

Laboratorio de Bioquímica
Facultad de Farmacia
Barcelona

Inducción de ribonucleasas en hongos. III. Cinética de la reacción enzimática *

por

C. M. Cuchillo **, J. M. Ventura, E. Concustell y V. Villar-Palasi

(Recibido para publicar el 11 de febrero de 1967)

En trabajos anteriores (1, 2) se han estudiado los efectos producidos en la inducción de ribonucleasa por *Pleospora* al variar las condiciones de cultivo inductivo, habiéndose procedido asimismo a la purificación de la ribonucleasa inducida (3).

En el presente trabajo se analizan las características cinéticas del proceso enzimático mediante el estudio de la acción ejercida por los principales factores que afectan a la velocidad inicial de reacción: concentración enzimática, concentración de sustrato, tiempo y pH. Al mismo tiempo se comparan los resultados obtenidos utilizando amortiguador Tris/ClH y de fosfatos de igual pH y concentración.

Material y métodos

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD RIBONUCLEÁSICA. Se ha utilizado el método de TANAKA (16) en la determinación del pH óptimo de actividad. En los demás casos se ha utilizado el mismo pro-

cedimiento modificado en el tipo de amortiguador: Tris/ClH 0,2 M, pH 7,5 en lugar de amortiguador de fosfatos de la misma concentración y pH.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN. Se ha obtenido la misma por representación gráfica directa (9), por el método de LINEWEAVER-BURK (7) y mediante el método estadístico de WILKINSON (17).

Resultados

INFLUENCIA DEL TIEMPO Y DE LA CONCENTRACIÓN ENZIMÁTICA. En la Fig. 1 se muestran las curvas del progreso de la reacción enzimática en función del tiempo utilizando concentraciones de ribonucleasa de 5,8; 6,1; 7,5 y 10,4 uni-

* Con una ayuda a la Investigación del Ministerio de Educación Nacional.

** Beneficiario de una Beca de Iniciación a la Investigación. Dirección actual: Department of Biochemistry, University College, London, Gower St., W.C.1.

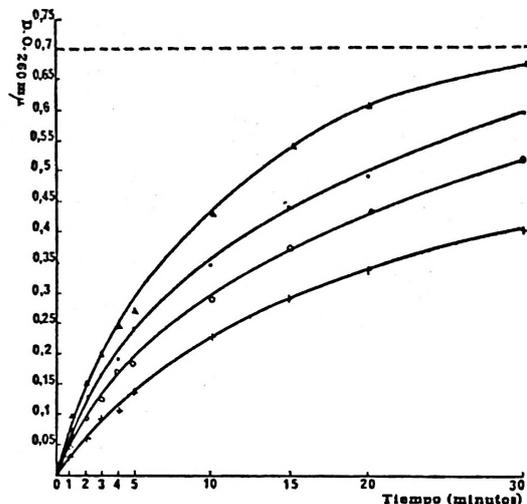


FIG. 1. Velocidad de reacción de la ribonucleasa de *Pleospora*, frente a RNA de levadura: + 5,8 un./ml.; O 6,1 un./ml.; ● 7,5 un./ml.; ■ 10,4 un./ml. La línea a trazos indica el valor límite de la reacción (A).

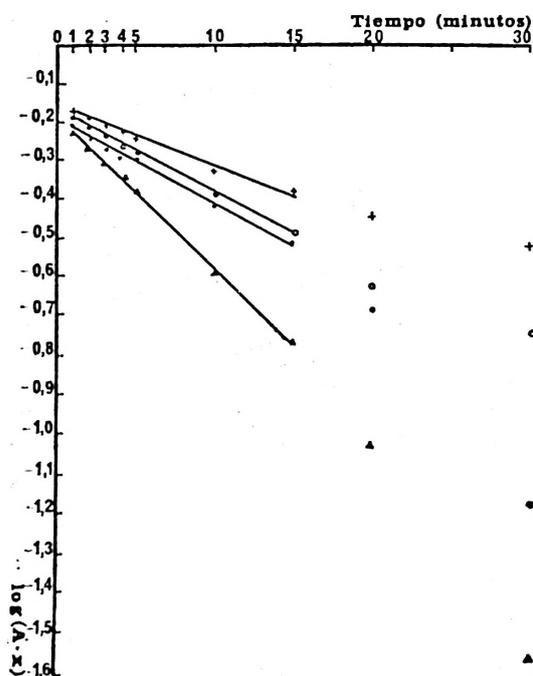


FIG. 2. Velocidad de reacción. Representación de los logaritmos de $(A-x)$ frente al tiempo. Condiciones experimentales: las mismas de la Fig. 1.

dades/ml. El valor límite alcanzado (A) se señala mediante la línea de trazos.

En la figura 1 se representan los logaritmos de $(A-x)$, en donde x es el valor obtenido en un momento dado, frente al tiempo de incubación.

DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE MICHAELIS-MENTEN Y DE LA VELOCIDAD MÁXIMA DE REACCIÓN. Para la determinación de la constante de Michaelis y al mismo tiempo de la velocidad máxima de reacción se ha obtenido la actividad ribonucleásica utilizando las siguientes concentraciones finales de RNA (en mg/ml): 0,05; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,250; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0.

En la figura 3 se representa la determinación de la constante de Michaelis por el método de LINEWEAVER-BURK.

Los valores obtenidos mediante el método de WILKINSON son los siguientes: $K_m^o = 0,0985471$ (a); $V^o = 0,2730530$ (b).

Ajuste fino de ambos parámetros: $K_m = 0,0985482$ (a); $V = 0,2730924$ (b). (a) expresada en mg/ml de RNA. (b) expresada en unidades de D.O. a $260 \mu/15$ min.

pH ÓPTIMO DE ACTUACIÓN. Los resultados obtenidos en la determinación de la actividad ribonucleásica a distin-

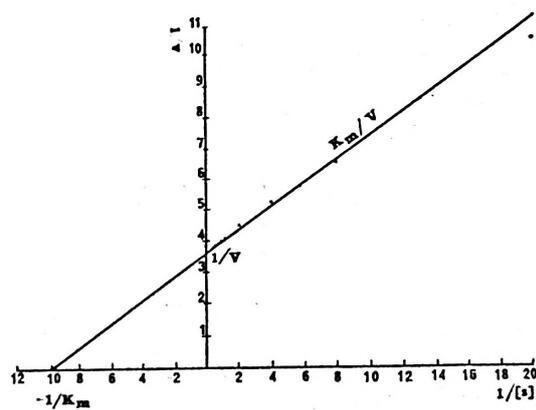


FIG. 3. Determinación de la constante de Michaelis por el método de LINEWEAVER-BURK.

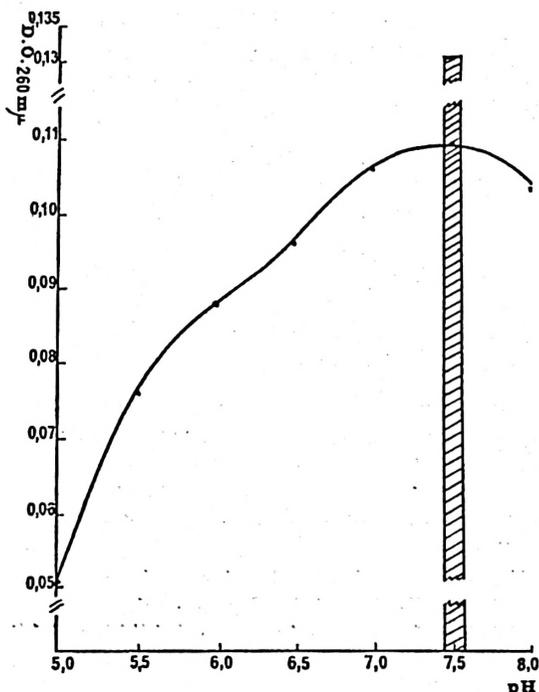


FIG. 4. Actividad de la ribonucleasa de *Pleospora* en función del pH. Línea continua : en amortiguador de fosfatos : Banda rayada : actividad a pH 7,5 en amortiguador Tris/ClH.

tos valores de pH en amortiguador de fosfatos 0,2 M, se representan en la figura 4. En la misma figura se indica igualmente la actividad obtenida utilizando amortiguador Tris/ClH 0,2 M, pH 7,5.

Discusión

En su comportamiento cinético frente a RNA de levadura, la ribonucleasa inducida de *Pleospora* sigue un patrón similar al de la mayoría de enzimas conocidos.

La acusada curvatura que presenta la gráfica de la actividad ribonucleásica en función del tiempo (Fig. 1) hace que sea difícil la obtención de las velocidades iniciales mediante el trazado de tangentes en el punto inicial, por lo que se ha utilizado un método indirecto represen-

tando los logaritmos de (A-x) frente al tiempo. La linealidad de la gráfica, al menos en los tiempos iniciales indica que se cumple la ecuación que define las reacciones de primer orden

$$k = \frac{2,303}{t} \log \frac{A}{A - x}$$

en donde *k* es una constante de proporcionalidad conocida como velocidad de reacción específica y *t* es el tiempo.

Sabido es que el mecanismo degradativo de la ribonucleasa sobre RNA se produce en dos etapas (18) : la primera, formación de un diéster cíclico entre el fosfato y los carbonos 2' y 3' de la ribosa y la segunda, desciclación del mismo con producción del éster 3' fosfórico, según el esquema (Fig. 6) :

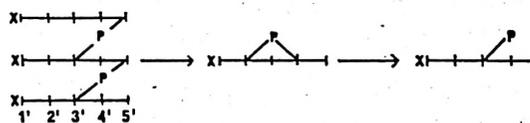


FIG. 5. Esquema de la reacción catalizada por la ribonucleasa. (Véase texto).

en el que *x* indica una base — púrica o pirimídica — y *P* el grupo fosfato, estando representada la ribosa por la línea recta en la que se señalan los cinco carbonos numerados. El progreso de la reacción depende de la especificidad de la ribonucleasa objeto de estudio respecto al tipo de bases del RNA utilizado como sustrato.

Dado que las dos etapas señaladas presentan unas características cinéticas claramente definidas (12, 18) la evaluación de la constante de Michaelis utilizando RNA como sustrato no proporciona un parámetro que defina exactamente la afinidad del enzima por el sustrato, sino sólo una idea del total de la reacción. En este sentido se ha calculado la constante de Michaelis y la velocidad máxima de reacción para la concentración de enzima utilizada.

Los resultados obtenidos con los tres métodos diferentes muestran una gran concordancia, estimándose como el más preciso el valor obtenido según el método de WILKINSON (17) debido a la posibilidad de obtener un ajuste fino de los parámetros objeto de estudio.

La constante de Michaelis obtenida para la ribonucleasa adaptativa de *Pleospora* es inferior a las de las ribonucleasas de bazo y orina humanas (4) así como a las de alfalfa y barsim (8), lo que demuestra que la afinidad aparente hacia el sustrato es muy alta.

La ribonucleasa de *Pleospora* presenta un pH óptimo de actuación de 7,5 en amortiguador de fosfatos. El pH óptimo de las diferentes ribonucleasas conocidas varía entre amplios límites, desde 4,5 para la de germen de *Lolium multiflorum* (15) y *Taka-Diastasa T₂* (14) hasta 8,2 para la ribonucleasa de tejido adiposo de rata (5) y 8,5 para la de *Thiobacillus thioparus* (11). Varias ribonucleasas presentan un pH óptimo de actuación del orden del de la ribonucleasa de *Pleospora*, así la ribonucleasa A de páncreas de buey presenta la máxima actividad a pH 7,7 (6), la de suero de rata y de cobaya a 7,4 (13), la ribonucleasa T₁ de *Taka-Diastasa* (14) y la de *Bacillus subtilis* (10) ambas con un pH óptimo de actividad de 7,5.

La determinación de la actividad ribonucleásica a pH 7,5 alcanza un valor 1,6 veces mayor cuando se utiliza amortiguador Tris/CeH que cuando se utiliza amortiguador de fosfatos de la misma concentración, actuando el ion fosfato como inhibidor débil de la actividad ribonucleásica.

Conclusiones

El progreso de la degradación del RNA por la ribonucleasa de *Pleospora* sigue las características de la cinética de primer orden, al menos en sus estadios iniciales.

La constante de Michaelis de la ribonucleasa inducida en *Pleospora* frente a RNA de levadura presenta un valor de $9,8 \times 10^{-3}$ gr/100 ml.

El pH óptimo de actividad es de 7,5, actuando el ion fosfato como inhibidor débil de la reacción enzimática.

Resumen

Se han estudiado las características cinéticas más importantes de la reacción de degradación del RNA de levadura catalizada por la ribonucleasa inducida en *Pleospora*, en función de la concentración enzimática, concentración de sustrato, tiempo y pH.

La reacción transcurre según la cinética de primer orden, al menos en sus primeros estadios, presentando un pH óptimo de actuación de 7,5 y siendo el valor de la constante de Michaelis de $9,8 \times 10^{-3}$ g/100 ml.

El ion fosfato actúa como inhibidor débil de la ribonucleasa adaptativa de *Pleospora*.

Summary

Induction of ribonucleases in fungi.
III. Kinetics of the enzymatic reaction.

The most important aspects of the kinetics of the breakdown of yeast RNA by the action of the *Pleospora*-induced ribonuclease have been studied. Factors involved in this study were enzyme concentration, substrate concentration, time and pH.

Through the reaction, first-order kinetics are observed, at least during the early stages of the reaction; the optimal pH has a value of 7.5 and the Michaelis-Menten constant has a value of 9.8×10^{-3} gr/100 ml.

Phosphate ions act as weak inhibitors of the *Pleospora* adaptative ribonuclease.

Bibliografía

1. CUCHILLO, C. M., CONCUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V.: *R. esp. Fisiol.*, **22**, 19, 1966.

2. CUCHILLO, C. M., VENTURA, J. M., CON-
CUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : Comu-
nicación al VII Congreso de la Sociedad
de Farmacia del Mediterráneo Latino.
Burdeos, 1966 (en prensa).
3. CUCHILLO, C. M., VENTURA, J. M., CON-
CUSTELL, E., y VILLAR-PALASÍ, V. : *R. esp.
Fisiol.*, **23**, 81, 1967.
4. DELANEY, R. : *Biochemistry*, **2**, 438, 1963.
5. EICHEL, H. J., FIGUEROA, E. M., and GOL-
DENBERG, E. K. : *Biochim. Biophys. Acta*,
51, 216, 1961.
6. KUNITZ, M. : *J. Gen. Physiol.*, **24**, 15,
1940.
7. LINEWEAVER, H., and BURK, D. : *J. Am-
Chem. Soc.*, **56**, 658, 1934.
8. MARTÍN, J. : Tesis Doctoral, Barcelona.
9. MICHAELIS, L., and MENTEN, M. L. : *Bio-
chem. Z.* **49**, 333, 1913.
10. NISHIMURA, S. : *Biochim. Biophys. Acta*,
45, 15, 1960.
11. OSTROWSKI, W. L. and WALCZAR, Z. : *Acta
Biochem. Polon.* (Trad. inglesa), **8**, 345,
1961.
12. RABIN, B. R., and MATHIAS, A. P. : Mos-
bacher Colloquium der gesellschaft für
physiologische Chemie, n.º 14, Mosbach,
Baden, 97, 1963.
13. RABINOVITCH, M., and DOHI, S. R. : *Arch.
Biochem. Biophys.*, **70**, 329, 1957.
14. SATO, K., and EGAMI, F. : *J. Biochem.*
(Tokyo), **44**, 753, 1957.
15. SHUSTER, L. : *J. Biol. Chem.*, **229**, 289,
1957.
16. TANAKA, K. : *J. Biochem.* (Tokyo), **50**,
62, 1961.
17. WILKINSON, G. N. : *Biochem. J.*, **80**, 324,
1961.
18. WITZEL, H. : en DAVIDSON, J. N., y
COHN, W. E. : *Progress in Nucleic Acid
Research*, Vol. II, Academic Press, New
York, 221, 1963.

