

Purificación de la purinnucleósido fosforilasa. Actividad frente a desoxinosina

R. Fusté * y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona

(Recibido el 30 de octubre de 1975)

R. FUSTE and J. BOZAL. *Purification of Purine Nucleoside Phosphorylase Activity on Deoxynosine*. Rev. esp. Fisiol., 32, 193-198, 1976.

Purified preparations of pigeon liver PNPase (E.C. 2.4.2.1) have been obtained by acid preparation of liver homogenates at pH = 5, followed by a fractionation with ammonium sulphate (25-50 % saturation) and by a chromatographic adsorption on DEAE-cellulose. The preparation obtained shows a PNPase specific activity 325 times greater than that of the original homogenates.

Kinetic studies carried out with homogenates and purified preparations of pigeon liver PNPase seem to suggest that inosine and deoxynosine react on the same catalytic site of the enzyme molecule.

La purinnucleósido fosforilasa (PNPasa) o purinnucleósido:ortofosfatorribosiltransferasa (E.C. 2.4.2.1) cataliza la fosforólisis y la arsenólisis de los nucleósidos purínicos (2).

En la fosforólisis de los desoxinucleósidos purínicos, FRIEDKIN y KALCKAR (6, 7) aislaron desoxirribosa-1-P entre los productos de la reacción y comprobaron que, a partir del azúcar desfosforilado y la base purínica, no se verificaba la síntesis del desoxinucleósido correspondiente.

La degradación enzimática de los nu-

cleósidos y de los desoxinucleósidos purínicos origina productos análogos y plantea el problema de si la acción es atribuible o no al mismo enzima.

El comportamiento de la PNPasa purificada de eritrocitos humanos con inosina y desoxinosina, empleados alternativamente como sustrato e inhibidor (3), respectivamente, sugiere que sean diferentes enzimas los responsables de cada una de las transformaciones. Se ha indicado (1, 9), por el contrario, que la mencionada PNPasa posee un solo centro activo en el que se verifica la fosforólisis de los nucleósidos y de los desoxinucleósidos; el que la guanosina y la desoxiguanosina inhiban competitivamente la fosforólisis de

* Becario del Ministerio de Educación y Ciencia.

la inosina y de la desoxinosina (9) puede contribuir a sugerir que estas últimas se fijan sobre el mismo centro activo del enzima.

Es objeto del presente trabajo dilucidar si la acción que ejerce la PNPasa purificada de hígado de pichón sobre la inosina y la desoxinosina es atribuible o no a un mismo enzima, y para ello se ha trabajado con PNPasa purificada de hígado de pichón. El método de purificación que se propone para el enzima de dicha procedencia se basa en los descritos por KIM (9), PINTO (10) y KALCKAR (8) para la PNPasa de eritrocitos humanos. Con el purificado obtenido se ha efectuado el estudio cinético del comportamiento como sustratos de mezclas de ambos nucleósidos purínicos, con objeto de establecer si se fijan en idéntico centro activo de la PNPasa de hígado de pichón.

Material y métodos

Como material enzimático se empleó hígado de pichón, obtenido de animales recién sacrificados, a partir de los cuales se obtuvieron homogeneizados crudos por trituración del tejido suspendido en tampón de fosfato sódico 0,05 M pH 7,4, en un homogeneizador de cuchillas a 4-5° C.

La actividad enzimática de las diferentes etapas del proceso de purificación y en las experiencias cinéticas, se determinó espectrofotométricamente acoplando xantinoxidasa de leche (9) que transforma la hipoxantina liberada en ácido úrico; los incrementos de absorbancia se leen a 293 nm (ϵ ácido úrico = $12,5 \times 10^3$ D.O. $\times$ M⁻¹) en un espectrofotómetro Beckman DBG-T a $37 \pm 0,1$ C, en cubetas de 3 ml y 1 cm de paso de luz.

En el proceso de purificación la actividad se determinó en muestras que contenían inosina 2×10^{-4} M, fosfato 5×10^{-2} M (introducido como tampón de pH 7,4) una cantidad apropiada de PNPasa, para que la velocidad de reacción se mantuviese lineal durante los cinco

primeros minutos y el volumen de disolución de xantinoxidasa de leche necesario para que la concentración final fuese de 1/75U/ml, la cual se halla en exceso en todos los casos respecto a la de PNPasa.

Se define una unidad PNPasa como la cantidad de enzima que produce un incremento de absorbancia de 0,01 por minuto, medida a 293 nm a $37 \pm 0,1$ ° C, equivalente a la formación de $0,8 \times 10^{-3}$ μ moles de ácido úrico/min/ml.

El contenido en proteína de las fracciones se determinó por el método de WARBURG y CHRISTIAN (11) multiplicando la absorbancia leída a 280 nm por 1,1 mg/ml Δ D.O. con lo que se obtiene la concentración de proteína en mg por ml.

En el estudio cinético de las mezclas de inosina y de desoxinosina se han aplicado las ecuaciones propuestas por DIXON (4) correspondientes a la actuación de uno o dos enzimas sobre ambos sustratos.

Resultados

Purificación de la PNPasa de hígado de pichón. Etapa I. Se inicia el proceso procediendo a la separación de las fracciones celulares por centrifugación diferencial. Se parte de 100 g de hígado de pichón procedentes de animales recién sacrificados y se suspenden en 210 ml de tampón de fosfato sódico 0,05 M, pH 7,4 a +4° C. La mezcla se homogeniza en un triturador de cuchillas y la suspensión obtenida se centrifuga durante 30 minutos a $4.500 \times g$ a 0° C. El sobrenadante S₁ activo (250 ml) se centrifuga de nuevo durante 30 minutos a 0° C y $22.400 \times g$; la actividad PNPasa permanece en el sobrenadante S₂ (192 ml).

Etapa II. El sobrenadante S₂ se acidifica a pH 5,0 (con ácido acético 0,05 M) y se mantiene en reposo durante una hora a +4° C, se centrifuga posteriormente a $22.400 \times g$ durante 30 minutos a 0° C; se logra así separar las nucleoproteínas. El sobrenadante S₃ (185 ml) se lleva a pH 7,4 por adición de hidróxido sódico 0,1 M.

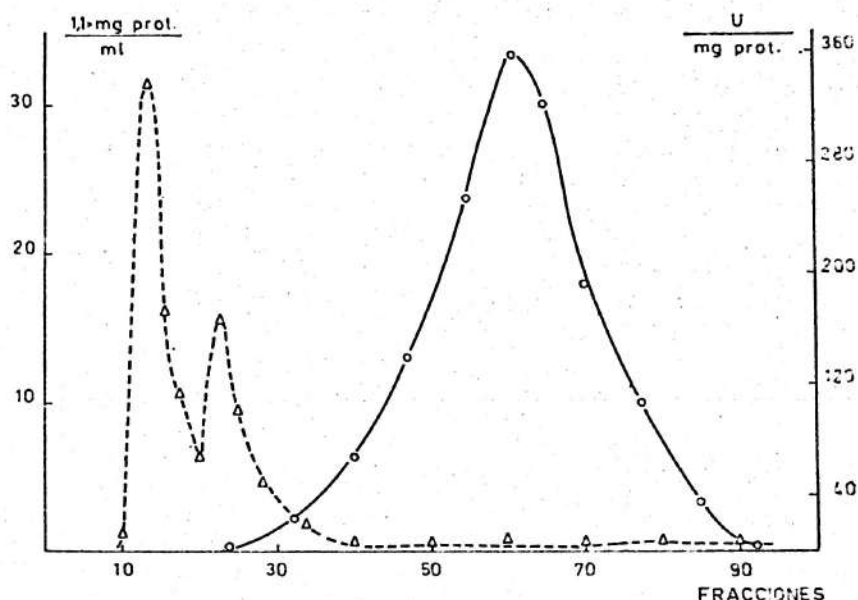


Fig. 1. Cromatografía en DEAE-celulosa de PNPasa parcialmente purificada.
— Actividad específica en U/mg prot.; --- mg prot./ml.

Etapas III. La disolución S_3 se lleva al 25 % de saturación por adición de sulfato amónico sólido, la suspensión se deja en reposo 1 hora y se centrifuga a $22.400 \times g$, 30 minutos a 0°C . El sobrenadante S_4 se lleva al 50 % de saturación en sulfato amónico y al cabo de 12 horas de reposo a 4°C se separa el residuo activo R_5 , por centrifugación a $4.500 \times g$, durante 30 minutos a 0°C .

Etapas IV. El residuo R_5 se disuelve en tampón de fosfato sódico 0,01 M de pH 7,4, en la proporción 1/3 y la disolución se dializa durante 24 horas a 4°C , frente al mismo tampón, lográndose así la eliminación de sulfatos.

El dializado se eluye a través de una columna de DEAE-celulosa ($30 \times 2 \text{ cm}$) previamente equilibrada con tampón de fosfato sódico 0,01 M, de pH 7,4. Empleando el mismo tampón como eluyente, se recogen las veinte fracciones primeras y, seguidamente, se eluye con un gradien-

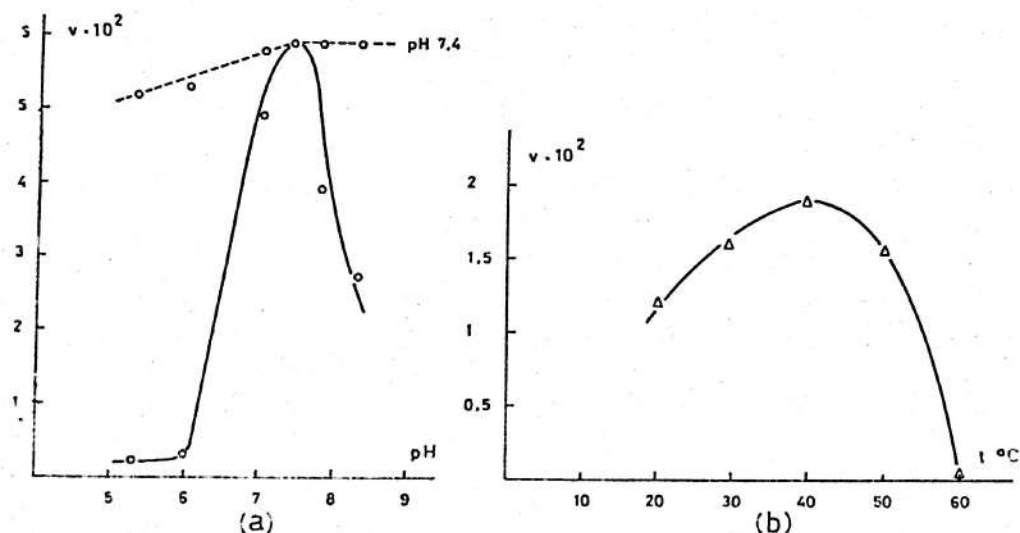
te de fosfatos obtenido por mezcla de volúmenes iguales de tampón de fosfatos 0,01 y 0,2 M, de pH 7,4. La velocidad de elución fue de 1 ml/min. En la figura 1 aparece el perfil de la separación cromatográfica. Los eluidos cromatográficos de la zona de máxima actividad PNPasa se llevan al 65 % de saturación en sulfato amónico (R_6).

En la tabla I aparecen los resultados obtenidos en cada una de las etapas del proceso de purificación descrito.

Fosforolisis de la desoxinosina. La desoxinosina experimenta fosforolisis cuando se incuba con homogeneizados crudos de hígado de pichón. Se han determinado el pH y la temperatura óptimos a los que los mencionados homogeneizados catalizan la transformación. El pH óptimo es de 7,4; el efecto del pH se muestra reversible en la zona alcalina (fig. 2). La temperatura óptima está comprendida entre los $35-40^\circ \text{C}$ en presencia de tampón de fos-

Tabla I. Purificación de la PNPasa de hígado de pichón.

Etapa	Fracción	Volumen o peso	Unidades totales $\times 10^{-3}$	Actividad específica	Rdto.	Pureza relativa
I. Centrifugación diferencial	S ₁	250 ml	1.100	1,06	100	1,0
	S ₂	192 ml	979	1,41		1,5
II. Tratamiento a pH 5	S ₃	182 ml	874	2,35	7,6	2,4
III. Fraccionamiento sulfato amónico (25-50 %)	R ₅	5 g	837	10,9		10
IV. Columna DEAE celulosa	R ₆	0,5 g	187	326	17	326

Fig. 2. Desoxinosina-PNP-asa (hígado de pichón)-g $\times$ fosfato.

Concentración homogeneizado 0,83 mg hígado/ml incubado. (a) Estabilidad y pH óptimo en tampón de fosfatos 0,05 M; intervalo pH (5,3 a 8). Las muestras se preincubaron durante 30 minutos a los respectivos pH. (b) Temperatura óptima en tampón de fosfatos 0,05 M pH = 7,4. Las muestras se preincubaron durante 5 min. a las correspondientes temperaturas.

fatos 0,05 M pH 7,4; a los 60° C la acción enzimática ya no tiene lugar (fig. 2).

Acción de la PNPasa sobre mezclas de inosina y de desoxinosina. Con objeto de determinar si la fosforólisis de los dos nucleósidos ocurre en el mismo centro activo de la PNPasa de hígado de pichón, o bien son dos los enzimas que catalizan la reac-

ción, se ha procedido a efectuar el estudio cinético de mezclas no equimolares y equimolares, constituidas por inosina y desoxinosina que contenían una concentración constante de fosfato (0,05 M). Las experiencias se han efectuado con homogeneizados crudos de hígado de pichón y con el preparado de PNPasa purificada anteriormente descrito.

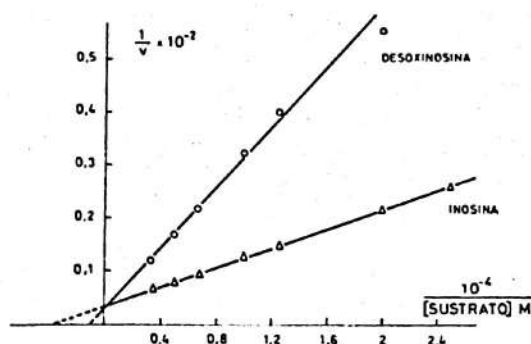


Fig. 3. Parámetros cinéticos aparentes en la fosforólisis de la inosina y desoxinosina (homogeneizados o purificados).

Concentración de fosfato constante 0,05 M. K_m (inosina) = 3×10^{-4} M; K_m (desoxinosina) = 9×10^{-4} M; V_{max} = $2,5 \times 10^{-2}$ μ moles/min/ml incubado.

Los valores de los parámetros cinéticos obtenidos con ambos sustratos aparecen en la figura 3.

Mezclas no equimolares de inosina y de desoxinosina. Las mezclas en estudio estuvieron constituidas por concentraciones de inosina variable (3×10^{-4} M a 4×10^{-5} M) y de desoxinosina constantes (2×10^{-4} M y 5×10^{-5} M). Las velocidades experimentales se han comparado con las teóricas, calculadas mediante las ecuaciones de DIXON (4). Los resultados obtenidos al trabajar con homogeneizados de hígado de pichón y desoxinosina $5 \times$

10^{-5} M aparecen en la figura 4, en la que se observa que la curva correspondiente a la velocidad experimental coincide con las teóricas correspondientes tanto si son uno o dos los enzimas responsables de la transformación de ambos sustratos; sin embargo, cuando la concentración de desoxinosina es 2×10^{-4} M los valores experimentales coinciden con los teóricos correspondientes a la actuación de un solo enzima, hecho lógico ya que por ser la desoxi-

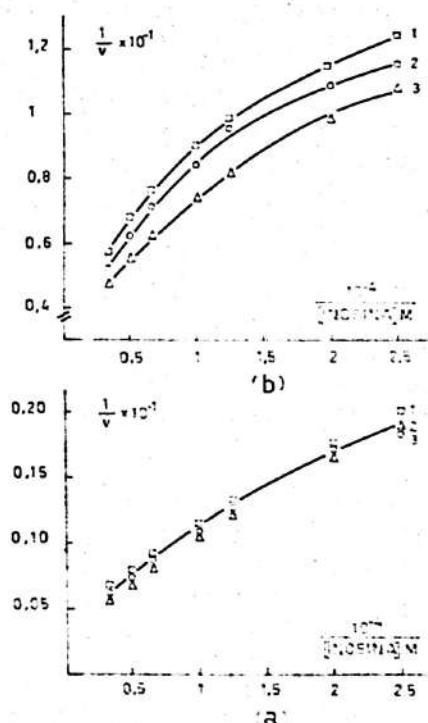


Fig. 4. Velocidades iniciales de reacción en mezclas no equimolares de inosina y desoxinosina.

Concentración homogeneizado 0,83 mg hígado/ml incubado. Concentración de fosfato constante 0,05 M. (a) concentración de desoxinosina constante 5×10^{-5} M; (b) concentración de desoxinosina constante 2×10^{-4} M. Línea 1: Curva teórica trazada con la ecuación correspondiente a la actuación de un único enzima sobre ambos sustratos (4). Línea 2: Curva teórica trazada con la ecuación correspondiente a la actuación de dos enzimas sobre ambos sustratos (4). Línea 3: Curva experimental.

Tabla II. Relación de velocidades iniciales de reacción para concentraciones iguales de inosina y desoxinosina.

[Inosina] 10^4 M	[Desoxinosina] 10^4 M	V_a/V_b $\Delta DO/mln$	$V_a K_b/V_b K_a$
0,2	0,2	3,2	3,3
0,4	0,4	3,2	
0,6	0,6	2,8	
0,8	0,8	3,1	
1,0	1,0	3	
2,0	2,0	2,5	

xinosina el substrato menos afín el efecto de competencia por el mismo centro activo será más acusado al aumentar su concentración.

Mezclas equimolares de inosina y de desoxinosina. Al actuar los purificados de PNPasa y los homogeneizados crudos de hígado de pichón sobre mezclas equimolares de los nucleósidos en estudio, se pone de manifiesto que ambos substratos compiten por el mismo centro activo de la PNPasa, al cumplirse la correspondiente ecuación propuesta por DIXON (4).

En la tabla II se recogen los resultados obtenidos al trabajar con PNPasa purificada. Análoga relación de velocidades iniciales se obtuvo al trabajar con homogeneizados crudos.

Discusión

Se propone un método de purificación para la PNPasa de hígado de pichón mediante el cual se consigue un preparado enzimático cuya actividad específica es 326 veces superior a la del homogeneizado inicial y que mantiene su actividad conservado a 4° C durante 90 días. El método que se describe introduce el tratamiento ácido, antes de proceder al fraccionamiento con sulfato amónico y la cromatografía en columna de DEAE-celulosa.

Se ha podido comprobar que la desoxinosina experimenta fosforólisis por los homogeneizados de hígado de pichón y que las condiciones óptimas de actuación son idénticas a las que exhiben frente a la inosina (5).

El estudio cinético de la fosforólisis de mezclas no equimolares y equimolares de ambos nucleósidos por homogeneizados y por purificados de PNPasa de hígado de pichón, revelan que es éste el único enzima que cataliza la transformación y que ambos substratos compiten por el mismo centro activo; el resultado concuerda con

lo observado al trabajar con PNPasa de eritrocitos humanos (9). El estudio efectuado no permite descartar la posibilidad de existencia de isoenzimas que difieran en la afinidad que exhiben frente a los substratos en estudio.

Resumen

Se han obtenido preparados purificados de PNPasa (E.C. 2.4.2.1) de hígado de pichón por tratamiento de los homogeneizados hepáticos mediante una precipitación ácida a pH = 5, seguida de un fraccionamiento salino con sulfato amónico (25-50 % saturación) y una adsorción cromatográfica en DEAE-celulosa. El purificado obtenido muestra una actividad específica 326 veces superior a la de los homogeneizados iniciales.

Estudios cinéticos realizados con homogeneizados y purificados de PNPasa de hígado de pichón ponen de manifiesto que la inosina y la desoxinosina se transforman en el mismo centro activo de la molécula enzimática.

Bibliografía

1. AGARWAL, R. P. y PARKS, R. E. J.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 644-647, 1969.
2. BARMAN, T. E.: *Enzyme Handbook*, Vol. 1, Springer Verlag, Berlin, 1969, p. 330.
3. DE VERDIER G. H. y GOULD, B. J.: *Biochim. Biophys. Acta*, **68**, 333-341, 1963.
4. DIXON, y M. WEBB, C. E.: *The Enzymes* (2nd). Longmans Green, London, 1967, p. 84.
5. FUSTÉ, R. y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 235-244, 1975.
6. FRIEDKIN, M. y KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **184**, 437-448, 1950.
7. FRIEDKIN, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 112-115, 1952.
8. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 477-486, 1967.
9. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1763-1770, 1968.
10. PINTO, B.: *Rev. esp. Fisiol.*, **26**, 157-166, 1970.
11. WARBURG, O. y CHRISTIAN, W.: *Biochem. Z.*, **310**, 384-387, 1941.