida por la Universidad de Barcelona.

rebro y músculo, los cuales, limpios de grasa, eran lavados con solución salina fisiológica, para eliminar la sangre que pudieran contener. Se pesaban y homogenizaban con homogenizador MSE, con 2,5 veces su peso de agua destilada fría. Se mantenía el homogenizado 24 horas en refrigeradora con unas gotas de tolueno y se centrifugaba a 3.000 revoluciones por minuto para separar los residuos tisulares groseros. Esta metódica y la de valoración de los datos de la proteólisis es la misma expuesta en el trabajo citado (3) y los resultados son expresados en D.O./100 mg de proteína.

Los extractos se utilizaban a concentraciones medias de proteínas totales de 21,0 g % (hígado); 9,5 g % (bazo); 20,5 g % (riñón); 20,5 g % (músculo); y 9,2 g % (cerebro). Determinación por el método del biuret.

Resultados

En una primera experiencia se estudió la curva de autoproteólisis de bazo entre pH 1 y 10. Se encontraron dos máximos, uno alrededor de 1, y otro de 4. Se inactivó el extracto por calor,

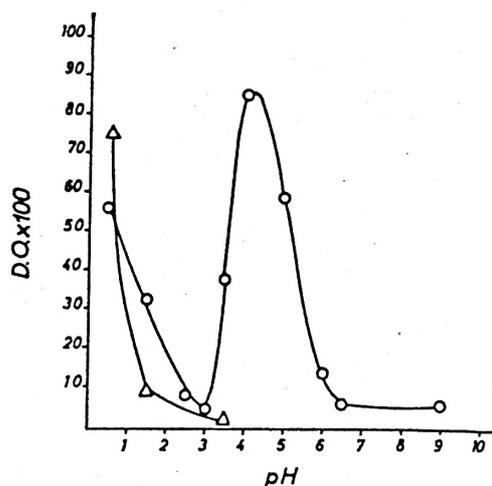


FIG. 1. Curvas de actividad autoproteolítica en extractos de bazo de conejo activos (O) e inactivados por el calor (Δ).

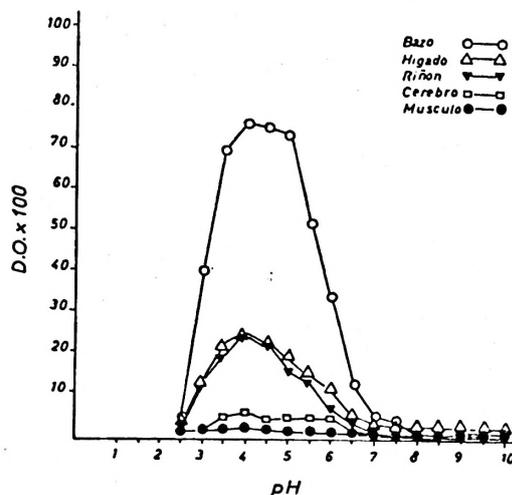


FIG. 2. Curvas de actividad autoproteolítica en extractos de bazo (O), hígado (Δ), riñón (▼), cerebro (□) y músculo de conejo (●). Cada una de ellas corresponde al promedio de seis experiencias duplicadas.

permaneciendo el máximo hallado alrededor de 1, lo cual demostró que en esta zona, tan fuertemente ácida no se producía autoproteólisis enzimática, sino proteólisis ácida (fig. 1). Debido a esta comprobación se prosiguieron los estudios prescindiendo de pH inferiores a 2,5.

Se estudiaron curvas de actividad autoproteolítica en bazo, hígado, riñón, cerebro y músculo (fig. 2, correspondientes cada una al promedio de 6 experiencias duplicadas). En estas curvas se aprecia un máximo de actividad alrededor de 4, aunque la curva correspondiente al cerebro, dentro de su limitada actividad, abarca una ancha zona; en ninguna de ellas aparece autoproteólisis significativa en la zona neutra. La intensidad autoproteolítica máxima corresponde al bazo, con gran diferencia sobre los restantes órganos. Le siguen al bazo, el hígado y riñón, con actividades parecidas; menor intensidad tiene el cerebro, que presenta una curva mucho más aplanada que los anteriores y, final-

mente, la curva de menor actividad corresponde al músculo, con actividad ínfima.

Discusión

Destaca de estos resultados, la existencia de proteólisis ácida, no enzimática, por debajo de pH 2,5. Nos parece un dato interesante para situar la actividad propia de estas proteinasas ácidas o catepsinas, ya que en determinadas condiciones experimentales puede interferir con la misma. A este respecto es probable que de los dos máximos a pH 2,0 y 3,3 de la curva de actividad proteolítica de los extractos de mucosa de estómago, píloro y duodeno hallados por TAYLOR (13), uno de ellos, el 2,0 sea debido a esta proteólisis ácida o a la actividad del pepsinógeno en tan bajo pH de incubación o a ambas cosas a la vez. También LAPRESLE y WEBB (8) identificaron la catepsina E en medula ósea de conejo, con una zona de actividad entre pH 1,5 y 4,5, y un máximo de 2,5; nuestros resultados sobre la proteólisis ácida, y el hecho de que la catepsina fuese activada por la cisteína, únicamente entre pH 3,5 y 4,5 — aunque ligeramente — y no a pH inferiores, refuerza nuestra suposición de que a pH inferiores a 2,5, puede interferir la proteólisis ácida, no enzimática.

Es de destacar también de los resultados obtenidos en los órganos estudiados, la presencia de autoproteólisis en una amplia zona, que va de pH 3 a 6,5, con un máximo también amplio que va de 3,5 a 5. Esto parece indicar que en el fenómeno de la autoproteólisis intervienen todas las catepsinas o proteinasas ácidas, en contraste al parecer con la proteólisis de otras proteínas como la albúmina o globulina humanas (3) en las que el óptimo de actividad es mucho más restringido, alrededor de pH 3,5, lo cual hace pensar que en su proteólisis intervendría una única catepsina o

un número limitado de las mismas. La presencia de varias enzimas determinantes de estas curvas de actividad parece demostrarse por los trabajos de SCHWABE y KALNITSKY (11) en pulpa dentaria de bóvido, quienes encuentran un óptimo de actividad catéptica global a pH 4, pero consiguen separar por Sephadex 75-G, primero, y por hidroxipatita después (cromatografía en columna), cuatro subfracciones enzimáticas con actividad catéptica a pH óptimo 3,0, 3,5 a 4,5 y 5,0, respectivamente. Por lo tanto, puede deducirse que la actividad catéptica total corresponde a la suma algebraica de las actividades de las catepsinas componentes.

Otro dato de interés es el hecho que a partir de pH 7, no aparece autoproteólisis significativa en todos los órganos estudiados, aunque es muy probable que con métodos más sensibles o con ayuda de activadores (cisteína, etc.) se encuentre actividad en la zona neutra. Así, los antes citados SCHWABE y KALNITSKY, encuentran actividad autoproteolítica (en la zona ácida) con el método de la ninhidrina — mucho más sensible —, y no por lectura a 280 $m\mu$ de los péptidos solubilizados. A este respecto, WALEY y HEYNINGEN (14) sugieren que las proteinasas neutras — al igual que las ácidas — serían de aparición general en los tejidos, pero al ser aquellas (proteinasas neutras) de menor intensidad que éstas (proteinasas ácidas), se hace más difícil su identificación.

Por otra parte puede ser significativa la constante incidencia del pH óptimo de estas proteinasas ácidas en una zona tan restringida como la comprendida entre 3,5 y 4 con muy pequeñas oscilaciones, debidas seguramente a las variaciones en las condiciones de experimentación. Con el método de ANSON, con hemoglobina desnaturizada ácida, se han encontrado catepsinas en tiroides de ternero, pH óptimo 3,5-4; en miometrio de conejo, pH óptimo 3,6; en

hipofisis de carnero, pH óptimo 3,5; en cerebro de rata, pH óptimo 3,8; en tracto intestinal de rata, pH óptimo 3,7. Estos óptimos de actividad proteolítica, usando como sustrato la Hb desnaturizada ácida, hallados por el método de ANSON se corresponden casi exactamente con los hallados en la autoproteolisis sobre el propio sustrato (véase fig. 2); o a lo sumo el óptimo en la autoproteolisis se acerca más a 3. Así, SCHWABE y KALNITSKY encuentran en pulpa dentaria de bóvido un óptimo de 3 para la autólisis y entre 3,5 y 4 para la proteólisis. Este dato puede tener interés para establecer con mayor seguridad el hecho de la no diferencia entre proteínas homólogas y heterólogas (3).

En cuanto a las proteinasas neutras, el que la Hb desnaturizada no sea soluble a pH superiores a 5,5 descarta la posibilidad de ser utilizada como sustrato idóneo para estas enzimas; si el estudio de las proteinasas neutras se llevase a cabo de una manera sistemática, en condiciones experimentales análogas, como en el caso de las ácidas, es probable que aparezca también, como en éstas, una constancia en la aparición del pH óptimo. Dado que la proteólisis enzimática ácida transcurre a un óptimo de pH por debajo de 4, la intervención directa del anticuerpo en la misma, en el sentido de acelerar o retardar la proteólisis del antígeno es muy dudosa, ya que los complejos antígeno-anticuerpo o no se forman a estos pH o si están previamente formados se disocian (5, 6). De aquí el interés, para la comprensión de los mecanismos inmunológicos del estudio más intenso de las proteinasas intracelulares neutras. Por otra parte, es posible formular posibilidades indirectas para explicar la intervención del anticuerpo en la activación de las proteinasas ácidas.

Y, en cuanto a las intensidades de actividad autoproteolítica en nuestra experiencia sobre conejo, encontramos que

el orden de mayor a menor intensidad, es: bazo, hígado y riñón, cerebro y músculo, que coincide con los datos hallados por WALEY y HEYNINGEN en buey (14). SNOKE y NEURATH (12) en sus experiencias sobre músculo de conejo sugieren que la baja actividad autolítica y proteolítica del músculo, es el resultado de un mecanismo inhibitorio, como se desprende de las técnicas de purificación, en las que la actividad aparece aumentada (13). Asimismo KOSZALKA y MILLER (7) encontraron en ratas la ausencia de autólisis significativa, debido a que la enzima era saturada por su natural sustrato, el músculo proteico. Este mecanismo inhibitorio es un dato que hay que tener presente al efectuar la valoración de la actividad de estas proteinasas intracelulares.

También es precisamente interesante el hecho que el máximo de actividad corresponda al bazo y con una gran diferencia en relación al hígado y riñón que le siguen, ya que el bazo es de los órganos estudiados, el único que manifiesta actividad inmunológica intensa. Por otra parte la actividad del hígado y riñón, aunque mucho menor, coincide también con la conocida participación de estos órganos en el metabolismo proteico, mientras que dicha participación es escasa en cerebro y músculo, en los que se observa la menor actividad autoproteolítica.

Resumen

Se ha investigado la actividad autoproteolítica de los extractos acuosos de bazo, hígado, riñón, músculo y cerebro de conejo, entre unos límites de pH de 2,5 a 10. Los extractos se obtenían como se detalla en un trabajo anterior, al igual que la técnica del método para la medida de la actividad proteolítica, expresada como D.O./100 mgr de proteína.

En una primera serie de experiencias se examinaba la autoproteólisis por debajo de

pH 2,5, en extractos de bazo inactivados y no inactivados por calor. El grado de proteolisis era prácticamente el mismo en ambos extractos, lo cual demostraba la existencia de proteolisis ácida. Por esta razón, la escala de pH investigada posteriormente, comenzaba a pH 2,5 (fig. 1).

La actividad autoproteolítica máxima se encontró en extractos de bazo, seguido a continuación por los extractos de hígado y riñón con actividades mucho más bajas, y por cerebro y músculo, con actividades inferiores, el último de los cuales con actividad apenas manifiesta (fig. 2). El óptimo de actividad se hallaba entre pH 3,5 y 5,0, con unos límites de pH de 3,0 a 6,0. Esto parece indicar que la autoproteolisis es debida a varias proteinasas y que la curva obtenida representa la suma algebraica de las actividades de todas ellas. Este hecho ha sido claramente demostrado por SCHWABE y KALNITSKY en el caso de la actividad catéptica de pulpa dentaria de bóvido, cuya actividad óptima a pH 4,0, han demostrado que estaba integrada por cuatro diferentes catepsinas, con pH óptimos a 3,0, 3,5 a 4,5 y 5,0. La ancha zona de actividad en la autoproteolisis, contrasta con los límites más estrechos obtenidos en la proteolisis de otras proteínas.

En nuestras condiciones experimentales no ha sido apreciada actividad autoproteolítica por encima de pH 6, es decir, la existencia de una autoproteolisis neutra. Quizás con un método más sensible, como han indicado WALLEY y HEYNINGEN, los resultados pueden ser positivos. La no existencia de autoproteolisis a pH neutro, o al menos en mucho menor grado que la autoproteolisis ácida, puede ser interesante en la discusión de las posibles relaciones entre las reacciones antígeno-anticuerpo y la proteolisis del antígeno.

Es también interesante el hecho que la actividad autoproteolítica máxima correspondía al bazo, un órgano inmunológicamente activo, y después, al hígado y riñón, cuya contribución al metabolismo proteico es conocida. El orden del grado de actividad que nosotros hemos encontrado en conejo, es el mismo registrado por WALLEY y HEYNINGEN en el buey. La ínfima actividad del músculo de conejo es también observada por SNOKE y NEUGATH y KOSZALKA y MILLER, quienes sugieren que puede ser debida a la existencia de un inhibidor o un exceso de sustrato.

Summary

Curves of autoproteolytic activity in different organs of the rabbit.

We have investigated the autoproteolytic activity of aqueous extracts of rabbit spleen, liver, kidney, muscle and brain, in a range of pH from 2,5 to 10. The extracts have been obtained as detailed in a former paper (3), the same as the technical method for proteolytic activity measurements, expressed as O.D./100 mg of protein.

In a first series of experiments the auto proteolysis at pH below 2.5 has been examined, in spleen extracts inactivated and not inactivated by heat. The degree of proteolysis is practically the same in both extracts (fig. 1), which demonstrates the existence of an acid proteolysis. For this reason the range of pH investigated afterwards begins at pH 2.5.

The maximum activity of autoproteolysis has been found in spleen extracts, followed at a much lower level by liver and kidney extracts, and at a very small level by brain and muscle, the latter with a nearly insignificant activity (fig. 2). The optimum has been found at pH 3.5-5.0, but with an activity range from pH 3.0 to 6.0. This seems to indicate that the autoproteolysis is due to several acid proteinases, and that the curve obtained represents the summation effects of all of them. This fact has been clearly shown by SCHWABE and KALNITSKY (11) in the case of catheptic activity of bovine dental pulp, whose optimum activity at pH 4.0, has been shown integrated by four different cathepsins, with optimum pH at 3.0, 3.5 to 4.5 and 5.0. The broad range of activity for autoproteolysis, contrasts with the sharp end limits obtained in the proteolysis of other protein (3, 11).

In our experimental conditions auto-

proteolytic activity over pH 6 has not been appreciated, that's to say, the existence of a neutral autoproteolysis. Perhaps with a more sensitive method, as is pointed out by WALEY and HEYNINGEN (14), the results should be positive. The non existence of autoproteolysis at neutral pH, or at least at a much lower degree than acid autoproteolysis, may be interesting in the discussion of the possible relations between antigen-antibody reactions and antigen proteolysis.

It is also interesting to note that the maximum autoproteolytic activity is shown in spleen, an immunologically active organ, and after, in the liver and kidney the contribution of which to protein turnover is known. The order of degree in activity that we have found in the rabbit is the same registered by WALEY and HEYNINGEN (14) in the ox. The insignificant activity of rabbit muscle is also observed by SNOKE and NEURATH (12), and KOSZALKA and MILLER (7), who suggest that may be due to the existence of an inhibitor or to an excess of substrate.

Bibliografía

1. ADAMS, E., y SMITH, E. L. : *J. Biol. Chem.*, **191**, 651, 1951.
2. DANNENBERG, A. M., y SMITH, E. L. : *J. Biol. Chem.*, **215**, 45, 1955.
3. GRAS, J. : *R. esp. Fisiol.*, **22**, 49, 1966.
4. HASCHEN, R. J., y KRUG, K. : *Nature*, **209**, 511, 1966.
5. HEIDELBERGER, M., y KENDALL, F. F. : *J. Exp. Med.*, **62**, 467, 1938.
6. KLEINSSCHIMIDT, W. J., y BOYER, P. D. : *J. Immunol.*, **69**, 247, 1952.
7. KOSZALKA, T. R., y MILLER, L. L. : *J. Biol. Chem.*, **235**, 669, 1960.
8. LAPRESLE, C., y WEBB, T. : *Biochem. J.*, **84**, 455, 1962.
9. MARKS, N., y LAJTHA, A. : *Biochem. J.*, **89**, 438, 1963.
10. MORRISON, W. L., and NEURATH, H. : *J. Biol. Chem.*, **200**, 39, 1953.
11. SCHWABE, C., y KALNITSKY, G. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **109**, 68, 1965.
12. SNOKE, J. E., y NEURATH, H. : *J. Biol. Chem.*, **187**, 127, 1950.
13. TAYLOR, W. H. : *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **42**, 1313, 1960.
14. WALEY, S. G., y HEYNINGEN, R. : *Biochem. J.*, **83**, 274, 1962.