

REACCIÓ DE LA RIBONUCLEASA A DE PÀNCREAS DE BOU AMB PIRIDOXAL-FOSFAT

per D. OBACH i C. M. CUCHILLO

Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma
de Barcelona

Són diverses les tècniques utilitzades per a conèixer els aminoàcids que formen part del centre actiu d'un enzim. Citarem com a exemples més representatius les tècniques d'obtenció de derivats covalents formats entre l'enzim i el substrat, o entre l'enzim i un anàleg del substrat, així com les tècniques de reacció química controlada amb reactius específics per a uns determinats grups, etc. (KOSHLAND, 1960). D'entre aquestes tècniques, una de les més utilitzades actualment és la del marcat per afinitat. El fonament d'aquesta tècnica és obtenir una substància anàloga al substrat que tingui les dues particularitats següents: *a*) que manqui dels grups químics que donen lloc a la reacció enzimàtica amb el substrat, i *b*) que contingui un grup químic reactiu en la posició adequada, el qual reaccionarà amb l'enzim en forma irreversible.

En el marcat per afinitat, cal que es produeixi una pèrdua de l'activitat enzimàtica com a conseqüència del bloqueig d'un grup imprescindible, bé en la fixació del substrat, bé en la catàlisi pròpiament dita. L'analogia estructural permet de suposar que la reacció ha tingut lloc en el centre actiu i que, per tant, la pèrdua d'activitat no és deguda a un canvi conformacional de la proteïna enzimàtica induït per la presència del reactiu emprat (KOSHLAND, 1960; SINGER, 1967).

En alguns casos, la reacció entre el reactiu d'afinitat i el grup químic específic de l'enzim dona lloc a un compost inestable que, conseqüentment, és necessari estabilitzar per a poder conèixer el lloc de reacció. Aquest cas és el del piridoxal-fosfat, que és capaç de reaccionar amb el grup ϵ -NH₂ de les lisines i donar lloc a la formació d'una base de Schiff característica. Aquesta base de Schiff és, tanmateix, poc estable, i pot ésser hidrolitzada fàcilment. Per això cal estabilitzar el complex Piridoxal-lisina, la qual cosa és assolida per reducció de la base de Schiff

amb borohidruir de sodi, amb què hom obté l'estabilització del complex mitjançant la formació d'una amina secundària (FISHER, 1964; FISHER *et al.*, 1958).

El centre actiu dels enzims, tal com ja ha estat dit, és format no solament per aminoàcids que intervenen en la catàlisi pròpiament dita sinó també per d'altres que hi intervenen formant llocs específics per a la fixació dels substrats o dels cofactors. L'especificitat d'aquests dos processos depèn altament de l'estructura terciària local. Hom ha pogut observar en molts casos que els residus implicats presenten valors pK_a anòmals, i ha estat observat que llur reactivitat és químicament atípica en comparació amb compostos models. Aquests fets han portat a la conclusió que els residus del centre actiu poden estar preparats per a dur

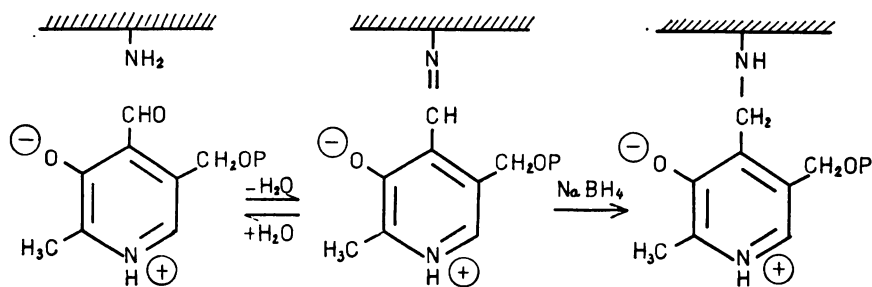


FIG. 1. — Reacció del piridoxal-fosfat amb el grup ϵ -NH₂ d'una lisina de la proteïna enzimàtica i posterior reducció de la base Schiff obtinguda

a terme llur funció en una condició localitzada d'alta energia (VALLEE i WILAILMS, 1968).

La formació de complexos entre el piridoxal-fosfat i els enzims que en són dependents per a l'activitat és un exemple de la reactivitat específica de centre actiu. Com a regla general, el grup aldehyd del cofactor forma un enllaç aldimí només amb un residu lisil del gran nombre dels que es troben a la proteïna (FASSELLA, 1967).

Els residus lisils del centre actiu que no depenen del piridoxal-fosfat per a l'activitat podrien estar condicionats en una forma que permetria la formació específica de l'aldimina amb piridoxal-fosfat, ja que un bon nombre d'enzims s'inhibeixen en la seva presència (RIPPA *et al.*, 1967; SHAPIRO *et al.*, 1968; VALLEE i RIORDAN, 1969; PISZKIEWICZ *et al.*, 1970).

La ribonucleasa A de pàncreas de bou és un enzim en el qual el piridoxal-fosfat no té funció coneguda, però que posseeix un centre fixador de fosfat molt ben caracteritzat (WYCKOFF *et al.*, 1967; KARTHA *et al.*, 1967). Quan la ribonucleasa és tractada amb piridoxal-fosfat i

borohidrur de sodi, es perd activitat catalítica. Aquesta pèrdua d'activitat és atribuïda per MEANS i FEENEY (1971) i RAETZ i AULD (1972) a la unió del piridoxal-fosfat a un residu lisil topològicament adjacent al centre actiu. Segons els primers autors, la reacció té lloc solament amb el grup ϵ -NH₂ de la lisina 7, mentre que els segons, en un treball molt més complet, mostren que la reacció té lloc amb els grups ϵ -NH₂ de les lisines 7 i 41 en una proporció de 2 a 3.

A causa del nostre interès per escatir la funció del grup lisina 7, i sospitant que podria estar implicat en la fixació de purines en el nucleòtid adjacent en 5' a l'enllaç fosfodiester hidrolitzat per la ribonucleasa (DEAVIN *et al.*, 1966, a; 1966, b; RABIN *et al.*, 1969) decidírem d'estudiar aquesta reacció amb la intenció d'analitzar el comportament cinètic del derivat en lisina 7 quan són utilitzats substrats diferents, com és ara ARN, àcid citidílic 2',3' cíclic i nucleòsids monofosfats del tipus CpX on X pot ésser qualsevol de les quatre bases pròpies de l'ARN.

La utilització del piridoxal-fosfat com a marcador d'afinitat de la ribonucleasa prové del fet que el piridoxal-fosfat inhibeix competitivament la hidròlisi de l'àcid citidílic 2',3' cíclic a pH 7,15 en tampó tris-ClH 0,05 M. La constant d'inhibició té un valor $K_i = 2,8 \times 10^{-3}$ M (MEANS i FEENEY, 1971). D'altra banda, hom considera com a evidència de reacció en el centre actiu per fixació del fosfat el fet que un excés de 35 vegades la concentració de piridoxal no té cap efecte sobre l'activitat ribonucleàsica (MEANS i FEENEY, 1971; RAETZ i AULD, 1972).

Com a comprovació adicional, s'ha pogut veure que, en les condicions de treball, el tractament de la ribonucleasa amb borohidrur de sodi sol no produeix inhibició de l'activitat enzimàtica.

En els nostres experiments, hem trobat que les condicions de treball són summament importants de cara a la interpretació final dels resultats; hi ha, però, diverses diferències, algunes de força consideració, en relació amb els treballs abans esmentats, és a dir, amb el de MEANS i FEENEY (1971) i amb el de RAETZ i AULD (1972).

Com a material de partida, ha estat utilitzada sempre la ribonucleasa A obtinguda per cromatografia sobre CM-cel·lulosa, a partir de ribonucleasa 5 vegades cristallitzada (Calbiochem) segons el mètode de TABORSKY (1959) i dessalinitzada amb Sephadex G-25 fine (1,8 x 81 cm) (Pharmacia).

La determinació de l'activitat enzimàtica fou feta segons el mètode de CROOK, MATHIAS i RABIN (1960) mesurant l'increment de la densitat òptica a 284 nm utilitzant àcid citidílic 2',3' cíclic com a substrat, i amb el mètode de WITZEL i BARNARD (1962) mesurant la disminució de la densitat òptica a 286 nm, emprant dinucleòsids monofosfats com a substrats.

En iniciar els experiments de modificació de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat foren emprades quantitats equimolars d'enzim i de cofactor, però els resultats demostraren que el rendiment no era massa elevat. Per aquies motiu hom augmentà la concentració de cofactor a 3 vegades la concentració d'enzim.

Hom féu reaccionar 82,2 mg de ribonucleasa A amb 4,05 mg de piridoxal-fosfat (Merck) dissolts en 8 ml de tampó d'imidazol-ClH pH 6,0, I = 0,05 durant 10 minuts a 25° C. L'estabilització de la base de Schiff fou feta per reducció amb borohidrur de sodi en excés fins que la so-

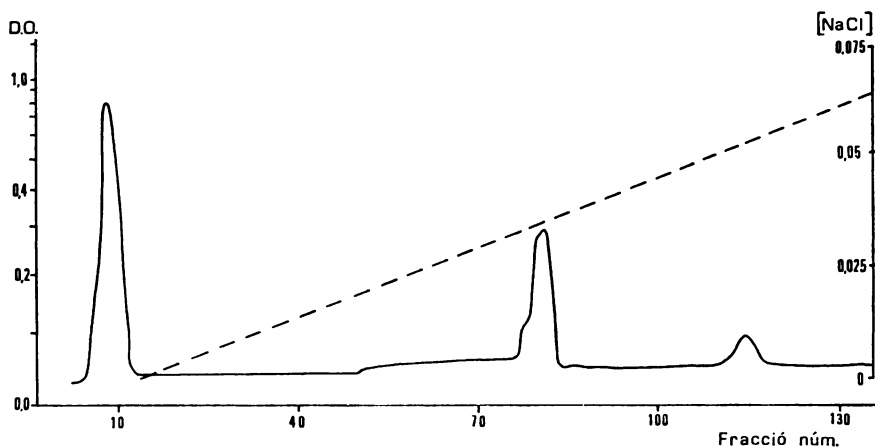


FIG. 2. — Cromatografia sobre CM-cel·lulosa dels derivats obtinguts a la reacció de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (—) D. O. 280 nm. (---) Concentració clorur sòdic. Fraccions de 2 ml

lució restà totalment descolorida. A continuació hom procedí a eliminar l'excés de reactius de baix pes molecular, cromatografiant el conjunt sobre Sephadex G-25 fine (1,8 × 81 cm) equilibrat amb tampó tris-ClH 0,01 M, pH 8,0. El pic d'alt pes molecular fou cromatografiat seguidament sobre CM-cel·lulosa (0,9 × 25 cm) (Whatman CM-52) equilibrada amb tampó tris-ClH 0,01 M, pH 8,0. L'elució fou duta a terme amb un gradient lineal de clorur sòdic des de 0 a 0,15 M.

Dels tres pics principals obtinguts d'aquesta cromatografia hom mesurà els espectres d'absorció a l'ultraviolat entre 230 nm i 340 nm. A la figura 3 hi ha representats els espectres d'absorció dels tres pics, i també el del producte de reducció del piridoxal-fosfat amb borohidrur de sodi. L'espectre del tercer pic presenta característiques espectrals similars a les de la ribonucleasa A nativa, bé que la relació densitat òptica

a 280 nm sobre la de 260 nm és una mica baixa. A la figura també podem observar que el quocient entre les densitats òptiques a 320 nm i 280 nm és aproximadament el doble en el cas del primer pic que en el del segon. D'això, i tenint en compte els antecedents bibliogràfics, hom deduí que el primer pic de la cromatografia devia correspondre a un derivat bisubstituit, mentre que el segon devia ésser monosubstituit.

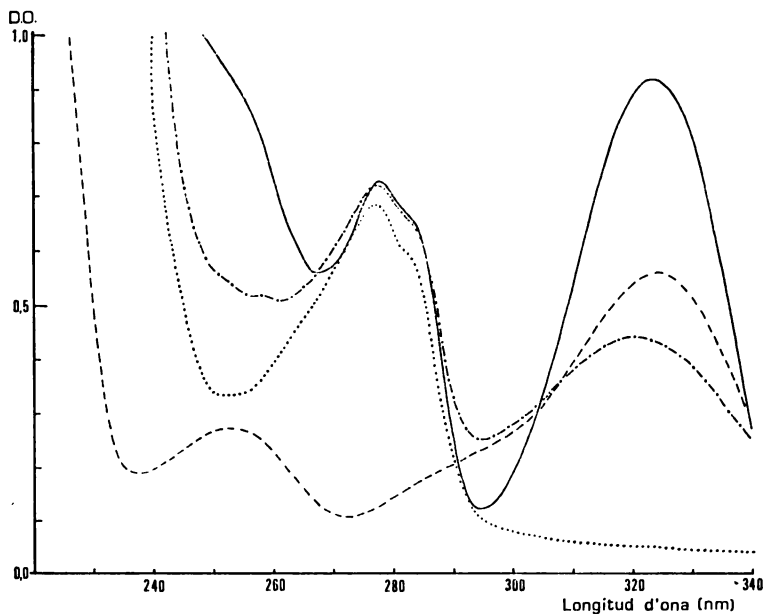


FIG. 3. — Espectres d'absorció: (—) Derivat bisubstituit de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (— · —) Derivat monosubstituit. (. . . .) Ribonucleasa no reaccionada. (— —) Producte de la reducció del piridoxal-fosfat amb borohidruir de sodi

A la cromatografia també poguérem apreciar que el segon pic era asimètric. Per aquest motiu fou recromatografiat sobre CM-cel·lulosa (0,9 × 25 cm) utilitzant un gradient format per tris-ClH 0,005 M, pH 7,2 com a tampó inicial i tris-ClH 0,1 M, pH 8,5, com a tampó final, amb un gradient de clorur sòdic de 0 a 0,1 M. El derivat fou fraccionat en dos pics clarament diferenciats un dels quals correspon als derivats que tenen el piridoxal-fosfat unit a la lisina 7, i l'altre als que el tenen unit a la lisina 41 (RAETZ i AULD, 1972).

En posteriors preparacions, fou eliminada la primera cromatografia so-

bre CM-cel·lulosa i hom procedí directament a la cromatografia, amb gradient mixt de força iònica i pH en les mateixes condicions ja descrites, del component d'alt pes molecular obtingut de la cromatografia amb Sephadex G-25 fine.

A la gràfica següent, mostrem un fraccionament típic de les ribonucleases modificades amb piridoxal-fosfat. Com pot ésser observat fàcilment, el perfil d'elució és francament complex i demostra la presència d'un gran nombre de derivats.

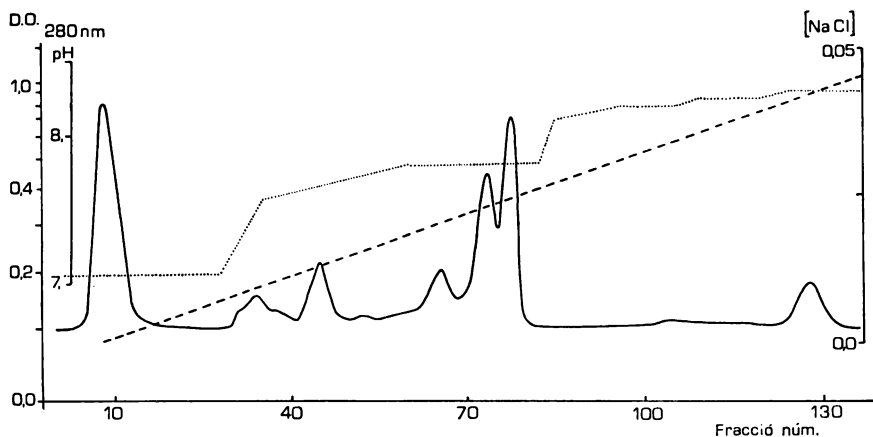


FIG. 4. — Cromatografia sobre CM-cel·lulosa dels derivats obtinguts a la reacció de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (—) D. O. 280 nm. (---) Concentració de clorur sòdic. (. . . .) pH

El primer pic presenta un espectre ultraviolat propi d'un derivat bisubstituït. L'últim pic és ribonucleasa no reaccionada. Els tres anteriors són derivats monosubstituïts i els restants són probablement bisubstituïts, bé que la proporció de densitat òptica de 320 nm a 280 nm és quelcom més petita que en el primer pic.

RAETZ i AULD (1972) dedueixen que el piridoxal-fosfat es fixa preferentment a les lisines 7 i 41 perquè els grups ϵ -NH₂ d'aquests residus deuen tenir un pK_a rebaixat en comparació amb el de les altres lisines no integrants del centre actiu. Basen llur conclusió en el fet que compostos models, com es ara N- α -acetil-D,L-lisina, no reaccionen en absolut amb el piridoxal-fosfat. D'altra banda, la impossibilitat, per part del piridoxal fosfat, d'inactivar completament la ribonucleasa, l'expliquen en funció de l'impediment estèric que presenta la reacció en la lisina 7 per a modificar la lisina 41, que és indispensable per a l'activitat. Els nos-

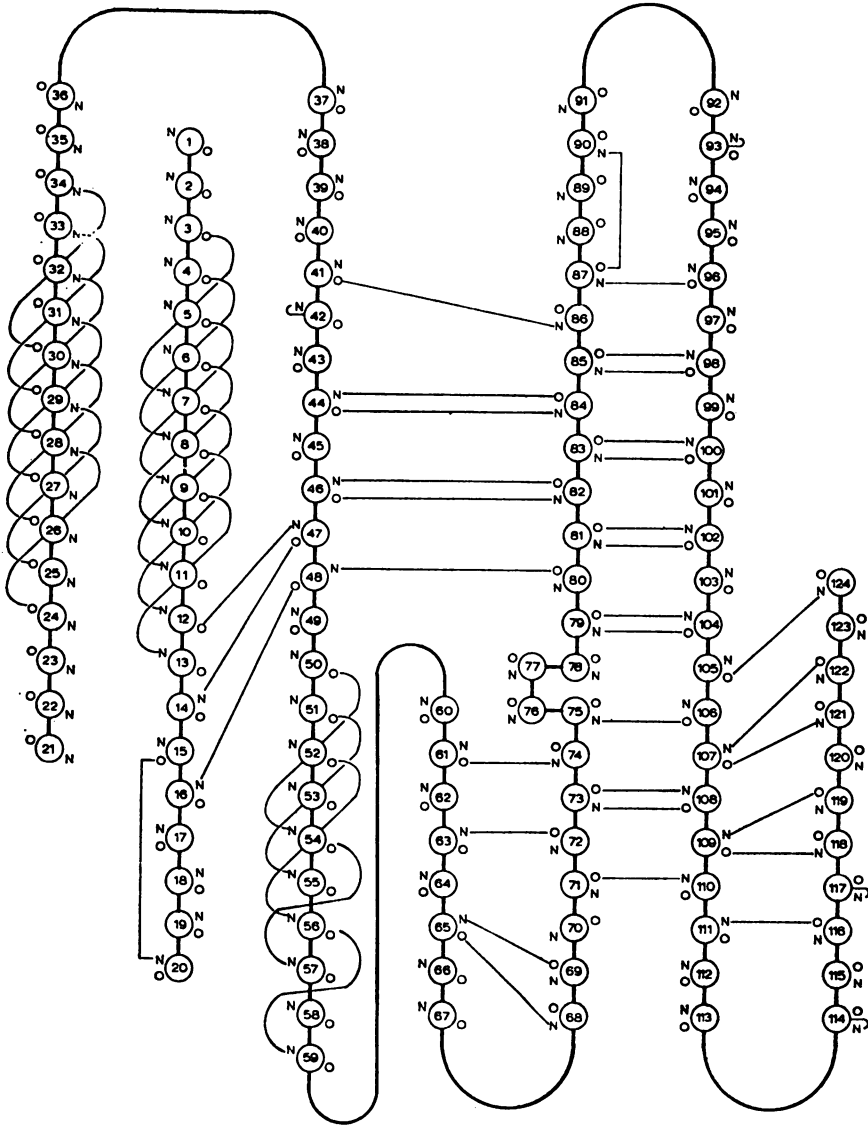


FIG. 5. — Model esquelètic de la ribonucleasa S segons Wyckoff *et al.* (1970)

tres resultats demostren que una disminució del pK_a de les lisines 7 i 41 del centre actiu únicament no és suficient per a explicar la reacció amb el piridoxal-fosfat, puix que, si bé en menys proporció, es produeix com

a mínim un tercer derivat monosubstituït. A més, si és cert que la modificació a la lisina 7 impedeix la reacció a la lisina 41, i viceversa, hom no podria explicar l'aparició, en una proporció considerable, de derivats bisubstituïts. De fet, però, és clar que han d'existir diferències, bé que molt subtils, entre els diferents microentorns de cada residu aminoàcid, ja que, en els espectres de les diferents fraccions, hom observa desplaçaments apreciables en el màxim d'absorció del piridoxamina-fosfat substituït que varien entre 317 i 325 nm. Aquestes variacions deuen ésser produïdes per la formació en diferents proporcions de diverses espècies ionitzades fosforil-piridoxil-lisil-ribonucleases.

En la figura 5 es pot observar l'estructura de la ribonucleasa S segons el model de WYCKOFF *et al.* (1970). En aquest model hom pot veure les posicions de les lisines 7 i 41, les histidines 12 i 119 i el conjunt de la cavitat que forma el centre actiu de l'enzim. Un dinucleòsid monofosfat del tipus Pir-p-Pur es col·locaria amb la pirimidina a la part més interior de la cavitat del centre actiu voltada pels residus 30 i 44, el grup fosfat entre els residus 8 i 119 i la base púrica entre 111 i 118.

L'anàlisi del comportament cinètic demostra que la unió del piridoxal-fosfat disminueix en gran manera l'activitat de la ribonucleasa A. Aquesta disminució d'activitat és diferent segons si la reacció té lloc amb la lisina 7 o amb la lisina 41, únics derivats monosubstituïts estudiats fins al moment present. La disminució d'activitat del derivat 7 és de l'ordre del 73 % utilitzant àcid citidílic 2',3' cíclic, i entre el 74 % i el 84 % utilitzant dinucleòsids monofosfats com a substrats.

En el cas del derivat en lisina 41, la disminució és de quasi el 95 % amb àcid citidílic 2',3' cíclic. Hom no observa cap tipus d'activitat amb dinucleòsids monofosfats. En aquest cas podem pensar que la substitució en lisina 41 permet un petit grau d'allotjament a un substrat petit tal com l'àcid citidílic 2',3' cíclic però que impedeix totalment l'allotjament d'un substrat de dimensions més grans. Una explicació alternativa seria que la presència del grup ϵ -NH₂ en forma lliure de la lisina 41 és absolutament necessària per a l'etapa de transesterificació catalitzada per l'enzim, mentre que la reacció d'hidròlisi podria transcórrer sense el grup lliure, bé que a una velocitat molt inferior.

BIBLIOGRAFIA

1. CROOK, E. M., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Biochem. J.» 74, 234-238 (1960).
2. DEAVIN, A., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Nature» 211, 252-255 (1966 a).
3. DEAVIN, A., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Biochem. J.» 101, 14c-16c (1966 b).
4. FASELLA, P.: «Ann. Rev. Biochem.» 36, 185 (1967).
5. FISCHER, E. H. dins «Structure and activity of enzymes». GOODWIN, T. W., HARRIS, J. I., i HARTLEY, B. S., Editors. Academic Press, Londres, 111-120 (1964).
6. FISCHER, E. H., KENT, A. B., SNYDER, E. R. i KREBS, E. G.: «J. Amer. Chem. Soc.» 80, 2906 (1958).
7. KARTHA, G., BELLO, J., i HARKER, D.: «Nature» 213, 862 (1967).
8. KOSHLAND, D. E. jr.: Adv. Enzymol. 22, 45-97 (1960).
9. MEANS, G. E. i FEENEY, R. E.: «J. Biol. Chem.» 246, 5532-5533 (1971).
10. PISZKIEWICZ, D., LANDEN, M. i SMITH, E. L.: «J. Biol. Chem.» 245, 2622 (1970).
11. RABIN, B.R., CUCHILLO, C. M., DEAVIN, A., KEMP, C. M. i MATHIAS, A. P.: «FEBS Symposium» Vol. 19. Academic Press, London, 203-218 (1969).
12. RAETZ, C. R. H. i AULD, D. S.: «Biochemistry» II, 2229-2236 (1972).
13. RIPPA, M., SPANIO, L. i PONTREMOLI, S.: «Arch. Biochem. Biophys.» 118, 48 (1967).
14. SHAPIRO, S., ENSER, M., PUGH, E. i HORECKER, B. L.: «Arch. Biochem. Biophys.» 128, 554 (1968).
15. SINGER, S. J.: «Adv. Protein. Chem.» 22, 1-54 (1967).
16. TABORSKY, G.: «J. Biol. Chem.» 234, 2652 (1959).
17. VALLEE, B. L. i RIORDAN, J. F.: «Ann. Rev. Biochem.» 38, 733-794 (1968).
18. VALLEE, B. L. i WILLIAMS, R. J. P.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.» 59, 498 (1968).
19. WITZE, H. i BARNARD, E. A.: «Biochem. Biophys. Res Comm.» 7, 289-294 (1962).
20. WYCKOFF, H. W., HARDMAN, K. D., ALLEWELL, N. M., INAGAMI, T., JOHNSON, L. N. i RICHARDS, F. M.: «J. Biol. Chem.» 242, 3984 (1967).
21. WYCKOFF, H. W., TSEBNOGLOU, D., HANSON, A. W., KNOX, J. R., LEE, B. i RICHARDS, F. M.: «J. Biol. Chem.» 245, 305 (1970).