

# ADENOSINA DESAMINASA DE MUSCULO DE BOVIDO: EFECTOS DEL pH SOBRE LOS PARAMETROS CINETICOS DE LA REACCION

Por J.M. Zumalacárregui (1)  
V. Díez (1)  
C. Martínez (1)

## INTRODUCCION

La adenosina desaminasa (adenosina aminohidrolasa: E.C. 3.5.4.4.) cataliza a todos los efectos la desaminación hidrolítica irreversible de la adenosina a inosina y amoníaco. En un trabajo previo publicado por nosotros, Martínez y col.<sup>5</sup> hemos descrito un método de purificación para esta enzima obtenido de músculo esquelético de bóvido con el que se logra un enriquecimiento de la actividad de 950 veces aproximadamente. En el mencionado trabajo se han publicado también datos sobre algunas propiedades cinéticas y catalíticas de la enzima (perfil de pH, efecto de la temperatura sobre la estabilidad, necesidad de cofactores, inhibición por reactivos con grupos sulfidrilo,  $K_m$ , etc.). Al pH óptimo la reacción sigue un mecanismo ordenado UNI-BI donde el amoniaco es el primer producto que se libera, Martínez y col.<sup>6</sup>:



En este mecanismo, la etapa limitante de la velocidad en el sentido directo es la liberación del amoniaco del complejo enzima-amoniaco-inosina de acuerdo con Orsi y col.<sup>7</sup>.

En la presente publicación se estudia el efecto del pH sobre la velocidad máxima y la constante de Michaelis de la reacción catalizada por la adenosina desaminasa de músculo de bóvido, con la finalidad de obtener información acerca de qué grupos ionizables están implicados en la actividad catalítica de la enzima.

(1) Dpto. de Higiene y Tecnología de los Alimentos y Toxicología.

## MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron para este estudio preparaciones purificadas de adenosina desaminasa de músculo esquelético de bóvido según el método descrito por Martínez y col.<sup>5</sup> exentas de actividades AMP desaminasa y 5' nucleotidasa y que, en las condiciones estándar de ensayo, muestran una relación lineal entre la velocidad inicial y la concentración de enzima.

La actividad enzimática se midió a 25°C. en un espectrofotómetro «Hitachi 200» siguiendo el descenso de la absorbancia a 265 nm por el método de Kalckar<sup>2</sup>.

La mezcla de la reacción consistía en 150 umoles de tampón fosfato a distintos pHs. 130 umoles de adenosina y enzima en un volumen final de 3 ml. Se define una unidad de actividad como la cantidad de enzima que cataliza la desaminación de 1 umol de adenosina por minuto en las condiciones citadas y a pH 7,0.

Antes de estudiar los efectos del pH sobre la velocidad máxima y la  $K_m$  se realizó un experimento previo para conocer el grado de estabilidad del enzima frente al pH en el rango de 5,3 a 8,6. Para ello se incubaron alícuotas de la preparación enzimática durante cinco minutos en tampones fosfato 0.05 M a varios pH en el intervalo señalado y a la temperatura normal de análisis. En estas condiciones la adenosina desaminasa es estable en todo el rango de pH estudiado.

## RESULTADOS

En la tabla I se muestran los valores de  $K_m$  y velocidad máxima en función del pH en el intervalo de 5,3–8,6. Los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  se determinaron a cada pH por el procedimiento gráfico de Lineweaver-Burk<sup>3</sup> utilizando las concentraciones variables del sustrato adenosina siguientes: 6,25; 12,5; 25; 50 y 100  $\mu$ M en la mezcla de análisis.

La velocidad máxima se expresa como  $\mu$ moles de sustrato transformados por minuto y por 100 unidades de enzima.

## DISCUSION

Nuestros resultados se discuten sobre el supuesto de que el mecanismo citado en la introducción (ordenado uni-bi) es el que sigue la reacción a lo largo de todo el rango de pH estudiado.

En las figuras 1 y 2 se muestra el efecto del pH sobre las constantes cinéticas  $V_{max}/K_m$  en función del pH (fig. 1) parece que son esenciales en la unión de la enzima al sustrato, dos grupos ionizables: uno de pK 5,8 posiblemente un residuo de histidina (un grupo imidazol de la histidina) y otro pK 7,5 requerido en forma protonada probablemente un grupo  $\alpha$ -amino.

La etapa limitante de la velocidad parece estar gobernada asimismo por dos grupos ionizables: uno es pK 5,8 y otro en torno a pK 8, como se desprende de la representación log.  $V_{max}$  en función del pH (fig. 2), asociados probablemente a un grupo imidazol de la histidina y a un grupo tiol respectivamente. Resultados similares han obtenido Chilson y Fisher<sup>1</sup> con la adenosina desaminasa de intestino de bóvido y Orsi y col.<sup>7</sup> con la de duodeno de ternera.

TABLA I  
Efectos del pH sobre los parámetros cinéticos de la reacción

pH	$K_m$	$V_{max}$
5,3	17,38	56,20
5,5	20,54	83,00
5,9	21,33	173,00
6,3	22,91	186,00
6,6		190,00
6,8	23,30	194,90
7,0	23,70	194,90
7,2	24,49	199,50
7,4		190,00
7,6	26,86	186,00
7,8	31,60	177,00
8,0	35,55	125,00
8,3		63,00
8,6	33,18	39,80

Existe cierta duda acerca de la naturaleza de uno de los grupos requeridos para la actividad de la adenosina desaminasa, concretamente el de pK 8. Sin embargo, algunos autores, como Maguire y Simu, han demostrado que en el mecanismo de la reacción participa un grupo SH en el centro activo y los estudios de inhibición por el para-hidroximercuribenzoato realizados por nosotros, Martínez y col.<sup>5</sup>, parecen indicar que, efectivamente, el pK de 8 aunque algo desplazado hacia la izquierda (el PCMB inhibe a pH 8,5) corresponde a un grupo tiol.

## RESUMEN

En este trabajo se ha investigado la dependencia del pH de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la adenosina desaminasa de músculo esquelético de bóvido en el rango de pH de 5,3 a 8,6.

Los resultados obtenidos indican que al menos tres grupos ionizables diferentes del centro activo del enzima participan en la reacción. Uno, probablemente asociado a un resto imidazol de la histidina (pK 5,8) y los otros dos (pK 7,5 y pK 8) asociados a un grupo  $\alpha$ amino y a un grupo tiol.

## BOVINE SKELETAL MUSCLE ADENOSINE DEAMINASE: pH EFFECTS ON THE KINETIC PARAMETERS OF THE REACTION

### SUMMARY

The pH dependence of the kinetic parameters of the reaction catalyzed by adenosine deaminase (E.C. 3.5.4.4.) was investigated in the pH range of 5.3–8.6.

From the results obtained it is postulated that at least three groups of pKs of 5.8, 7.5 and 8.0 participate in the reaction. These groups are associated probably with a rest of histidine, an  $\alpha$ amino group and a thiol residue respectively.

### BIBLIOGRAFIA

- 1) CHILSON, O.P. & FISHER, J.R. (1963). Some comparative studies of calf and chicken adenosine deaminase. *Archs. biochem. Biophys.* 102, 77-85.
- 2) KALCKAR, H.M. (1947). Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. II. Determination of adenine compounds. *J. Biol. Chem.* 167, 445-459.
- 3) LINEVEAWER, H. & BURK, D. (1934). *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658.
- 4) MAGUIRE, M.H. & SIM, M.K. (1971). Studies on adenosine deaminase. II. Specificity and Mechanism of Action of Bovine placental adenosine deaminase. *Eur. J. Biochem.* 23, 22-29.
- 5) MARTINEZ, C.; ZUMALACARREGUI, J.M.; DIEZ, V. y BURGOS, J. (1984). Bovine Skeletal muscle adenosine deaminase: Purification and some properties. *Int. J. Biochem.* 16 (12), 1.279-1.282.
- 6) MARTINEZ, C.; DIEZ, V. y ZUMALACARREGUI, J.M. Kinetics and Thermodynamics of adenosine deaminase (Enviado a Enzyme para su publicación).
- 7) ORSI, B.A.; MCFERRAN, N.; HILL, A. y BINGHAM, A. (1972). Kinetics and the mechanism of action of Adenosine Aminohydrolase. *Biochemistry*, 11, (18), 3.386-3.392.

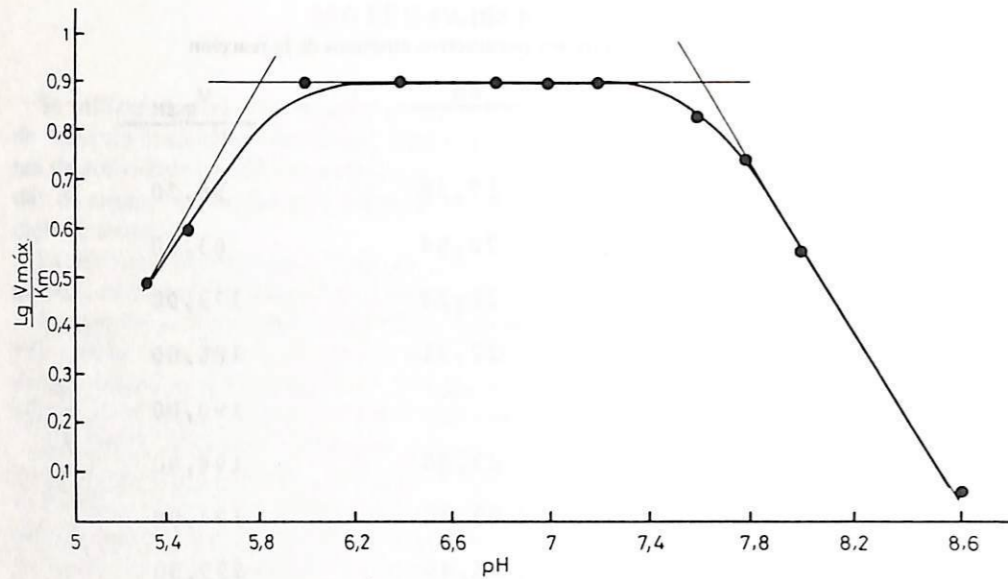


Fig. 1.- Determinación de los pK implicados en la unión del enzima al sustrato. Representación de log. V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> en función del pH.

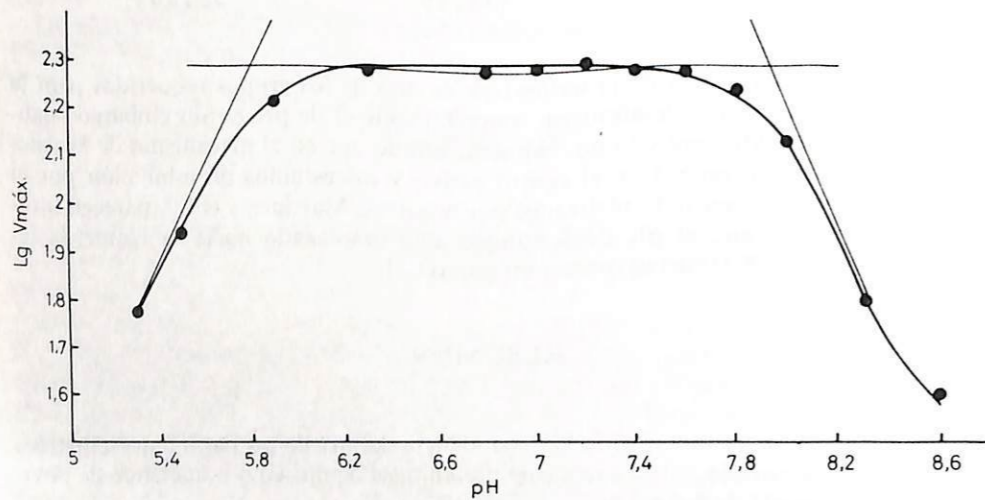


Fig. 2.- Determinación de los pK de la etapa limitante de la velocidad (liberación del amoniaco del complejo E-Amoniaco-Inosina). Representación de log. V<sub>max</sub> en función del pH.