

Propiedades físico-químicas de la arginosuccinato-sintetasa de hígado de cobaya *

G. Soler **, F. J. Mataix *** y M. Ruiz-Amil

Departamento de Bioquímica
Facultad de Veterinaria
Madrid-3

(Recibido el 28 de julio de 1981)

G. SOLER, F. J. MATAIX and M. RUIZ-AMIL. *Physico-Chemical Properties of Guinea Pig Liver Arginosuccinate Synthetase*. Rev. esp. Fisiol., 38, 83-90. 1982.

The behaviour of guinea pig liver arginosuccinate synthetase with respect to pH, temperature and kinetic parameters of substrates and inhibitors has been investigated. The enzyme shows the maximum activity at pH 8 and maximum stability (15 min at 30° C) at pH in the range of 6.5 and 8. With respect to temperature it remains stable (15 min at pH 8) up to 40° C.

The results found for the K_m values of the enzyme substrates L-citrulline, L-aspartate and ATP are 0.038 mM, 0.045 mM and 0.090 mM respectively.

L-ornithine, diaminopimelic acid, pyrophosphate and ATP acted as inhibitors of the enzyme (competitive or not, according to the case). These kinetic studies of substrates and inhibitors were carried out with a partially purified fraction of the enzyme which had been purified 7.3 fold, which practically suppressed the ATP-ase activity, present in crude extracts.

Como continuación de trabajos anteriores (13-15) sobre el ciclo de la urea en hígado de cobaya, se ha investigado el

comportamiento físico-químico de la arginosuccinato sintetasa (ASS) (E.C. 6.3.4.5.), enzima que cataliza la reacción limitante de este ciclo (2, 8, 12). Esta enzima, que ha sido purificada a partir de hígado de rata y bovino y estudiada en lo que se refiere a sus propiedades físico-químicas (9-11), presenta diferencias según el origen y su grado de purificación.

En el presente trabajo se estudia el comportamiento de la arginosuccinato-sintetasa de hígado de cobaya frente al pH y la temperatura, así como sus parámetros cinéticos respecto a substratos e inhibidores.

* Este trabajo ha sido realizado con ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica de la Presidencia de Gobierno y en parte con aparatos donados por la Fundación Alexander von Humboldt.

Dirección actual:

** Medical College of Virginia. Dept. of Biochemistry. Richmond, Va. 23298. U.S.A.

*** Departamento de Fisiología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.

Material y métodos

Reactivos. L-citrulina, L-aspartato y L-lisina procedían de Merck; adenosintrifosfato (ATP), fosfoenolpiruvato (PEP), mioquinasa (MK), piruvatoquinasa (PK), lactato deshidrogenasa (LDH), nicotinamido adenindinucleótido reducido (NADH), pirofosfatasa y ornitina, de Boheringer; y ácido diaminopimélico, pirofosfato y diacetilmonoxina (DAMO) de Sigma. Otros productos químicos utilizados eran de grado analítico.

Material biológico. Se utilizaron hígados de cobayas machos, entre 500 y 600 g de peso, alimentados *ad libitum* con una dieta formada por alfalfa y una mezcla de cebada, avena y salvado de trigo a partes iguales.

Ensayo de actividad enzimática. La actividad enzimática de ASS se determinó en sobrenadantes de extractos crudos, que se prepararon por homogeneización de 2 g de hígado del animal recién sacrificado, por sección de las carótidas, con dos veces su volumen de agua destilada, seguida de centrifugación a 0-4° C durante 30 minutos a 16.000 × g. La medida de la actividad enzimática de la ASS en extracto crudo se realizó utilizando la técnica descrita por SCHIMKE (12), pero determinando la citrulina no consumida por el método de ARCHIBALD (1), y añadiendo pirofosfatasa a la mezcla de reacción para impedir la inhibición por pirofosfato. La mezcla de reacción contenía: Tris-ClH, pH 8, 150 μmoles; L-citrulina, 2 μmoles; L-aspartato, 5 μmoles; Cl₂Mg, 5 μmoles; ClK, 20 μmoles; ATP, 3 μmoles; PEP, 5 μmoles; PK, 4 U.I.; pirofosfatasa, 2 U.I. y 0,05 ml de extracto enzimático, conteniendo aproximadamente 4 mg de proteína. El volumen final fue de 1 ml. La incubación se realizó a 37° C el tiempo adecuado y la reacción se paralizaba por adición de 1 ml de ácido tricloroacético al 5%.

Utilizando extractos crudos se ha determinado la influencia del pH en la actividad y estabilidad de la enzima, así como su estabilidad frente a la temperatura.

En el caso de la actividad en función del pH se hicieron distintos ensayos empleando la mezcla de reacción arriba indicada, pero variando sólo el pH mediante soluciones tampones de distinta naturaleza: tampón de fosfato potásico para pH entre 5,5 y 7,5; tampón Tris-ClH para pH entre 8 y 11.

La influencia del pH sobre la estabilidad enzimática se determinó diluyendo a 1/4 el extracto crudo con los tampones indicados en el caso anterior para los correspondientes pH a la concentración de 0,1 M. Estas diluciones a diferentes pH se mantuvieron 15 min a 30° C, determinándose a continuación la actividad enzimática residual en 0,1 ml de cada muestra por el método ya descrito para extracto crudo. La concentración de proteína de la enzima diluida con los diferentes tampones era aproximadamente de 20 mg/ml.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad enzimática se ensayó diluyendo el extracto crudo a 1/4 con tampón Tris-ClH 0,1 M, pH 8 y manteniendo alícuotas de esta dilución durante 15 min a temperaturas entre 20 y 70° C, con intervalos de 10° C. A continuación se determinó la actividad residual como anteriormente, empleando 0,1 ml de la enzima calentada. La concentración de proteína de la muestra diluida fue de unos 20 miligramos/mililitro.

Los estudios cinéticos se realizaron con enzima parcialmente purificada siguiendo la técnica descrita por RATNER (5, 7) para hígado de bovino, pero realizando solamente los tres primeros pasos, ya que así se consigue un grado de purificación suficiente para nuestros experimentos.

La estimación de la actividad de la enzima parcialmente purificada se realizó de acuerdo con el método de RATNER (7),

que está basado en acoplar la formación de AMP en presencia de MK con el ATP de la mezcla de reacción para producir ADP, cuya velocidad de formación se puede seguir mediante los sistemas PEP-PK y NADH-LDH.

La mezcla de reacción contenía: Tris-CIH, pH 7,5, 150 μ moles; L-citrulina, 6 μ moles; L-aspartato, 15 μ moles; Cl_2Mg , 15 μ moles; ClK, 60 μ moles; ATP, 7,5 μ moles; PEP, 10 μ moles; MK, 2 U.I.; PK, 3 U.I.; pirofosfatasa, 2 U.I. y NADH, 0,5 μ moles con la cantidad adecuada de enzima, en un volumen final de 3 ml.

La proteína se determinó por el método de LOWRY *et al.* (3).

Resultados

Actividad y estabilidad de la enzima en función del pH y de la temperatura. La ASS de hígado de cobaya presenta su máxima actividad a pH 8 y es estable durante 15 min a 30° C a pH comprendido entre 6,5 y 8,0. La figura 1 muestra los resultados obtenidos acerca de la influencia del pH sobre la actividad y la estabilidad de la enzima.

Con respecto a la temperatura, esta enzima se puede considerar estable (15 min a pH 8) hasta 40° C, inactivándose de modo apreciable a partir de esta temperatura.

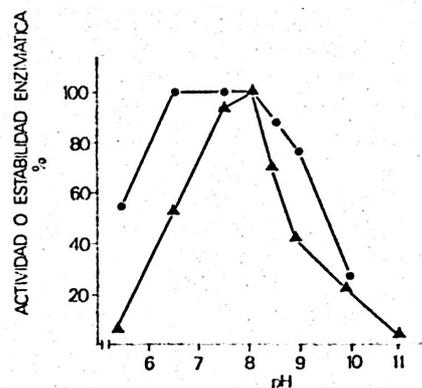


Fig. 1. Actividad y estabilidad de las ASS de hígado de cobaya en función del pH.

Las determinaciones se realizaron como se indica en métodos. Los puntos representados en los gráficos constituyen el valor medio de tres experimentos. (▲) actividad; (●) estabilidad.

Purificación parcial de la ASS de hígado de cobaya. En la tabla I se expresan los resultados de la purificación en la que se observa que, en el tercer paso se ha conseguido un grado de purificación de 7,3 veces, eliminando prácticamente la actividad ATP-ásica.

Constantes cinéticas de la ASS de hígado de cobaya. 1) Constantes de Michaelis aparentes: Los valores de K_m aparentes, empleando la representación de Lineweaver y Burk, fueron, respectiva-

Tabla I. Purificación parcial de la arginosuccinato sintetasa de hígado de cobaya.

| Fracción | Actividad *U/ml | Proteína mg/ml | Volumen ml | Actividad específica U/mg/prot. | Recuperación % | Grado de purificación | Actividad ATPasa U/ml |
|--|-----------------|----------------|------------|---------------------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|
| Extracción del polvo acetónico | 0,169 | 21,2 | 55 | 0,008 | 100 | — | 2,37 |
| Precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ | 0,38 | 10,8 | 17 | 0,035 | 69,60 | 4,42 | 0,76 |
| Adsorción negativa con DEAE-celulosa | 0,41 | 7 | 8 | 0,059 | 35,30 | 7,3 | ≈ 0 |

*U = micromoles transformados por minuto.

mente, 0,038 mM, 0,045 mM y 0,090 mM para L-citrulina, L-aspartato y ATP (figura 2). En los tres casos se observa en mayor o menor grado inhibición por exceso de sustrato. 2) Constantes de inhibición: En la figura 3 se expresa el efecto

que ejercen diversas sustancias sobre el comportamiento cinético de las ASS

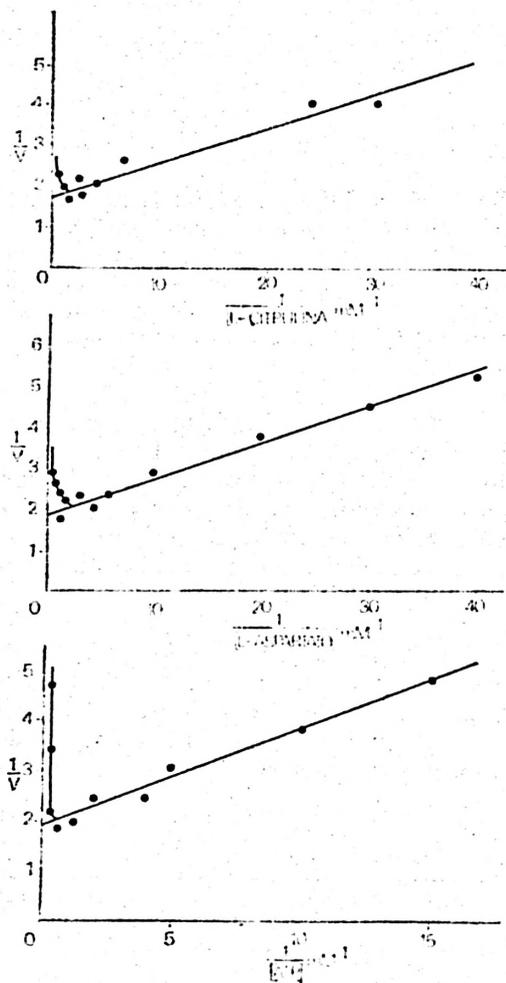


Fig. 2. Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de reacción catalizada por la ASS.

Los puntos representados en los gráficos constituyen el valor medio de tres experimentos. Las rectas han sido ajustadas por el método de mínimos cuadrados.

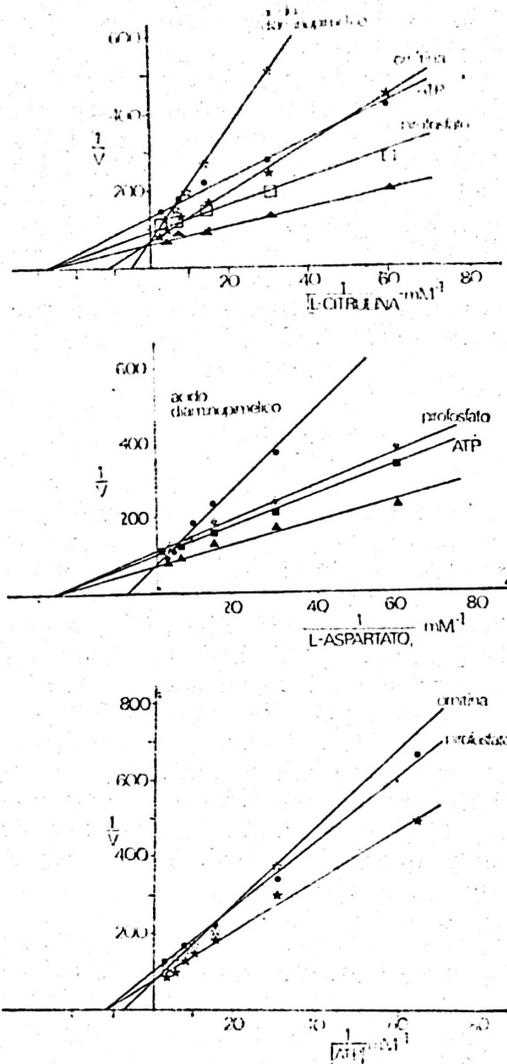


Fig. 3. Inhibición de la ASS por ATP (10 mM frente a L-citrulina y 5 mM frente a L-aspartato), L-ornitina (2 mM), ácido diaminopimélico (1 mM) y pirofosfato (0,05 mM) frente a los sustratos de la reacción.

Los puntos representados en los gráficos constituyen el valor medio de tres experimentos. Las rectas han sido ajustadas por el método de mínimos cuadrados.

Tabla II. Efecto de diferentes sustancias sobre la actividad enzimática de ASS con indicación en su caso de la constante de inhibición [K_i (mM)] y del tipo de la misma.

| Sustancias ensayadas | Substratos | | |
|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| | L-citrulina | L-aspartato | ATP |
| ATP | 15,30 _{nc} | 10,33 _{nc} | — |
| L-ornitina | 1,35 _c | — | 3,55 _c |
| Ac. diamino-pimérico | 0,18 _c | 0,50 _c | — |
| Pirofosfato | 0,11 _{nc} | 0,12 _{nc} | 0,17 _{nc} |

c = inhibición competitiva; nc = no competitiva; — = no se detecta inhibición.

frente a sus substratos. En la tabla II se sumarizan las K_i de los compuestos indicados, así como el tipo de inhibición que presenta cada uno. L-lisina 2 mM no presenta efecto inhibitor detectable.

Discusión

La influencia del pH sobre la ASS ha sido estudiada en distintos organismos; PETRACK y RATNER (4), en hígado de bovino encuentran máxima actividad a pH 8,7, dato que difiere muy poco del hallado por otros autores (11) para rata, que es de 8,4. El pH de máxima actividad encontrado por nosotros para la ASS de hígado de cobaya alcanza el valor de 8, que se aparta ligeramente de los datos anteriormente mencionados.

En cuanto al pH de máxima estabilidad, los resultados muestran que la enzima es estable entre pH 6,5 y 8, lo cual indica que es una enzima bastante apta para ser sometida a un proceso de purificación.

Con respecto al tratamiento térmico, la enzima de hígado de cobaya es estable a temperaturas que concuerdan con las aplicadas por RATNER (7) en la purificación de la ASS de bovino.

La purificación parcial de la ASS se

llevó a cabo con el fin de eliminar la actividad ATP-ásica que interfería la valoración enzimática, obteniendo un grado de purificación de 7,3, muy similar al encontrado por RATNER (7) en idénticas condiciones, y no detectándose en la fracción purificada actividad ATP-ásica.

Los resultados obtenidos en este trabajo con respecto a los valores de K_m para la ASS parcialmente purificada de hígado de cobaya, no difieren grandemente de los encontrados por ROCHOVANSKY y RATNER (9), con la enzima purificada de hígado de bovino y de riñón de cerdo, a excepción del valor para ATP, así como de los valores para la enzima cristalizada de hígado de rata (11). Sin embargo, estos valores se apartan en un orden de magnitud aproximadamente cuando se comparan con los de la enzima cristalizada de hígado de bovino (10), que son más elevados.

En la ASS de bovino (5, 6) se ha puesto de manifiesto un efecto inhibitor del ATP usado a concentración de sustrato, efecto descrito aquí (fig. 3) en la ASS de hígado de cobaya. Basándonos en esta inhibición se ha estudiado el efecto del ATP frente a los restantes substratos de la reacción (L-citrulina, L-aspartato). Las K_i del ATP en estas condiciones fueron 15,3 mM y 10,3 mM, respectivamente. La inhibición encontrada es de tipo no competitivo. Según ROCHOVANSKY *et al.* (10) el efecto inhibitor del ATP encontrado por RATNER (5, 6) indica una cooperatividad negativa en la unión del ATP a la enzima, independiente de la concentración de los substratos aminoacídicos. En nuestros experimentos, con ASS de cobaya, no se observó cooperatividad negativa de este sustrato.

Con respecto al pirofosfato, producto también de la reacción catalizada por la ASS, en la enzima de cobaya se ha puesto de manifiesto una inhibición de tipo no competitivo (fig. 3), cuyas K_i frente a citrulina, aspartato y ATP son 0,11 mM, 0,12 mM y 0,17 mM, respectivamente.

Esta inhibición concuerda con los resultados obtenidos con ASS purificada de bovino por PETRACK y RATNER (4), que pusieron de manifiesto que la síntesis de arginosuccinato era ostensiblemente baja en ausencia de pirofosfatasa. No sucedía lo mismo cuando usaban extractos crudos que contenían pirofosfatasa o cuando se suplementaba la mezcla de reacción con pirofosfatasa exógena. Estos datos sugieren que la pirofosfatasa puede controlar *in vivo* la actividad de la ASS.

Frente a la ASS de hígado de cobaya se ha ensayado una serie de aminoácidos que de un modo u otro están relacionados estructuralmente con el ciclo de la urea (ornitina, lisina y ácido diaminopimélico), los cuales han sido estudiados en relación con su efecto inhibidor. En este contexto se estudia el tipo de inhibición ejercido frente a cada uno de los sustratos de la reacción con los correspondientes cálculos K_i .

Es interesante destacar cómo la ornitina y el ácido diaminopimélico se manifiestan como excelentes inhibidores competitivos frente a la citrulina. Sus bajos valores de K_i indican una posible competencia de estos aminoácidos por la unión al centro activo correspondiente a la citrulina. La K_i para el ácido diaminopimélico está aproximadamente en el orden de magnitud de la K_m para la citrulina.

La ornitina y el ácido diaminopimélico inhiben también la ASS de hígado de cobaya frente a otros sustratos de la reacción. La ornitina frente al ATP, presentando una K_i (3,5 mM), mucho más elevada que la K_m para este sustrato; el ácido diaminopimélico frente al aspartato, con una K_i (0,50 mM), que es un orden de magnitud superior a la K_m del mencionado sustrato. Ambas inhibiciones pueden también explicarse, como en el caso de la inhibición por arginina de esta misma enzima (16), por analogía estructural de algunos grupos funcionales de inhibidores y sustratos.

Resumen

Se investiga el comportamiento frente al pH y la temperatura, y los parámetros cinéticos de los sustratos e inhibidores de la arginosuccinato sintetasa del hígado de cobaya (EC 6.3.4.5.). La enzima exhibe máxima actividad a pH 8 y máxima estabilidad (15 min a 30° C) a pH comprendido entre 6,5 y 8. Con respecto a la temperatura es estable (15 min a pH 8) hasta 40° C.

Respecto a sus sustratos, L-citrulina, L-aspartato y ATP los valores de K_m encontrados para esta enzima son 0,038, 0,045 y 0,09 mM, respectivamente. L-ornitina, ácido diaminopimélico, pirofosfato y ATP se manifiestan como inhibidores (competitivos o no, según el caso) de la enzima. Estos estudios cinéticos de sustratos e inhibidores se han realizado con una fracción parcialmente purificada de la enzima en la que se obtuvo un grado de purificación de 7,3, y en la que estaba prácticamente ausente una actividad ATP-ásica, existente en los extractos crudos.

Bibliografía

1. ARCHIBALD, R. M.: *J. Biol. Chem.*, **156**, 121-142, 1951.
2. GRISOLIA, S.: En «Phosphorus Metabolism», vol. I (Mc Elroy y Glass, eds.). Johns Hopkins. Baltimore, 1952, p. 619.
3. LOWRY, O. H., ROSEBOROUGH, N. J., FARR, A. L. y RANDALL, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
4. PETRACK, B. y RATNER, S.: *J. Biol. Chem.*, **233**, 1494-1500, 1958.
5. RATNER, S.: *Methods Enzymol.*, **2**, 356-367, 1955.
6. RATNER, S.: En «The Enzymes», vol. VI (Boyer, P. D., Lardy, H. y Myrback, K., eds.). Academic Press. Nueva York, 1962, p. 496.
7. RATNER, S.: *Methods Enzymol.*, **17**, 298-303, 1970.
8. RATNER, S.: *Advances Enzymol.*, **39**, 1-90, 1973.
9. ROCHOVANSKY, O. y RATNER, S.: *J. Biol. Chem.*, **242**, 3839-3849, 1967.

10. ROCHOVANSKY, O., KODOVSAKI, H. y RATNER, S.: *J. Biol. Chem.*, 252, 5287-5294, 1977.
11. SAHEKI, T., KUSUMI, T., TAKADA, S., KATUNUMA, T. y KATUNUMA, N.: *FEBS Letters*, 58, 314-317, 1975.
12. SCHIMKE, R. T.: *J. Biol. Chem.*, 237, 459-468, 1962.
13. SOLER, G., MATAIX, F. J. y RUIZ-AMIL, M.: *Anal. Inst. Inv. Vet.*, 25, 247-258, 1978-1979.
14. SOLER, G., MATAIX, F. J. y RUIZ-AMIL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 36, 77-82, 1980.
15. SOLER, G., MATAIX, F. J. y RUIZ-AMIL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 37-44, 1981.
16. SOLER, G., MATAIX, F. J. y RUIZ-AMIL, M.: *Rev. esp. Fisiol.*, 37, 359-362, 1981.

