

Una serina proteasa plasmática sería responsable de procesar la renina inactiva renal

PAULA A. VINCENT*, ELENA R. MARTINEZ de MELIAN, D. CECILIA GUARDIA, EDUARDO DE VITO

RESUMEN

Objetivos

Purificar y caracterizar una enzima plasmática (*PreR-Co*) que activa la renina renal.

Métodos

1. Se purificó por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografías en DEAE celulosa, Sephacryl S-200 HR, de inmunoafinidad e intercambio iónico en FPLC. 2. Se efectuó electroforesis en SDS-PAGE, transferencia a Immobilon-P, estudio de la secuencia N-terminal y homología en banco de datos. 3. Se estudió la actividad amidasa, esterasa y quininogenásica. 4. La renina se midió por incubación con exceso de sustrato homólogo y RIA de angiotensina I y la renina inactiva se calculó por diferencia en el contenido de renina antes del tratamiento con *PreR-Co* y después de él. Se estudió en extractos renales el efecto de diferentes concentraciones de enzima y la acción de inhibidores de proteasas. 5. Se investigó su acción en el plasma de rata normal y acidificado.

Resultados

1. La enzima purificada es termolábil, de $\text{PM} = 37$ kDa, es inhibida por DFP, PMSF y aprotinina. 2. La secuencia N-terminal para los 13 primeros aa fue: **IIGGSMDAKGSFP** Esta tiene 90% de homología con la cadena R de la haptoglobina, 69% con las serina proteasas y 65% con las calicreínas. 3. La *PreR-Co* incubada con quininógeno provoca liberación de quininas, hidroliza BAPNA y la unión éster del sustrato fluorogénico. 4. El extracto renal incubado con un exceso de *PreR-Co* aumentó 6 veces la concentración de renina activa. 5. No se observaron modificaciones de PRC cuando el plasma normal o acidificado fue tratado con *PreR-Co*.

Conclusiones

El 85% de la renina total del riñón es renina inactiva. La *PreR-Co* sería una serina proteasa probablemente de la familia de las calicreínas que es capaz de procesar la renina renal pero no la plasmática. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 761-768.

Palabras clave Renina inactiva - Riñón - Prorenina - Renina - Activación de renina - Sistema renina-angiotensina

INTRODUCCION

En 1970, De Vito y colaboradores (1) comunicaron por primera vez que la renina activa en cortes de riñón se originaba de un precursor inactivo. Posteriormente, experimentos de acidificación y proteólisis mostraron que una renina inactiva estaba presente en

el líquido amniótico y en el plasma; (2) también se encontró en extractos de riñón de conejo, (3) en sangre y en extracto de tumor de Wilms. (4) La presencia de renina inactiva en el plasma, líquidos biológicos y tejidos ha generado una larga lista de posibles funciones; sin embargo, su significación fisiológica

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) - Universidad Nacional de Tucumán - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - San Miguel de Tucumán - Argentina

Estos estudios fueron subsidiados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán

* Becaria del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán

Trabajo recibido para su publicación: 4/99. Aceptado: 7/99

Dirección para separatas: Dr. Eduardo De Vito - INSIBIO - Universidad Nacional de Tucumán - Chacabuco 461 - (4000) S. M. de Tucumán - Argentina - Tel.: 54-081-248921 - Fax: 54-81-248025 - [E-mail: edevito@unt.edu.ar](mailto:edevito@unt.edu.ar)

aún no se ha aclarado. Se observó que las reninas inactivas pueden ser activadas *in vitro* por varias enzimas, (5) pero no se pudo comprobar que éstas desempeñen el mismo papel *in vivo*. Además, el mecanismo preciso de activación de renina en el riñón y el plasma permanece sin esclarecer.

Recientemente se aisló del plasma de rata una fracción proteica que activa la renina inactiva renal. (6) Esta fracción proteica estaba ligada a una cantidad importante de albúmina y, además, algunas preparaciones mostraban retención de pequeñas cantidades de angiotensinógeno, lo que interfería con la identificación correcta de la enzima. El objetivo del presente estudio fue: 1) purificar la enzima, 2) identificarla y caracterizarla y 3) estudiar si también es capaz de activar la prorenina del plasma.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon ratas hembras albinas (originalmente Sprague-Dawley), criadas en nuestro bioterio, de 220-250 g de peso. Fueron alojadas en cajas (seis animales por caja) y mantenidas en condiciones controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) y luz (luz entre 6 AM y 8 PM), con libre acceso a una dieta balanceada y agua.

Recolección de muestras y purificación de la enzima

Las ratas anestesiadas con éter (diethyl éter Fisher Sci. Co., USA) fueron nefrectomizadas bilateralmente a través de una incisión dorsolateral. Se removieron rápidamente los riñones y la corteza renal se homogeneizó en NaCl al 0,9% (100 mg de tejido/ml) con un homogeneizador Ultra-turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). Los extractos se centrifugaron a 24,000 g durante 30 minutos a 5°C y el sobrenadante se separó en alícuotas de 100 μl , que se conservaron a -40°C hasta su uso. Después de 24 horas de la nefrectomía, las ratas fueron anestesiadas con éter y sangradas por punción aórtica en la bifurcación de las arterias ilíacas. La sangre se recogió en tubos previamente enfriados que contenían 30 FEU/ml de heparina (Laboratorios Abbott, Buenos Aires, Argentina). El plasma se separó y se usó de inmediato o se conservó a -40°C . El plasma de 20 ratas nefrectomizadas se acidificó a un pH de 6,0 y se trató con una solución 4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final de 1,5 M. El precipitado se descartó y el sobrenadante se llevó a una concentración final de 2,3 M con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El nuevo precipitado se separó por centrifugación, se lavó dos veces con una solución 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se disolvió en un volumen mínimo de agua y se dializó 24 horas contra agua destilada. La concentración de proteínas en el dializado se midió con el método de Bradford. (7)

Cromatografía de intercambio fónico en DEAE

celulosa: Cincuenta ml del dializado (850 mg de proteína) se mezclaron por agitación suave durante 30 minutos con DEAE celulosa equilibrada con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6. La resina se separó por filtración y las proteínas ligadas fueron eluidas con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6 que contenía 200 mM de NaCl. El eluido se dializó contra agua destilada y se concentró en un evaporador Speed-vac (Savant Instrument, Inc., Farmingdale, NY, USA).

Filtración por gel: Un ml (18 mg de proteína) del eluido de la DEAE se aplicó a una columna (90 x 1,6 cm) de Sephacryl S-200 HR, equilibrada con buffer fosfato 50 mM, pH 7,6 que contenía 150 mM NaCl y 0,02% (p/v) de azida sódica. La cromatografía de filtración por gel se desarrolló con el empleo del mismo buffer a un flujo de 50 ml/h y se recogieron fracciones de 1,5 ml. El perfil de proteínas se estableció por absorbancia a 280 nm y los diferentes picos se aislaron y concentraron en un evaporador Speed-vac.

Cromatografía de inmunoafinidad: Se obtuvieron anticuerpos antialbúmina de rata de dos conejos mediante la inyección (cada 10 días durante 6 a 8 semanas) en la cavidad peritoneal de una emulsión de 1 mg de albúmina pura de rata, disuelta en 250 μl de una solución de NaCl al 0,9% y 250 μl de adyuvante de Freund completo. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y los anticuerpos séricos se purificaron parcialmente por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis contra buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9 que contenía NaCl 0,5 M. El dializado (proteínas totales 26,93 mg/ml) se congeló a -40°C hasta su uso. Los anticuerpos se pegaron a Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno de acuerdo con Cuatrecasas & Anfinsen. (8) Una columna que contenía 24 ml de gel de inmunoafinidad (anticuerpos antialbúmina de rata ligados a Sepharosa 4B) se equilibró con NaCl al 0,9% y se sembraron 2 ml de la fracción con actividad de *PreR-Co* obtenida en la etapa de filtración por gel (10 mg de proteína). Se eluyó con NaCl al 0,9% y se recogieron fracciones de 2 ml. El perfil de proteínas se siguió a 280 nm y se midió la capacidad de activar renina en cada fracción de acuerdo con el método que se describió anteriormente. La presencia de albúmina en las fracciones se probó por inmunoprecipitación en medio líquido (*ring test*). La columna se regeneró por pasaje de 100 ml de buffer glicina-HCl 0,2 M, pH 3,5 y lavado con NaCl al 0,9%. La fracción activa se concentró 20 veces en un evaporador Speed-vac.

Cromatografía de intercambio fónico en Mono

Q: Cien μl (200 μg de proteína) de la fracción proveniente de la columna de inmunoafinidad se inyectaron en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (Pharmacia), equilibrada con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6, asociada con un sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia

LKB, Uppsala, Sweeden). Después de lavar con 10 ml del mismo buffer, la proteína retenida fue eluida usando buffer fosfato 20 mM, pH 7,6 con un gradiente lineal de NaCl (20 a 500 mM) y un flujo de 60 ml/h. Se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se juntaron las fracciones capaces de activar renina inactiva, se concentraron 30 veces en un evaporador Speedvac y se aplicaron a una segunda columna Mono Q HR 5/5 en iguales condiciones, excepto que las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 20 a 250 mM de NaCl. Se localizó la fracción proteína activa y se midió la concentración de proteínas.

Determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal

Se realizó electroforesis en SDS-PAGE de la fracción activa de la segunda Mono Q HR 5/5, la banda obtenida se transfirió a una membrana de Immobilon-P y se envió a BIO-SYNTHESIS Inc. PO Box 28, Lewisville, Texas 75067-0028, USA, para estudio de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal.

Activación de renina *in vitro*

Activación de renina en extracto de riñón: La solución de extracto renal (100 mg/ml) se diluyó 1:10 con buffer fosfato 50 mM (pH 7,4) inmediatamente antes de su uso. Diez μ l del extracto de riñón diluido (100 μ g de tejido) se pipetearon en tubos siliconados que contenían 50 μ l de buffer fosfato 50 mM, pH 7,4 o 50 μ l de muestra de la fracción cromatográfica e incubados en un baño con agitación durante 15 minutos a 37°C. La angiotensina I (Ang I) que podría formarse durante la incubación se removió por filtración en una pequeña columna (0,4 x 3,5 cm) de Sephadex G-25. (9) La recuperación de renina en este paso fue $97 \pm 4\%$ (n = 12), mientras que no se detectó Ang I en el ensayo.

Determinación de la concentración de renina activa: La renina se midió por incubación de 100 μ l del eluido de la Sephadex G-25 con 0,90 ml (2 μ g de Ang I) de un angiotensinógeno homólogo, obtenido de plasma de ratas macho 2NX como lo describirán previamente De Vito y colaboradores. (10) El polvo liofilizado del angiotensinógeno se disolvió inmediatamente antes de su uso en NaCl al 0,9% en buffer fosfato-citrato (0,075 M, pH 6,8) que contenía EDTA (4 mM), PMSF (1,4 mM) y sulfato de neomicina (1,1 mM). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y la Ang I generada se midió por radioinmunoensayo (RIA) (RIANEM) fabricado por DuPont Medical Products (Boston, MA, USA). También se incubó el eluido de la columna Sephadex G-25 sin angiotensinógeno y se incluyeron incubaciones a 4°C para descartar la presencia de Ang I. La

renina activada se calculó como la diferencia entre la concentración de renina obtenida después de la activación y la concentración de renina del extracto renal. El resultado se expresó como ng Ang I/mg tejido/h.

Efecto de inhibidores de proteasas: Una dilución del extracto renal (100 μ g de tejido) se incubó 15 minutos con 5 μ g de *PreR-Co* como ya se describió, pero en presencia de diferentes inhibidores de proteasas: aprotinina (0,23 mM), DFP (2 mM), NEM (40 mM), PMSF (2 mM) EDTA (80 mM), Leupeptin (8 mM), SBTI (4 mg/ml). También se incubó un tubo en presencia de isopropanol (vehículo de alguno de los inhibidores).

Activación de renina de extracto renal usando diferentes concentraciones de enzima: Con el objeto de calcular la concentración óptima de enzima capaz de procesar toda la renina inactiva renal presente en las muestras, el extracto renal (100 μ g de tejido) se incubó 15 minutos con diferentes concentraciones de *PreR-Co* (2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 30 μ g y 50 μ g).

Activación de renina plasmática: Dos alícuotas de 200 μ g de plasma normal se incubaron durante 15 minutos a 37°C con 50 μ l (10 μ g de proteína) de *PreR-Co* y sin *PreR-Co*. Se midió la concentración de renina plasmática (PCR) de ambos por incubación con 750 μ l de la solución de angiotensinógeno (1,2 μ g Ang I/ml/h) y RIA de Ang I. La renina inactiva del plasma se calculó como la diferencia entre las concentraciones de renina en el plasma incubado con *PreR-Co* y sin esta enzima.

Activación por tripsina: La prorenina del plasma fue activada por tripsina de acuerdo con Johannessen y colaboradores. (11) El plasma se incubó durante 60 minutos a 0°C con 4 mg/ml de tripsina. La reacción se detuvo por el agregado de un exceso de SBTI (inhibidor de tripsina de la soja) y el incubado se trató con *semi-dry* Dowex 50WX2 100-200 mesh (Bio-Rad AG, Richmond, Ca, USA). La renina del plasma se midió antes del tratamiento con tripsina y después de él. La renina inactiva en riñón se determinó siguiendo el mismo procedimiento pero con la incubación de 10 μ l de una dilución del extracto renal (100 μ g de tejido) con tripsina (concentración final 0,25 mg/ml) en presencia de albúmina de suero bovino (10 mg/ml) y 5 mM de CaCl₂. La reacción se detuvo por el agregado de SBTI (0,5 mg/ml).

Destrucción de inhibidores de proteasas plasmáticas: Para remover la mayoría de los inhibidores de proteasas plasmáticas, el plasma se incubó a un pH $2,8 \pm 0,1$, durante 30 minutos a 25°C y luego se llevó a un pH de 6,8. Después de esto, el plasma se trató con *PreR-Co* como se describió previamente, pero aumentando la concentración de proteínas a 50 μ g (cuatro experimentos).

Determinación de la actividad de amidasa

Cuatrocientos μl de una solución de 174 μg de *benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride* (BAPNA) en buffer Tris-HCl 150 mM, pH 7,5 que contenía 5 mM de cisteína y 2 mM de EDTA se incubaron a 37°C con 100 μl de *PreR-Co* (3 μg de proteína). La p-nitroanilina generada se determinó espectrofotométricamente a 410 nm. (12) La cantidad de sustrato hidrolizado por *PreR-Co* se expresó como unidades BAPNA, definida como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 μM de sustrato por minuto en las mismas condiciones.

Determinación de la actividad esterasa

La actividad esterasa se determinó con el empleo de un sustrato fluorogénico para esterasas (BCECF AM), por incubación de 1,0 μl de muestra (0,5 μg de proteína) con 1,0 μl de BCECF AM y 1,5 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7. La ruptura de la unión éster se midió por la emisión a 540 nm con excitación a 500 nm en un espectrofotofluorómetro Aminco-Browman (American Instrument Co., Inc. Silver Spring, MA, USA).

Determinación de la actividad quinogenásica

La actividad quinogenásica se midió incubando 20 a 40 μl de *PreR-Co* (2-4 μg de proteínas) con 200 μl de quinínogeno parcialmente purificado de perro (2,000 ng de quininas) disuelto en 1,000 μl de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 que contenía EDTA (15 mg/ml), 1,10 fenantrolina (1 mg/ml) y 8 OH-quinolina (1 mg/ml), con la adición o sin ella de SBTI (100 μg /ml). La presencia de caliceínas inactivas se

determinó por incubación de la muestra con 20 μg de tripsina durante 30 minutos a 37°C y la reacción se detuvo por la adición de 100 μg de SBTI. Las quininas generadas durante la incubación se midieron por RIA. La actividad quinogenásica se expresó como la cantidad de quininas generadas por μg de proteína por minuto de incubación con quinínogeno.

Estadística

Los datos se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre dos grupos de datos se evaluaron con la prueba de la t de Student o mediante análisis de varianza de la menor diferencia significativa de las medias cuando se compararon más de dos grupos. (13)

RESULTADOS

Purificación: El plasma de rata precipitado con sulfato de amonio y cromatografiado en DEAE celulosa mostró tres picos proteicos principales al ser eluido de la Sephacryl S-200 HR. Sólo uno de estos picos, que eluye a una masa molecular correspondiente a 52.000 fue capaz de activar la renina inactiva renal. En este pico se detectó una cantidad importante de albúmina y cantidades pequeñas de angiotensinógeno. Luego de pasar por la columna de inmunoafinidad, el único pico de proteína activo eluye a los 10 ml después de iniciada. De acuerdo con el *ring test*, la albúmina fue removida completamente. Las fracciones con actividad fueron concentradas y aplicadas en la columna Mono Q HR 5/5, de la cual emergen varios picos, pero uno solo activo eluye a 200 mM de NaCl. Cuando este pico se

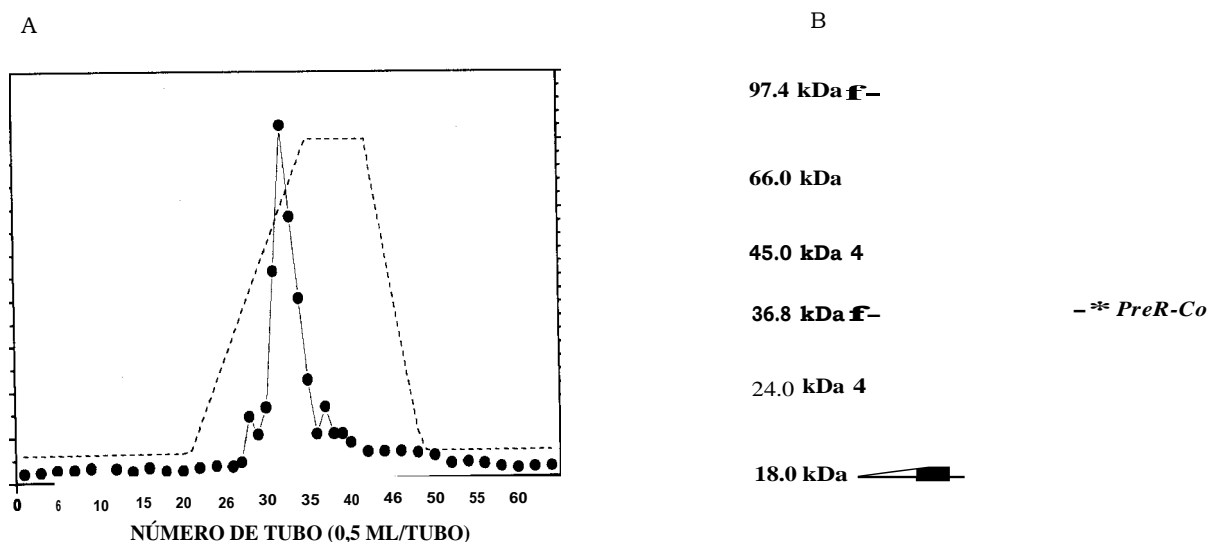


Fig. 1. Panel A: Cinco mg de proteína de la fracción activa de la primera Mono Q HR 5/5 fueron aplicados a una segunda Mono Q HR 5/5. Los círculos llenos muestran la absorbancia a 280 nm. La línea punteada representa el gradiente de NaCl. Se observa un único pico que eluye a 200 mM de NaCl. Panel B: Electroforesis en SDS-PAGE del pico de la segunda Mono Q HR 5/5. Se observa una única banda que corre aproximadamente a 37 kDa.

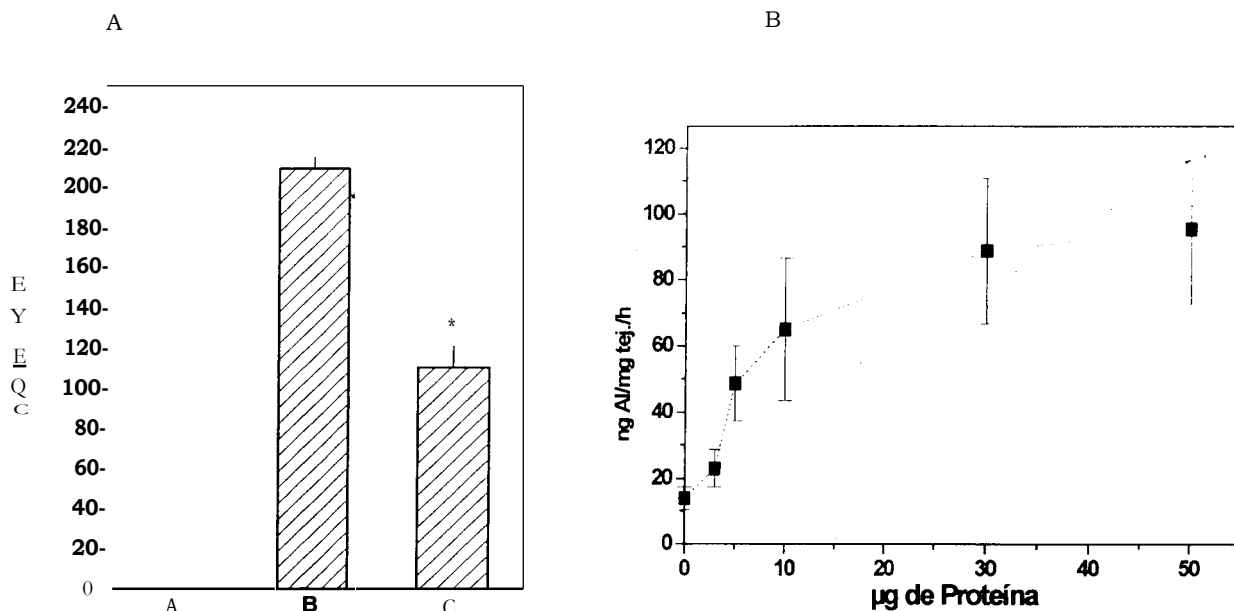


Fig. 2. Panel A: La barra A muestra la concentración de renina activa en homogenatos de corteza renal. La barra B indica la concentración de renina después del tratamiento durante 15 minutos a 37°C con *PreR-Co*. La barra C muestra los valores de renina activa de los homogenatos de corteza renal después del tratamiento con tripsina. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 10 experimentos. * $p < 0,01$. Panel B: Los cuadrados llenos representan la concentración de renina activa luego del tratamiento del homogenato de corteza renal con diferentes cantidades de proteína (*PreR-Co*).

aplicó por segunda vez a la columna Mono Q HR 5/5, un único pico (*PreR-Co*) eluye a 200 mM de NaCl manteniendo su actividad (Figura 1A). Con la columna de inmunoafinidad se alcanzó una purificación de 307 veces y de 485 veces con la primera Mono Q HR 5/5, siendo de 970 veces al final de todo el procedimiento con una actividad específica de 3.182 ng Ang I/mg proteína/h. El sustrato de renina plasmática se controló en cada fracción por incubación de 50 μ l de muestra con un exceso de renina de riñón de rata (1,2 μ g Ang I/ml/h). No se detectó angiotensinógeno en el pico activo después del pasaje por la segunda Mono Q. La electroforesis en SDS-PAGE seguida de tinción con plata presenta una banda aproximadamente a 37 kDa (Figura 1B). El estudio de la composición de aminoácidos desde el extremo N-terminal dio como resultado la siguiente secuencia: IIGGSMDAKGSFP El rastreo en bancos de datos le asigna una homología del 90% con la cadena (3 de la haptoglobina, 69% con las serina proteasas y 65% con las calicreínas.

Activación de renina inactiva de riñón y plasma por *PreR-Co*: La concentración de renina en homogenatos de corteza renal fue 34 ± 4 ng Ang I/mg de tejido/h. Se encontró un incremento significativo ($p < 0,01$) después de 15 minutos de incubación con 50 μ l (10 μ g de proteína) de *PreR-Co* (209 ± 7 ng/Ang I/mg tejido/h). Por tratamiento con tripsina, el resultado fue 110 ± 11 ng Ang I/mg tejido/h (Figura 2A). La propiedad de *PreR-Co* de activar la renina

inactiva renal fue anulada por la presencia de 2,0 mM de DFP o de 2,0 mM de PMSF o de 0,23 mM de aprotinina. El resto de los inhibidores, así como el isopropanol no tuvieron ningún efecto sobre la acti-

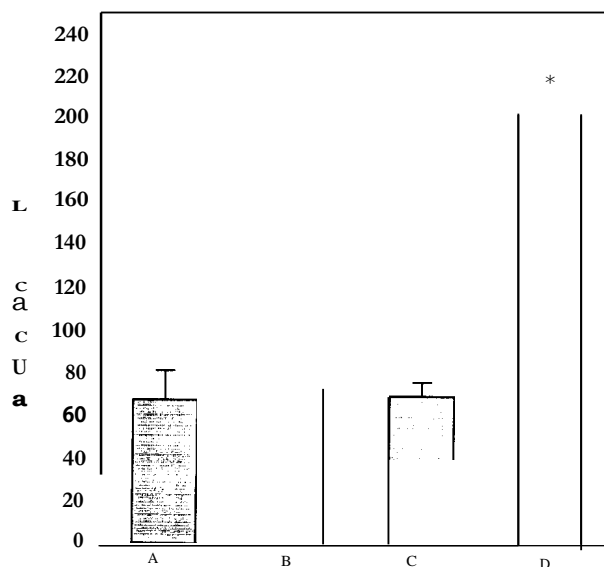


Fig. 3. La concentración de renina plasmática (PRC) se midió en plasma normal (barra A). No se encontró una diferencia significativa cuando plasmas normales se trataron con *PreR-Co* (barra B) o se acidificaron a un pH de $2,8 \pm 0,1$ durante 30 minutos a 25°C y trataron con *PreR-Co* (barra C). La barra D muestra los valores de PRC después del tratamiento con tripsina. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0,01$.

vidad. Cuando el homogenato de corteza renal se incubó con diferentes concentraciones de *PreR-Co*, se observó que la meseta de activación se alcanza con 5 tg de la enzima donde prácticamente el total de la renina inactiva ha sido activada (Figura 2B). La concentración de renina en el plasma normal de ratas fue de $67,6 \pm 13,3$ ng Ang I/ml/h y no se encontró ninguna diferencia significativa ($73,74 \pm 11,1$ ng Ang I/ml/h) después del tratamiento con diferentes cantidades de *PreR-Co* (10 a 50 μ g de proteína). También se encontraron resultados similares en plasmas que fueron tratados con 50 μ g de *PreR-Co* ($70,2 \pm 0,2$ ng Ang I/ml/h) pero que previamente habían sido acidificados con el objeto de inactivar la mayor cantidad de antiproteasas. El tratamiento con tripsina, por el contrario, aumenta significativamente la PRC ($202,8 \pm 7,8$ ng Ang I/ml/h) (Figura 3).

Actividad amidasa: La actividad amidasa se midió en tres experimentos, en los cuales se vio que 47.tg de enzima fueron capaces de hidrolizar 1 tM del sustrato BAPNA por minuto (actividad específica = 20 U/mg), mientras que 50 μ g de papaína (enzima de referencia) hidrolizan 1 tM de BAPNA por minuto.

Actividad esterasa: La habilidad de *PreR-Co* para hidrolizar el sustrato fluorogénico para esterasas (BCECF AM) se muestra en la Figura 4. La actividad esterasa de *PreR-Co* fue abolida por la adición de PMSF 2 mM al medio.

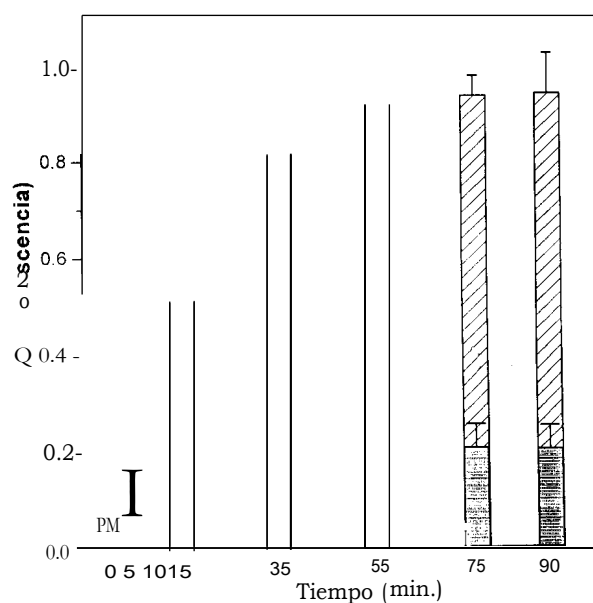


Fig. 4. El ensayo fluorométrico se desarrolló por incubación de 1,0 μ l de muestra (0,5 μ g de proteína) con 1,0 μ l de BCECF AM y 1,5 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7. La emisión a 540 nm con excitación a 500 nm se midió en un espectrofotofluorómetro y se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia. Las barras rayadas representan los valores medios \pm SEM de 4 experimentos. Las barras grises muestran los valores cuando en el medio de la reacción se agrega PMSF.

Actividad quinogenásica: La incubación de *PreR-Co* (4 μ g de proteína) con quinógeno de perro produce $25,2 \pm 0,9$ pg de bradiquinina/min/ μ g de proteína y no se encontró ninguna diferencia cuando se incubó en presencia de SBTI ($28,3 \pm 0,1$ pg de bradiquinina/min/ μ g de proteína). Después del procesamiento de la muestra con tripsina el resultado fue de $23,3 \pm 2,7$ pg de bradiquinina/min/ μ g de proteína, lo cual indica que *PreR-Co* no es un precursor activable.

DISCUSION

Las principales conclusiones de este trabajo son: primero, que se aisló una enzima del plasma de ratas capaz de activar la renina inactiva renal y segundo, que esta enzima, contrariamente a lo que se esperaba, no procesa la prorrénina del plasma. Esta enzima estaba en estudio por este laboratorio (6) y durante su investigación se descubrió que la fracción proteica purificada contenía una cantidad importante de albúmina que no era eliminada por los métodos usados de purificación y también cantidades pequeñas de angiotensinógeno que interferían con la identificación precisa de la enzima. En el presente trabajo se muestra que la albúmina se remueve usando un anticuerpo específico anti-albúmina acoplado a Sepharose 4B. Además, el angiotensinógeno fue eliminado por la columna Mono Q HR 5/5. La fracción proteica final muestra una única banda en SDS-PAGE con una masa molecular de aproximadamente 37 kDa. La secuencia N-terminal (IIGSMDAKGSFP) revela una alta homología (90%) con la cadena R de la haptoglobina y también con calicreína (65%), pero no coincide totalmente con ninguna enzima proteolítica conocida. Este hecho hace suponer que *PreR-Co* es una nueva enzima que procesa renina inactiva renal. La haptoglobina es una glucoproteína de la cual, hasta el momento, no se demostró actividad proteolítica, pero que muestra que tiene una fuerte homología con la familia de las serina proteasas. Además, *PreR-Co* tiene la capacidad de hidrolizar uniones éster además de uniones peptídicas y éstas son propiedades comunes en diversas serina proteasas. Por otra parte, *PreR-Co* fractura el quinógeno y también muestra una homología del 65% con las calicreínas, lo que nos hace suponer que la enzima podría pertenecer a la familia de las calicreínas. No obstante, la validación de esta hipótesis requiere que se realicen más investigaciones.

El mecanismo intrínseco de cómo la renina recientemente sintetizada es secretada o almacenada en el riñón es complejo: la renina inactiva renal es una proteína heterogénea debido a su glucosilación variable; (14) la renina activa renal también es una glucoproteína (15) heterogénea respecto del isoelectro-

enfoque, (16) lo cual puede ser debido a la glucosilación diferencial. (17) En el camino secretorio constitutivo de la renina activa parecen prevalecer formas relativamente ácidas de renina, (18) lo cual hace suponer que el procesamiento de renina inactiva a renina activa podría estar regulado por mecanismos de glucosilación. Con referencia a la ruptura del péptido que modula la forma inactiva de renina, existen muchas enzimas capaces de activar la renina inactiva en tejidos, (19) pero la enzima y el mecanismo preciso de conversión todavía se desconoce. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la renina activa después de la incubación de extractos de corteza renal con la *PreR-Co*. Esta observación ciertamente sugiere un mecanismo de activación de alguna enzima generadora de Ang I. Se comprobó que el producto de la activación era renina, ya que un anticuerpo específico contra renina renal de rata neutralizó la actividad generadora de Ang I. (6) Por lo contrario, no se encontró ninguna activación cuando el plasma o las fracciones cromatográficas del plasma que contenían renina inactiva se incubaron con diferentes cantidades de *PreR-Co*. Sin embargo, se observó que tanto la renina inactiva renal como la plasmática fueron activadas con tripsina. El hecho de que inhibidores de proteasa plasmática puedan actuar como inhibidores de *PreR-Co* parece poco probable, porque *PreR-Co* se ensayó en plasmas en los que la mayoría de los inhibidores de proteasas fueron removidos por acidificación y porque la concentración de *PreR-Co* empleada fue suficientemente alta (50 µg) como para ser inhibida por los inhibidores remanentes y más aun porque *PreR-Co* activó la renina inactiva renal de extractos renales en presencia de plasma donde la enzima fue incapaz de activar prorrenina. Este resultado claramente muestra que *PreR-Co* es capaz de procesar la renina inactiva renal pero no la prorrenina plasmática. Estas evidencias nos permiten especular que la renina inactiva del plasma podría tener una conformación diferente de la de la renina inactiva renal, el sitio de acción para *PreR-Co* no estaría expuesto y por lo tanto no sería susceptible de ser atacado por ella.

A pesar de que diversas enzimas fueron propuestas como posibles candidatas para procesar la renina inactiva renal, todavía no se conoce la enzima precisa involucrada en este proceso y, por extensión, no se conoce la posibilidad de que esta enzima pueda interactuar en otros tejidos o con prorrenina de plasma. Kim y colaboradores (20) purificaron una enzima de glándula submandibular de ratón (llamada *prorenin-converting enzyme*), la cual específicamente oliva prorrenina de glándula submandibular de ratón, pero no es activa con la renina renal. Además, no se detectó ninguna actividad presora o vasocons-

trictora después de la infusión endovenosa de prorrenina recombinante. (21) Por otra parte, ratas transgénicas que tienen un gen adicional para la renina (Ren 2) tienen una concentración plasmática elevada de prorrenina, pero la concentración de renina tanto en la sangre como en el riñón permanece normal. (2) Estos dos últimos hallazgos sugieren que la prorrenina del plasma no es la fuente de la renina activa plasmática y que por lo tanto se produce una pequeña conversión o ninguna en la sangre circulante. Esto concuerda totalmente con nuestros resultados, ya que no pudimos encontrar activación de la prorrenina plasmática con una proteína que es totalmente activa en homogenatos de riñón.

Una pregunta atractiva referente a esto es: ¿Por qué una enzima circulante tiene la función de procesar la renina inactiva renal? Probablemente porque el pasaje de renina inactiva a renina activa debe reflejar los cambios y balances que ocurren en la concentración de renina activa circulante. Por otra parte, si se supone que una enzima circulante es la responsable de la activación de la renina inactiva renal, la pregunta sería: ¿Cómo es transportada ésta desde el lugar de síntesis hasta el riñón? De acuerdo con los presentes experimentos, nosotros somos incapaces de definir el mecanismo preciso; sin embargo, el hecho de la dificultad experimental en separar la albúmina ligada a la enzima en el proceso de purificación nos permite especular que la albúmina tendría un papel importante en el transporte de la enzima hasta el sitio de activación.

En resumen, nuestros resultados indican la presencia en el plasma de ratas de una proteína que promueve un incremento de aproximadamente 6 veces en la renina activa cuando se incubaba durante pocos minutos con extracto renal; no obstante, fue incapaz de activar la prorrenina del plasma. Esta enzima fue purificada 900 veces y parece que es una enzima que puede regular la conversión de la forma inactiva a la forma activa en el riñón.

SUMMARY

A PLASMA SERINE PROTEASE WOULD BE RESPONSIBLE OF INACTIVE RENIN PROCESSING IN KIDNEY

The aim of the present research was to characterize a plasma protein fraction (*PreR-Co*) involved in renin activation. The *PreR-Co* was obtained as a single electrophoretic band from rat plasma by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, Sephacryl S-200 HR, immunoaffinity with an anti-rat albumin and ion-exchange chromatography. The N-terminal amino acid sequence was studied, as well as amidase, esterase and kallikrein activities. Rat kidney extract

(KE) or plasma were incubated with purified *PreR-Co* during 15 minutes at 37°C and renin concentration was measured by incubation with homologous angiotensinogen. Plasma or KE were also activated by trypsin.

Results

The purified enzyme has a molecular weight of 37 kDa and N-terminal amino acid sequence was IIGGSMDAKGSFP, which has 90% homology to the R-chain of haptoglobin, 69% to serine-proteases and 65% to kallikreins. There was a six-fold increase in renin concentration when KE was incubated with purified *PreR-Co* while renin activity increased 4 times when KE was treated with trypsin. The enzyme activity was inhibited by DFP, PMSF and aprotinin. *PreR-Co* was unable to process inactive plasma renin (prorenin) even after addition of up to 50.µg of enzyme (67.6 ± 13.3 and 73.7 ± 11.1 ng Ang I/ml/h).

Conclusions

These results suggest that *PreR-Co* could be a serine protease carried to the kidney by albumin where *PreR-Co* processes inactive renal renin. Consequently, this protease may play an important role in the balance of circulating renin.

Key words Inactive renin - Kidneys - Prorenin - Renin - Renin activation - Renin-angiotensin system

Agradecimiento

Los autores están agradecidos con el Dr. H. L. Nolly por su ayuda en la determinación de la actividad quinínogenásica.

BIBLIOGRAFIA

- De Vito E, Cabrera RR, Fasciolo JC. Renin production and release by rat kidney slices. *Am J Physiol* 1970; 219:1042-1045.
- Morris BJ, Lurnbers ER. The activation of renin in human amniotic fluid by proteolytic enzymes. *Bochim Biophys Acta* 1972; 289: 385-391.
- Leckie BJ. The activation of a possible zymogen of renin in rabbit kidney. *Clin Sci* 1973; 44: 301-304.
- Day RP, Luetscher JA. Big renin: A possible prohormone in kidney and plasma of a patient with Wilms' tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 923-926.
- Schalekamp MA, Derkx FH (Chapter 6), Skinner SL (Chapter 7). En: Robertson JIS, Nicholls MG (eds). The renin-angiotensin system. Kent, UK, Tirnes Mirror Intern Publ Ltd 1993; 1: 6.1-7.14.
- De Vito E, Martínez de Melián ER, Guardia DC. Activation of renal renin by a protein plasma fraction: A novel enzymatic mechanism. *Comp Biochem Physiol* 1996; 113B: 433-438.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-252.
- Cuatrecasas P, Anfinsen CB. Affinity chromatography. *Ann Rev Biochem* 1971; 40: 259-278.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning. a) A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
- De Vito E, Gordon SB, Cabrera RR, Fasciolo JC. Release of renin by rat kidney slices. *Am J Physiol* 1970; 219:1036-1041.
- Johannessen A, Nielsen AH, Poulsen K. Measurement of inactive renin in rat plasma: Effect of nephrectomy and sialoadenectomy on the plasma concentration. *J Hypertens* 1990; 8: 345-349.
- Arnon R. Individual proteolytic enzymes. 14 Papain. En: Perlmann GE, Loran L (eds). *Methods in enzymology*. Vol XIX, Section II. NY, USA, Academic Press 1970; pp 228-230.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods* (2a ed). Ames, Iowa, Iowa State University Press 1967.
- Printz MP, Dworschack RT. Evidence for the glycoprotein nature of kidney renin. *Biochim Biophys Acta* 1977; 494:162-171.
- Druilhet RE, Overturf ML. Separation of multiple forms of renin from human, rabbit, hog, and baboon kidney by isoelectric focusing. En: Sambhi MP (ed). *Heterogeneity of renin and renin substrate*. New York, Elsevier North Holland Inc 1981; pp 89-99.
- Khalidi N, Mc Kenzie JK. Isoelectric heterogeneity of human prorenin (inactive renin) in body fluids. *Am J Hypertens* 1991; 4: 56-59.
- Sessler FM, Jacques JA, Malvin RL. Different production and decay rates of six renin forms isolated from rat plasma. *Amer J Physiol* 1986; 250: E551-E557.
- Katz SA, Malvin RL. Secretion of newly synthesized renin. *Endocrinology* 1982; 111: 201-207.
- Shinagawa T, Do YS, Baxter JD, Carilli C, Schilling J, Hsueh WA. Identification of an enzyme in human kidney rat correctly processes prorenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1927-1931.
- Kirn WS, Nakayama K, Nakagawa T, Kawamura Y, Hara-guchi K, Murakami K. Mouse submandibular gland prorenin-converting enzyme is a member of glandular kallikrein family. *J Biol Chem* 1991; 266: 19283-19287.
- Lenz T, Sealey JE, Maack T y col. Half-life, hemodynamic renal and hormonal effects of prorenin in cynomolgus monkeys. *Am J Physiol* 1991; 260: R804-R810.
- Mullins JJ, Peters J, Canten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344: 541-544.

Una serina proteasa plasmática sería responsable de procesar la renina inactiva renal

PAULA A. VINCENT*, ELENA R. MARTINEZ de MELIAN, D. CECILIA GUARDIA, EDUARDO DE VITO

RESUMEN

Objetivos

Purificar y caracterizar una enzima plasmática (*PreR-Co*) que activa la renina renal.

Métodos

1. Se purificó por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cromatografías en DEAE celulosa, Sephacryl S-200 HR, de inmunoafinidad e intercambio iónico en FPLC. 2. Se efectuó electroforesis en SDS-PAGE, transferencia a Immobilon-P, estudio de la secuencia N-terminal y homología en banco de datos. 3. Se estudió la actividad amidasa, esterasa y quininogenásica. 4. La renina se midió por incubación con exceso de sustrato homólogo y RIA de angiotensina I y la renina inactiva se calculó por diferencia en el contenido de renina antes del tratamiento con *PreR-Co* y después de él. Se estudió en extractos renales el efecto de diferentes concentraciones de enzima y la acción de inhibidores de proteasas. 5. Se investigó su acción en el plasma de rata normal y acidificado.

Resultados

1. La enzima purificada es termolábil, de $\text{PM} = 37$ kDa, es inhibida por DFP, PMSF y aprotinina. 2. La secuencia N-terminal para los 13 primeros aa fue: **IIGGSMDAKGSFP** Esta tiene 90% de homología con la cadena R de la haptoglobina, 69% con las serina proteasas y 65% con las calicreínas. 3. La *PreR-Co* incubada con quininógeno provoca liberación de quininas, hidroliza BAPNA y la unión éster del sustrato fluorogénico. 4. El extracto renal incubado con un exceso de *PreR-Co* aumentó 6 veces la concentración de renina activa. 5. No se observaron modificaciones de PRC cuando el plasma normal o acidificado fue tratado con *PreR-Co*.

Conclusiones

El 85% de la renina total del riñón es renina inactiva. La *PreR-Co* sería una serina proteasa probablemente de la familia de las calicreínas que es capaz de procesar la renina renal pero no la plasmática. REV ARGENT CARDIOL 1999; 67: 761-768.

Palabras clave Renina inactiva - Riñón - Prorenina - Renina - Activación de renina - Sistema renina-angiotensina

INTRODUCCION

En 1970, De Vito y colaboradores (1) comunicaron por primera vez que la renina activa en cortes de riñón se originaba de un precursor inactivo. Posteriormente, experimentos de acidificación y proteólisis mostraron que una renina inactiva estaba presente en

el líquido amniótico y en el plasma; (2) también se encontró en extractos de riñón de conejo, (3) en sangre y en extracto de tumor de Wilms. (4) La presencia de renina inactiva en el plasma, líquidos biológicos y tejidos ha generado una larga lista de posibles funciones; sin embargo, su significación fisiológica

Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO) - Universidad Nacional de Tucumán - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) - San Miguel de Tucumán - Argentina

Estos estudios fueron subsidiados por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina y el Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán

* Becaria del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán

Trabajo recibido para su publicación: 4/99. Aceptado: 7/99

Dirección para separatas: Dr. Eduardo De Vito - INSIBIO - Universidad Nacional de Tucumán - Chacabuco 461 - (4000) S. M. de Tucumán - Argentina - Tel.: 54-081-248921 - Fax: 54-81-248025 - [E-mail: edevito@unt.edu.ar](mailto:edevito@unt.edu.ar)

aún no se ha aclarado. Se observó que las reninas inactivas pueden ser activadas *in vitro* por varias enzimas, (5) pero no se pudo comprobar que éstas desempeñen el mismo papel *in vivo*. Además, el mecanismo preciso de activación de renina en el riñón y el plasma permanece sin esclarecer.

Recientemente se aisló del plasma de rata una fracción proteica que activa la renina inactiva renal. (6) Esta fracción proteica estaba ligada a una cantidad importante de albúmina y, además, algunas preparaciones mostraban retención de pequeñas cantidades de angiotensinógeno, lo que interfería con la identificación correcta de la enzima. El objetivo del presente estudio fue: 1) purificar la enzima, 2) identificarla y caracterizarla y 3) estudiar si también es capaz de activar la prorenina del plasma.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon ratas hembras albinas (originalmente Sprague-Dawley), criadas en nuestro bioterio, de 220-250 g de peso. Fueron alojadas en cajas (seis animales por caja) y mantenidas en condiciones controladas de temperatura ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) y luz (luz entre 6 AM y 8 PM), con libre acceso a una dieta balanceada y agua.

Recolección de muestras y purificación de la enzima

Las ratas anestesiadas con éter (diethyl éter Fisher Sci. Co., USA) fueron nefrectomizadas bilateralmente a través de una incisión dorsolateral. Se removieron rápidamente los riñones y la corteza renal se homogeneizó en NaCl al 0,9% (100 mg de tejido/ml) con un homogeneizador Ultra-turrax (Janke & Kunkel, Staufen, Germany). Los extractos se centrifugaron a 24,000 g durante 30 minutos a 5°C y el sobrenadante se separó en alícuotas de 100 μl , que se conservaron a -40°C hasta su uso. Después de 24 horas de la nefrectomía, las ratas fueron anestesiadas con éter y sangradas por punción aórtica en la bifurcación de las arterias ilíacas. La sangre se recogió en tubos previamente enfriados que contenían 30 FEU/ml de heparina (Laboratorios Abbott, Buenos Aires, Argentina). El plasma se separó y se usó de inmediato o se conservó a -40°C . El plasma de 20 ratas nefrectomizadas se acidificó a un pH de 6,0 y se trató con una solución 4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta una concentración final de 1,5 M. El precipitado se descartó y el sobrenadante se llevó a una concentración final de 2,3 M con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. El nuevo precipitado se separó por centrifugación, se lavó dos veces con una solución 3 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se disolvió en un volumen mínimo de agua y se dializó 24 horas contra agua destilada. La concentración de proteínas en el dializado se midió con el método de Bradford. (7)

Cromatografía de intercambio fónico en DEAE

celulosa: Cincuenta ml del dializado (850 mg de proteína) se mezclaron por agitación suave durante 30 minutos con DEAE celulosa equilibrada con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6. La resina se separó por filtración y las proteínas ligadas fueron eluidas con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6 que contenía 200 mM de NaCl. El eluido se dializó contra agua destilada y se concentró en un evaporador Speed-vac (Savant Instrument, Inc., Farmingdale, NY, USA).

Filtración por gel: Un ml (18 mg de proteína) del eluido de la DEAE se aplicó a una columna (90 x 1,6 cm) de Sephacryl S-200 HR, equilibrada con buffer fosfato 50 mM, pH 7,6 que contenía 150 mM NaCl y 0,02% (p/v) de azida sódica. La cromatografía de filtración por gel se desarrolló con el empleo del mismo buffer a un flujo de 50 ml/h y se recogieron fracciones de 1,5 ml. El perfil de proteínas se estableció por absorbancia a 280 nm y los diferentes picos se aislaron y concentraron en un evaporador Speed-vac.

Cromatografía de inmunoafinidad: Se obtuvieron anticuerpos antialbúmina de rata de dos conejos mediante la inyección (cada 10 días durante 6 a 8 semanas) en la cavidad peritoneal de una emulsión de 1 mg de albúmina pura de rata, disuelta en 250 μl de una solución de NaCl al 0,9% y 250 μl de adyuvante de Freund completo. Se obtuvo sangre por punción cardíaca y los anticuerpos séricos se purificaron parcialmente por precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis contra buffer carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9 que contenía NaCl 0,5 M. El dializado (proteínas totales 26,93 mg/ml) se congeló a -40°C hasta su uso. Los anticuerpos se pegaron a Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno de acuerdo con Cuatrecasas & Anfinsen. (8) Una columna que contenía 24 ml de gel de inmunoafinidad (anticuerpos antialbúmina de rata ligados a Sepharosa 4B) se equilibró con NaCl al 0,9% y se sembraron 2 ml de la fracción con actividad de *PreR-Co* obtenida en la etapa de filtración por gel (10 mg de proteína). Se eluyó con NaCl al 0,9% y se recogieron fracciones de 2 ml. El perfil de proteínas se siguió a 280 nm y se midió la capacidad de activar renina en cada fracción de acuerdo con el método que se describió anteriormente. La presencia de albúmina en las fracciones se probó por inmunoprecipitación en medio líquido (*ring test*). La columna se regeneró por pasaje de 100 ml de buffer glicina-HCl 0,2 M, pH 3,5 y lavado con NaCl al 0,9%. La fracción activa se concentró 20 veces en un evaporador Speed-vac.

Cromatografía de intercambio fónico en Mono

Q: Cien μl (200 μg de proteína) de la fracción proveniente de la columna de inmunoafinidad se inyectaron en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (Pharmacia), equilibrada con buffer fosfato 20 mM, pH 7,6, asociada con un sistema de FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography, Pharmacia

LKB, Uppsala, Sweeden). Después de lavar con 10 ml del mismo buffer, la proteína retenida fue eluida usando buffer fosfato 20 mM, pH 7,6 con un gradiente lineal de NaCl (20 a 500 mM) y un flujo de 60 ml/h. Se recogieron fracciones de 0,5 ml. Se juntaron las fracciones capaces de activar renina inactiva, se concentraron 30 veces en un evaporador Speedvac y se aplicaron a una segunda columna Mono Q HR 5/5 en iguales condiciones, excepto que las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de 20 a 250 mM de NaCl. Se localizó la fracción proteína activa y se midió la concentración de proteínas.

Determinación de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal

Se realizó electroforesis en SDS-PAGE de la fracción activa de la segunda Mono Q HR 5/5, la banda obtenida se transfirió a una membrana de Immobilon-P y se envió a BIO-SYNTHESIS Inc. PO Box 28, Lewisville, Texas 75067-0028, USA, para estudio de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal.

Activación de renina *in vitro*

Activación de renina en extracto de riñón: La solución de extracto renal (100 mg/ml) se diluyó 1:10 con buffer fosfato 50 mM (pH 7,4) inmediatamente antes de su uso. Diez μ l del extracto de riñón diluido (100 μ g de tejido) se pipetearon en tubos siliconados que contenían 50 μ l de buffer fosfato 50 mM, pH 7,4 o 50 μ l de muestra de la fracción cromatográfica e incubados en un baño con agitación durante 15 minutos a 37°C. La angiotensina I (Ang I) que podría formarse durante la incubación se removió por filtración en una pequeña columna (0,4 x 3,5 cm) de Sephadex G-25. (9) La recuperación de renina en este paso fue $97 \pm 4\%$ (n = 12), mientras que no se detectó Ang I en el ensayo.

Determinación de la concentración de renina activa: La renina se midió por incubación de 100 μ l del eluido de la Sephadex G-25 con 0,90 ml (2 μ g de Ang I) de un angiotensinógeno homólogo, obtenido de plasma de ratas macho 2NX como lo describirán previamente De Vito y colaboradores. (10) El polvo liofilizado del angiotensinógeno se disolvió inmediatamente antes de su uso en NaCl al 0,9% en buffer fosfato-citrato (0,075 M, pH 6,8) que contenía EDTA (4 mM), PMSF (1,4 mM) y sulfato de neomicina (1,1 mM). La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C y la Ang I generada se midió por radioinmunoensayo (RIA) (RIANEM) fabricado por DuPont Medical Products (Boston, MA, USA). También se incubó el eluido de la columna Sephadex G-25 sin angiotensinógeno y se incluyeron incubaciones a 4°C para descartar la presencia de Ang I. La

renina activada se calculó como la diferencia entre la concentración de renina obtenida después de la activación y la concentración de renina del extracto renal. El resultado se expresó como ng Ang I/mg tejido/h.

Efecto de inhibidores de proteasas: Una dilución del extracto renal (100 μ g de tejido) se incubó 15 minutos con 5 μ g de *PreR-Co* como ya se describió, pero en presencia de diferentes inhibidores de proteasas: aprotinina (0,23 mM), DFP (2 mM), NEM (40 mM), PMSF (2 mM) EDTA (80 mM), Leupeptin (8 mM), SBTI (4 mg/ml). También se incubó un tubo en presencia de isopropanol (vehículo de alguno de los inhibidores).

Activación de renina de extracto renal usando diferentes concentraciones de enzima: Con el objeto de calcular la concentración óptima de enzima capaz de procesar toda la renina inactiva renal presente en las muestras, el extracto renal (100 μ g de tejido) se incubó 15 minutos con diferentes concentraciones de *PreR-Co* (2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g, 30 μ g y 50 μ g).

Activación de renina plasmática: Dos alícuotas de 200 μ g de plasma normal se incubaron durante 15 minutos a 37°C con 50 μ l (10 μ g de proteína) de *PreR-Co* y sin *PreR-Co*. Se midió la concentración de renina plasmática (PCR) de ambos por incubación con 750 μ l de la solución de angiotensinógeno (1,2 μ g Ang I/ml/h) y RIA de Ang I. La renina inactiva del plasma se calculó como la diferencia entre las concentraciones de renina en el plasma incubado con *PreR-Co* y sin esta enzima.

Activación por tripsina: La prorenina del plasma fue activada por tripsina de acuerdo con Johannessen y colaboradores. (11) El plasma se incubó durante 60 minutos a 0°C con 4 mg/ml de tripsina. La reacción se detuvo por el agregado de un exceso de SBTI (inhibidor de tripsina de la soja) y el incubado se trató con *semi-dry* Dowex 50WX2 100-200 mesh (Bio-Rad AG, Richmond, Ca, USA). La renina del plasma se midió antes del tratamiento con tripsina y después de él. La renina inactiva en riñón se determinó siguiendo el mismo procedimiento pero con la incubación de 10 μ l de una dilución del extracto renal (100 μ g de tejido) con tripsina (concentración final 0,25 mg/ml) en presencia de albúmina de suero bovino (10 mg/ml) y 5 mM de CaCl₂. La reacción se detuvo por el agregado de SBTI (0,5 mg/ml).

Destrucción de inhibidores de proteasas plasmáticas: Para remover la mayoría de los inhibidores de proteasas plasmáticas, el plasma se incubó a un pH $2,8 \pm 0,1$, durante 30 minutos a 25°C y luego se llevó a un pH de 6,8. Después de esto, el plasma se trató con *PreR-Co* como se describió previamente, pero aumentando la concentración de proteínas a 50 μ g (cuatro experimentos).

Determinación de la actividad de amidasa

Cuatrocientos μl de una solución de 174 μg de *benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide hydrochloride* (BAPNA) en buffer Tris-HCl 150 mM, pH 7,5 que contenía 5 mM de cisteína y 2 mM de EDTA se incubaron a 37°C con 100 μl de *PreR-Co* (3 μg de proteína). La p-nitroanilina generada se determinó espectrofotométricamente a 410 nm. (12) La cantidad de sustrato hidrolizado por *PreR-Co* se expresó como unidades BAPNA, definida como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar 1 μM de sustrato por minuto en las mismas condiciones.

Determinación de la actividad esterasa

La actividad esterasa se determinó con el empleo de un sustrato fluorogénico para esterasas (BCECF AM), por incubación de 1,0 μl de muestra (0,5 μg de proteína) con 1,0 μl de BCECF AM y 1,5 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7. La ruptura de la unión éster se midió por la emisión a 540 nm con excitación a 500 nm en un espectrofotofluorómetro Aminco-Browman (American Instrument Co., Inc. Silver Spring, MA, USA).

Determinación de la actividad quinogenásica

La actividad quinogenásica se midió incubando 20 a 40 μl de *PreR-Co* (2-4 μg de proteínas) con 200 μl de quinínogeno parcialmente purificado de perro (2,000 ng de quininas) disuelto en 1,000 μl de buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5 que contenía EDTA (15 mg/ml), 1,10 fenantrolina (1 mg/ml) y 8 OH-quinolina (1 mg/ml), con la adición o sin ella de SBTI (100 μg /ml). La presencia de caliceínas inactivas se

determinó por incubación de la muestra con 20 μg de tripsina durante 30 minutos a 37°C y la reacción se detuvo por la adición de 100 μg de SBTI. Las quininas generadas durante la incubación se midieron por RIA. La actividad quinogenásica se expresó como la cantidad de quininas generadas por μg de proteína por minuto de incubación con quinínogeno.

Estadística

Los datos se expresan como la media \pm SEM. Las diferencias entre dos grupos de datos se evaluaron con la prueba de la t de Student o mediante análisis de varianza de la menor diferencia significativa de las medias cuando se compararon más de dos grupos. (13)

RESULTADOS

Purificación: El plasma de rata precipitado con sulfato de amonio y cromatografiado en DEAE celulosa mostró tres picos proteicos principales al ser eluido de la Sephacryl S-200 HR. Sólo uno de estos picos, que eluye a una masa molecular correspondiente a 52.000 fue capaz de activar la renina inactiva renal. En este pico se detectó una cantidad importante de albúmina y cantidades pequeñas de angiotensinógeno. Luego de pasar por la columna de inmunoafinidad, el único pico de proteína activo eluye a los 10 ml después de iniciada. De acuerdo con el *ring test*, la albúmina fue removida completamente. Las fracciones con actividad fueron concentradas y aplicadas en la columna Mono Q HR 5/5, de la cual emergen varios picos, pero uno solo activo eluye a 200 mM de NaCl. Cuando este pico se

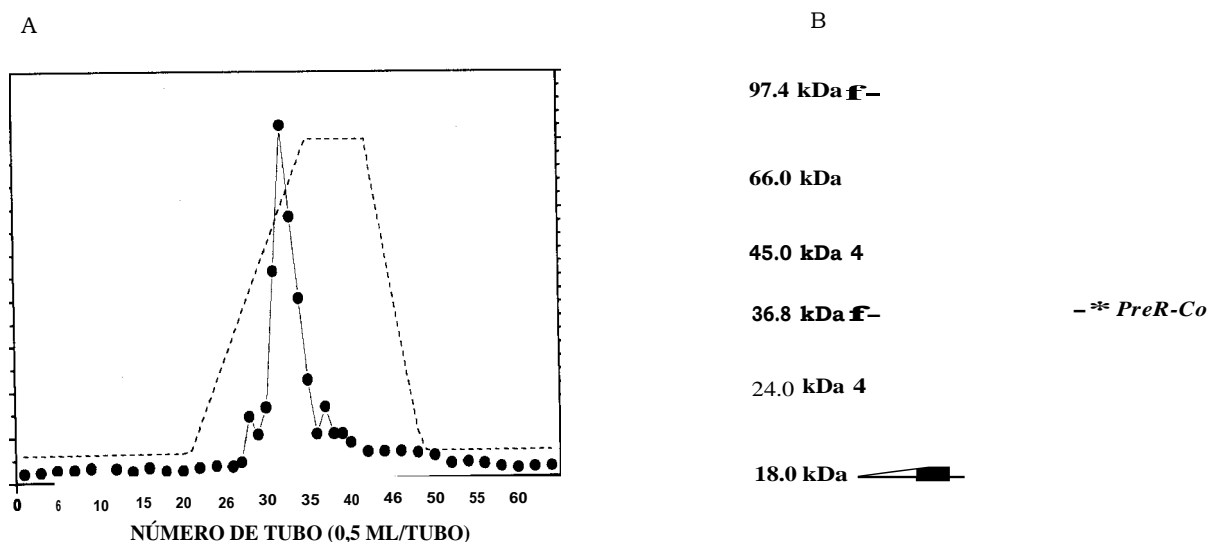


Fig. 1. Panel A: Cinco mg de proteína de la fracción activa de la primera Mono Q HR 5/5 fueron aplicados a una segunda Mono Q HR 5/5. Los círculos llenos muestran la absorbancia a 280 nm. La línea punteada representa el gradiente de NaCl. Se observa un único pico que eluye a 200 mM de NaCl. Panel B: Electroforesis en SDS-PAGE del pico de la segunda Mono Q HR 5/5. Se observa una única banda que corre aproximadamente a 37 kDa.

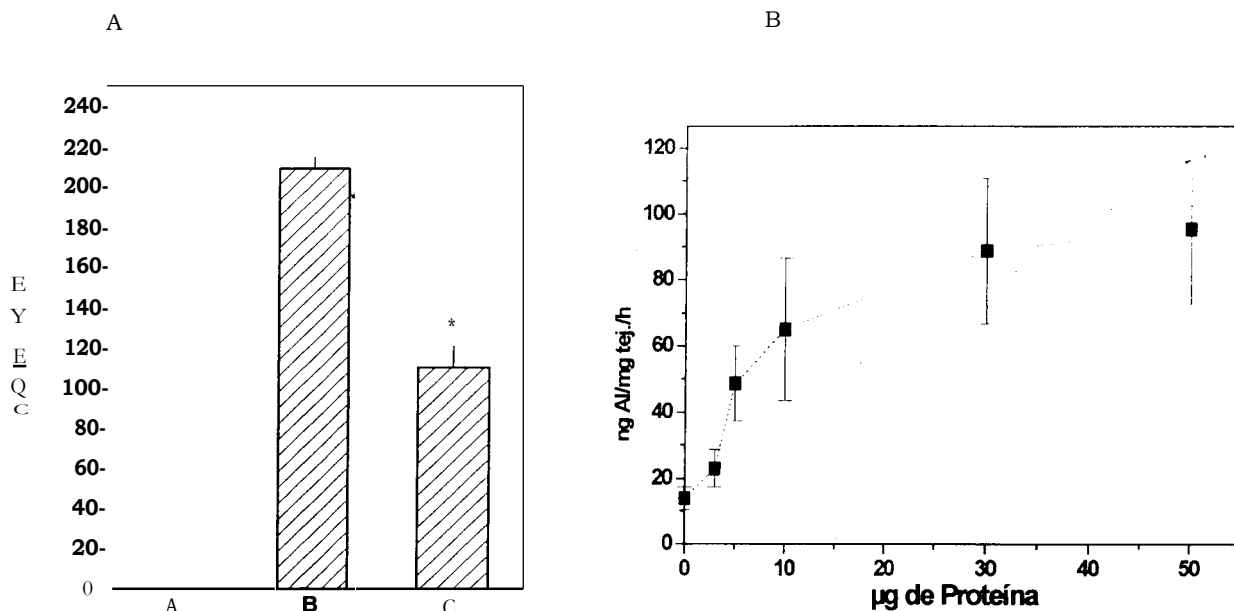


Fig. 2. Panel A: La barra A muestra la concentración de renina activa en homogenatos de corteza renal. La barra B indica la concentración de renina después del tratamiento durante 15 minutos a 37°C con *PreR-Co*. La barra C muestra los valores de renina activa de los homogenatos de corteza renal después del tratamiento con tripsina. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 10 experimentos. * $p < 0,01$. Panel B: Los cuadrados llenos representan la concentración de renina activa luego del tratamiento del homogenato de corteza renal con diferentes cantidades de proteína (*PreR-Co*).

aplicó por segunda vez a la columna Mono Q HR 5/5, un único pico (*PreR-Co*) eluye a 200 mM de NaCl manteniendo su actividad (Figura 1A). Con la columna de inmunoafinidad se alcanzó una purificación de 307 veces y de 485 veces con la primera Mono Q HR 5/5, siendo de 970 veces al final de todo el procedimiento con una actividad específica de 3.182 ng Ang I/mg proteína/h. El sustrato de renina plasmática se controló en cada fracción por incubación de 50 µl de muestra con un exceso de renina de riñón de rata (1,2 µg Ang I/ml/h). No se detectó angiotensinógeno en el pico activo después del pasaje por la segunda Mono Q. La electroforesis en SDS-PAGE seguida de tinción con plata presenta una banda aproximadamente a 37 kDa (Figura 1B). El estudio de la composición de aminoácidos desde el extremo N-terminal dio como resultado la siguiente secuencia: IIGGSMDAKGSFP El rastreo en bancos de datos le asigna una homología del 90% con la cadena (3 de la haptoglobina, 69% con las serina proteasas y 65% con las calicreínas.

Activación de renina inactiva de riñón y plasma por *PreR-Co*: La concentración de renina en homogenatos de corteza renal fue 34 ± 4 ng Ang I/mg de tejido/h. Se encontró un incremento significativo ($p < 0,01$) después de 15 minutos de incubación con 50 µl (10 µg de proteína) de *PreR-Co* (209 ± 7 ng/Ang I/mg tejido/h). Por tratamiento con tripsina, el resultado fue 110 ± 11 ng Ang I/mg tejido/h (Figura 2A). La propiedad de *PreR-Co* de activar la renina

inactiva renal fue anulada por la presencia de 2,0 mM de DFP o de 2,0 mM de PMSF o de 0,23 mM de aprotinina. El resto de los inhibidores, así como el isopropanol no tuvieron ningún efecto sobre la acti-

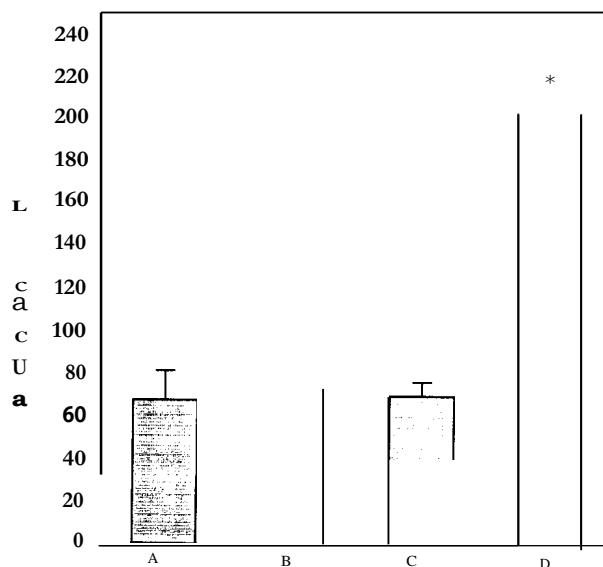


Fig. 3. La concentración de renina plasmática (PRC) se midió en plasma normal (barra A). No se encontró una diferencia significativa cuando plasmas normales se trataron con *PreR-Co* (barra B) o se acidificaron a un pH de $2,8 \pm 0,1$ durante 30 minutos a 25°C y trataron con *PreR-Co* (barra C). La barra D muestra los valores de PRC después del tratamiento con tripsina. Los valores se expresan como la media \pm SEM de 6 experimentos. * $p < 0,01$.

vidad. Cuando el homogenato de corteza renal se incubó con diferentes concentraciones de *PreR-Co*, se observó que la meseta de activación se alcanza con 5 μg de la enzima donde prácticamente el total de la renina inactiva ha sido activada (Figura 2B). La concentración de renina en el plasma normal de ratas fue de $67,6 \pm 13,3$ ng Ang I/ml/h y no se encontró ninguna diferencia significativa ($73,74 \pm 11,1$ ng Ang I/ml/h) después del tratamiento con diferentes cantidades de *PreR-Co* (10 a 50 μg de proteína). También se encontraron resultados similares en plasmas que fueron tratados con 50 μg de *PreR-Co* ($70,2 \pm 0,2$ ng Ang I/ml/h) pero que previamente habían sido acidificados con el objeto de inactivar la mayor cantidad de antiproteasas. El tratamiento con tripsina, por el contrario, aumenta significativamente la PRC ($202,8 \pm 7,8$ ng Ang I/ml/h) (Figura 3).

Actividad amidasa: La actividad amidasa se midió en tres experimentos, en los cuales se vio que 47. μg de enzima fueron capaces de hidrolizar 1 tM del sustrato BAPNA por minuto (actividad específica = 20 U/mg), mientras que 50 μg de papaína (enzima de referencia) hidrolizan 1 tM de BAPNA por minuto.

Actividad esterasa: La habilidad de *PreR-Co* para hidrolizar el sustrato fluorogénico para esterasas (BCECF AM) se muestra en la Figura 4. La actividad esterasa de *PreR-Co* fue abolida por la adición de PMSF 2 mM al medio.

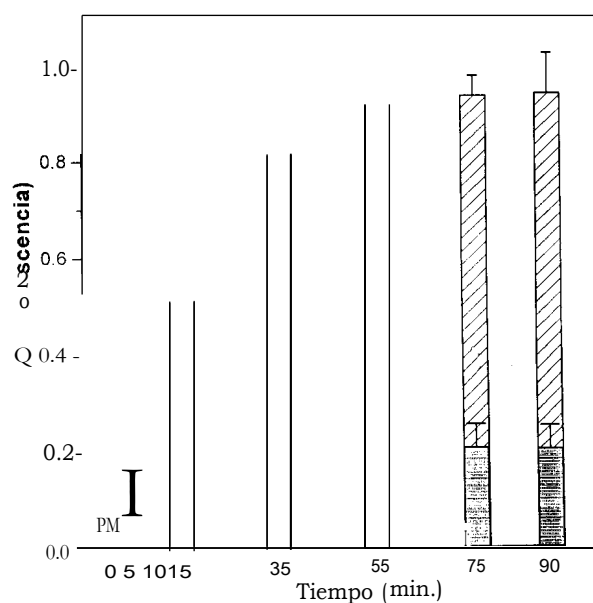


Fig. 4. El ensayo fluorométrico se desarrolló por incubación de 1,0 μl de muestra (0,5 μg de proteína) con 1,0 μl de BCECF AM y 1,5 ml de buffer fosfato 50 mM, pH 7. La emisión a 540 nm con excitación a 500 nm se midió en un espectrofotofluorómetro y se expresó en unidades arbitrarias de fluorescencia. Las barras rayadas representan los valores medios \pm SEM de 4 experimentos. Las barras grises muestran los valores cuando en el medio de la reacción se agrega PMSF.

Actividad quinogenásica: La incubación de *PreR-Co* (4 μg de proteína) con quinógeno de perro produce $25,2 \pm 0,9$ pg de bradiquinina/min/ μg de proteína y no se encontró ninguna diferencia cuando se incubó en presencia de SBTI ($28,3 \pm 0,1$ pg de bradiquinina/min/ μg de proteína). Después del procesamiento de la muestra con tripsina el resultado fue de $23,3 \pm 2,7$ pg de bradiquinina/min/ μg de proteína, lo cual indica que *PreR-Co* no es un precursor activable.

DISCUSION

Las principales conclusiones de este trabajo son: primero, que se aisló una enzima del plasma de ratas capaz de activar la renina inactiva renal y segundo, que esta enzima, contrariamente a lo que se esperaba, no procesa la prorrénina del plasma. Esta enzima estaba en estudio por este laboratorio (6) y durante su investigación se descubrió que la fracción proteica purificada contenía una cantidad importante de albúmina que no era eliminada por los métodos usados de purificación y también cantidades pequeñas de angiotensinógeno que interferían con la identificación precisa de la enzima. En el presente trabajo se muestra que la albúmina se remueve usando un anticuerpo específico anti-albúmina acoplado a Sepharose 4B. Además, el angiotensinógeno fue eliminado por la columna Mono Q HR 5/5. La fracción proteica final muestra una única banda en SDS-PAGE con una masa molecular de aproximadamente 37 kDa. La secuencia N-terminal (IIGSMDAKGSFP) revela una alta homología (90%) con la cadena R de la haptoglobina y también con calicreína (65%), pero no coincide totalmente con ninguna enzima proteolítica conocida. Este hecho hace suponer que *PreR-Co* es una nueva enzima que procesa renina inactiva renal. La haptoglobina es una glucoproteína de la cual, hasta el momento, no se demostró actividad proteolítica, pero que muestra que tiene una fuerte homología con la familia de las serina proteasas. Además, *PreR-Co* tiene la capacidad de hidrolizar uniones éster además de uniones peptídicas y éstas son propiedades comunes en diversas serina proteasas. Por otra parte, *PreR-Co* fractura el quinógeno y también muestra una homología del 65% con las calicreínas, lo que nos hace suponer que la enzima podría pertenecer a la familia de las calicreínas. No obstante, la validación de esta hipótesis requiere que se realicen más investigaciones.

El mecanismo intrínseco de cómo la renina recientemente sintetizada es secretada o almacenada en el riñón es complejo: la renina inactiva renal es una proteína heterogénea debido a su glucosilación variable; (14) la renina activa renal también es una glucoproteína (15) heterogénea respecto del isoelectro-

enfoque, (16) lo cual puede ser debido a la glucosilación diferencial. (17) En el camino secretorio constitutivo de la renina activa parecen prevalecer formas relativamente acídicas de renina, (18) lo cual hace suponer que el procesamiento de renina inactiva a renina activa podría estar regulado por mecanismos de glucosilación. Con referencia a la ruptura del péptido que modula la forma inactiva de renina, existen muchas enzimas capaces de activar la renina inactiva en tejidos, (19) pero la enzima y el mecanismo preciso de conversión todavía se desconoce. Nuestros resultados muestran un aumento significativo en la renina activa después de la incubación de extractos de corteza renal con la *PreR-Co*. Esta observación ciertamente sugiere un mecanismo de activación de alguna enzima generadora de Ang I. Se comprobó que el producto de la activación era renina, ya que un anticuerpo específico contra renina renal de rata neutralizó la actividad generadora de Ang I. (6) Por lo contrario, no se encontró ninguna activación cuando el plasma o las fracciones cromatográficas del plasma que contenían renina inactiva se incubaron con diferentes cantidades de *PreR-Co*. Sin embargo, se observó que tanto la renina inactiva renal como la plasmática fueron activadas con tripsina. El hecho de que inhibidores de proteasa plasmática puedan actuar como inhibidores de *PreR-Co* parece poco probable, porque *PreR-Co* se ensayó en plasmas en los que la mayoría de los inhibidores de proteasas fueron removidos por acidificación y porque la concentración de *PreR-Co* empleada fue suficientemente alta (50 µg) como para ser inhibida por los inhibidores remanentes y más aun porque *PreR-Co* activó la renina inactiva renal de extractos renales en presencia de plasma donde la enzima fue incapaz de activar prorrenina. Este resultado claramente muestra que *PreR-Co* es capaz de procesar la renina inactiva renal pero no la prorrenina plasmática. Estas evidencias nos permiten especular que la renina inactiva del plasma podría tener una conformación diferente de la de la renina inactiva renal, el sitio de acción para *PreR-Co* no estaría expuesto y por lo tanto no sería susceptible de ser atacado por ella.

A pesar de que diversas enzimas fueron propuestas como posibles candidatas para procesar la renina inactiva renal, todavía no se conoce la enzima precisa involucrada en este proceso y, por extensión, no se conoce la posibilidad de que esta enzima pueda interactuar en otros tejidos o con prorrenina de plasma. Kim y colaboradores (20) purificaron una enzima de glándula submandibular de ratón (llamada *prorenin-converting enzyme*), la cual específicamente oliva prorrenina de glándula submandibular de ratón, pero no es activa con la renina renal. Además, no se detectó ninguna actividad presora o vasocons-

trictora después de la infusión endovenosa de prorrenina recombinante. (21) Por otra parte, ratas transgénicas que tienen un gen adicional para la renina (Ren 2) tienen una concentración plasmática elevada de prorrenina, pero la concentración de renina tanto en la sangre como en el riñón permanece normal. (2) Estos dos últimos hallazgos sugieren que la prorrenina del plasma no es la fuente de la renina activa plasmática y que por lo tanto se produce una pequeña conversión o ninguna en la sangre circulante. Esto concuerda totalmente con nuestros resultados, ya que no pudimos encontrar activación de la prorrenina plasmática con una proteína que es totalmente activa en homogenatos de riñón.

Una pregunta atractiva referente a esto es: ¿Por qué una enzima circulante tiene la función de procesar la renina inactiva renal? Probablemente porque el pasaje de renina inactiva a renina activa debe reflejar los cambios y balances que ocurren en la concentración de renina activa circulante. Por otra parte, si se supone que una enzima circulante es la responsable de la activación de la renina inactiva renal, la pregunta sería: ¿Cómo es transportada ésta desde el lugar de síntesis hasta el riñón? De acuerdo con los presentes experimentos, nosotros somos incapaces de definir el mecanismo preciso; sin embargo, el hecho de la dificultad experimental en separar la albúmina ligada a la enzima en el proceso de purificación nos permite especular que la albúmina tendría un papel importante en el transporte de la enzima hasta el sitio de activación.

En resumen, nuestros resultados indican la presencia en el plasma de ratas de una proteína que promueve un incremento de aproximadamente 6 veces en la renina activa cuando se incubaba durante pocos minutos con extracto renal; no obstante, fue incapaz de activar la prorrenina del plasma. Esta enzima fue purificada 900 veces y parece que es una enzima que puede regular la conversión de la forma inactiva a la forma activa en el riñón.

SUMMARY

A PLASMA SERINE PROTEASE WOULD BE RESPONSIBLE OF INACTIVE RENIN PROCESSING IN KIDNEY

The aim of the present research was to characterize a plasma protein fraction (*PreR-Co*) involved in renin activation. The *PreR-Co* was obtained as a single electrophoretic band from rat plasma by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation, Sephacryl S-200 HR, immunoaffinity with an anti-rat albumin and ion-exchange chromatography. The N-terminal amino acid sequence was studied, as well as amidase, esterase and kallikrein activities. Rat kidney extract

(KE) or plasma were incubated with purified *PreR-Co* during 15 minutes at 37°C and renin concentration was measured by incubation with homologous angiotensinogen. Plasma or KE were also activated by trypsin.

Results

The purified enzyme has a molecular weight of 37 kDa and N-terminal amino acid sequence was IIGGSMDAKGSFP, which has 90% homology to the R-chain of haptoglobin, 69% to serine-proteases and 65% to kallikreins. There was a six-fold increase in renin concentration when KE was incubated with purified *PreR-Co* while renin activity increased 4 times when KE was treated with trypsin. The enzyme activity was inhibited by DFP, PMSF and aprotinin. *PreR-Co* was unable to process inactive plasma renin (prorenin) even after addition of up to 50.µg of enzyme (67.6 ± 13.3 and 73.7 ± 11.1 ng Ang I/ml/h).

Conclusions

These results suggest that *PreR-Co* could be a serine protease carried to the kidney by albumin where *PreR-Co* processes inactive renal renin. Consequently, this protease may play an important role in the balance of circulating renin.

Key words Inactive renin - Kidneys - Prorenin - Renin - Renin activation - Renin-angiotensin system

Agradecimiento

Los autores están agradecidos con el Dr. H. L. Nolly por su ayuda en la determinación de la actividad quinínogenásica.

BIBLIOGRAFIA

- De Vito E, Cabrera RR, Fasciolo JC. Renin production and release by rat kidney slices. *Am J Physiol* 1970; 219:1042-1045.
- Morris BJ, Lurnbers ER. The activation of renin in human amniotic fluid by proteolytic enzymes. *Bochim Biophys Acta* 1972; 289: 385-391.
- Leckie BJ. The activation of a possible zymogen of renin in rabbit kidney. *Clin Sci* 1973; 44: 301-304.
- Day RP, Luetscher JA. Big renin: A possible prohormone in kidney and plasma of a patient with Wilms' tumor. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 38: 923-926.
- Schalekamp MA, Derkx FH (Chapter 6), Skinner SL (Chapter 7). En: Robertson JIS, Nicholls MG (eds). The renin-angiotensin system. Kent, UK, Tirnes Mirror Intern Publ Ltd 1993; 1: 6.1-7.14.
- De Vito E, Martínez de Melián ER, Guardia DC. Activation of renal renin by a protein plasma fraction: A novel enzymatic mechanism. *Comp Biochem Physiol* 1996; 113B: 433-438.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-252.
- Cuatrecasas P, Anfinsen CB. Affinity chromatography. *Ann Rev Biochem* 1971; 40: 259-278.
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning. a) A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory 1982.
- De Vito E, Gordon SB, Cabrera RR, Fasciolo JC. Release of renin by rat kidney slices. *Am J Physiol* 1970; 219:1036-1041.
- Johannessen A, Nielsen AH, Poulsen K. Measurement of inactive renin in rat plasma: Effect of nephrectomy and sialoadenectomy on the plasma concentration. *J Hypertens* 1990; 8: 345-349.
- Arnon R. Individual proteolytic enzymes. 14 Papain. En: Perlmann GE, Loran L (eds). *Methods in enzymology*. Vol XIX, Section II. NY, USA, Academic Press 1970; pp 228-230.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical methods* (2a ed). Ames, Iowa, Iowa State University Press 1967.
- Printz MP, Dworschack RT. Evidence for the glycoprotein nature of kidney renin. *Biochim Biophys Acta* 1977; 494:162-171.
- Druilhet RE, Overturf ML. Separation of multiple forms of renin from human, rabbit, hog, and baboon kidney by isoelectric focusing. En: Sambhi MP (ed). *Heterogeneity of renin and renin substrate*. New York, Elsevier North Holland Inc 1981; pp 89-99.
- Khalidi N, Mc Kenzie JK. Isoelectric heterogeneity of human prorenin (inactive renin) in body fluids. *Am J Hypertens* 1991; 4: 56-59.
- Sessler FM, Jacques JA, Malvin RL. Different production and decay rates of six renin forms isolated from rat plasma. *Amer J Physiol* 1986; 250: E551-E557.
- Katz SA, Malvin RL. Secretion of newly synthesized renin. *Endocrinology* 1982; 111: 201-207.
- Shinagawa T, Do YS, Baxter JD, Carilli C, Schilling J, Hsueh WA. Identification of an enzyme in human kidney rat correctly processes prorenin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1927-1931.
- Kirn WS, Nakayama K, Nakagawa T, Kawamura Y, Hara-guchi K, Murakami K. Mouse submandibular gland prorenin-converting enzyme is a member of glandular kallikrein family. *J Biol Chem* 1991; 266: 19283-19287.
- Lenz T, Sealey JE, Maack T y col. Half-life, hemodynamic renal and hormonal effects of prorenin in cynomolgus monkeys. *Am J Physiol* 1991; 260: R804-R810.
- Mullins JJ, Peters J, Canten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; 344: 541-544.