

## Actividad de la purinnucleósido fosforilasa con metabolitos purínicos

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. *Purine Metabolites in the Activity of Purine Nucleoside Phosphorylase*. Rev. esp. Fisiol., 32, 199-204. 1976.

In the phosphorolytic degradation catalyzed by chicken liver PNPase (E.C. 2.4.2.1) inosine appears to behave as a better substrate than xanthosine.

Hypoxanthine, xanthine, guanine and purine ( $1 \times 10^{-1}$  M) appear to be inhibitors of the pigeon liver PNPase, whereas allopurinol, ATP, ITP, CTP and UTP ( $1 \times 10^{-3}$  M) do not inhibit the enzyme. Both PNPase activities exhibit the same optimum temperature (37-40° C). Chicken liver PNPase optimum pH is in the range 6.5-7, whereas that of pigeon liver is in the range 7-7.5.

Lineweaver-Burk plots for the inosine phosphorolysis catalyzed by chicken liver PNPase yielded straight lines if substrate concentrations were lower than  $1 \times 10^{-4}$  M but concave downward curves at higher substrate concentrations. This activation increases when the homogenates are stored at 4° C and pH = 7 during 24 h or more; pigeon liver PNPase does not show this activation phenomenon.

La purinnucleósido fosforilasa (PNPasa) o purinnucleósido: ortofosfatorribosiltransferasa (E.C. 2.4.2.1) es un enzima muy difundido en los tejidos de los mamíferos, de las aves y de los peces; aparece también en las levaduras. Los eritrocitos humanos poseen actividad PNPasa muy elevada (12) que se ha relacionado con la anemia deficitaria en hierro con resultados variables, ya que mientras SAGONE *et al.* (8) no encuentran variaciones de

actividad, RAMACHANDRAN *et al.* (7) observaron un incremento considerable de aquélla en dicho estado.

La actividad PNPasa de los tejidos de caballo y de buey se halla localizada en el núcleo de sus células (11) y la de hígado de rata en el citoplasma (9). Las observaciones histoquímicas (5) concuerdan con lo expuesto, pero han de completarse para dilucidar si la distribución intracelular del enzima varía según las especies.

El papel fisiológico de la PNPasa no se conoce con certidumbre, ya que aunque la reacción que cataliza es reversible (1) parece ser que su función principal en el

\* Becario del Ministerio de Educación y Ciencia.

metabolismo nucleosídico es la degradativa.

En este trabajo se estudia la capacidad de degradación fosforolítica exhibida por los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón sobre la inosina, la adenosina y la xantosina, así como la influencia que ejercen las bases púricas y sus nucleótidos en dicho proceso degradativo.

### Material y métodos

La PNPasa procede de hígados de pollo y de pichón obtenidos de animales recién sacrificados. El tejido troceado se suspendió en tampón de fosfato sódico 0,05 M, de pH 7,4 o en el de tris-acetato (sal sódica) 0,05 M, de pH 7, en la proporción de 1/4 (p/v) y se trituroó en un homogeneizador de cuchillas a 5° C.

Se utiliza como disolución enzimática el sobrenadante obtenido al centrifugar los homogeneizados a  $5.000 \times g$  durante 30 minutos a 0° C.

La actividad PNPasa con inosina como sustrato se determinó espectrofotométricamente (4) acoplado xantinoxidasa de leche, 1/75 ó 1/150 U/ml si se trabaja con hígado de pichón o de pollo, respectivamente. Los incrementos de absorbancia se leyeron a 293 nm ( $\epsilon$  ácido úrico =  $12,5 \times 10^3$  D.O.  $\times M^{-1}$ ) en un espectrofotómetro Beckman DBG7, en cubetas de 3 ml y de 1 cm de paso de luz a  $37 \pm 0,1^\circ C$  (4).

La actividad PNPasa en presencia de purinas o de inhibidores que afectan a la actividad de la xantinoxidasa de leche, se determinó mediante incubación a  $37 \pm 0,1^\circ C$ , durante intervalos de tiempo variables (de 0 a 20 minutos). Las mezclas en incubación estuvieron constituidas por el sustrato nucleosídico ( $5 \times 10^{-4}$  M), el inhibidor (en su caso), tampón de fosfatos 0,05 M, pH 7,4, y el homogeneizado cuya concentración se escogió de modo que se obtuviese linealidad en la producción de base púrica durante el intervalo de tiempo de incubación. Se tomó 1 ml de los incubados a los distintos intervalos de

tiempo y se vertió sobre 4 ml de ácido perclórico al 5%. El precipitado proteico se separó por filtración al cabo de 15 minutos y en los filtrados, previamente neutralizados (pH 7,4), se determinó el contenido total en hipoxantina con xantinoxidasa de leche (3).

### Resultados

*Fosforolisis de los nucleósidos purínicos.* La actividad fosforolítica de los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón se determinó frente a inosina, xantosina y adenosina en medio tamponado de fosfatos 0,05 M, pH 7,4, mediante el método de incubación.

La degradación fosforolítica de la inosina es la que se verifica a mayor velocidad, mientras que la de la xantosina es mucho más reducida; en la transformación de la adenosina interviene además la adenosindesaminasa, por ello la velocidad es menor que la de la inosina (fig. 1).

*Efecto de derivados purínicos y de la 4-amino-5-imidazol carboxamida sobre la actividad de la PNPasa de hígado de pichón.* Las bases púricas y el alopurinol (4-hidroxipirazolo,3,4-d-pirimidina) exhiben distinto comportamiento frente a la fosforolisis de la inosina catalizada por los homogeneizados de hígado de pichón (ta-

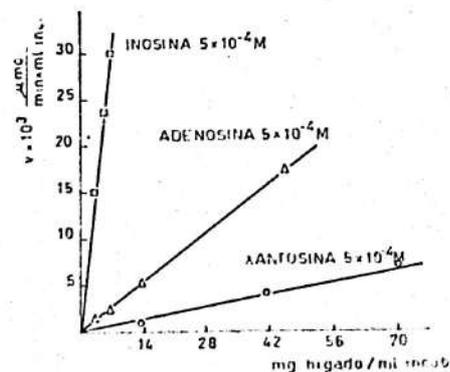


Fig. 1. Transformación de inosina, adenosina y xantosina por los homogeneizados de hígado de pollo.

Tabla. I. Efecto de las purinas sobre la actividad de la PNPasa de hígado de pichón. La actividad enzimática se determinó por el método de incubación. La concentración del homogeneizado fue de 0,83 mg hígado/ml incubado.

Inhibidor	Concentración 10 <sup>3</sup> M	Inhibición %
Hipoxantina	1- 2	19-39
Xantina	1- 4	9-42
Guanina	1- 5	24-56
Purina	2- 4	13-23
Alopurinol	1-10	nula

bla I); así, mientras que las purinas inhiben la actividad PNPasa el alopurinol  $1 \times 10^{-3}$  M no la afecta aunque su concentración es superior a la presente en el plasma de pacientes tratados con dicho fármaco (2).

Los nucleótidos ITP, UTP, CTP ( $2,3 \times 10^{-3}$  M) y ATP ( $1,8 \times 10^{-3}$  M) no modifican la actividad fosforolítica de la PNPasa; sin embargo, la 4-amino-5-imidazol carboxamida ( $1 \times 10^{-3}$  M) la inhibe en un 25 %.

*Actividad de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón en función del pH.* En

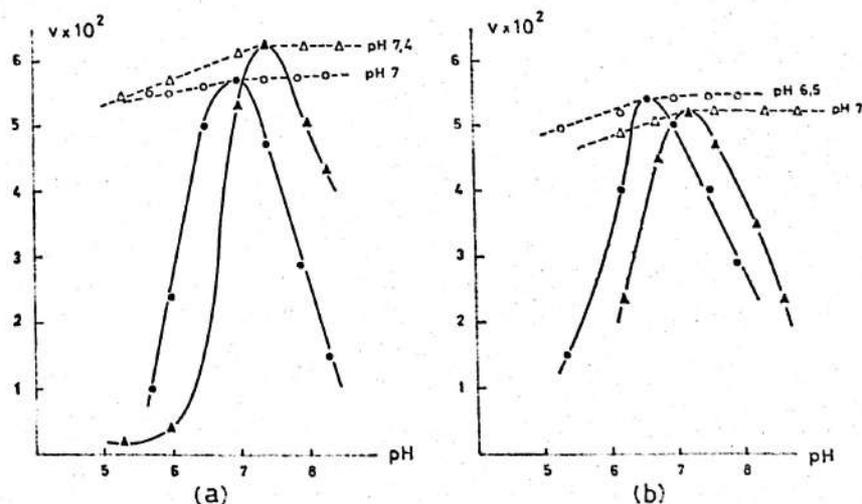


Fig. 2. Estabilidad y pH óptimo de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón. a) con tampón de fosfato (sal sódica) 0,05 M; b) con tampón de tris-acetato 0,05 M; ▲ hígado de pichón; ● hígado de pollo.

la figura 2 se indica el efecto del pH entre 5,3 y 8,5 sobre la fosforolisis de la inosina catalizada por la PNPasa presente en los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón. Puede observarse que para el enzima hepático de pollo el pH óptimo varía de 7 a 6,5 según el tampón sea de fosfato o de tris-acetato, respectivamente; sin embargo, para el enzima de hígado de pichón el pH óptimo es 7,4 en tampón de fosfatos, y 7 en tris-acetato.

La permanencia del enzima de ambas procedencias durante 30 minutos a los diversos pH en estudio no provoca variaciones de la actividad. Cuando se incuban muestras de PNPasa de ambos orígenes durante 30 minutos a los diversos valores de pH (obtenidos con ambos tampones) y se determina posteriormente la actividad a los correspondientes pH óptimos, solamente recuperan el máximo de actividad las muestras en las que la incubación previa se efectuó en la zona alcalina de pH (figura 2).

*Actividad de la PNPasa de hígado de pollo y de pichón en función de la temperatura.* Se determinó la temperatura óp-

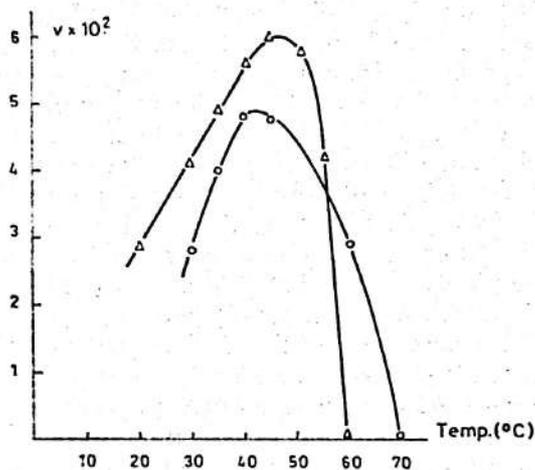


Fig. 3. Temperatura óptima del sistema inosina-PNPasa-fosfato.

Δ hígado de pichón; ○ hígado de pollo.

tima de actuación de la PNPasa de ambos orígenes, en la fosforólisis de la inosina, en muestras que se hallaban a sus correspondientes pH óptimos (tampón de fosfatos), y que se preincubaron 5 minutos a las diversas temperaturas (fig. 3). El máximo de actividad está comprendido entre 40-45° C.

Actividad de los homogeneizados de hígado de pollo y de pichón frente a concentraciones elevadas de inosina. En la fosforólisis de la inosina por los homogeneizados de hígado de pollo (0,83 mg hígado/ml incubado) recién preparados (tampón tris-acetato); la representación de LINEWEAVER-BURK (6) es lineal,  $K_m = 3,7 \times 10^{-5}$  H (fig. 4); sin embargo, al diluir el homogeneizado (0,5 mg hígado/ml incubado) se producen desviaciones de la linealidad, que corresponden a incrementos de la velocidad inicial a concentraciones de inosina superiores a  $6 \times 10^{-5}$  M (figura 4).

Cuando el homogeneizado inicial permanece 24 horas a 4° C y pH 7 en el mismo tampón, las desviaciones de la linealidad aparecen en el homogeneizado concentrado (0,83 mg hígado/ml incubado), a idénticas concentraciones de inosina (figura 4); mediante el empleo de homogeneizados más concentrados (3,3 mg hígado/ml incubado) desaparece el fenómeno de activación, pero varía el valor de  $K_m$  (inosina) =  $8 \times 10^{-5}$  M (fig. 4).

El fenómeno descrito no ha sido observado en los homogeneizados de hígado de

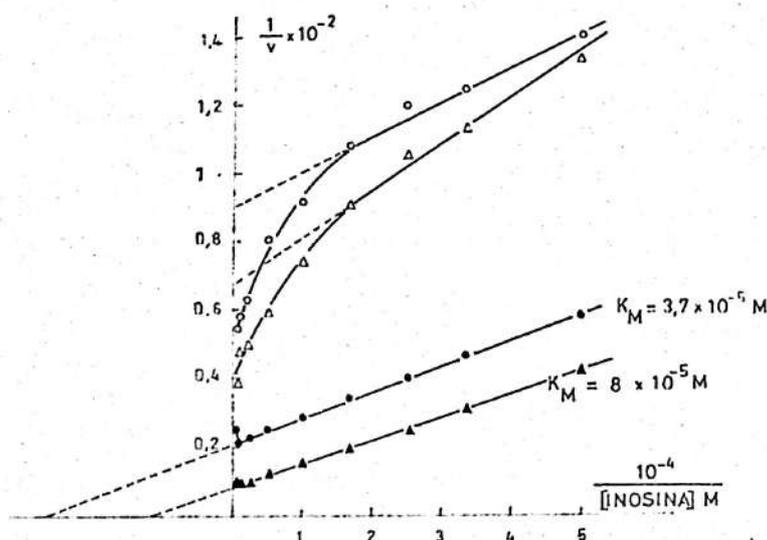


Fig. 4. Actividad PNPasa hepática de pollo frente a concentraciones elevadas de inosina. [Homogeneizado]: ● = 0,83 mg/ml recién preparado; ○ = 0,5 mg/ml recién preparado; ▲ = 3,3 mg/ml 24 horas a 4° C; △ = 0,83 mg/ml 24 horas a 4° C.

pichón, aún en los muy diluidos (0,04 mg hígado/ml incubado), después de ser conservados a 4° C y en tampón tris-acetato durante diversos intervalos de tiempo.

Los fenómenos descritos sugieren la existencia de dos formas de PNPasa de hígado de pollo predominando una de ellas en el enzima nativo. La transformación en la segunda de las formas parece ser inducida por el tiempo de conservación de los homogeneizados a +4° C y su existencia se pone de manifiesto al emplear concentraciones de inosina elevadas.

El que la PNPasa de hígado de pichón no experimente activación por efecto de las concentraciones de inosina mencionadas, sugiere la existencia de diferencias estructurales con la PNPasa de hígado de pollo.

### Discusión

La degradación fosforolítica de la adenosina en hipoxantina efectuada por los homogeneizados hepáticos de pollo pone de manifiesto la actuación de dos sistemas enzimáticos diferentes: el de la adenosín-desaminasa y el de la purinnucleósido fosforilasa, ambas presentes en el órgano en estudio.

Los resultados descritos sugieren que la vía preferente en la degradación de los nucleósidos purínicos hasta ácido úrico, en el hígado de pollo, es la que requiere la formación intermedia de la inosina, que es el sustrato preferente de la purinnucleósido fosforilasa, y de la posterior actuación de la xantindeshidrogenasa sobre las bases púricas (hipoxantina o xantina) aparecidas en la fosforólisis.

La especificidad de la PNPasa hepática de pollo y de pichón respecto a los sustratos nucleosídicos es independiente de la procedencia del enzima.

La hipoxantina, la xantina, la guanina y la purina inhiben *in vitro* la actividad fosforolítica de la PNPasa de hígado de pichón; isn embargo, el alopurinol no la afecta.

La actividad fosforolítica de la PNPasa de hígado de pichón frente a la inosina no se ve modificada por la presencia de ATP, ITP, UTP y CTP ( $1 \times 10^{-3}$  M), en contraposición con lo observado con PNPasa de *Bacillus cereus* (10). Estas discrepancias pueden atribuirse a diferencias estructurales entre ambas enzimas relacionadas con su papel fisiológico.

El pH óptimo de actuación de la PNPasa de hígado de pollo (7-6,5) y de pichón (7,5-7) varía ligeramente según el tampón en que se determina (fosfatos o tris-acetato); el intervalo de temperatura óptima (47-40° C) coincide en el enzima de ambas procedencias.

Los estudios cinéticos efectuados con PNPasa de hígado de pollo muestran que si las concentraciones de inosina son relativamente elevadas ( $1 \times 10^{-4}$  M) el enzima experimenta una activación deducible de la desviación de la linealidad en la representación de LINEWEAVER-BURK (6). El fenómeno sólo se observa al trabajar con homogeneizados diluidos y facilita su percepción la permanencia de los mismos a +4° C y tampón tris-acetato durante 24 horas. En los homogeneizados de hígado de pichón no se observa el fenómeno, lo que puede ser indicio de diferencias estructurales entre ambas enzimas.

Se sugiere que la PNPasa de hígado de pollo experimente *in vitro* alteraciones en su molécula que den lugar a la aparición de formas enzimáticas secundarias de menor afinidad.

### Resumen

En la degradación fosforolítica catalizada por la PNPasa (E.C. 2.4.2.1) de hígado de pollo, la inosina es mejor sustrato que la xantosina.

La hipoxantina, la xantina, la guanina y la purina ( $1 \times 10^{-4}$  M) inhiben a la PNPasa de hígado de pichón mientras que el alopurinol, ATP, ITP, CTP y UTP ( $1 \times 10^{-3}$  M) no ejercen efecto alguno.

La temperatura óptima es 37-40° C para la PNPasa de ambas procedencias. El pH óptimo

del enzima de hígado de pollo está comprendido entre 6,5 y 7 y el de pichón entre 7-7,5.

En las representaciones de Lineweaver-Burk para la fosforólisis de la inosina catalizada por la PNPasa de hígado de pollo se obtienen líneas rectas si las concentraciones de sustrato son inferiores a  $1 \times 10^{-4}$  M y curvas a concentraciones superiores. Esta activación se incrementa cuando los homogeneizados se mantienen a 4° C y pH 7 durante intervalos superiores a 24 horas; la PNPasa de hígado de pichón no experimenta el fenómeno.

### Bibliografía

1. BARMAN, T. E.: *Enzyme Handbook*, Vol. I, Springer Verlag, Berlín, 1969, p. 330.
2. ELION, G. B., KOVENSKY, A. y HITCHINGS, G. H.: *Biochem. Pharmacol.*, **15**, 863-889, 1966.
3. KALCKAR, H. M.: *J. Biol. Chem.*, **167**, 429-443, 1947.
4. KIM, B. K., CHA, S. y PARKS, R. E.: *J. Biol. Chem.*, **243**, 1763-1770, 1968.
5. KIYOSHI, K.: *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **16**, 289-302, 1969.
6. LINEWEAVER, H. y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.
7. RAMACHANDRAN, M. y IYER, G. Y. N.: *Clin. Chim. Acta*, **40**, 281-284, 1972.
8. SAGONE, A. L. y BALCERZAK, S. P.: *Amer. J. Med. Sci.*, **259**, 350-357, 1970.
9. SCHNEIDER, W. C. y HOGEBOOM, G. H.: *J. Biol. Chem.*, **195**, 161-166, 1952.
10. SERRA, N. C., FALCONE, G. CERGIGNANI, G. e IPATA, P. L.: *Febbs Letters*, **2**, 335-338, 1971.
11. STERN, H., ALLFREY, V., MIRSKY, A. E. y SAETREN, H.: *J. Gen. Physiol.*, **35**, 559-578, 1952.
12. TSUBOI, K. K. y HUDSON, P. B.: *J. Biol. Chem.*, **224**, 889-897, 1957.