

Requerimientos estructurales de la guanina aminohidrolasa de cerebro de cobaya

L. Martínez-Farnos, S. Gubert y J. Bozal

Departamento de Bioquímica
Facultad de Química
Universidad de Barcelona
Barcelona - 28

(Recibido el 24 de noviembre de 1977)

L. MARTINEZ-FARNOS, S. GUBERT and J. BOZAL. *Structural Requirements of Guanine Aminohydrolase*. Rev. esp. Fisiol., 34, 295-300. 1978.

Structural requirements of substrates and inhibitors of guinea-pig brain guanine aminohydrolase (GAH; E.C. 3.5.4.3), have been established by working with guanine analogs (8-azaguanine, 1-methylguanine, thioguanine and guanosine), purine precursors (5-aminoimidazole-4-carboxamide), purinic bases (xanthine, hypoxanthine, adenine and uric acid) and pyrimidinic bases (cytosine, thymine and uracil). The need of the purine ring for the compounds to behave as substrate has been shown. The carbonyl group placed in position 6, plays an essential role in purine and pyrimidine binding to the enzymatic molecule. 5-aminoimidazole-4-carboxamide and allopurinol are enzyme inhibitors, while guanosine, thioguanine and 2,6-diaminopurine are not. Groups in positions 2, 6, 7 and 9 play a significant role in the union of the guanine molecule with guanine aminohydrolase.

En el hígado de cobaya (7) aparecen cuatro formas moleculares de guanina aminohidrolasa (GAH; E.C. 3.5.4.3), mientras que en músculo esquelético, el corazón, el riñón y el cerebro del mismo animal, solamente aparece una forma del enzima. Se ha postulado que son idénticas la forma molecular presente en el cerebro y la forma molecular III de hígado de cobaya (8), de las que se han sugerido que poseen cisteína e histidina en su centro activo (8).

El establecimiento de los requerimientos estructurales de los sustratos de la guanina aminohidrolasa ha constituido

objeto de atención de diversos autores. Así, ROY (10) indica que la guanina y la 8-azaguanina se desaminan con el concurso del enzima de músculo de bacalao. MANSOOR *et al.* (6), por su parte, demuestran que el enzima de hígado de rata provoca el mismo efecto sobre la tioguanina. BAKER (1), trabajando con guanina aminohidrolasa de hígado de rata, ha demostrado que los grupos situados en las posiciones 1, 6, 7 y 9 de la molécula de la guanina son esenciales para la actividad catalítica, mientras que CURRIE *et al.* (2) indican que lo son los situados en las posiciones 2, 6, 7 y 8 de aquella molécula.

En el presente trabajo se aborda el estudio de los grupos funcionales presentes en la guanina que se muestran necesarios para establecer la unión con el enzima y su posible intervención en la transformación catalítica. A este fin, se determina el comportamiento de diversas purinas y pirimidinas, de análogos estructurales de la guanina y de precursores purínicos frente a la guanina aminohidrolasa de cerebro de cobaya. Los resultados que se describen permiten poner de manifiesto que los grupos situados en las posiciones 2, 6, 7 y 9 de la molécula de la guanina son esenciales para su actuación como sustrato de la guanina aminohidrolasa.

Material y métodos

El enzima empleado es GAH de cerebro de cobaya. Una vez separado el cerebro y la médula espinal, se obtiene un homogeneizado del tejido cerebral en sacarosa 0,25 M (1/10, p/v) por trituración en un Potter-Elvehjem a 4° C. El homogeneizado se centrifuga a $50.000 \times g$, 2 h a 0° C y el sobrenadante (S_{50}) se dializa frente a tampón tris-HCl 0,05 M, de pH 8,1, a 4° C, 24 h.

Los sustratos, inhibidores y análogos estructurales empleados son: guanina, adenina, hipoxantina, xantina, ácido úrico, citosina, timina, uracilo, pirimidina e imidazol (Merck); ácido 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC), 8-azaguanina, 2,6-diaminopurina, guanosina y tioguanina (Sigma) y 1H-pirazol(3,4-d)-pirimidín-4-ol (alopurinol, Calbiochem). Se utilizaron disoluciones recién preparadas en tampón tris-HCl 0,05 M, a pH 8,1.

La actividad GAH se determina por el método de ROUSH y NORRIS (9), por lectura directa de los decrementos de absorbancia a 245 nm, en un espectrofotómetro Beckman K-25, provisto de inscriptor, a $37 \pm 0,1^\circ$ C, en cubetas de 3 ml y 1 cm de paso de luz. Las muestras contenían tampón tris-HCl 0,05 M de pH 8,1, guanina o 8-azaguanina ($60 \mu\text{M}$) y el volumen

de disolución de inhibidor cuya acción se estudia. La reacción se inicia con la adición del enzima hasta completar el volumen de 3 ml.

El tipo de inhibición y las constantes de inhibición se determinan mediante la representación doble recíproca de v vs. $[S]$ (5) para los sistemas con o sin inhibidor.

Resultados

Inhibición de GAH por purinas y pirimidinas. La hipoxantina ($100 \mu\text{M}$), la xantina ($300 \mu\text{M}$) y el ácido úrico ($300 \mu\text{M}$) producen la pérdida del 50 % de la actividad (I_{50}) de la GAH de cerebro ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg), mientras que la adenina, hasta $200 \mu\text{M}$, no provoca efecto alguno en las condiciones de trabajo. Por su parte, la concentración de las pirimidinas, citosina, timina y uracilo que provoca el 50 % de inhibición de la GAH de cerebro ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) es, de $300 \mu\text{M}$ para todas ellas, mientras que ni la pirimidina ($200 \mu\text{M}$) ni el imidazol ($10^4 \mu\text{M}$), modifican la actividad de la GAH.

El contacto previo, 30 min a 37° C, entre el enzima ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) y las purinas y pirimidinas mencionadas — para

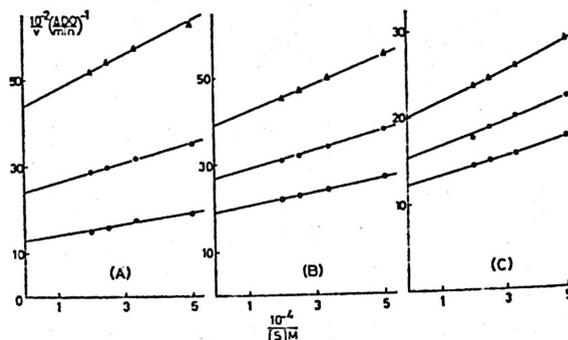


Fig. 1. Cinética de la inhibición de GAH por derivados purínicos.

A) [Hipoxantina] μM : 70 (\bullet) y 200 (Δ); B) [Xantina] μM : 100 (\bullet) y 300 (Δ); C) [Ácido úrico] μM : 100 (\bullet) y 300 (Δ); [Guanina] μM : de 20 a 50 (O); [Enzima]: $5,0 \times 10^{-2}$ U por mg; Tampón: tris-HCl 0,05 M, pH 8,1; Temperatura: $37 \pm 0,1^\circ$ C K_p , determinadas por el método gráfico de LINWEAVER-BURK (5).

aquellas concentraciones que producen un 50 % de inhibición —, no incrementa la inhibición. La diálisis durante 24 horas, frente al tampón tris-HCl 0,05 M y pH 8,1, de muestras de GAH ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) y de las bases púricas o pirimidínicas a las concentraciones antes indicadas, permite la recuperación total de la actividad inicial que presentan muestras del enzima en ausencia del inhibidor sometidas al mismo proceso de diálisis, lo que indica que las inhibiciones son reversibles.

Las purinas ensayadas producen una inhibición no competitiva pura (fig. 1A, B y C). Los valores de $K_{ii} = K_{ip}$ (μM) son: 87 (hipoxantina), 240 (xantina) y 430 (ácido úrico). Las pirimidinas, por su parte, se comportan como inhibidores acompetitivos de la GAH (figs. 2A, 2B y 2C) y los valores de K_i (μM) hallados son: 455 (citosina), 655 (timina) y 485 (uracilo). Los estudios efectuados en la zona de inhibición por sustrato muestran (fig. 3) que en presencia de citosina, u otras pirimidinas, la inhibición que aparece al aumentar la concentración de sustrato, crece con el aumento de la concentración de citosina, lo que apoya la hipótesis de la formación de complejos ternarios inactivos ESI.

Efecto de análogos estructurales de guanina sobre la actividad GAH. Con obje-

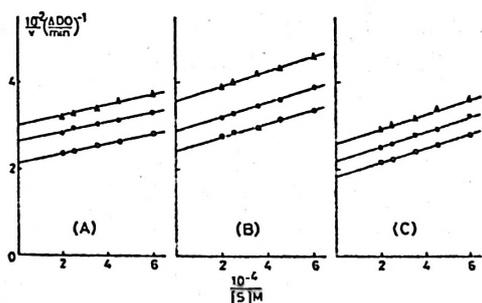


Fig. 2. Cinética de la inhibición producida por pirimidinas.

A) [Citosina] μM : 133 (●) y 200 (Δ); B) [Timina] μM : 150 (●) y 300 (Δ); C) [Uracilo] μM : 100 (●) y 200 (Δ); [Guanina] μM : de 16,7 a 50 (○); [Enzima], solución tampón y K_i como en la figura 1.

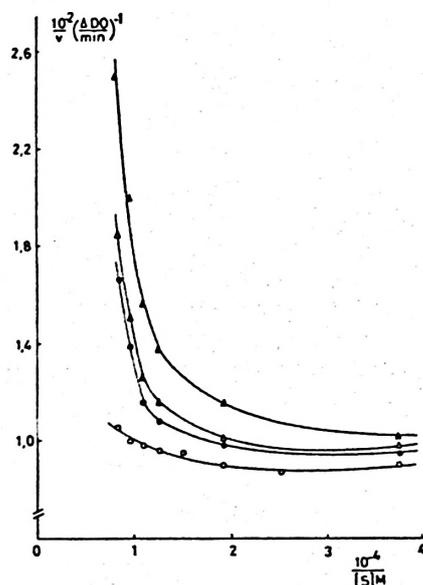


Fig. 3. Inhibición de GAH por citosina en la zona de inhibición por guanina.

[Enzima]: $1,23 \times 10^{-2}$ U/mg; [Guanina] μM : de 26,7 a 120 (○); [Citosina] μM : 133 (●), 200 (Δ) y 266 (▲); Tampón: tris-HCl 0,05 M, pH 8,1; Temperatura: $37 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

to de determinar los grupos de la molécula de guanina que son importantes para la unión con la molécula de GAH, se ha establecido el efecto de la tioguanina y de la 2,6-diaminopurina (modificación en el grupo 6 del anillo purínico de guanina), de la guanosina (modificación en el grupo 9) y del alopurinol (modificación en los grupos 2 y 7), sobre la actividad de la GAH.

La guanosina, la tioguanina y la 2,6-diaminopurina (200 μM) no modifican la actividad de la GAH ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) y tampoco son sustratos del enzima. El alopurinol es un inhibidor reversible de la GAH. En efecto, la diálisis durante 24 horas frente al tampón tris-HCl 0,05 M, de pH 8,1, de muestras de GAH ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) que son a la vez 300 μM en alopurinol, permite recuperar la misma actividad que la de una muestra paralela del enzima sin alopurinol y que se ha sometido a idéntico proceso. Las concentraciones de alopurinol que producen I_{50} son:

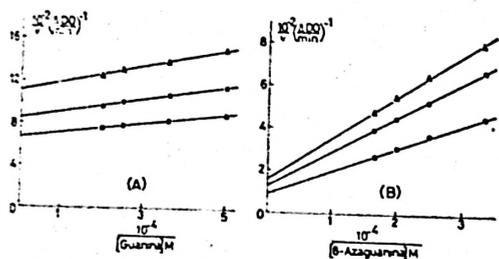


Fig. 4. Inhibición por Alopurinol de los sistemas Guanina-GAH y 8-Azaguanina-GAH. A) [Guanina] μM : de 20 a 50 (\circ); [Alopurinol] μM : 100 (\bullet) y 300 (Δ); B) [8-Azaguanina] μM : de 30 a 60 (\circ); [Alopurinol] μM : 100 (\bullet) y 200 (Δ); [Enzima], solución tampón y K_1 como en la figura 1.

300 μM con guanina (60 μM) y 450 μM con 8-azaguanina (60 μM) como sustratos. La incubación previa (30 min a 37° C) de muestras de enzima y el alopurinol de la misma composición no produce variaciones de la inhibición. Las inhibiciones producidas por el alopurinol con ambas purinas como sustratos son de tipo no competitivo puro: con guanina, $K_{ii} = K_{ip} = 370 \mu\text{M}$ (fig. 4A); con 8-azaguanina, $K_{ii} = K_{ip} = 230 \mu\text{M}$ (fig. 4B).

Inhibición de GAH por el 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC). El precur-

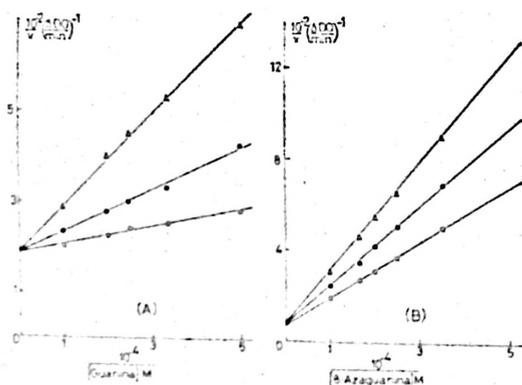


Fig. 5. Inhibición por AIC de los sistemas Guanina-GAH y 8-Azaguanina-GAH. A) [Guanina] μM : de 20 a 100 (\circ); [AIC] μM : 50 (\bullet) y 80 (Δ); B) [8-Azaguanina] μM : de 28,5 a 100 (\circ); [AIC] μM : 50 (\bullet) y 80 (Δ); [Enzima], solución tampón y K_1 como en la figura 1.

sor purínico AIC (80 μM) es inhibidor reversible de la GAH ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg); demostrado del mismo modo que se ha descrito con el alopurinol. El valor de I_{50} de la GAH ($5,0 \times 10^{-2}$ U/mg) se alcanza cuando el AIC es 80 μM o 90 μM frente a guanina y 8-azaguanina (60 μM), respectivamente. Los porcentajes de inhibición no varían cuando se incuban previamente (30 min a 37° C) muestras del enzima y el inhibidor de las condiciones reseñadas.

El AIC es inhibidor competitivo de la GAH con los sustratos guanina ($K_i = 215 \mu\text{M}$, fig. 5A) y 8-azaguanina ($K_i = 80 \mu\text{M}$, figura 5B).

Discusión

En un trabajo anterior (8) se ha demostrado que la 8-azaguanina y la 1-metilguanina son sustratos de la guanina aminohidrolasa, lo que sugiere que las posiciones 1 y 8 de la guanina no son esenciales para su unión con el enzima, si bien los sustituyentes introducidos ($-\text{CH}_3$ y $-\text{N}=\text{O}$) disminuyen la afinidad de los derivados purínicos mencionados. El que la 6-tioguanina no sea sustrato de la GAH de cerebro de cobaya o lo sea malo de los enzimas de cerebro de rata (6) y de hígado de conejo (2) indica que la existencia del grupo carbonilo en la posición 6 favorece la unión entre el sustrato y el enzima. La suposición se confirma si se considera que ni la adenina, ni la 2,6-diaminopurina son sustratos o inhibidores del enzima, mientras que la hipoxantina, la xantina, el ácido úrico y el alopurinol, que poseen dicho grupo, lo inhiben no competitivamente; se unen, por ello, a un centro del enzima diferente del que lo hace la guanina y se originan formas inactivas del enzima.

El N en posición 7 en el anillo de purina interviene en la unión con la guanina aminohidrolasa ya que ni la 7-metilguanina (3) ni la 1,7-dimetilguanina (1) son sustratos del enzima. El que la guanosina

no sea sustrato o inhibidor de la GAH indica que el grupo —NH situado en la posición 9 de la guanina debe hallarse libre para que pueda unirse al enzima y que éste manifieste su actividad catalítica. De lo expuesto puede deducirse que los entornos de las posiciones 6, 7 y 9 de la guanina sean las zonas de unión de la purina a la GAH y que la posición 2 de la base (C—NH_2) es la zona donde ocurre la desaminación del sustrato por adición de agua al doble enlace 2,3.

El 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC), es inhibidor competitivo de la GAH de cerebro de cobaya; contiene en las posiciones 6, 7 y 9 los mismos grupos que la guanina, y además un grupo amino en posición muy parecida a la de la base púrica, lo que puede contribuir a confirmar las aseveraciones anteriores. La acción del AIC puede estar relacionada con el mantenimiento del equilibrio celular purínico, ya que su actuación está ligada a la supresión efectiva del catabolismo de la guanina a nivel de actividad guanina aminohidrolasa, hecho sugerido también por LEWIS y GLANTZ (4) al estudiar la acción del AIC sobre la GAH de hígado de cobaya.

El que el imidazol y la pirimidina no provoquen efecto alguno sobre la actividad de la guanina aminohidrolasa y que la citosina, la timina y el uracilo, sean inhibidores incompetitivos, confirma la necesidad de la estructura purínica completa de los sustratos del enzima. Al ser el sistema en estudio unreactante, podría admitirse que las bases pirimidínicas forman la guanina o bien un complejo binario SI, o un ternario inactivo ESI, si bien los fuertes aumentos observados en la inhibición provocada por la citosina en la zona de inhibición por el sustrato guanina, sugieren claramente que la inhibición provocada por las pirimidinas ensayadas se debe a la formación de complejos ternarios ESI.

El conjunto de los resultados comentados permiten formular la hipótesis de

que, por una parte, los grupos esenciales que determinan el comportamiento de la guanina como sustrato de la guanina aminohidrolasa son los situados en las posiciones 2, 6, 7 y 9 de su estructura purínica, y por otra, que la presencia del grupo carbonilo en la posición 6 de la estructura purínica y pirimidínica, es necesaria para que dichos compuestos se comporten como inhibidores del enzima.

Resumen

El empleo de compuestos relacionados estructuralmente con el sustrato guanina (8-azaguanina, 1-metilguanina, tioguanina y guanosina), de precursores purínicos (5-aminoimidazol-4-carboxamida) (AIC), de bases púricas (xantina, hipoxantina, adenina y ácido úrico) y de bases pirimidínicas (citosina, timina y uracilo), ha permitido establecer los requerimientos estructurales de los sustratos e inhibidores de la guanina aminohidrolasa (E.C. 3.5.4.3) de cerebro de cobaya. Se demuestra la necesidad del anillo purínico para que el compuesto se comporte como sustrato. El grupo carbonilo en posición 6 juega un papel esencial en la unión entre las bases púricas y pirimidínicas y la molécula enzimática. El ácido 5-aminoimidazol-4-carboxamida y el alopurinol son inhibidores del enzima, mientras que la guanosina, la tioguanina y la 2-6-diaminopurina, no ejercen efecto alguno. Los hechos experimentales muestran el significativo papel que desempeñan los grupos situados en las posiciones 2, 6, 7 y 9 de la molécula de guanina en su unión a la guanina aminohidrolasa.

Bibliografía

1. BAKER, B. R.: *J. Med. Chem.*, **10**, 59-61, 1967.
2. CURRIE, R., BERGEL, F., y BRAY, R. C.: *Biochem. J.*, **104**, 634-638, 1967.
3. HITCHINGS, G. H., y FALCO, E. A.: *Proc. Nat. Acad. Sci. Wash.*, **30**, 294-297, 1944.
4. LEWIS, A. S., y GLANTZ, M. D.: *J. Biol. Chem.* **249**, 3862-3866, 1974.
5. LINEWEAVER, H., y BURK, D.: *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658-666, 1934.

6. MANSOOR, M., KALYANKAR, G. D., y TALWAR, G. P.: *Biochem. Biophys. Acta*, **77**, 307-317, 1963.
7. MARTÍNEZ-FARNÓS, L., GUBERT, S., y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 73-80, 1978.
8. MARTÍNEZ-FARNÓS, L., GUBERT, S., y BOZAL, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 205-212, 1978.
9. ROUSH, A., y NORRIS, E. R.: *Arch. Biochem.*, **29**, 124-129, 1950.
10. ROY, J. E.: *Canad. J. Biochem.*, **44**, 1093-1098, 1966.