

Mecanismo reaccional de la purín nucleósido fosforilasa de hígado de ave. II. Inhibición por los productos de la reacción

R. Fusté* y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Barcelona

(Recibido el 18 de abril de 1975)

R. FUSTE and J. BOZAL. *Purine Nucleoside Phosphorylase. Catalytic Reaction Mechanism. II. Product-Reaction-Inhibition*. Rev. esp. Fisiol., 31, 265-270.

According to Cleland's theoretical predictions, inosine phosphorolysis catalyzed by chicken and pigeon's liver PNPase (Purine nucleoside:orthophosphate ribosyltransferase. E.C. 2.4.2.1.) appears to be a rapid equilibrium random bi-bi with «dead end» enzyme-phosphate-hypoxanthine complex. This mechanism implies the existence of two essential active centers in the enzymatic molecule to which inosine and phosphate attach themselves independently.

The observed lack of analogy in the PNPase mechanism of different species seems to suggest the existence of structural differences between them.

En un trabajo anterior (8) acerca de la fosforólisis de la inosina catalizada por la purín nucleósido fosforilasa PNPasa (E.C. 2.4.2.1) de hígado de pollo y de pichón, se estableció que el enzima de ambas procedencias se ajusta, de acuerdo con las estipulaciones teóricas de ALBERTY (1, 2) y de DALZIEL (5), a un mecanismo secuencial bi-bi al azar; la etapa limitante de velocidad corresponde a la interconversión del complejo ternario E-substratos en E productos. Sin embargo, la inhibición que ejerce el fosfato respecto a la inosina, en ambos casos, corresponde, según CLELAND (3, 4), a un mecanismo secuencial bi-bi ordenado, con la consi-

guiente formación de un complejo de «vía muerta» EBQ que correspondería al complejo ternario E-fosfato-hipoxantina.

Al no ser posible establecer una correlación entre los resultados obtenidos en el estudio de las velocidades iniciales de reacción, con los de la inhibición ejercida por el fosfato (8), se ha completado el estudio del mecanismo de reacción de la purín nucleósido fosforilasa de ambos orígenes, aplicando al método de las inhibiciones ejercidas por los propios productos de la reacción, tal como prescriben las predicciones teóricas de CLELAND (*loc. cit.*).

Con inosina y fosfato como substratos se ha determinado el efecto inhibitor que provoca la ribosa-1-P, la hipoxantina y la guanina respecto a la inosina y al fosfato, en presencia de concentraciones saturan-

* Becario por el Ministerio de Educación y Ciencia.

tes y no saturantes del sustrato que se mantiene constante.

Material y métodos

El estudio cinético de las inhibiciones ejercidas por los propios productos de la reacción en la fosforólisis de la inosina se realizó de modo paralelo en los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón, a sus respectivos pH óptimos (7 y 7,4) en tampón de tris-acetato 0,05 M. La concentración de ambos homogeneizados, 0,83 mg tejido/ml, se mantuvo constante en todas las experiencias.

La determinación de la actividad enzimática se efectuó espectrofotométricamente acoplado al sistema xantinoxidasa de leche (9) midiendo a 293 nm los incrementos de ácido úrico.

Para el estudio cinético de la inhibición ejercida por la hipoxantina se utilizó un método analítico directo, basado en la lectura de los descensos de densidades ópticas a $\lambda = 280$ nm provocados por la disminución de la concentración de inosina durante la actuación de la PNPasa (12).

Resultados

Inhibición por ribosa-1-P, del sistema inosina-PNPasa-fosfato. La inhibición

ejercida por la ribosa-1-P (R-1-P) sobre el enzima de ambos orígenes se determina con concentraciones variables de inosina y dos concentraciones constantes de fosfato 5×10^{-2} M y 5×10^{-3} M que son, respectivamente, saturante y no saturante para ambos enzimas.

El R-1-P es inhibidor competitivo (figura 1) respecto de la inosina, independientemente de que la concentración de fosfato sea o no saturante. Resultados análogos se obtienen con la PNPasa de hígado de pollo, en este caso las constantes de inhibición obtenidas son:

$K_i = 6,7 \times 10^{-3}$ M (fosfato saturante) y $K_i = 1,2 \times 10^{-3}$ M (fosfato no saturante)

Se determinó la inhibición ejercida por el R-1-P sobre las dos PNPasa en estudio con fosfato como sustrato variable e inosina como sustrato constante. Cabe señalar que el enzima de ambas procedencias no se satura por el nucleósido. Con los homogeneizados de hígado de pichón la concentración de inosina fue 4×10^{-4} M; sin embargo, con el enzima de hígado de pollo la concentración de inosina constante fue 1×10^{-4} M, ya que con la PNPasa de esta procedencia se observan desviaciones de la linealidad en la representación de Lineweaver-Bruk si las con-

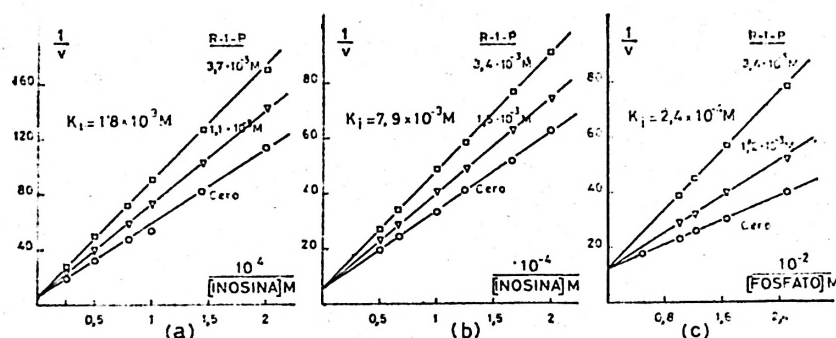


Fig. 1. Inhibición por ribosa-1-P del sistema inosina-PNPasa (hepática de pichón)-fosfato. (a), (b): Concentraciones variables de inosina y constante de fosfato 5×10^{-3} M y 5×10^{-2} M, respectivamente; (c): Concentraciones variables de fosfato y constante de inosina 4×10^{-4} M.

Las velocidades iniciales se expresan en $\Delta D.O./min$ a 293 nm en 3 ml.

centraciones del sustrato superan a la mencionada.

El R-1-P es un inhibidor competitivo (fig. 1) de ambas PNPasa, respecto del fosfato. Con el enzima de hígado de pollo $K_i = 3,7 \times 10^{-3}$ M.

Inhibición del sistema inosina-PNPasa (hepática de pichón)-fosfato, por hipoxantina. El estudio se ha efectuado únicamente con el enzima de hígado de pichón, debido a la ausencia de xantindeshidrogenasa en el tejido hepático del ave (6).

Se estudió el carácter de la inhibición que ejerce la hipoxantina, utilizando como sustrato variable la inosina y dos con-

centraciones de fosfato constantes, saturante y no saturante.

La hipoxantina es inhibidor competitivo respecto a la inosina, independientemente de la concentración de fosfato, y no competitivo respecto al fosfato (fig. 2), siendo la concentración de inosina constante de 4×10^{-4} M.

Inhibición del sistema inosina-PNPasa-fosfato por guanina. Los resultados anteriores pueden confirmarse estudiando, con el enzima de ambas procedencias, la inhibición ejercida por la guanina, pro-

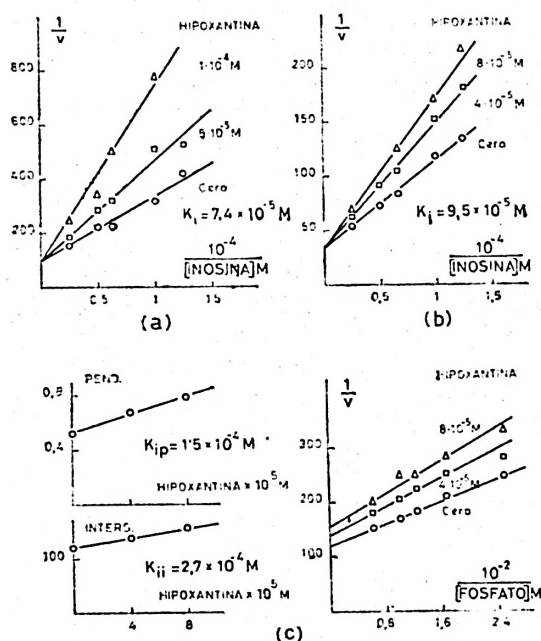


Fig. 2. Inhibición por hipoxantina del sistema inosina-PNPasa (hepática de pichón)-fosfato. (a), (b): Concentraciones variables de inosina y constantes de fosfato 8×10^{-3} M y 5×10^{-3} M, respectivamente; (c): Concentraciones variables de fosfato y constantes de inosina 4×10^{-4} M y representaciones secundarias. Las velocidades iniciales se expresan en $\Delta D.O./min$ a 293 nm en 3 ml.

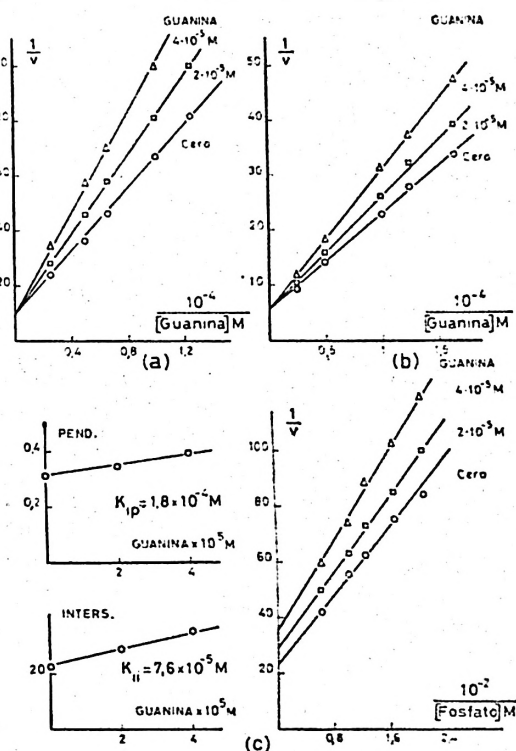


Fig. 3. Inhibición por guanina del sistema inosina-PNPasa (hepática de pichón)-fosfato. (a), (b): Concentraciones variables de inosina y constantes de fosfato 5×10^{-3} M y 5×10^{-3} M, respectivamente; (c): Concentraciones variables de fosfato y constantes de inosina 4×10^{-4} M y representaciones secundarias. Las velocidades iniciales se expresan en $\Delta D.O./min$ a 293 nm en 3 ml.

ducto de la reacción catalizada por la PNPasa cuando el sustrato nucleosídico es la guanosina (10).

El método analítico aplicado es el descrito en un trabajo anterior (8). La concentración de xantinoxidasa fue de 1/75 U/ml. Las concentraciones de guanina utilizadas no inhiben a la xantinoxidasa de leche.

Los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón no presentan actividad guanásica perceptible en las condiciones experimentales descritas.

El efecto inhibitor inducido por la guanina respecto a la inosina, se determinó con dos concentraciones de fosfato constantes: saturante y no saturante.

La guanina es inhibidor competitivo del enzima de hígado de pichón (fig. 3), respecto de la inosina, independientemente de la concentración de fosfato.

Análogos resultados se obtienen con el enzima de hígado de pollo. El valor de las constantes de inhibición son, en este caso, independientes de la concentración de fosfato $K_i = 4,3 \times 10^{-5}$ M.

Sin embargo, la guanina es inhibidor no competitivo respecto al fosfato (fig. 3) independientemente de la procedencia del enzima.

La concentración de inosina que se mantuvo constante para la PNPasa de hígado de pollo y de pichón fue de 1×10^{-4} M y 4×10^{-4} M, respectiva-

mente. Las constantes de inhibición para el enzima de hígado de pollo son:

$$K_{ii} = 9,5 \times 10^{-5} \text{ M}$$

$$\text{y } K_{ip} = 1,6 \times 10^{-4} \text{ M}$$

En la tabla I se resumen los resultados obtenidos en el estudio del mecanismo de reacción de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón mediante el estudio de las inhibiciones ejercidas por los propios productos de la reacción.

Tabla I. *Inhibición por producto (Cleland) PNPasa hepática de pichón.*

Inhibidor	Sustrato (Variable)		
	Inosina Fosfato no sat.	inosina Fosfato sat.	Fosfato Inosina no sat.
Ribosa-1-P	C	C	C
Hipoxantina	C	C	NC
Guanina	C	C	NC

Secuencia reaccional de la PNPasa hepática de pichón y de pollo. El conjunto de los resultados obtenidos en el estudio de las inhibiciones por producto, concuerdan, según CLELAND (3), en que el mecanismo por el que rige su actuación la PNPasa hepática de ave (pollo y pichón) en la fosforólisis de la inosina, es secuencial bi-bi al azar en equilibrio rápido, con la formación de un complejo de «vía muerta» E-fosfato-hipoxantina.

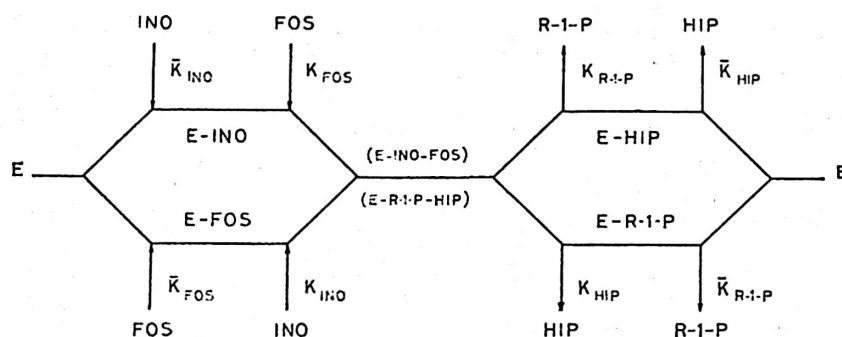


Fig. 4. *Esquema de la secuencia reaccional de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón en la fosforólisis de la inosina.*

Este mecanismo implica la existencia de dos centros activos esenciales en la actividad enzimática, uno para la inosina y otro para el fosfato; de acuerdo con la nomenclatura de CLELAND (4), se representa esquemáticamente en la figura 4.

Discusión

La aplicación a los resultados que se describen de las predicciones teóricas de CLELAND (*loc. cit.*) confirman que la secuencia mecanística de actuación de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón se rige por un mecanismo secuencial al azar, en el cual la etapa limitante de la velocidad es la interconversión del complejo ternario E-inosina-fosfato en E-ribosa-1-P-hipoxantina, con la formación de un complejo de «vía muerta» (E-fosfato-hipoxantina). Esto permite explicar que la inhibición provocada por el fosfato (8) sea incompetitiva respecto a la inosina, ya que aquél se une con dos formas enzimáticas diferentes, dando lugar a la formación de dos complejos ternarios, uno «productivo» E-inosina-fosfato y otro de «vía muerta» E-hipoxantina-fosfato.

El que la PNPasa de ambos orígenes se adapte a este mecanismo implica la existencia de dos centros esenciales en la molécula enzimática, uno para el fosfato y otro para la inosina.

El mecanismo que se propone para la fosforólisis de la inosina con PNPasa hepática de ave (pollo y pichón) difiere de los sugeridos por otros autores con el enzima procedente de piel (7), de eritrocitos humanos (9) y de bazo de buey (11). Todos ellos coinciden en afirmar que la ausencia reaccional se ajusta a un mecanismo secuencial bi-bi ordenado, destacando KRENITSKY (11) la existencia de dos formas enzimáticas isomórficas interconvertibles entre sí, una de ellas se combina con la base y la otra con el nucleósido. En el mecanismo de actuación de la PNPasa de procedencia humana, tanto de la piel (7) como de eritrocitos (9), no

existen formas isomórficas del enzima; sin embargo, difieren entre sí en el orden de adición de los sustratos.

La discrepancia existente entre los mecanismos de actuación de la PNPasa de los distintos orígenes puede atribuirse a que la forma estructural del enzima varía de unos tejidos a otros, aspecto que trata de aclarar los estudios actuales.

Resumen

La fosforólisis de la inosina catalizada por la purín nucleósido fosforilasa de hígado de pollo y de pichón (E.C. 2.4.2.1) se adapta, de acuerdo con las predicciones teóricas de Cleland, a un mecanismo secuencial al azar bi-bi, en equilibrio rápido, con la formación de un complejo ternario de «vía muerta» E-fosfato-hipoxantina. Este mecanismo implica la existencia de dos centros activos esenciales en la molécula enzimática, en los que concurren la inosina y el fosfato, respectivamente.

El que el enzima de otros orígenes se ajuste a un mecanismo de reacción distinto quizá pueda atribuirse a diferencias estructurales entre ellos.

Bibliografía

1. ALBERTY, R. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **75**, 1928, 1953.
2. ALBERTY, R. A.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 1777, 1958.
3. CLELAND, W. W.: *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 104, 1963.
4. CLELAND, W. W.: *Ann. Rev. Biochem.*, **35**, 77, 1967.
5. DALZIEL, K.: *Acta Chem. Scand.*, **2**, 1706, 1957.
6. EDSON, N. L., KREBS, H. A. y MODEL, A.: *Biochem. J.*, **30**, 1380, 1936.
7. FIER, W. y DEBERSAQUES, J.: *Enzymologia*, **24**, 197, 1962.
8. FUSTÉ, R. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 235, 1975.
9. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1763, 1968.
10. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1771, 1968.
11. KRENITSKY, T. A.: *Mol. Pharmacol.*, **3**, 526, 1967.
12. SERRA, M. C., FALCONE, G., CERCIGNANI, G. e IPATA, P. L.: *Febs Letters*, **2**, 335, 1971.

