

Inhibición de la adenosín-desaminasa por nucleótidos adenílicos

M. Sopena, F. Pallardó y J. Cabo

Cátedra de Bioquímica y Fisiología
Facultad de Medicina
Valencia (España)

(Recibido el 21 de mayo de 1971)

M. SOPENA, F. PALLARDO and J. CABO. *Inhibition of Adenosin-desaminase by Adenine-nucleotides*. R. esp. Fisiol., 27, 311-316. 1971.

From a biochemical point of view, we think that inhibition of adenosin-desaminase by adenine-nucleotides represents a cybernetic mechanism, a positive feed-back which could act as a regulator of this nucleotides synthesis.

From a physiological point of view, we postulate that the role attributed to adenine-nucleotides as regulators of coronary flux may be mediated through adenosine, as results of inhibition of adenosin-desaminase, enzyme which provides the hydrolytic deamination of the nucleoside.

In the present paper it has been studied the kinetics of the inhibition of adenosin-desaminase by adenine-nucleotides. The amount of inhibition found was 8, 12 and 25 % for concentrations of 0.08 mM of AMP, ADP and ATP respectively, and 23, 26 and 40 % for concentrations of 0.16 mM. Present findings accord with values of K_i of 0.024 mM for ATP, 0.032 mM for ADP and 0.038 mM for AMP. We suggest that this may be due to the influence of the phosphoric chain on the affinity of the enzyme for each nucleotide.

Desde hace algunos años se viene concediendo gran importancia a los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP, AMP) como efectores alostéricos de numerosos enzimas (6, 8, 9, 20, 21). En este sentido, merece destacarse el trabajo de SCARANO *et al.* (13) sobre la regulación de la dCMP-aminohidrolasa, enzima que, por el mismo mecanismo que la adenosín-desaminasa, consigue la desaminación hidrolítica del dCMP a dUMP. Su actividad se encuentra regulada por un activador alostérico, el dCTP-Mg, y un inhibidor alostérico, el dTTP-Mg. Estos efectores

determinan un cambio en la afinidad de los sitios catalíticos del enzima, para el sustrato y para los inhibidores competitivos del enzima; sobre esta base, SCARANO *et al.* (13) llegan a proponer una hipótesis acerca del control del *pool* de los precursores de la biosíntesis del DNA (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

Desde el punto de vista fisiológico, hace ya algún tiempo que se viene atribuyendo a la adenosina y sus derivados nucleotídicos un papel primordial en la regulación metabólica del flujo coronario (1-4, 7, 17-19). En este sentido, en una serie de

trabajos nuestros anteriores (10, 14-16), hemos demostrado que el dipiridamol, conocida droga antianginosa, tiene un marcado efecto inhibitor de la adenosín-desaminasa, de donde puede deducirse que la adenosina es el mediador químico de la acción de la citada droga.

En el presente trabajo se estudia el efecto de los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP y AMP) sobre la actividad de la adenosín-desaminasa. Desde un punto de vista bioquímico, era presumible que dichos nucleótidos al presentar una estructura química tan similar al sustrato del enzima (adenosina), pudieran determinar alguna modificación en su actividad, tal como ser degradados por él, o inhibir a éste en competencia con el sustrato específico. Esta última posibilidad presentaba tanto más interés cuanto que una de las vías para la biosíntesis de los nucleótidos adenílicos parte precisamente de la adenosina.

Desde un punto de vista fisiológico, el estudio de las modificaciones de la actividad de la adenosín-desaminasa por los nucleótidos adenílicos, podría aclarar la participación de éstos en la regulación del flujo coronario, permitiendo diferenciar si lo hacen por una actuación directa o es mediada por la adenosina, según demos-tramos con el dipiridamol.

Material y métodos

El enzima (EC 3.5.4.4), la adenosina y los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP, AMP) fueron proporcionados por la Boehringer Mannheim. La actividad enzimática se ha determinado mediante espectrofotometría, persiguiendo el descenso de la absorbancia a 265 $m\mu$, según la técnica de KALCKAR (5). Dicho descenso de la absorbancia corre paralelo con la desaparición de la adenosina por transformación en inosina.

La primera serie de experiencias ha sido considerada como testigo, al objeto de comprobar la actividad enzimática de la

adenosín-desaminasa en ausencia de cualquier otra sustancia frente al sustrato específico, la adenosina. Para ello, se incu-tura constante de 25°, 40 μ g de adenosín-baron durante 10 minutos a la tempera-desaminasa en 1 ml de tampón TRIS-HCl, 0,1 M a pH 7,4. Se tomaron mues-tras de 20 μ l y se añadieron a las cubetas del espectrofotómetro conteniendo 3 ml de una solución de adenosina a concen-traciones de 30, 60, 75, 90, 120 y 150 μ M en tampón TRIS-HCl 0,1 M a pH 7,4.

Tras la adición de muestras de 20 μ l del enzima diluido a las distintas cubetas, éste quedaba siempre a la concentración de 0,26 μ g/ml. Hemos empleado esta concen-tración de enzima y no otra, porque, tras los ensayos iniciales con diferentes concentraciones de sustrato, las gráficas obtenidas por el procedimiento de Lineweaver-Burk, demostraban que la recta correspondiente a la cinética de la reac-ción enzimática, queda en una posición con respecto a los ejes de coordenadas en que puede verse con máxima claridad cualquier desviación determinada por ac-tivadores — desplazamiento hacia abscis-sas de dicha recta — o inhibidores — des-plazamiento hacia ordenadas.

Antes de la realización de las experien-cias que se describen a continuación, se ha investigado la posibilidad de que los nucleótidos adenílicos (ATP, ADP, AMP) pudieran ser sustratos del enzima objeto de estudio. Los resultados obtenidos ex-cluyeron de forma indudable tal posibi-lidad.

En una serie de experiencias posterio-res, se investigó la posible inhibición en-zimática por los diversos nucleótidos ade-nílicos. Comenzando por el ATP, se pro-cedió a incubar durante 10 minutos y a temperatura constante de 25°, mezclas que contenían por ml: 40 μ g de adenosín-desaminasa, 0,80-0,16 μ moles de ATP y tampón TRIS-HCl 0,1 M y pH 7,4; con idéntico proceder a las experiencias tes-tigo, se añadieron muestras de 20 μ l de la mezcla incubada, a las cubetas del es-

pectrofotómetro que contenían el sustrato (adenosina) a las mismas concentraciones que hemos descrito para las experiencias testigo.

Se realizaron dos series más de experiencias para investigar la posible inhibición determinada por el resto de los nucleótidos adenílicos (ADP y AMP), procediéndose de idéntica forma a la descrita para el ATP y empleando concentraciones equimoleculares a la de éste, en las mezclas de incubación.

Resultados

La figura 1 corresponde a la cinética de la reacción catalizada por la adenosín-desaminasa y su inhibición por el ATP, expresada por el método de Lineweaver-Burk. En ella puede comprobarse la naturaleza competitiva de la inhibición ocasionada por el ATP a las concentraciones de 0,08 y 0,16 mM.

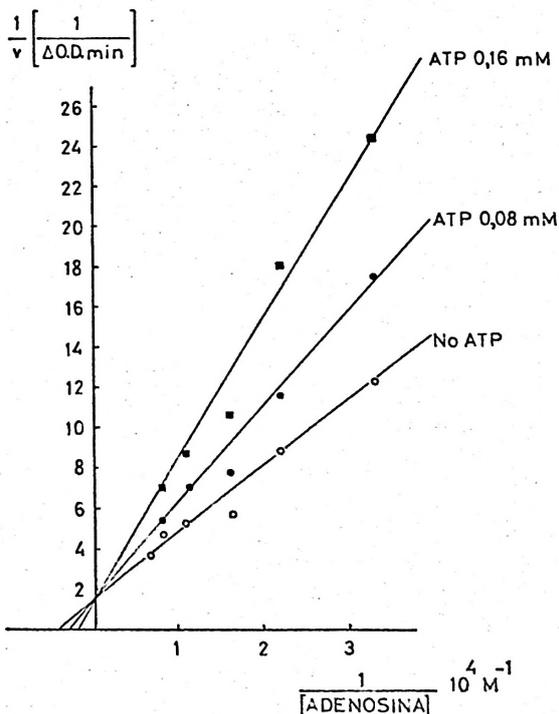


Fig. 1. Cinética de la inhibición de la adenosin-desaminasa por el ATP, expresada por el método de Lineweaver-Burk. Concentración de enzima: 40 µg/ml en la incubación.

En la figura 2 A se representa dicha inhibición ocasionada por el ATP, relacionando la velocidad inicial de la reacción con la concentración de ATP.

En la figura 2 B se representa dicha inhibición ocasionada por el ATP, relacionando la velocidad inicial de la reacción con la concentración de ATP.

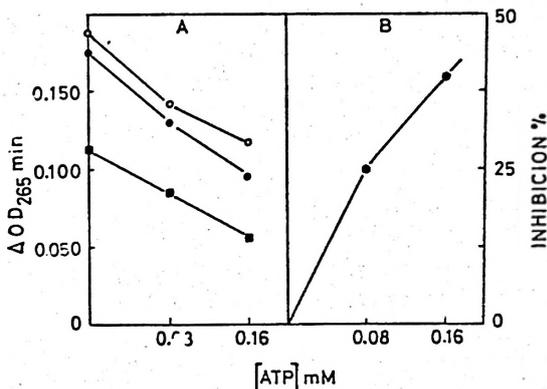


Fig. 2

A) Velocidad inicial de reacción frente a la concentración de ATP. Iguales condiciones experimentales que en la figura anterior. Concentraciones de adenosina: (O) 90 µM, (●) 60 µM, (■) 45 µM.

B) Inhibición enzimática en porcentaje frente a las concentraciones de ATP empleadas. Se ha dado el valor del 100 % a la actividad enzimática en ausencia de ATP.

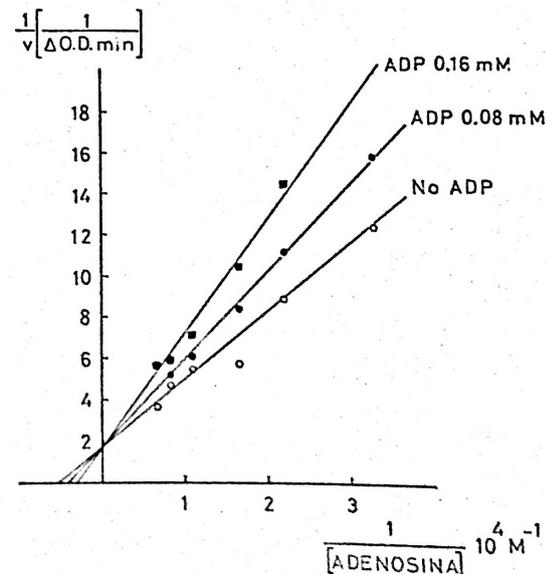


Fig. 3. Cinética de la inhibición de la adenosin-desaminasa por el ADP, expresada por el método de Lineweaver-Burk.

ción frente a la concentración de inhibidor, utilizando tres concentraciones de sustrato (90, 60 y 45 μM por adenosina). Puede comprobarse que el grado de inhibición corre paralelo con la concentración empleada de inhibidor. En la figura 2 B se expresa el porcentaje de la inhibición

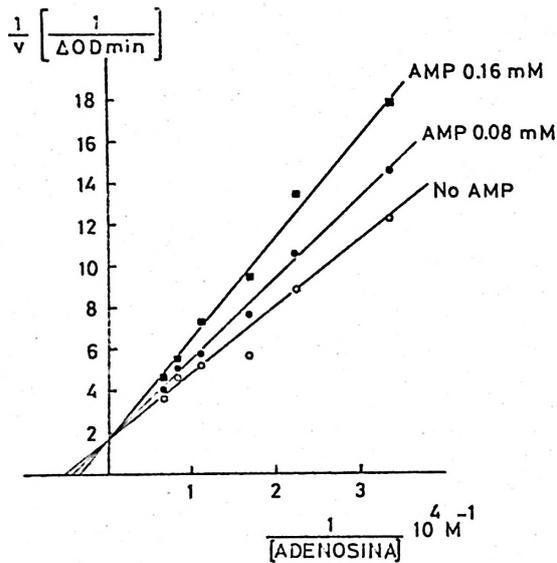


Fig. 4. Cinética de la Inhibición de la adenosin-desaminasa por el AMP, expresada por el método de Lineweaver-Burk.

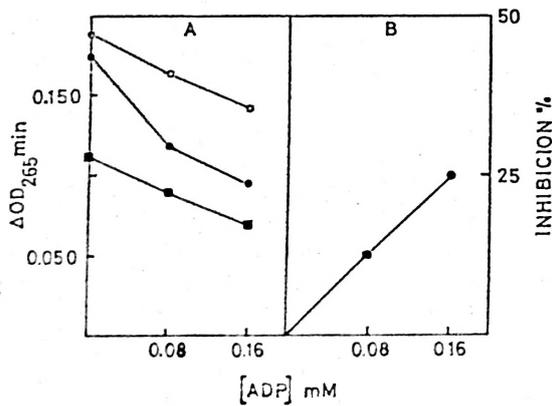


Fig. 5. Inhibición de la adenosin-desaminasa por el ADP.

A) Valor de la velocidad inicial de la reacción frente a las concentraciones de ADP empleadas. Igual concentración de enzima que en las anteriores experiencias.
B) Inhibición en porcentaje frente a las concentraciones empleadas de ADP.

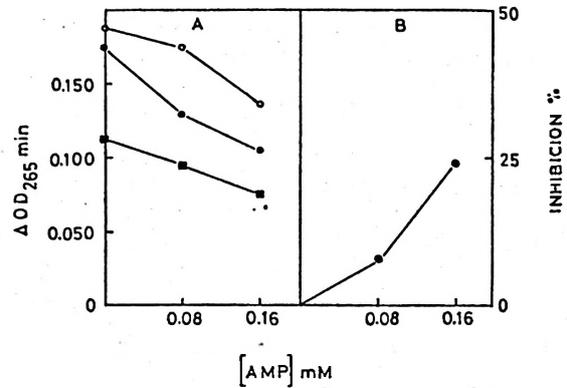


Fig. 6

Igual que la figura anterior pero empleando AMP como inhibidor.

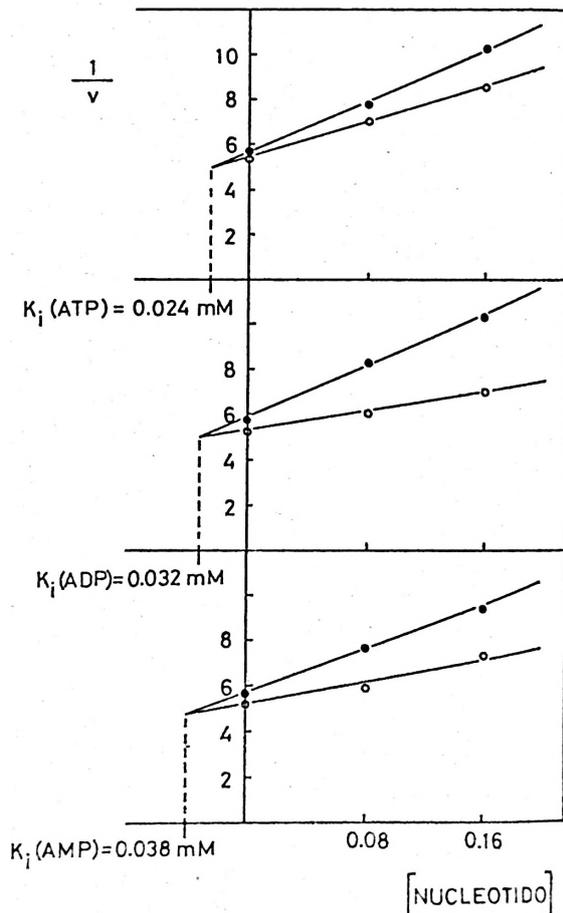


Fig. 7. Representación de Dixon para el cálculo del valor de K_i para los tres nucleótidos inhibidores de la adenosin-desaminasa.

en función de la concentración de inhibidor, obteniéndose una inhibición del 25 y 40 % con concentraciones de 0,08 y 0,16 mM de ATP, respectivamente.

En las figuras 3 y 4 se expresa la cinética enzimática y la inhibición ocasionada por el ADP y AMP al emplear ambos a concentraciones equimoleculares a las mencionadas para el ATP, observándose una progresiva disminución de la intensidad de la inhibición sin que se modifique la naturaleza competitiva de la misma.

El grado de inhibición ocasionado por estos dos nucleótidos (ADP y AMP) queda expresado en las figuras 5 y 6, obteniéndose una inhibición del 12 y 25 % para concentraciones 0,08 y 0,16 mM de ADP, y una inhibición del 8 y 23 % para las mismas concentraciones de AMP.

El valor de K_i para los tres nucleótidos adenílicos queda expresado por el método de Dixon (fig. 7) al relacionar el valor inverso de la velocidad inicial de la reacción enzimática frente a las concentraciones empleadas de inhibidor. Se han obtenido los valores de 0,024, 0,032 y 0,038 mM para el ATP, ADP y AMP, respectivamente.

Discusión

Dada la similitud estructural existente entre el sustrato (adenosina) y los nucleótidos adenílicos, es lógico que la naturaleza de la inhibición por éstos ocasionada sea de la variedad competitiva, pues ambos (sustrato e inhibidores) deben competir por el mismo lugar de unión o lugar catalítico del enzima. En efecto, tanto los nucleótidos como la adenosina muestran una fracción no polar — el núcleo purínico — a través del cual pueden establecer enlaces de tipo hidrofóbico con regiones del enzima dotadas de una elevada proporción de residuos no polares, como ya ha sido demostrado para el sustrato (11, 12).

De los resultados descritos en el apartado anterior, puede deducirse igualmente que el orden de sucesión de los nucleóti-

dos adenílicos en cuanto a la intensidad de la inhibición enzimática por ellos ocasionada, se encuentra en relación con la longitud de su cadena fosforada. Por otro lado, estos resultados se encuentran en concordancia con los valores de K_i progresivamente crecientes para cada nucleótido a medida que aumenta la longitud de dicha cadena fosforada, lo que indica una disminución progresiva de la afinidad del enzima para cada nucleótido.

A la vista de los resultados obtenidos la inhibición de la adenosín-desaminasa por los nucleótidos adenílicos, parece tener una importante proyección bioquímica y fisiológica. Desde el punto de vista bioquímico, esta inhibición enzimática induce a formular una hipótesis acerca de la regulación de la vía adenosín-kinásica empleada para la síntesis de los propios nucleótidos adenílicos, en el sentido de que éstos, al inhibir la degradación de la adenosina, aumentarían el *pool* de ésta, siendo susceptible de ser fosforilada por la adenosín-kinasa en presencia de ATP, con formación de AMP y ADP. Posteriormente, la resíntesis de ATP a partir de estos dos nucleótidos es sencilla, perpetuándose así el mecanismo según un sistema de *feed-back* o retroalimentación positiva (fig. 8).

La segunda proyección de la inhibición de la adenosín-desaminasa por los nucleótidos adenílicos es de índole fisiológica. Habiendo sido establecido que el consumo de oxígeno por parte del miocardio es el factor metabólico principal en la regulación del flujo coronario, han

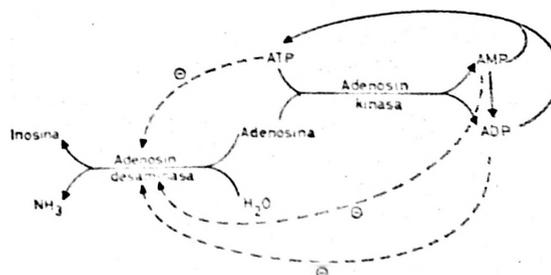


Fig. 8. Hipótesis de la regulación por «*feed-back*» de la síntesis de nucleótidos adenílicos.

surgido numerosas hipótesis acerca del mediador químico encargado de transmitir las órdenes generadas por la hipoxia miocárdica al sistema arterial coronario. Entre estos mediadores se han citado metabolitos resultantes de la actividad cardíaca en condiciones de hipoxia (ácido láctico, sustancias P de Lewis, etc.), liberación local de catecolaminas o de AMP-3',5'-cíclico, etc.

Sin embargo, recientemente se ha atribuido a la adenosina y sus derivados nucleotídicos el papel de mediadores en la vasodilatación coronaria generada por la hipoxia, tal y como ya hemos reseñado en trabajos anteriores (10, 14-16). Igualmente, y como consecuencia de ello, se ha formulado la hipótesis del papel de la adenosina como mediador de la acción coronario-dilatadora de numerosas drogas antianginosas (1-4, 7, 17-19). En este sentido, se demostró que el dipiridamol es un inhibidor competitivo de la adenosín-desaminasa (10, 14), por lo que su acción coronario-dilatadora hay que interpretarla como resultante del acúmulo de adenosina consecutivo a la inhibición enzimática por él ocasionada.

Basándonos en las experiencias anteriores se puede formular la hipótesis de que la participación de los nucleótidos adenílicos en la regulación del flujo coronario tenga igualmente como mediador químico a la adenosina, puesto que se comportan como inhibidores competitivos de la adenosín-desaminasa.

Resumen

Se estudia la cinética de la inhibición de la adenosín-desaminasa por los nucleótidos adenílicos. La intensidad de la inhibición ocasionada ha sido del 8, 12 y 25 % para una concentración 0,08 mM de AMP, ADP y ATP, respectivamente; y del 23, 26 y 40 % para una concentración 0,16 mM de los tres nucleótidos. Estos resultados se encuentran en concordancia con los valores de K_i de 0,024 mM para el ATP, 0,032 mM para el ADP y de 0,038 mM para el AMP. Se atribuyen dichos resul-

tados a la influencia de la longitud de la cadena fosforada sobre la afinidad del enzima para cada nucleótido.

Bibliografía

1. AFONSO, S. y O'BRIEN, G. S.: *Circulation Res.*, **20**, 403, 1967.
2. AFONSO, S. y O'BRIEN, G. S.: *Physiologist.*, **9**, 129, 1966.
3. BONATI, F.: Conferencia pronunciada en el Congreso Farmacológico de Praga. 1963.
4. DEUTICKE, B. y GERLACH, E.: *Arch. Pharm. Exp. Path.*, **225**, 107, 1966.
5. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 445, 1947.
6. KREBS, E. G. y FISCHER, E. H.: *Ad. Enzymol.*, **24**, 263, 1962.
7. KUBLER, W., BRESTSCHNEIDER, H. J., GREBE, D. y ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, **297**, 61, 1967.
8. MANSOUR, T. E.: *J. Biol. Chem.*, **238**, 2285, 1963.
9. POGSON, C. I. y RANDLE, P. I.: *Biochem. J.*, **100**, 683, 1966.
10. RODRIGO BAEZA, F. J.: Tesina de Licenciatura. Valencia, 1970.
11. RONCA, G., BAUER, C. y ROSSI, C. A.: *Europ. J. Biochem.*, **1**, 434, 1967.
12. RONCA, G., BAUER, C. y ROSSI, C. A.: *Boll. Soc. Ital. Sper.*, **41**, 22, 1965.
13. SCARANO, E., ROSSI, M. y GERACI, G.: In «Regulation of Enzyme Activity and Allosteric Interactions». Academic Press London, 1967.
14. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., RODRIGO, F. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **26**, 303, 1970.
15. SOPENA, M., VIÑA, J., CALDERÓN, J., PALLARDO, F., RODRIGO, F. y CABO, J.: *R. esp. Fisiol.*, **27**, 49, 1971.
16. SOPENA, M., VIÑA, J., PALLARDO, F. y CABO, J.: Experiencias no publicadas.
17. SPIECKERMANN, P. G., BRESTSCHNEIDER, H. J., GREBE, D., KUBLER, W. y ORELLANO, L. E.: *Pflug. Arch. Ges. Physiol.*, **297**, 62, 1967.
18. STAFORD, A.: *Brit. J. Pharmacol.*, **28**, 218, 1966.
19. STAFORD, A.: *Nature*, **214**, 390, 1967.
20. TAKETA, K. y PGELL, B. M.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 651, 1965.
21. WILLIAMSON, J. R.: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2308, 1965.