



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Enzims del catabolisme purínic en fraccions subcel·lulars d'escorça cerebral de rata: caracterització de l'adenosina desaminasa purificada del teixit

Josep Joan Centelles i Serra

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA



ENZIMS DEL CATABOLISME PURÍNIC EN FRACCIONS
SUBCEL·LULARS D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA:
CARACTERITZACIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA
PURIFICADA DEL TEIXIT.

Memòria presentada per
En Josep Joan CENTELLES i SERRA
per a aspirar al grau de
Doctor en Química

Barcelona, juliol de 1986





UNIVERSIDAD DE BARCELONA

FACULTAD DE QUIMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA

Av. Diagonal, 647 - Tel. 330 73 11

08028 - BARCELONA

RAFAEL FRANCO i FERNANDEZ, Professor Titular de Bioquímica i Biología Molecular del Departament de Bioquímica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona,

CERTIFICO:

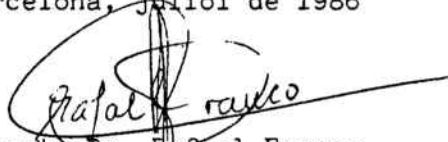
Que el treball experimental i la redacció de la Memòria titulada:

"ENZIMS DEL CATABOLISME PURÍNIC EN FRACCIONS SUBCEL·LULARS D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA: CARACTERITZACIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA PURIFICADA DEL TEIXIT".

han estat realitzats per En Josep Joan Centelles i Serra, sota la meva direcció, en aquest Departament de Bioquímica.

Així ho faig constar i autoritzo la seva presentació a efectes de col·lació del grau de Doctor.

Barcelona, juliol de 1986


Signat: Dr. Rafael Franco

Director

ABREVIATURES

ADA	Adenosina desaminasa
ADP	5'-difosfat d'adenosina
A.E.	Activitat específica
AMP	5'-monofosfat d'adenosina
AMP _c	3',5'-monofosfat d'adenosina cíclic
APRT	Adenín fosforribosil transferasa
Asina	Adenosina
ATP	5'-trifosfat d'adenosina
ATPasa	Adenosina trifosfatasa
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Relació entre la concentració de N,N'-metilén bisacrilamida i la concentració total d'acrilamida (en %)
DEAE-	Dietil aminoetil-
DMSO	Dimetil sulfòxid
DNA	Àcid desoxirribonuclèic
EDTA	Àcid etilén diamino tetraacètic, sal disòdica
EHNA	Eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina
xg	Gravetats
GAH	Guanín amino hidrolasa
GDH	Glutamat deshidrogenasa
GMP	5'-monofosfat de guanosina
GPRT	Guanín fosforribosil transferasa

HGPRT	Hipoxantín guanín fosforribosil transferasa
IgG	Immunoglobulines G
IMP	5'-monofosfat d'inosina
int	Intersecció
K_{i1}	Constant de inhibició que afecta a la intersecció
K_{ip}	Constant de inhibició que afecta al pendent
K_m	Constant de Michaelis
LDH	Lactat deshidrogenasa
M	Molaritat
MAO	Monoamino oxidasa
MDH	Malat deshidrogenasa
Medi A	Medi que conté: sacarosa 0,28 M, tris 30 mM - HCl pH 7,4
MTT	Bromur de 3(4,5-dimetiltiazolil-2-)2,5-difeniltetraazoli
MW	Pes mol.lecular
NADH	Nicotín adenín dinucleòtid (forma reduïda)
NADPH	Fosfat de nicotín adenín dinucleòtid (forma reduïda)
P_i	Ortofosfat inorgànic
PD-10	Columna preempaquetada de Sephadex G-25
PMS	Metasulfat de fenazina
PNP	Purín nucleòsid fosforilasa
PRPP	5'-fosforribosil-1-pirofosfat
pdt	Pendent
RNA	Acid ribonuclèic
R_s	Radi de Stokes
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
R-1-P	1-fosfat de ribosa

SNC	Sistema nerviós central
T	Concentració total d'acrilamida (en %)
TCA	Acid tricloracètic
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-etilén diamina
tris	tris(hidroxi metil) amino metà
U	Unitat enzimàtica (quantitat d'enzim que catalitza la transformació de 1 μ mol de substrat en 1 seg a 30° C)
UV	Ultravioleta
V	Velocitat màxima
v	Velocitat inicial
XDH	Xantín deshidrogenasa
XMP	5'-monofosfat de xantosina
XO	Xantín oxidasa
5'N	5'nucleotidasa
ϵ	Absortivitat molar
λ	Longitud d'ona

4.2. PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ DE VESÍCULES SINÀPTIQUES DE CERVELL DE RATA	28
4.2.1. MÈTODE DE SOLLER ET AL. (1973)	28
4.2.2. MÈTODE DE TAMIR ET AL. (1974)	30
4.3. RENTATS DE LES FRACCIONS PARTICULADES	32
4.4. GENERACIÓ DELS ANTICOSSOS I SAGNAT DELS CONILLS	33
4.5. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES.	36
4.5.1. CROMATOGRÀFIA DE FILTRACIÓ EN GEL	36
4.5.2. CROMATOGRÀFIA DE BSCANVI IÒNIC	37
4.5.3. DETERMINACIÓ DEL RADI DE STOKES PER FILTRACIÓ EN GEL	38
4.6. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES	39
4.6.1. ELECTROFORESI ANALÍTICA EN GELS DE POLIACRILAMIDA	39
4.6.2. ELECTROFORESI PREPARATIVA EN GELS DE POLIACRILAMIDA (ELECTRO-ELUCIÓ)	40
4.6.3. ELECTROENFOCAMENT ISOELÈCTRIC EN PLAQUES D'AGAROSA	40
4.6.4. IMMUNOELECTROFORESI EN PLAQUES D'AGAR	42
4.6.5. TINCIÓ GENERAL DE PROTEÏNES	43
4.6.6. TINCIÓ ESPECÍFICA DE L'ADENOSINA DESAMINASA	44
4.7. TÈCNiques DE MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA	45
4.7.1. PROCÉS DE FIXACIÓ	45
4.7.2. PROCÉS D'INCLUSIÓ	46
4.7.3. PROCÉS D'ULTRAMICROTOMIA	46
4.7.4. PROCÉS DE TINCIÓ	46
4.7.5. PROCÉS D'OBSERVACIÓ	47
4.7.6. LOCALITZACIÓ CITOQUÍMICA DE LA 5'NUCLEOTIDASA	47
4.7.7. LOCALITZACIÓ CITOQUÍMICA DE L'ADENOSINA DESAMINASA	47
4.8. DETERMINACIÓ DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES	48

4.8.1. ENZIMS DEL METABOLISME PURÍNIC	49
4.8.1.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ADA	50
4.8.1.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT 5'N	50
4.8.1.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GAH	51
4.8.1.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PNP	51
4.8.2. ALTRES ENZIMS NO PURÍNICIS	52
4.8.2.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LDH	52
4.8.2.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MDH	52
4.8.2.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA A pH 7,4	53
4.9. DETERMINACIÓ DELS PARAMETRES CINÈTICS	53
4.10. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS TERMODINÀMIQUES	54
4.10.1. CÀLCUL DE L'ENERGIA D'ACTIVACIÓ	54
4.10.2. CÀLCUL DE L'ENTALPIA STANDARD	54
5. PART EXPERIMENTAL	56
5.1. DIFERÈNCIES DE LOCALITZACIÓ DE LA 5'N I DE L'ADA RESPECTE A ALTRES ENZIMS PURÍNICIS	56
5.1.1. EXTRACCIÓ DELS ENZIMS DE DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA	56
5.1.1.1. SINAPTOSOMES	56
5.1.1.2. VESÍCULES SINÀPTIQUES AÏLLADES PEL MÈTODE DE SOLLER ET AL. (1973)	61
5.1.1.3. VESÍCULES SINÀPTIQUES I MEMBRANES SINÀPTIQUES AÏLLADES PEL MÈTODE DE TAMIR ET AL. (1974)	62
5.1.2. CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DE LA 5'N I DE L'ADA EN DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA	64
5.1.2.1. 5'NUCLEOTIDASA	66
5.1.2.1.1. INTERFERÈNCIA DE LES FOSFATASES SOBRE LA 5'N	66
5.1.2.1.2. CONSTANTS DE MICHAELIS	68

5.1.2.1.3. CONSTANTS D'INHIBICIÓ PER ADP	76
5.1.2.2. ADENOSINA DESAMINASA	81
5.1.2.2.1. CONSTANTS DE MICHAELIS	81
5.1.2.2.2. INHIBICIÓ PER ADP	89
5.1.3. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N I DE L'ADA EN DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA	89
5.1.3.1. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N A MICROSOMES	90
5.1.3.2. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N A SINAPTOSOMES	90
5.1.3.3. LOCALITZACIÓ DE L'ADA A SINAPTOSOMES	95
5.2. ESTUDI DEL TRANSPORT DE L'ADENOSINA	97
5.2.1. ESTUDI SEGONS LA VARIACIÓ DELS PUNTS ISOSBÈSTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-INOSINA	97
5.2.1.1. DETERMINACIÓ DELS PUNTS ISOSBÈSTICS ADENOSINA-INOSINA	97
5.2.1.2. MICROSOMES	98
5.2.1.3. SINAPTOSOMES	101
5.2.1.4. VESÍCULES SINÀPTIQUES	103
5.2.2. ESTUDI DE BANYS D'ORGANS PER HPLC	103
5.2.2.1. DETERMINACIÓ DELS TEMPS DE RETENCIÓ DE L'ADENOSINA I LA INOSINA	103
5.2.2.2. BANYS DE FRAGMENTS DE CERVELL	104
5.2.2.3. BANYS DE FRAGMENTS DE BUDELL PRIM	105
5.3. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA	108
5.3.1. PURIFICACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA	108
5.3.2. ELECTROFORESI DEL PURIFICAT D'ADA	112
5.3.3. COMPOSICIÓ AMINOÀCIDA	114
5.3.4. RADI DE STOKES	114
5.3.5. PUNT ISOELÈCTRIC	118

5.3.6. ESTUDIS CINÈTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-ADA-INOSINA	118
5.3.6.1. DETERMINACIÓ DE LA K_m I DE LA V DEL PURIFICAT	118
5.3.6.2. INHIBICIÓ PER DIVERSOS METABOLITS PURÍNICIS	120
5.3.6.2.1. INHIBICIÓ PER PURINES	120
5.3.6.2.2. INHIBICIÓ PER NUCLEÒSIDS	123
5.3.6.2.3. INHIBICIÓ PER NUCLEÒTIDS	123
5.3.6.3. EFECTE DE DIVERSES DROGUES SOBRE L'ACTIVITAT ADA	126
5.3.7. EFECTE DE LA TEMPERATURA EN L'ACTIVITAT ADA	127
5.3.7.1. TEMPERATURA ÒPTIMA D'ACTIACIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA	129
5.3.7.2. VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V EN VARIAR LA TEMPERATURA. DETERMINACIÓ DE ΔH° I ΔE	129
5.3.8. EFECTE DEL pH EN L'ACTIVITAT ADA	133
5.3.8.1. pH ÒPTIM D'ACTUACIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA	133
5.3.8.2. VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V EN VARIAR EL pH	135
5.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA L'ADA DE CERVELL DE RATA	138
5.4.1. IMMUNOELECTROFORESI DELS ANTICOSSOS PURIFICATS	140
5.4.2. CROMATOGRAFIA PER HPLC	142
5.4.3. INHIBICIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA PELS ANTICOSSOS	142
5.4.3.1. INHIBICIÓ DE L'ADA PELS ANTICOSSOS SEGONS EL TEMPS DE CONTACTE ANTÍGEN-ANTICÒS	144
5.4.3.2. TIPUS D'INHIBICIÓ DE L'ANTICÒS	144
5.4.3.3. INHIBICIÓ SEGONS LA CONCENTRACIÓ DE L'ADA I DE L'ANTICÒS	145
5.5. CARACTERÍSTIQUES DE L'ADA DE DIVERSOS TEIXITS DE RATA	151
5.5.1. ACTIVITATS ADA DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES	151
5.5.2. ELECTROFORESI DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES	151

5.5.3. ESTUDIS CINÈTICS DE L'ADA DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES	152
5.5.3.1. DETERMINACIÓ DE LA K_m I DE LA V	152
5.5.3.2. INHIBICIÓ PER ETANOL	153
5.5.3.3. INHIBICIÓ PER DMSO	154
5.5.4. CARACTERÍSTIQUES DE L'ANTICÒS DE L'ADA DE CERVELL DE RATA	154
5.5.4.1. ESPECIFICITAT DE L'ANTICÒS EN FRONT DE TEIXITS DE RATA	154
6. DISCUSSIÓ	157
6.1. DIFERÈNCIES DE LA 5'N I DE L'ADA RESPECTE A ALTRES ENZIMS	157
6.2. ESTUDI DEL TRANSPORT DE L'ADENOSINA	163
6.3. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA	166
6.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA L'ADA DE CERVELL DE RATA	170
6.5. CARACTERÍSTIQUES DE L'ADA DE DIVERSOS TEIXITS DE RATA . .	171
7. CONCLUSIONS	175
8. BIBLIOGRAFIA	179

1. INTRODUCCIÓ

1.1. EL METABOLISME PURÍNIC

El metabolisme purínic consta d'una sèrie de reaccions enzimàtiques que poden separar-se en quatre grups segons el tipus de reacció a què donin lloc:

- 1) Biosíntesi "de novo"
- 2) Reaccions d'interconversió entre nucleòtids
- 3) Recuperació de les purines
- 4) Reaccions catabòliques

Totes les possibles interconversions entre les bases púriques lliures, els nucleòsids i els nucleòtids s'indiquen en la Figura 1.

La biosíntesi "de novo" és la ruta que condueix a la síntesi de l'IMP a partir de precursors no purínics.

Les reaccions d'interconversió entre nucleòtids permeten l'obtenció dels diferents nucleòtids a partir de l'IMP.

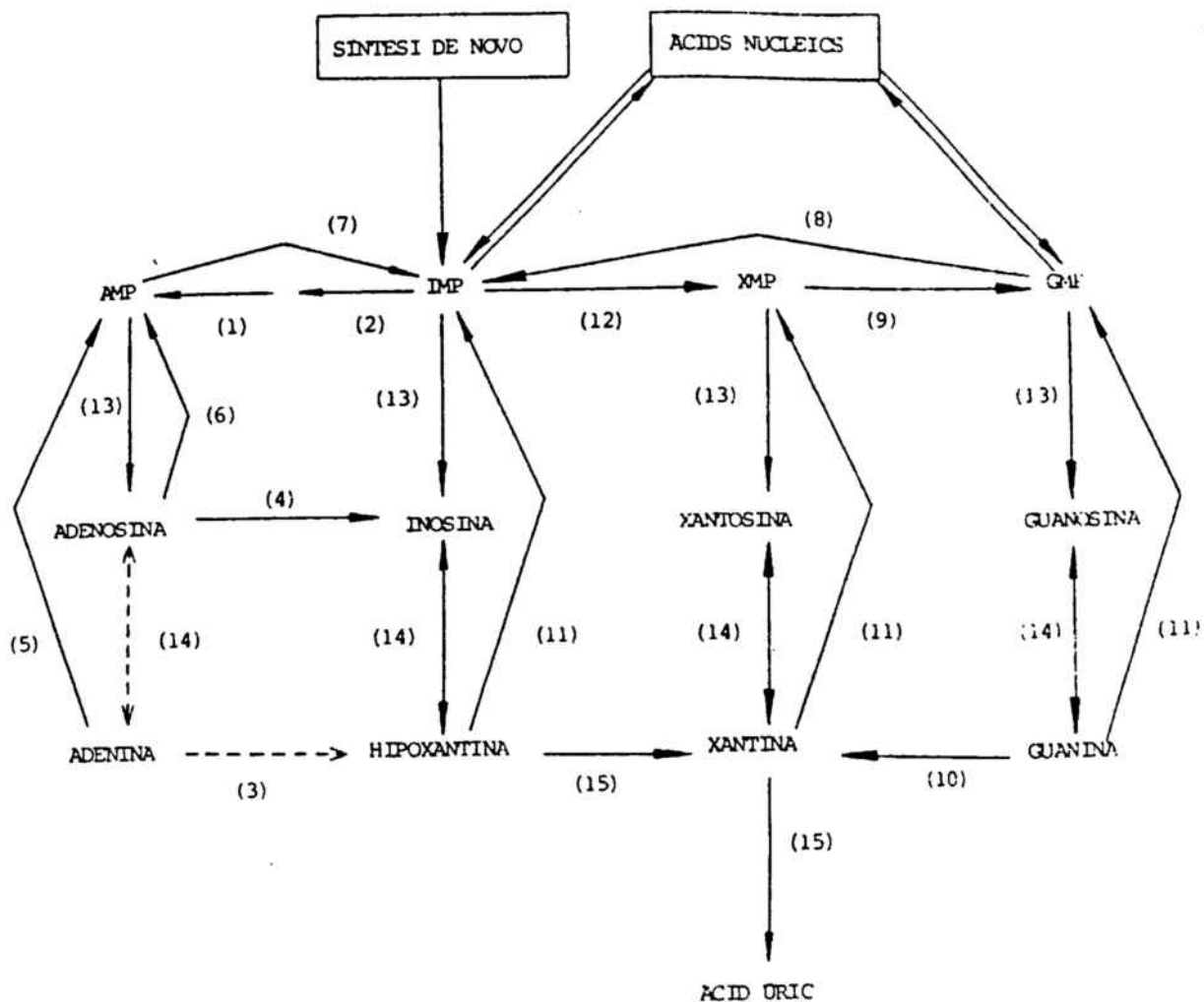


FIGURA 1.- ESQUEMA DEL METABOLISME PURINIC

- (1) Adenilsuccinasa E.C. 4.3.2.2.
- (2) Adenilsuccinato sintetasa E.C. 6.3.4.3.
- (3) Adenina desaminasa E.C. 3.5.4.2.
- (4) Adenosina desaminasa E.C. 3.5.4.4. (ADA)
- (5) Adenosina fosforribosiltransferasa E.C. 2.4.2.7. (APRT)
- (6) Adenosina quinasa E.C. 2.7.2.1.
- (7) AMP desaminasa E.C. 3.5.4.6.
- (8) GMP reductasa E.C. 1.6.6.8.
- (9) GMP sintetasa E.C. 6.3.4.1.
- (10) Guanina aminohidrolasa E.C. 3.5.4.3. (GAH)
- (11) Hipoxantin-guanin fosforribosiltransferasa E.C. 2.4.2.8. (HGPRT)
- (12) IMP deshidrogenasa E.C. 1.2.1.14.
- (13) 5'Nucleotidasa E.C. 3.1.3.5. (5'N)
- (14) Purinnucleòsid fosforilasa E.C. 2.1.2.4. (PNP)
- (15) Xantin oxidasa E.C. 1.2.3.2. (XO)

Les reaccions catabòliques permeten la degradació dels nucleòtids fins a les bases púriques per tal de ser excretades, o recuperades mitjançant les rutes de recuperació, que incorporen les purines als nucleòtids i nucleòsids.

S'ha observat que la ruta de "recuperació" de purines té més o menys importància segons la cèl.lula que s'estudiï, detall que suggereix que el nivell de nucleòtids, nucleòsids i bases púriques pot tenir diferent significació "in vivo" segons la funció desenvolupada per la cèl.lula (1).

En el cervell, on la síntesi "de novo" de les purines és de poca significació (2), la ruta de "recuperació" té molta importància; s'han observat greus neuropaties en nens que presentaven anormalitats genètiques en un dels enzims relacionat amb aquesta ruta, la HGPRT (3). Per altra banda, l'obtenció de nucleòtids per la via de recuperació de purines permet un estalvi d'energia, ja que en la biosíntesi "de novo" es consumeix ATP.

"In vitro" les esmentades vies de recuperació tenen molt poca activitat en comparació amb les vies de degradació, que condueixen els nucleòtids i nucleòsids a hipoxantina i xantina; ambdues bases produeixen àcid úric per l'acció de la xantín oxidasa (XO) en la majoria dels teixits. Ara bé, en cervell l'activitat d'aquest enzim és pràcticament nul.la encara que alguns autors suggereixen que existeix una petita quantitat en cervell de rata (4) detectada per mètodes molt sensibles (fluorimètrics). Segons això, el producte final de la degradació de purines en cervell no seria

l'àcid úric sinó la hipoxantina i la xantina, essent, almenys la hipoxantina, susceptible de recuperació per la via HGPRT (Fig. 1).

La gairebé nul·la activitat XO en cervell fa pensar en una recuperació més gran de purines, factor lògic perquè aquest teixit és molt deficient en la síntesi "de novo" (2); també es suggereix la possible toxicitat de l'àcid úric pel teixit nerviós en general o pel cervell en particular.

La via degradativa és intrincada i complexa perquè cada un dels enzims que hi són implicats són factibles de regulació. D'aquesta manera podria ser que llur activitat "in vitro" fos superior a la que presenten "in vivo".

Henderson et al. (5) van fer un estudi "in vivo" sobre els enzims del metabolisme purínic treballant amb cèl·lules intactes i comparant els seus resultats amb els que s'havien obtingut per als enzims estudiats fins llavors "in vitro". Es van trobar casos en què els resultats obtinguts d'extractes de cèl·lules concordaven amb els obtinguts en cèl·lules intactes, però en molts altres aquests resultats no coincidien.

Els mateixos autors (5) suggereixen que, tot i que l'esquema de la Fig. 1 és correcte, no és complet; ja que no té en compte les vies de síntesi i metabolisme dels coenzims nucleotídics. Per altra banda, hi ha processos que poden ser catalitzats per més d'un enzim; així s'obren noves vies del metabolisme de purines.

Cal tenir en compte que, en fer una extrapolació dels resultats obtinguts "in vivo", les discrepàncies entre ambdós sistemes són:

- a) Vies metabòliques interrelacionades.
- b) Activitats intracel·lulars dels enzims.
- c) Regulació enzimàtica tant a nivell metabòlic com a nivell genètic.
- d) Concentracions intracel·lulars de metabolits.

Altres factors que són més difícils d'avaluar són, entre d'altres, la localització intracel·lular, tant d'enzims com de substrats, la presència de metabolits inhibidors o estimuladors, el medi iònic i l'entorn hidrofòbic.

1.2. PAPER HORMONAL DELS COMPOSTOS PURÍNICS

Les purines intervenen en el metabolisme intermediari com a substrats, com a cofactors i són també mol·lècules reguladores. Així, poden actuar en la transmissió de l'energia cel·lular, en la síntesi dels àcids nucleics, en la vasodilatació i en la neurotransmissió.

L'adenosina està relacionada amb les respostes degudes a anoxia. Així, en els pulmons i en el miocardi, en resposta a una manca d'oxigen s'allibera adenosina (7), inosina i hipoxantina. En el fetge, en canvi, no s'alliberen purines com a resposta d'una manca d'oxigen (8). Quan el fetge està normalment oxigenat, el 80% de la hipoxantina, xantina i àcid úric s'eliminen pel pas a la sang; llavors l'adenosina s'incorpora probablement

als eritròcits i constituirà una font potencial d'alliberament per anoxia en els diversos teixits (9). S'ha descrit també la relació entre l'adenosina i les malalties asmàtiques (10).

La utilització de l'adenosina depèn de les activitats relatives de l'ADA i de l'adenosina quinasa (11,12). Els valors de K_m per a l'ADA són més elevats que per a l'adenosina quinasa. Una concentració baixa d'adenosina tendeix, doncs, a ser utilitzada novament per a formar AMP via adenosina quinasa (13). Però els nivells d'adenosina no influeixen només en les reaccions enzimàtiques relacionades amb aquest metabolit. Winn et al. (14) van suggerir que l'adenosina podia jugar un paper important en la regulació del fluxe cerebral de la sang. L'efecte vasodilatador de l'adenosina és causat per aquest metabolit i als seus derivats nucleotídics (15); així l'ATP, ADP i AMP exerceixen efectes vasomotors. No està ben establert com l'adenosina provoca la vasodilatació, però aquestes propietats estan relacionades amb la unió del metabolit a un receptor específic en la superfície de les artèries coronàries. Rockwell et al. (16), en un estudi comparatiu dels efectes d'anàlegs d'adenosina com a inhibidors de l'ADA de cor de bou i com a vasodilatadors, no troben cap correlació.

L'adenosina també actua com a neurotransmissor en el sistema nerviós mitjançant la unió del metabolit a diversos receptors específics que es troben en la sinapsi (17). Segons això, l'ADA actuarà com a regulador de la transmissió nerviosa en aquests nervis, anomenats nervis purinèrgics. En pacients amb deficiència d'ADA, l'acumulació d'adenosina en el cervell

conduïx a un estat menys excitat quan aquest metabolit es troba en la regió dels receptors (18).

La importància dels compostos purínics en la funció del SNC no es basa de forma única en les evidències fisiològiques i bioquímiques esmentades. Existeixen dades que conduïxen a suggerir que els nucleòtids i nucleòsids purínics tenen un paper essencial en aspectes del comportament i en desordres psiquiàtrics (19). En pacients amb estats esquizofrènics o de depressió psicòtica i neuròtica, el nivell d'ATP i d'adenosina és elevat en sang, així com el d'AMP_c en orina (20). També varia el nivell de nucleòsids en cervell després d'administrar antidepressius (21)

L'efecte de l'adenosina sobre la secreció hormonal és també força notable. L'acció sobre la esteroideogènesi ha estat la més estudiada; l'administració d'adenosina en rata està associada a un increment en les quantitats de corticoesterona en plasma (22). Però, l'adenosina, la inosina i la guanosina estimulen també la secreció de la insulina del pàncreas (23,24), possiblement perquè en ser metabolitzades donen lloc a intermediaris glucolítics, com la D-ribosa, que funcionen com a anàlegs de la glucosa (25).

La diabetis va associada a un augment d'activitat de l'adenilat ciclase i a una disminució de l'activitat 5'N. En ser l'adenosina un potent inhibidor de l'adenilat ciclase, sembla que un augment de la concentració d'adenosina pot estar relacionada amb aquesta malaltia (26).

1.3. LOCALITZACIÓ I DISTRIBUCIÓ DELS ENZIMS PURÍNICS

Els enzims purínics, excepte la 5'N que és un enzim marcador de membrana, es troben fonamentalment en la fracció soluble, però també es troben en altres fraccions.

Segons Stern et al. (6), la PNP de teixits de cavall i bou es localitza en els nuclis de les cèl.lules, quan es fan servir tècniques no aquoses per a aïllar els nuclis. Schneider i Hogeboom (27) mitjançant tècniques de centrifugació diferencial, van localitzar l'activitat PNP en el citoplasma en teixits de fetge de rata.

La distribució intracel.lular de la GAH ha estat molt estudiada per Kumar et al. (28), els quals van obtenir la major part d'activitat en la fracció soluble de cervell de rata, tot i que també està present en les altres fraccions, com en la fracció mitocondrial pesada.

Segons Masters hi ha enzims que existeixen en dues formes d'equilibri, una unida a membrana i l'altra lliure (29). De fet s'ha trobat molts enzims citosolubles en fraccions membranoses subcel.lulars, com per exemple l'adenosina desaminasa (ADA), la guanín aminohidrolasa (GAH), la purín nucleòsid fosforilasa (PNP), la lactat deshidrogenasa (LDH) i la malat deshidrogenasa (MDH) (30,31).

Franco (32) aïllà microsomes de cervell de rata pel mètode de Schneider i Hogeboom (33), va observar la presència de tots els enzims del catabolisme purínic i suggerí que la 5'N i l'ADA es troben en la cara

exterior de les membranes, mentre que la GAH i la PNP es troben closes dins dels components de la fracció microsomal.

1.3.1. LOCALITZACIÓ DE LA 5'NUCLEOTIDASA

La localització subcel·lular de la 5'N indica que l'enzim es troba en diverses fraccions subcel·lulars, i així s'utilitza com a enzim marcador de membranes plasmàtiques (34,35,36) si bé també s'ha descrit la seva presència en nuclis (37,38), microsomes (39,40,41) i en fracció citoplasmàtica (42,43,44,45).

Alguns autors han demostrat que la 5'N és un ectoenzim (46,47); però Zachowsky i Aubry (48) indiquen que existeix activitat 5'N lligada a la cara interna de la membrana citoplasmàtica. Per altra banda, Stanley et al. (49) presenten evidència que existeix una relació dinàmica entre l'enzim intracel·lular i el que es localitza a la superfície cel·lular.

Song et al. (50) localitzen l'activitat 5'N en el fetge de rata i en el de l'home en una forma lisosòmica, una citoplasmàtica i una altra enllaçada a membranes citoplasmàtiques, les quals mostren diferents especificitats de substrat. En el cervell de vedella, la major part d'activitat 5'N està localitzada en la fracció soluble; però també s'ha detectat una activitat 5'N lligada a la membrana citoplasmàtica (51), que per a ser alliberada necessita agents que trenquin la unió hidrofòbica, tal com detergents, disolvents orgànics o ions caotrópics.

Per tècniques immunoquímiques, Zachowski et al. (52) van demostrar que la 5'N és una proteïna capaç d'atravessar la membrana i la seva zona responsable de l'activitat hidrolítica pot estar encarada cap a l'exterior o cap a la cara citoplasmàtica, segons la cèl.lula.

En els sinaptosomes s'han efectuat pocs estudis de la presència de la 5'N, si bé se sap que aquest enzim es troba en mielina i en altres fraccions subcel.lulars del cervell (39).

Darrerament, Kreutzberg et al., emprant tècniques citoquímiques, han determinat mitjançant microscòpia electrònica la presència de 5'N a membranes (53). Així, aquests autors han demostrat la presència de l'enzim prop de les membranes sinaptosomals en cervell (54) i en la retina (55).

1.3.2. LOCALITZACIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA

Encara que l'ADA es troba fonamentalment en la fracció soluble (27,32), Stern et al. (56) utilitzant tècniques aquoses i no aquoses van localitzar activitat ADA en nuclis de fetge de vedella, però no en van trobar en nuclis de timus de vedella.

La localització subcel.lular en cervell ha estat molt dubtosa. Jordan et al. (57) localitzen l'activitat ADA en la fracció soluble de cervell de rosegair, i troben que el 65,3% de l'activitat en cervell de conill està en la fracció soluble i el 32,2% en el residu de cèl.lules trencades (nuclis, mitocondries, microsomes).

Mustafa i Tewari (58), treballant amb cervell de ratolí, van trobar que la fracció mitocondrial tenia una activitat despreciable de l'enzim, però el tractament de les mitocòndries amb Triton X-100 solubilitzava una quantitat apreciable d'enzim entre el 15% i el 20%. Pull i McIlwain (30) han discutit l'associació de l'ADA a les mitocòndries de cervell de ratolí, esmentant que l'activitat no està associada a les mitocòndries sinó als sinaptosomes que s'aïllen juntament amb la fracció mitocondrial.

També en teixits de procedència humana, Van der Weyden i Kelley (59) citen la presència d'una forma de l'enzim anomenada "particulada", amb un pes mol.lecular superior a 20.000.000 i que per tractament amb Triton X-100 dóna la forma C de l'ADA.

En cèl.lules cerebrals cultivades, de diversos orígens, s'ha observat una localització subcel.lular de l'ADA paral.lela a la de la 5'N, enzim marcador de la membrana plasmàtica (60).

Així, doncs, encara que l'ADA es classifica preferentment com un enzim soluble, els estudis més recents assenyalen que es troba unida amb algunes partícules subcel.lulars, sobretot de la fracció microsomal (32,33).

1.4. REACCIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA

L'adenosina desaminasa (ADA) (E.C. 3.5.4.4.) catalitza la desaminació de l'adenosina per hidròlisi a inosina i amoniac (vegeu Fig. 1). El mecanisme

d'aquesta reacció és difícil d'esbrinar; ja que encara que la reacció sigui irreversible, un dels substrats, l'aigua, es manté en concentració saturant durant tot el procés.

En el medi biològic, l'enzim actua sobre l'adenosina i sobre la desoxiadenosina (61). "In vitro" exhibeix una baixa especificitat de substrat. Així, l'especificitat de l'enzim és bastant restringida, tant respecte a l'anell purínic (62,63,64,65,66) com respecte al carbohidrat (62,67,68,69). La substitució en C₆ de l'anell purínic dona amplies possibilitats (62,63,64). Les velocitats màximes de reacció disminueixen en l'ordre: adenosina, ribòsid de 6-cloropurina, ribòsid de 6-hidroamilaminopurina, ribòsid de 6-metoxipurina, que rendeixen tots inosina. També s'ha estudiat l'acció dels substituents en C₂, i així el ribòsid de 2-amino, 6-cloropurina i el ribòsid de 2-amino, 6-metoxipurina són substrats de l'ADA (65) que rendeixen guanosina com a producte de la reacció. Simon (70) comenta que la presència d'un grup que atrau electrons en la posició C₆ pot ajudar al fet que es produeixi la reacció; en canvi, les substitucions en la posició 7 anul·len la reacció amb l'enzim (66).

Dels estudis amb substrats anàlegs es pot deduir que la basicitat del N₁ de l'anell purínic és un factor important en la unió dels purín ribonucleòsids al centre actiu de l'enzim (65,71). També cal tenir en compte els impediments estèrics d'alguns anàlegs de l'adenosina substituïts en C₂, C₆ o C₈ que no mostren activitat ADA (65).

Respecte al carbohidrat, l'enzim no presenta requeriments específics pels hidroxils de les posicions 2' i 3', que poden ser substituïts (62); en

canvi necessiten de l'hidroxil primari en la posició 5', ja que si aquest hidroxil està bloquejat, el substrat no s'uneix a l'enzim.

En determinar la influència del pH sobre l'activitat ADA (64,65) es dedueix l'existència de grups especials per a la unió de l'enzim amb el substrat: un grup amb pK_a de 5,7, que podria ser degut a un grup imidazola de la histidina i un altre a pK_a de 8,7, possiblement d'un grup sulfhidril de la cisteïna. Maguire et al. (65) postulen que la unió de l'ADA amb el substrat s'efectua mitjançant un pont d'hidrògen entre l'SH d'un reste de cisteïna i el N_1 de l'adenosina. La mol·lècula d'aigua s'uneix també amb un enllaç de pont d'hidrògen amb el N terciari d'un grup imidazola d'un reste d'histidina de l'enzim (vegeu Figura 2).

La presència d'un grup que atregui electrons en la posició C_6 de l'adenosina, determina que l'atac nucleofílic de l'aigua a la posició C_6 sigui més potent, fet que havien comprovat experimentalment Simon et al. (70).

El mecanisme de la reacció sembla ésser seqüencial ordenat. L'adenosina entra primer al centre actiu i a continuació l'aigua; en primer lloc s'allibera NH_3 i després la inosina (72).

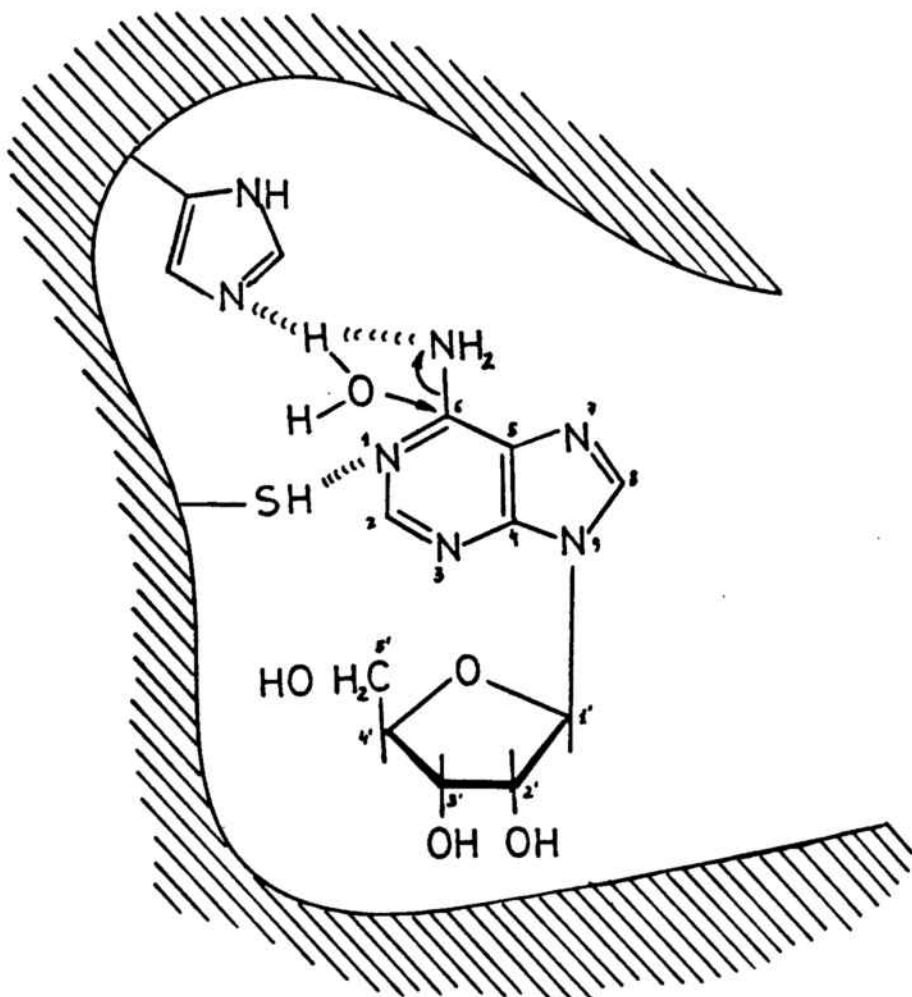


FIGURA 2.- POSSIBLE COL.LOCACIÓ DE L'ADENOSINA I L'AIGUA EN EL CENTRE
ACTIU DE L'ADENOSINA DESAMINASA.

L'ADA es troba àmpliament distribuïda en els organismes, i així ha estat estudiada en microorganismes (73), plantes (74), invertebrats (75,76,77), vertebrats (78,79) inclosos mamífers (80,81,82,83) i cèl.lules humanes (84,85).

Ma i Fischer (75) observaren que l'enzim es presenta en tres formes mol.leculars, que posseeixen pesos mol.leculars aproximats de 200.000, 100.000 i 35.000. Aquestes formes es designen com A, B i C

respectivament. En l'home i en els mamífers més evolucionats (86,87) es troben les formes A i C de l'enzim. La majoria dels òrgans i teixits presenten activitat ADA; els més actius en conill i en home són el duodè i la melsa i els menys actius el múscul esquelètic, la pell i els òssos; en la resta l'activitat és intermèdia (88). La proporció entre les formes A i C varia també segons el teixit; en leucòcits i eritròcits humans només apareix la forma C, en el pulmó i el fetge normals es troba principalment la forma A i en el pulmó i el fetge cancerosos i en estómac es troben les dues formes en quantitats apreciables (89).

La forma A procedeix de la formació d'un complex entre la forma C activa i una proteïna. Aquest factor proteic s'ha aïllat de teixits de conill (90), d'home (91) i de fibroblasts (92). La forma A es considera com una forma d'emmagatzematge de l'enzim, i l'absència del factor proteic en determinats teixits que normalment el posseeixen condueix a una alteració funcional del teixit. Així, no es troba el factor proteic en teixits de pulmó cancerosos (91) i abunda la forma C, quan normalment en el teixit normal s'hi troba la forma A preferentment. També és conegut que en els teixits que creixen ràpidament (com en els limfòcits), la quantitat de forma C respecte a la forma A és molt gran (93,94); els teixits cancerosos també proliferen de forma ràpida i, com s'ha descrit, posseeixen una quantitat superior de forma C.

La reacció d'unió del factor proteic amb la forma C s'efectua a temperatura ambient amb facilitat; aquesta reacció sembla que no requereix grups tiòlics ni metalls divalents i no mostra especificitat de substrat; és a dir, el factor aïllat de pulmó o de ronyó pot unir-se a la forma C

de qualsevol procedència ja sigui d'eritròcits, duodè, ... (91,95). Aquest fet ha servit per a demostrar que en els teixits malalts en els que no es detecta activitat de conversió, l'alteració estructural afecta el factor proteic però no la forma de pes molecular petit. S'ha demostrat que moltes formes d'ADA aïllades són glucoproteïnes; és a dir, posseeixen un elevat percentatge de carbohidrat a la seva mol.lècula (96). Es suggereix que el portador del carbohidrat és el factor proteic i que amb el temps pot degradar-se. Segons això, la forma C no seria una glucoproteïna per si mateixa.

A causa de l'estreta relació entre les formes A i C, les dues formes exhibeixen algunes característiques anàlogues; i així, els valors de K_m , d'energia d'activació, punt isoelèctric i comportament amb els inhibidors són comparables. No es pot dir la mateixa cosa respecte a l'estabilitat, ja que la forma A és més estable que la C, tant front a la calefacció com front al temps. Així, el factor proteic podria ser una proteïna reguladora estabilitzant (91).

Mustafa et al. (97), treballant amb cervell de ratolí, consideren com a forma C la de l'enzim de la fracció soluble, que perd quasi tota l'activitat per calefacció i que apareix com un sol pic per cromatografia; mentre que l'enzim mitocondrial, que perd solament un 22% d'activitat per calefacció, i per cromatografia dóna lloc a dos pics anomenats formes A i B pels autors.

1.5. PATOLOGIA PER DEFICIÈNCIA D'ADENOSINA DESAMINASA. PAPER FISIOLÒGIC DE L'ENZIM

El paper que desenvolupa l'ADA no està massa clar. Les purines estan íntimament relacionades amb el metabolisme intermediari com a substrats, com a cofactors i mol.lècules reguladores. Les funcions especialitzades d'aquests compostos inclueixen, entre altres, la intervenció en la transformació de l'energia cel.lular, la síntesi dels àcids nucleics, la vasodilatació, la neurotransmissió.

Hi ha evidències sobre deficiències lligades a la carència de tipus genètic d'algún dels enzims purínics (2) i també sobre immunodeficiències per carència d'ADA, PNP o 5'N (98,99,100). També el nivell enzimàtic és diferent segons el teixit estudiat; i aquest nivell es modifica durant el desenvolupament (101), transformacions neoplàstiques (99), diabetis (102) i segons la dieta alimentícia (103). Tot això suggereix la possibilitat d'una regulació a nivell genètic de la síntesi de proteïnes mitjançant una repressió o des-repressió dels gens que codifiquen els enzims purínics (2,98,100).

La importància de l'ADA en relació amb estats patològics és gran. Així, en l'anèmia hemolítica hereditària (104) s'observa un increment de 45-70 vegades en l'activitat ADA dels eritròcits, si bé l'enzim posseeix característiques iguals que les de l'enzim d'un individu sa. També s'observa un augment de l'activitat ADA en malalties com la mononucleosi infecciosa (105) i la cirrosi hepàtica (88).

Els mecanismes mol·leculars de la immunodeficiència per déficit d'ADA són desconeguts. Això no obstant, l'aparició repetida d'ambdós defectes pot indicar l'important paper del metabolisme purínic en el desenvolupament del sistema immune. La immunodeficiència és un desordre poc comú, però greu, que es caracteritza per una capacitat disminuïda per a combatre les infeccions. Les cèl·lules encarregades per a combatre-les són els limfòcits T i B. Els limfòcits T mantenen l'immunitat cel·lular i depenen de la glàndula del timus; els limfòcits B fabriquen les immunoglobulines i deriven de la medul·la òssia. Els limfòcits més relacionats amb la deficiència d'ADA són els limfòcits T, ja que no s'observa deficiència d'immunoglobulines en els pacients amb déficit d'ADA (98); apart que la deficiència d'ADA sembla que afecta més als precursors dels limfòcits T que als limfòcits ja madurs (106).

S'ha intentat diversos tractaments terapèutics amb la finalitat de corregir la deficiència d'ADA i restaurar la funció immune. La terapia més eficaç consisteix en el trasplantament dels òrgans limfòids. Mentre que el trasplantament de la glàndula del timus s'ha vist que no és eficaç, el trasplantament de la medul·la òssia ha provocat en determinats malalts una millora del seu déficit immunitari (107). També s'ha intentar tractar la deficiència d'ADA mitjançant transfusions d'eritròcits i de plasma (108), i si bé disminueix la quantitat d'ATP i d'adenosina en els limfòcits i eritròcits, no canvia molt l'estatus immune. És possible que la correlació parcial del defecte metabòlic no sigui suficient per a restaurar la funció limfocítica; pot ser que la presència d'ADA en el timus i en altres teixits limfòids sigui necessària per al desenvolupament del sistema limfòid.

Els nivells baixos d'activitat ADA també estan associats amb el càncer. S'ha postulat que el sistema immune juga un important paper en la destrucció de les cèl·lules neoplàsmiques d'aparició espontània; s'observa que els nivells d'ADA són normals en pacients amb tumors benignes i són baixos en pacients amb malalties canceroses. El nivell d'ADA dona una pauta per a seguir el desenvolupament de la malaltia cancerosa, ja sigui de tipus tumoral o no. Com més baix és el nivell d'ADA, més desenvolupada està la malaltia (99).

La deficiència hereditària d'ADA és de tipus recessiu; aquesta deficiència enzimàtica s'observa principalment en els eritròcits, limfòcits i sèrum (98). A nivell genètic no hi ha relació entre el dèficit d'ADA (gen localitzat al cromosoma 20) i d'altres que involucren la síntesi d'anticossos (gens localitzats al cromosoma 6) (109).

S'ha descrit també, casos en els que ambdós defectes no apareixen conjuntament. Així, Van der Weyden et al. han trobat una activitat ADA normal en els eritròcits dels pares d'un nen afectat d'immunodeficiència i de deficiència d'ADA. També citen el cas d'un nen amb una pèrdua quasi bé completa d'activitat ADA als eritròcits i que posseeix un funcionament normal del sistema immune amb una quantitat normal de limfòcits B i T i de immunoglobulines (110). Tots aquests fets indiquen que les bases moleculars per a la deficiència de l'ADA i la immunodeficiència poden mostrar una considerable heterogeneïtat.

Les causes per les quals la deficiència d'ADA pot provocar una disfunció en el sistema immune són difícils de conèixer. Existeix controvèrsia sobre

si l'adenosina és tòxica per al creixement cel·lular i la proliferació. En la maduració dels monòcits a macròfags (3-7% dels leucòcits), l'ADA exerceix un paper important, augmentant unes nou vegades la seva activitat; i si s'afegeix un inhibidor de l'ADA es paralitza el procés de creixement i maduració (111). Igualment, el contacte de limfoblasts, fibroblasts i limfòcits amb concentracions d'adenosina 10^{-6} - 10^{-5} M produeix una inhibició de la proliferació cel·lular (112,113).

Recentment s'ha descrit també una possible relació entre l'ADA i la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA) (114).

L'adenosina i la 2'-desoxiadenosina es poden generar en la cèl·lula o incorporar-se dins mitjançant uns mecanismes de transport que tenen les característiques de sistemes de difusió facilitada. En eritròcits i leucòcits es suggereix que hi ha un únic transportador que intervé en la incorporació de tots els nucleòsids de les purines i pirimidines (115). En plaquetes humanes hi ha dos sistemes de transport per l'adenosina; un d'elevada ($K_m = 9,8 \mu M$) i un de baixa afinitat ($K_m = 9,4 \mu M$) (116). L'adenosina transportada pel sistema de baixa afinitat arriba intacta dins la plaqueta i es transformarà via ADA i PNP en inosina i hipoxantina, en canvi l'adenosina transportada pel sistema d'elevada afinitat sembla que està protegida contra la degradació per l'ADA i es converteix en AMP via adenosina quinasa. Se suposa que existeix una estreta associació entre el transportador d'elevada afinitat amb l'adenosina quinasa associada a la membrana (117)

De totes les dades esmentades, es dedueix que l'ADA sembla que és un enzim catabòlic relacionat només amb la degradació de purines; però a causa de l'estructura de l'adenosina està relacionat també amb el metabolisme dels carbohidrats i dels lípids (118) i també controla la síntesi del DNA. Ara bé, els papers fisiològics de l'ADA i del seu substrat l'adenosina, no estan completament establerts. L'evidència demostra que les implicacions conegudes són molt àmplies i que moltes d'aquestes implicacions són encara desconegudes.

2. OBJECTE

La reacció catalitzada per l'adenosina desaminasa queda inclosa dins les transformacions que recull el metabolisme general de les purines i la seva relació amb la síntesi d'àcids nucleics i amb el seu paper de inactivació de l'adenosina considerada com a neurohormona. La manca de l'enzim provoca una alteració del metabolisme purínic que es manifesta a vegades en forma de greus immunodeficiències.

El principal objectiu del present treball ha estat establir diferències de comportament de l'adenosina desaminasa respecte a altres enzims purínics com la 5'nucleotidasa, la guanín aminohidrolasa, i la purinnucleòsid fosforilasa; així com respecte a la lactat deshidrogenasa i la malat deshidrogenasa, enzims que es troben en gran abundància en l'interior cel·lular.

Les esmentades diferències de comportament s'han comprovat que existeixen, treballant amb diverses fraccions subcel·lulars d'escorça cerebral de rata, teixit que s'ha emprat majoritàriament en el decurs de la present Memòria.

Amb tècniques bioquímiques, s'ha establert la presència de l'adenosina desaminasa en membranes cel·lulars i la seva anàloga topologia respecte a la 5'nucleotidasa i diferent de la topologia dels altres enzims estudiats.

Treballant també amb fraccions subcel·lulars s'han establert els paràmetres cinètics de l'adenosina desaminasa i de la 5'nucleotidasa, que es comparen amb els enzims presents en la fracció soluble. Per a comparar els resultats obtinguts mitjançant mètodes bioquímics en quant a la especial localització d'ambdós enzims es van fer comprovacions per microscòpia electrònica mitjançant tècniques citoquímiques.

El següent punt plantejat en aquest estudi va ser la caracterització de l'adenosina desaminasa de cervell de rata. Per això es purifica l'enzim a partir de la fracció soluble, i s'obtenen els anticossos policlonals anti-ADA purificada.

La caracterització de l'enzim inclou, entre d'altres, l'efecte que tenen els intermediaris purínics i diverses drogues components principals de fàrmacs antipsicòtics, ansiolítics, antidepressius, antihistamínics, vasodilatadors, antiinflamatoris, antibiòtics, broncodilatadors i antivomítius. També es determinen l'efecte del pH i de la temperatura en l'activitat de l'enzim, així com les variacions de les constants cinètiques amb aquests factors esmentats.

Els estudis immunoquímics i cinètics són de gran importància en la caracterització de l'enzim, i permeten també una comparació entre l'enzim que es localitza en diversos teixits de rata (cervell, cerebel, múscul esquelètic, fetge, cor, ronyó, estómac, budell prim, melsa i pulmó).

3. MATERIALS

3.1. MATERIAL BIOLÒGIC

Els materials biològics de partida van ser diversos teixits de rata. Els teixits es van separar de forma mecànica a partir de rates mascles de raça Wistar de 200-300 g de pes, recentment decapitades. Quan s'empraren cervells, els cerebels es van separar de forma sistemàtica.

Els animals utilitzats en la producció d'anticossos van ser conilles femelles albines de raça White New Zealand (BIOCENTRE).

3.2. REACTIUS

3.2.1. PROTEINES

Com a proteïnes standard i com a enzims, acoblats o per a mesurar activitats enzimàtiques, s'utilitzaren: seroalbúmina bovina (BSA) cristal·litzada, ferricitocrom c, ovoalbúmina, tripsina, γ -globulina humana (SIGMA); adenosina desaminasa i fosfatasa alcalina d'intestí de bou, xantinoxidasa de llet i purinnucleòsid fosforilasa de melsa de bou (BOEHRINGER-MANHEIM).

3.2.2. SUBSTRATS I INHIBIDORS

Els reactius utilitzats per a la determinació de les diverses activitats enzimàtiques i com a inhibidors de l'activitat adenosina desaminasa van ser: NADH, NADPH, inosina, xantosina (BOEHRINGER-MANHEIM); adenosina, guanosina, hipoxantina, adenina, guanina, xantina, 5'monofosfat d'adenosina (AMP), 5'trifosfat d'adenosina (ATP), àcid D L màlic, àcid oxalacètic, piruvat de sodi, p-nitrofenilfosfat de sodi, dimetil sulfòxid (DMSO), etanol absolut (MERCK); 5'difosfat d'adenosina (ADP) (SIGMA).

Les drogues utilitzades per a observar l'efecte que tenien sobre l'ADA van ser proporcionades per diversos laboratoris farmaceutics: 2-clorpromazina, oxazepam, meprobamat, tripeleminamina (WASSERMANN); clozapina, cetotifen (SANDOZ S.A.); sulpirida, nitrazepam, naproxen, rifampicina (PRODES S.A.); lorazepam (ORFI-FARMA); diazepam, medazepam, clordiazepòxid, imipramina, cafeïna, teobromina (LASA), cinnarizina, lidoflazina, acetaminofen (ESTEVE); dipiridamol (BOEHRINGER INGELHEIM S.A.); ouabaina (SIGMA); fenilbutazona, dimenhidrinat (J. URIACH I CIA.); albuterol (ANDREU S.A.) i teofilina (SCHARLAU).

3.2.3. ALTRES REACTIUS

Els productes utilitzats en la purificació de l'enzim i de les immunoglobulines, en la preparació de les diverses dissolucions de tampó i de les mostres per a observació mitjançant microscòpia electronica van ser: imidazola, clorur de sodi, tris(hidroximetil)amino metà, sacarosa.

dialdehid glutàric, tetròxid d'osmi (MERCK); acetat de sodi, àcid acètic, àcid clorhídric, monohidrògen fosfat de sodi, dihidrògen fosfat de sodi, metanol, monohidrògen fosfat de potassi, dihidrògen fosfat de potassi (PROBUS).

3.3. MATERIAL D'ELECTROFORESI I CROMATOGRAFIA

Els suports electroforètics utilitzats van ser acrilamida i agarosa i els reactius per a preparar-los: acrilamida, bis-acrilamida (EASTMAN-KODAK); persulfat d'amoni (UCB); N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED) (SCHUCHARDT); agarosa (MERCK). En la determinació del punt isoelèctric s'utilitzaren anfòlits (LKB i PHARMACIA).

En els revelats electroforètics generals o específics s'utilitzà: bromur de 3(4,5-dimetil-tiazolil-2)-2,5 difenil tetraazoli (MTT), metosulfat de fenazina (PMS) (SERVA); Coomassie Brilliant Blue (SEARLE).

En els processos de purificacions i en la determinació del radi de Stokes s'utilitzaren: DEAE-Sepharose, Sephadex G-25, Sephacril S-300 (PHARMACIA).

4. MÈTODES

4.1. PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ MICROSOMAL I SOLUBLE DE CERVELL DE RATA

L'homogeneïtzat d'escorça cerebral de rata s'ha realitzat en el medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. La relació habitual va ésser de 6,5 ml de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 / g d'òrgan.

L'homogeneïtzació s'efectuà utilitzant un homogeneïtzador de Potter-Elvehjem (B. Braun Melsunger, entre 95 i 115 μ m de folgança) a 500 rpm, 15 impulsos. La suspensió se centrifugà (centrifuga Beckman J2-21, rotor JA-20, 12.500xg, 30 min a 4° C) per a eliminar les cèl.lules senceres, els nuclis, les mitocondries i els sinaptosomes. El sobrenedant s'ultracentrifugà (ultracentrifuga Beckman L-5-75H, rotor 35 FA, 105.000xg, 90 min a 4° C). El residu constituí la fracció microsomal i el sobrenedant la fracció soluble. Pels assajos en que s'utilitzà la fracció soluble, aquesta es passà prèviament per una columna PD-10 (Sephadex G-25, Pharmacia Fine Chemicals) per a eliminar les sals i els substrats endògens (vegeu 4.5.1.).

Aquest mètode d'obtenció de fracció microsomal fou proposat per Schneider i Hogeboom (33); considerant-se la fracció microsomal com aquella que sedimenta a 105.000xg després d'eliminar mitocondries i nuclis d'un homogeneïtzat del teixit corresponent, en medi isotònic de sacarosa.

4.2. PREPARACIÓ DE LA FRACCIÓ DE VESÍCULES SINÀPTIQUES DE CERVELL DE RATA

4.2.1. MÈTODE DE SOLLER ET AL. (1973)

El mètode de Soller (119) és una modificació del de Whittaker, Michaelson i Kirkland (120).

S'homogeneïtzaren 20 g de teixit en 10 volums de sacarosa 0,32 M. La suspensió se centrifugà a 1.000xg, 10 min per a eliminar les cèl·lules senceres i els nuclis. El sobrenedant se centrifugà a 11.500xg, 20 min per a separar la fracció mitocondrial crua. Aquest residu se suspengué en H₂O (3 ml per g de teixit fresc equivalent) i es mantingué 15 min a 0-4° C per a trencar els sinaptosomes i alliberar les vesícules sinàptiques. Durant aquests 15 min es dispersaren les partícules amb l'ajut d'un homogeneïtzador Potter-Elvehjem, a 500 rpm, 5 impulsos i a intervals de 5 min. La suspensió se centrifugà a 6.000xg, 15 min i s'eliminà el residu. Es prengueren tres fraccions de 15 ml que es dipositaren cada una sobre 13 ml de sacarosa 0,2 M. El conjunt se centrifugà en rotor SW 25.1 (Ultracentrífuga Beckman L-5-75H) a 53.000xg, 120 min. La interfase resultant i la capa de sacarosa 0,2 M que estava per sobre (2 mm) del residu, es recollí i diluí en un volum igual de H₂O i es centrifugà el conjunt (105.000xg, 60 min, rotor 35 FA). El residu obtingut fou la fracció de vesícules sinàptiques crues. L'esquema d'aquest mètode de fraccionament es troba representat en la Figura 3. Totes les operacions es realitzaren a 0-4° C.

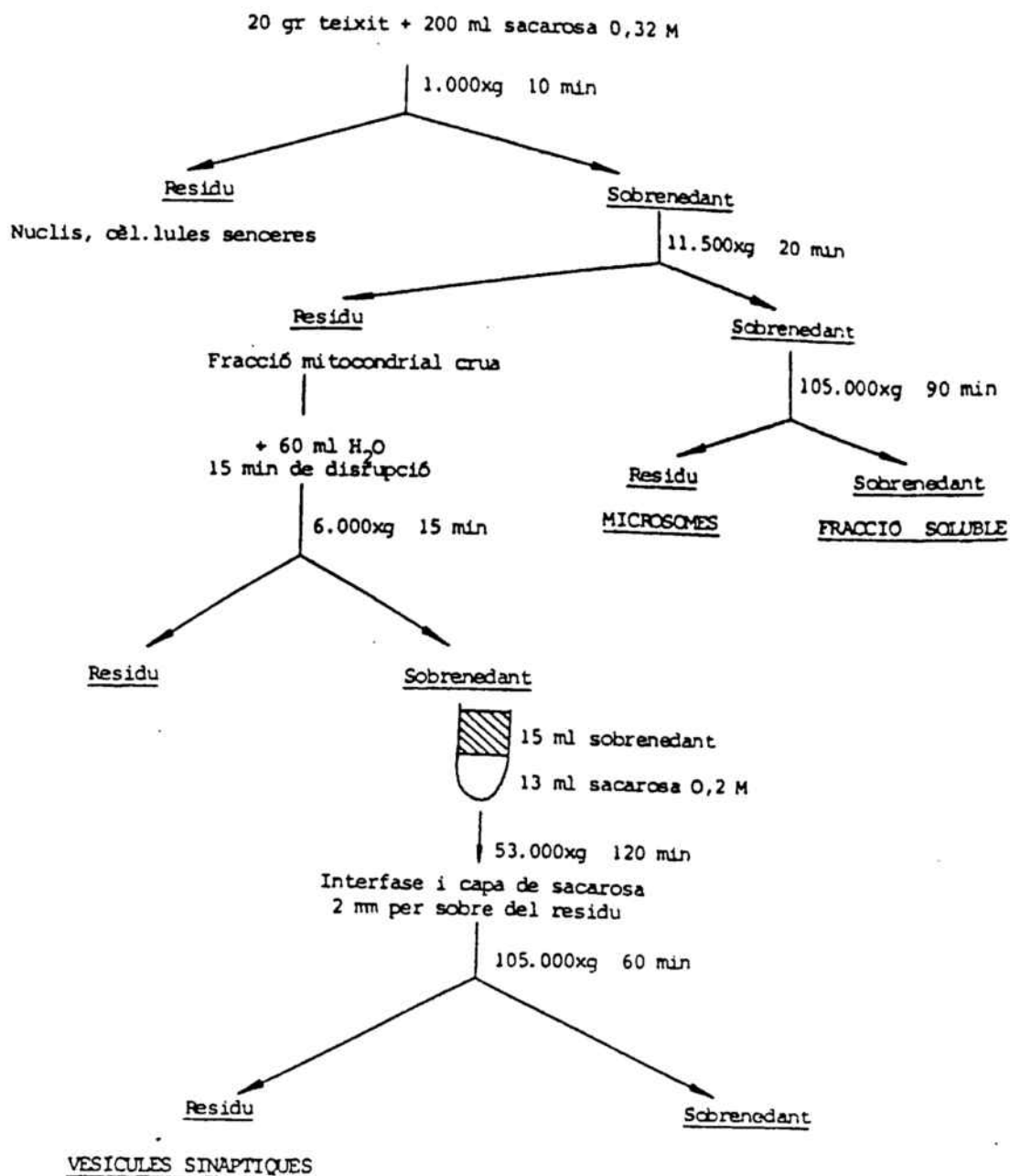


FIGURA 3.- ESQUEMA D'OBTENCIÓ DE VESÍCULES SINÀPTIQUES.
MÈTODE DE SOLLER ET AL. (1973)

Seguint el mètode de fraccionament proposat per Soller et al. (119) s'obtingué la fracció de vesícules sinàptiques. Les fraccions microsomal i soluble també es poden obtenir a partir d'aquest mètode de fraccionament.

4.2.2. MÈTODE DE TAMIR ET AL. (1974)

El mètode de Tamir et al. (121) es basa en substituir el gradient de sacarosa o de Ficoll utilitzat en la majoria dels mètode d'aïllament de vesícules sinàptiques pel gradient de diatrizoat de sodi (vegeu Fig. 4).

S'homogeneïtzaren 20 g de teixit en 9 volums de sacarosa 0,32 M. La suspensió se centrifugà a 1.000xg, 10 min per a eliminar les cèl·lules senceres i els nuclis. El sobrenedant se centrifugà a 14.500xg 15 min per a precipitar les mitocondries, els sinaptosomes, els fragments de mielina i alguns microsomes. Aquest residu es rentà en un volum de sacarosa 0,32 M igual que l'original i se sedimentà a 15.900xg 20 min. El residu se suspengué en 10 ml de sacarosa 0,32 M i els sinaptosomes se separaren col·locant 3 ml de la suspensió sobre un gradient discontinu de sacarosa format per 13 ml de sacarosa 0,8 M sobre 13 ml de sacarosa 1,2 M i centrifugant a 53.000xg 60 min en un rotor SW 25.1 (Ultracentrifuga Beckman L-5-75H). Les tres bandes de dalt dels tres tubs es van recollir juntes i es van diluir amb 1-2 volums d'aigua; els sinaptosomes es van sedimentar a 20.000xg 15 min.

Les vesícules sinàptiques s'obtingueren per xoc osmòtic dels sinaptosomes. Els sinaptosomes es van suspendre en 30 ml d'aigua freda (4° C) amb l'ajut d'un homogeneïtzador Potter-Elvehjem (500 rpm, 7 impulsos). La suspensió es va dispersar tres vegades a intervals de 10 min i es va centrifugar a continuació a 20.200xg 30 min. 15 ml del sobrenedant d'aquesta centrifugació es van col·locar sobre 15 ml de diatrizoat de sodi al 10% (p/v) i es va centrifugar el conjunt en rotor SW 25.1

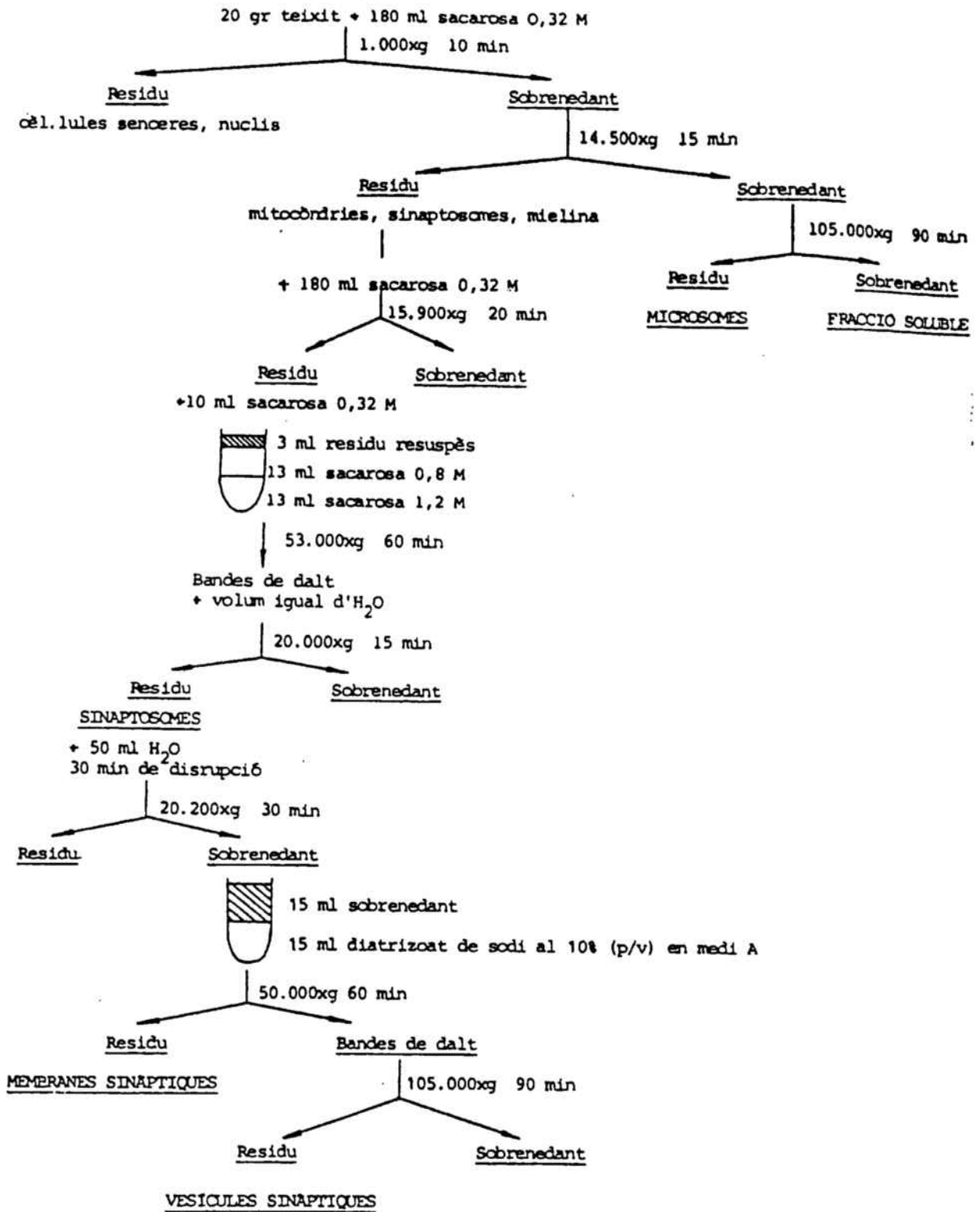


FIGURA 4.- ESQUEMA D'OBTENCIÓ DE VESÍCULES SINÀPTIQUES.
MÈTODE DE TAMIR ET AL. (1974).

Seguint el mètode de fraccionament proposat per Tamir et al. (121) s'obtingueren les fraccions de vesícules sinàptiques o bé la fracció sinaptosomal. Al mateix temps que s'aïllen les fraccions esmentades, també es poden obtenir els microsomes i la fracció soluble.

(Ultracentrifuga Beckman L-5-75H) a 50.000xg 60 min. El residu estava constituït per fragments de membranes sinàptiques; mentre que la banda corresponent a la fracció de vesícules sinàptiques, es va recollir i es va centrifugar a 105.000xg 90 min (rotor 35 FA, ultracentrifuga Beckman L-5-75H) per tal d'obtenir un residu d'aquesta fracció.

L'esquema d'aquest mètode de fraccionament es troba representat en la Figura 4. Totes les operacions es van realitzar a 0-4° C.

4.3. RENTATS DE LES FRACCIONS PARTICULADES

Les fraccions particulades (microsomes, vesícules sinàptiques, sinaptosomes i membranes sinàptiques) van ser rentats tal com es descriu a continuació.

La fracció particulada es rentà amb l'ajut d'un homogeneitzador de Potter-Elvehjem (500 rpm, 7 impulsos) i amb 2 ml del medi de rentat/g de teixit original equivalent.

Una alíquota de la suspensió es prengué per a fer determinacions d'activitats enzimàtiques i per a determinar proteïna. Per a tornar a precipitar la fracció particulada, se centrifuga a les mateixes revolucions en què s'havia obtingut aquesta fracció. El sobrenedant es guardà per a fer anàlisis enzimàtics i per a determinar proteïna.

Quan fou necessari, el nou residu es tornà a rentar segons el mateix procediment indicat.

En general s'ha procurat que els medis de rentat fossin isotònics i s'ha treballat a 0-4° C.

4.4. GENERACIÓ DELS ANTICOSSOS I SAGNAT DELS CONILLS

El procediment seguit fou anàleg al descrit per Judith L. Vaitukaitis (122). S'utilitzaren conilles femelles albines per a la obtenció dels anticossos. A continuació es descriu, esquemàticament, el procediment seguit per a l'obtenció d'anticossos:

1r. dia.- Extracció de 20 ml de sang de l'arteria central de l'orella. La sang es deixà coagular 30 min a 37° C i, després de 2 h a 2° C, el coàgul es desenganxà de les parets del recipient mitjançant una vareta. El dia següent el sèrum es decantà i se centrifugà 10 min a 3.000 rpm, per a eliminar els eritròcits que no haguessin coagulat. Aquest sèrum es va utilitzar com a control.

2n. dia.- Injecció intradèrmica de 7 ml d'emulsionat d'antigen-adjuvant complet de Freund 1:1. El pèl de l'esquena dels conills s'afaità i s'efectuaren diverses injeccions per tota l'esquena del conill tal com es veu a la Fig. 5. Per a augmentar la resposta immune, 2 ml d'una suspensió de Bordetella pertusis s'injectaren en dues punxades intradèrmiques a la part sacra-lumbar de l'esquena.



FIGURA 5.- ASPECTE DEL CONILL DESPRÉS DE LA INJECCIÓ INTRADÈRMICA PER TOTA L'ESQUENA DE L'EMULSIONAT D'ADA DE CERVELL DE RATA - ADJUVANT COMPLET DE FREUND 1:1

32è. dia.- Injecció intramuscular d' 1 ml d'emulsionat d'antigen-adjuvant complet de Freund 1:1. La punxada s'efectua a l'extremitat posterior dreta de l'animal.

62è. dia.- Injecció intravenosa d' 1 ml d'antigen. L'enzim s'injecta a la vena marginal de l'orella del conill. En aquest cas, no s'ha d'administrar adjuvant de Freund, perquè podrien aparèixer embolies grasses a l'animal.

69è. dia.- Extracció d'aproximadament 20 ml de sang de cada animal de l'arteria central de l'orella i repetició del procediment ja descrit per a obtenir el serum.

76è. dia.- Segona extracció d'aproximadament 20 ml de sang de cada animal i obtenció del sèrum.

83è. dia.- Tercera extracció d'aproximadament 20 ml de sang i obtenció del sèrum.

90è. dia.- Quarta extracció d'aproximadament 20 ml de sang i obtenció del sèrum.

Per a purificar la fracció immunoglobulínica del sèrum es van barrejar 20 ml de sèrum amb 20 ml de tampó fosfats 13 mM, NaCl 9 g/l de pH 7,2 i la mescla es va precipitar amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 40% de saturació. La mescla s'agità a 4°C durant 15 h i a continuació se centrifugà a 5.000 rpm (rotor JA-10) durant 15 min. El residu es va disoldre en 60 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,75 M, se centrifugà a 5.000 rpm (rotor JA-10) durant 15 min i el nou residu es va disoldre en 10 ml de tris-HCl 0,1 M pH 6,5. La solució es va dialitzar en front de la mateixa solució de tris-HCl i es va aplicar a una columna DEAE-Sepharosa (1,6 cm Ø x 35 cm) a un flux de 90 ml/h. Les immunoglobulines s'obtenen en el volum d'exclusió.

La fracció d'immunoglobulines així obtinguda no presentava activitat adenosina desaminasa.

4.5. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES

En les purificacions de l'enzim i de l'anticòs s'han utilitzat les tècniques cromatogràfiques de filtració en gel i de bescanvi iònic.

En els diferents processos, el flux de l'eluent s'ajustà mitjançant una bomba peristàtica LKB Bromma, model 2120 Varioperpex, o bé Gilson, model Minipuls II, intercalada entre la sortida de la columna i el col·lector de fraccions. Els eluïts es recolliren amb l'ajut d'un col·lector de fraccions Gilson model Escargot VFC, o bé LKB Bromma, model 2112 Redirac.

En cada procés, el gel corresponent s'equilibrà amb el tampó adient. El procés d'equilibrament es considerà acabat quan el pH i la conductivitat del tampó coincidien tant en l'entrada com en la sortida de la columna.

Tots els processos cromatogràfics es van realitzar a una temperatura de 4° C.

4.5.1. CROMATOGRAFIA DE FILTRACIÓ EN GEL

El gel de Sephadex G-25 s'utilitzà per a eliminar les sals, els metabòlits endògens i pel canvi de tampó.

Quan el volum dels preparats enzimàtics era petit s'utilitzaren columnes pre-empaquetades de Sephadex G-25 (FD-10, Pharmacia Fine Chemicals). La columna s'equilibrà passant a través d'ella 25 ml del tampó corresponent.

s'apliquen 2,5 ml de la mostra que es deixa penetrar dins la columna i s'elueix després amb 3,5 ml del mateix tampó d'equilibrat. La columna es renta amb 25 ml de tampó abans de tornar-se a utilitzar.

Durant el procés de purificació de l'adenosina desaminasa s'utilitza Sephadex G-25 en una columna Pharmacia K-26 (2,6 cm Ø x 60 cm) equilibrada amb tampó imidazola-HCl 50 mM pH 6,2 a un flux de 90 ml/h. L'aplicació de la mostra i l'elució s'efectuaren al mateix flux.

4.5.2. CROMATOGRAFIA DE BESCOANVI IÒNIC

Una columna amb un volum de llit de (1,0 cm Ø x 9,1 cm) s'ompli de gel de DEAE-Sepharosa inflat i desgasificat. Aquesta columna s'equilibra amb un tampó imidazola-HCl 50 mM pH 6,2 a un flux de 25 ml/h, aplicant a continuació la mostra enzimàtica que a aquest pH interacciona electrostàticament amb el grup dietilaminoetil. L'elució d'aquesta mostra s'efectua al mateix flux amb un gradient linial de NaCl de 0 M a 0,4 M en el mateix tampó imidazola-HCl 50 mM pH 6,2.

Per a purificar la fracció immunoglobulínica s'utilitza una columna Pharmacia K-16 (1,6 cm Ø x 35 cm) amb un flux de 90 ml/h. Les immunoglobulines no s'uneixen al grup DEAE a un pH 6,5 i s'obtenen en el volum d'elució. El desenvolupament d'aquesta cromatografia es va seguir mesurant l'absorció a 280 nm dels eluits mitjançant un espectrofotòmetre de flux continu LKB, model 8300 Uvicord II dotat d'un inscriptor LKB 9520-4 i col·locat a la sortida de la columna.

4.5.3. DETERMINACIÓ DEL RADI DE STOKES PER FILTRACIÓ EN GEL

La determinació del pes mol·lecular aparent de l'adenosina desaminasa es realitzà mitjançant el mètode d'Andrews (123) i es calculà el radi de Stokes (124, 125).

La cromatografia s'efectuà a través de una columna de Sephacril S-300 (1 cm Ø x 110 cm) utilitzant un tampó tris-HCl 50 mM NaCl 0,1 M pH 8,2 com a tampó d'elució.

Les proteïnes utilitzades com a marcadors van ser:

- 1.- Citocrom c (Pes mol·lecular = 13.000, $R_s = 16,5$ A)
- 2.- Mioglobina (Pes mol·lecular = 17.800, $R_s = 20,8$ A)
- 3.- Quimotripsinògen (Pes mol·lecular = 25.000, $R_s = 22,4$ A)
- 4.- Ovoalbúmina (Pes mol·lecular = 43.000, $R_s = 30,5$ A)
- 5.- Seroalbúmina bovina (Pes mol·lecular = 67.000, $R_s = 35,5$ A)
- 6.- Aldolasa (Pes mol·lecular = 158.000, $R_s = 48,1$ A)
- 7.- Catalasa (Pes mol·lecular = 232.000, $R_s = 52,2$ A)
- 8.- Ferritina (Pes mol·lecular = 440.000, $R_s = 61,0$ A)
- 9.- Tiroglobulina (Pes mol·lecular = 669.000, $R_s = 85,0$ A)

4.6. TÈCNiques ELECTROFORÈTIQUES

Les tècniques electroforètiques han estat de força ajut en la purificació de l'enzim i per a seguir el procés de purificació de l'anticòs anti adenosina desaminasa de cervell de rata.

4.6.1. ELECTROFORESIS ANALÍTICA EN GELS DE POLIACRILAMIDA

S'utilitzà la tècnica d'electroforesi discontinua. Els gels de poliacrilamida es van preparar amb 1,4 ml de gel separador (T = 9%, C = 0,56) i 0,2 ml de gel concentrador (T = 0,02%, C = $3 \cdot 10^{-4}$), en tubs de 6,5 cm de longitud i 0,7 cm de diàmetre intern.

El gel separador es preparà amb:

- 7,2 ml acrilamida/bisacrilamida (T = 40%, C = 2,5)
- 1,28 ml tampó tris-HCl pH 8,9
- 20,2 ml aigua
- 52 μ l N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED)
- 3,2 ml persulfat de potassi

El gel concentrador es preparà amb:

- 2 ml acrilamida/bisacrilamida (T = 0,16%, C = $2 \cdot 10^{-3}$)
- 2 ml tampó tris- H_2PO_4 pH 6,4
- 8,56 ml aigua
- 40 μ l TEMED
- 1,4 ml persulfat de potassi

El tampó del dipòsit inferior fou tris-HCl 25 mM pH 8,9 mentre que en el dipòsit superior s'utilitzà tris-glicina 37 mM pH 8,3. L'electroforesi s'efectuà durant 90 min a 1 mA per tub. Les mostres s'aplicaren amb blau de bromfenol com a marcador i glicerol com a densificador.

4.6.2. ELECTROFORESI PREPARATIVA EN GELS DE POLIACRILAMIDA

(ELECTRO-ELUCIÓ)

L'electroforesi preparativa es va realitzar en un tub de 7,3 cm de longitud i 2,0 cm de diàmetre. L'electroforesi s'efectuà durant 10 h a 200 v; en línies generals es preparà tal com es descriu a l'apartat 4.6.1., però s'utilitzaren 16 ml de gel separador (T = 12%, C = 0,75) i 7 ml de gel concentrador (T = 0,02%, C = $3 \cdot 10^{-4}$).

L'enzim es recollí utilitzant una bomba peristàltica a un flux de 25 ml/h. La Figura 6 mostra un esquema del montatge de l'equip de l'electroelució

4.6.3. ELECTROENFOCAMENT ISOELÈCTRIC EN PLAQUES D'AGAROSA

Per a efectuar l'enfocament isoelectric en plaques d'agarosa es procedí seguint el mètode de Pharmacia Fine Chemicals (126) amb una unitat electroforètica FBE 3000 (Pharmacia).

Les plaques d'agarosa es van preparar escalfant 0,3 g d'agarosa "IEP" (Pharmacia) en una dissolució de 3,6 g de sorbitol en 20 ml d'aigua. Va

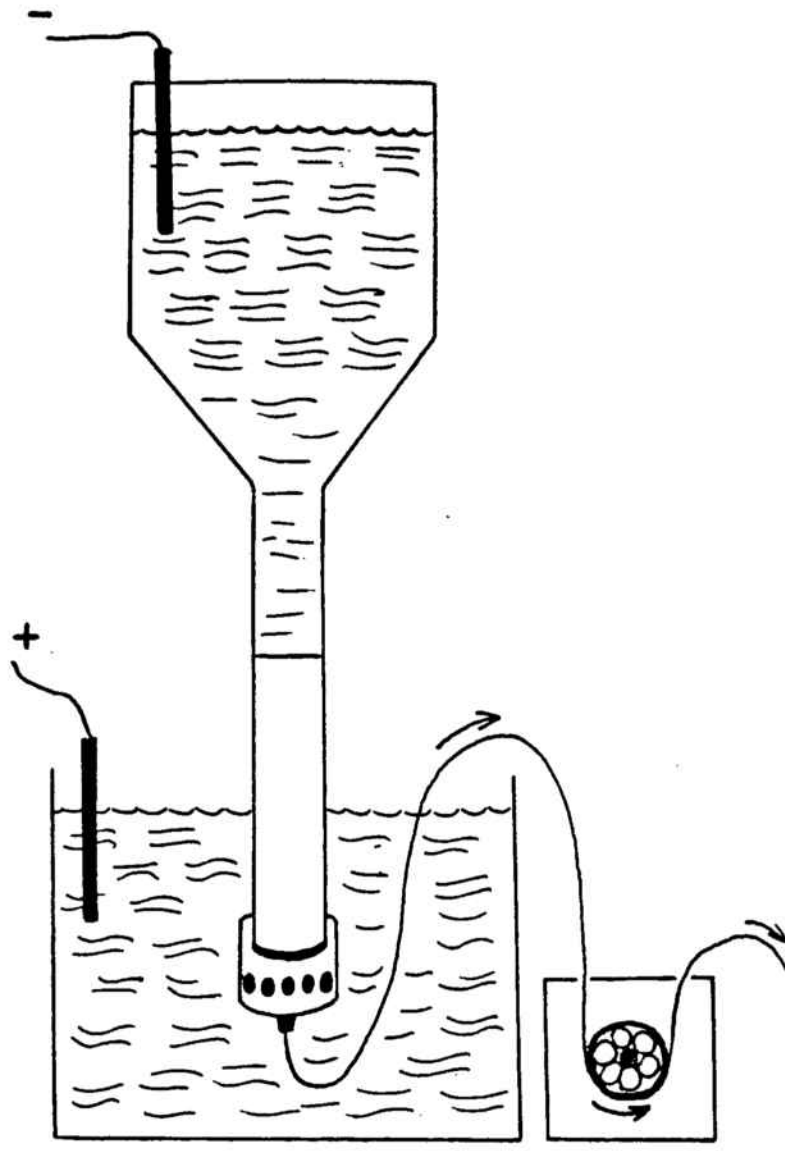


FIGURA 6.- ESQUEMA DE L'EQUIP DE L'ELECTRODEPOSICIO

cop dissolta l'agarosa s'afegi 1,9 ml d'anfòlits (40%) del marge de pH 3-10 i es preparà una placa sobre un full de 114 x 225 mm de "Gelbond film" (Marine Colloids Division).

L'aplicació de la mostra s'efectuà amb l'ajuda del paper absorbent Scheleicher-Schüll (Blood Collection Paper) de 10 x 5 mm, que absorbeix 25 µl de mostra. Els aplicadors es van eliminar després de 45 min del començament de l'enfocament.

La dissolució catòdica fou de NaOH 1 M i la anòdica de H₂SO₄ 0,05 M. L'enfoc isoelèctric s'inicià amb un voltatge de 500 v i una potència limit de 15 w, que es mantingué constant durant tot el procés. El voltatge no superà en cap moment els 1.500 v. Com a marcador s'utilitzà hemoglobina i l'electroenfocament es perllongà fins 15 min després d'enfocar-se aquesta proteïna (uns 75 min).

4.6.4. IMMUNOELECTROFORESI EN PLAQUES D'AGAR

Les plaques d'agar es van preparar escalfant 0,1 g d'agar en 10 ml de tampó tris-HCl 0,2 M pH 8,6 que, un cop dissolt, es va gelificar sobre un full 10 x 10 cm de "Gelbond film" (Marine Colloids Division).

Es van fer una serie de pous a la placa d'agar i es van aplicar les mostres. S'efectuà una electroforesi durant 2 h a 200 v a temperatura

ambient. Per a l'electroforesi s'utilitza una càmera d'electroforesi amb 250 ml de tampó tris-HCl 0,2 M pH 8,6 a cada costat de la càmera.

Un cop realitzada l'electroforesi es buida el gel de les trinxeres, que s'havien marcat prèviament paral·lelament al sentit en què es realitza l'electroforesi, i s'omplen amb 70 μ l d'anticòs. La immunodifusió es realitza en una càmera humida durant 12 h a temperatura ambient.

Les bandes de la immunoelectroforesi s'observaren com a precipitat de color blanc. Per a millorar l'observació d'aquestes bandes s'efectuà el procediment de tinció:

- diversos rentats amb 9 g/l NaCl per a eliminar les proteïnes no precipitades.
- un premsat de 15 min amb paper de filtre per a acabar d'absorbir les proteïnes no precipitades.
- diversos rentats amb aigua per a eliminar les sals.
- un premsat amb paper de filtre.
- tinció amb 1 g/l Coomassie Brilliant Blue R (SIGMA) en una dissolució 10:9:1 d'aigua:etanol:àcid acètic.
- decoloració amb una dissolució 10:9:1 d'aigua:etanol:àcid acètic.

4.6.5. TINCIÓ GENERAL DE PROTEINES

Els gels o les plaques que es volien tenyir es van mantenir uns 30 min en acid tricloracètic al 5% per tal de fixar les bandes, es van rentar amb acid acètic al 10% i es van mantenir 2 h en una dissolució de

Coomassie Brilliant Blue R (SIGMA) al 0,25% en una mescla de metanol, àcid acètic i aigua (30:10:60) (v/v/v) (127).

Els gels es van decolorar a continuació amb diversos rentats de metanol, àcid acètic i aigua (30:10:60) (v/v/v). La decoloració s'efectua en 3 h en un bany a 60° C.

4.6.6. TÏNCIÓ ESPECÍFICA DE L'ADENOSINA DESAMINASA

L'activitat ADA es manifestà en els gels o les plaques mitjançant el mètode de Spencer et al. (128). Es van dissoldre 10 mg d'adenosina i 0,2 g d'agar en 15 ml de tampò de fosfats de sodi 100 mM pH 7,5 i s'escalfà la mescla a 90° C. La dissolució es va deixar refredar fins a 45° C i es barrejà amb una altra dissolució que contenia 3 µl de PYP comercial (1 mg/ml, A.E. 25 U/mg), 8 µl de XO comercial (10 mg/ml, A.E. 0,4 U/mg), 2 mg de MTT i 2 mg de PMS en 5 ml de tampò de fosfats de sodi 100 mM pH 7,5.

Els gels de poliacrilamida es van col·locar en tubs que contenien la mescla i es van incubar a les fosques, a temperatura ambient, durant 20 min. L'activitat enzimàtica es localitza en bandes de color blau que destaquen sobre un fons groc. El color blau no queda fixat sobre el gel de poliacrilamida, sinó que es difón a través del gel d'agar.

4.7. TÈCNiques DE MICROSCòPIA ELECTRòNICA

Les tècniques de microscòpia electrònica s'utilitzaren en l'observació de microsomes i de sinaptosomes. A continuació es descriu el procés preparatiu previ a l'obtenció de les micrografies electròniques.

4.7.1. PROCÉS DE FIXACIÓ

Per a fixar els precipitats de microsomes o sinaptosomes s'utilitzà dialdehid glutàric 2,5% (v/v) en un medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. La mescla es deixà 1,5 h en contacte amb el residu i a continuació es rentà tota la nit amb sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4.

El residu rentat es post-fixà amb OsO_4 al 2% (p/v) en sacarosa 0,28 M, tris-HCl 30 mM, pH 7,4, durant 15-30 minuts. Un cop eliminat el OsO_4 mitjançant diversos rentats amb el tampó es rentà el residu tres vegades amb aigua durant 1 h cada vegada. Finalment s'afegí etanol 70% per a deshidratar.

El residu es recuperà amb l'ajuda d'una espàtula i la deshidratació es portà a terme per immersió en sèries successives d'etanol: 70%, 80%, 90%, 95% i etanol absolut.

4.7.2. PROCÉS D'INCLUSIÓ

Les mostres deshidratades es tracten amb el dissolvent del monòmer de la polimerització. Aquest monòmer no és soluble en aigua i per això es tracta la mostra dessecada amb etanol, amb els dissolvents:

- Dues parts d'etanol absolut i una part d'òxid de propilè.
- Una part d'etanol absolut i una part d'òxid de propilè.
- Una part d'etanol absolut i tres parts d'òxid de propilè.
- òxid de propilè absolut.

El temps utilitzat en aquestes operacions va ser de 15 min per a cada tractament; cada procés es va repetir tres vegades. Les mostres així tractades es van poder introduir dins del monòmer i es va iniciar la seva polimerització de la forma habitual amb "Araldite Durcupan ACM".

4.7.3. PROCÉS D'ULTRAMICROTOMIA

Es va treballar amb un ultramicrotom Reichert OmU-2 amb ganivetes de quars o diamant i es van prendre mostres a diferents nivells del residu perquè les observacions fossin més representatives.

4.7.4. PROCÉS DE TINCIÓ

La tinció s'ha efectuat amb acetat d'uranil al 2% (p/v), segons el mètode de Watson (129) i citrat de plom segons la tècnica de Reynolds (137).

4.7.5. PROCÉS D'OBSERVACIÓ

L'observació de les mostres es va realitzar amb un microscopi electrònic EM 200 i EM 301 a 60 kv d'acceleració en el Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

4.7.6. LOCALITZACIÓ CITOQUÍMICA DE LA 5'NUCLEOTIDASA

La localització de la 5'nucleotidasa a les fraccions particulades es posà de manifest mitjançant el mètode de Kreutzberg et al. (53). El residu particulat es fixà amb dialdehid glutàric 2,5% (v/v) en medi tamponat de sacarosa 0,28 M, tris-HCl 30 mM, pH 7,4, i es tractà 3 h en el medi histoquímic, que contenia també tris-maleat 50 mM pH 7,0, AMP 1 mM, $Pb(NO_3)_2$ 2 mM, $Mn(NO_3)_2$ 50 mM i sacarosa 0,25 M. Els controls s'efectuaren utilitzant el medi histoquímic sense AMP.

Després del tractament amb el medi histoquímic es procedí a la fixació, inclusió, tinció, ultramicrotomia i observació amb microscopi electrònic (vegeu apartats anteriors).

4.7.7. LOCALITZACIÓ CITOQUÍMICA DE L'ADENOSINA DESAMINASA

La localització de l'adenosina desaminasa a les fraccions particulades es posa de manifest mitjançant el mètode descrit per Trisobà et al. (31). El residu particulat es tracta durant 5 min a 37° C amb una dissolució de

ribòsid de 6-cloropurina 10 mM. Aquest substrat, anàleg de l'adenosina, rendeix clorur com a producte de la reacció de l'ADA, que es fa precipitar mitjançant un posterior tractament amb AgNO_3 120 mM durant 5 min a 37°C i a les fosques.

Després d'aquest tractament es procedí a la fixació, inclusió, tinció, ultramicrotomia i observació amb microscopi electrònic (vegeu apartats anteriors).

4.8. DETERMINACIÓ DE LES ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES

La determinació de les activitats enzimàtiques de forma contínua s'efectua espectrofotomètricament mesurant els increments o decrements d'absorbància deguts a la variació de concentració dels substrats o dels productes, segons les condicions experimentals.

Totes les mesures s'efectuaren en un espectrofotòmetre Pye Unicam SP 1700 termostatitzat, provist d'un inscriptor AR 25 i en cubetes de 10 mm de pas de llum, a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

Les activitats es calcularen en μkat , que corresponen a μmols de substrat transformats en un segon.

4.8.1. ENZIMS DEL METABOLISME PURÍNIC

Els substrats utilitzats van ser l'adenosina per l'ADA, l'AMP per la 5'N, la guanina per la GAH i la guanosina per la PNP.

Per a evitar una elevada absorbància, la concentració dels substrats va ser de $5 \cdot 10^{-5}$ M en la cubeta de l'espectrofotòmetre quan només es determinà l'activitat específica.

Les reaccions s'efectuaren en un medi tamponat de pH 7,4 compost de sacarosa 0,28 M i tris-HCl 30 mM, i en la determinació de l'activitat PNP s'afegí tampó de fosfats de sodi 0,2 M.

TAULA I

INCREMENTS D'ABSORTIVITAT MOLAR A LES LONGITUDS D'ONA EN LES QUALES ES DETERMINA L'ACTIVITAT

ENZIM	SISTEMA	λ (nm)	ϵ (A/M cm)
ADA	adenosina-inosina	265	7.800
5'N	AMP-inosina	265	8.400
GAH	guanina-xantina	248	4.700
PNP	guanosina-guanina	260	5.100

4.8.1.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT ADA

La determinació d'activitat de l'adenosina desaminasa s'efectua mesurant els decrements d'absorbància a 265 nm segons el mètode de Kalckar (132) deguts a la desaparició d'adenosina. A aquesta longitud d'ona correspon la màxima diferència entre els valors d'absortivitat molar per l'adenosina i la inosina (vegeu Taula I).

4.8.1.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT 5'N

La determinació d'activitat de la 5'nucleotidasa s'efectuà mesurant els decrements d'absorbància a 265 nm a causa de la disminució en la concentració d'AMP. Aquest mètode és acoblat i està basat en l'addició a la cubeta de reacció d'ADA comercial en quantitat suficient perquè transformi ràpidament l'adenosina que es va formant, en inosina; així s'obté una diferència més gran entre els valors d'absortivitat molar (vegeu Taula I). Aquest mètode és el descrit per Kalckar (133).

La concentració d'ADA comercial que s'ha afegit en la mescla de reacció en totes les determinacions d'activitat efectuades en el present treball ha estat 3,4 U/ml.

4.8.1.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT GAH

La determinació d'activitat de la guanina aminohidrolasa s'efectuà mesurant els decrements d'absorbància a 248 nm deguts a la desaparició de guanina (134). Aquesta longitud d'ona correspon a la màxima diferència entre els valors d'absortivitat molar entre guanina i xantina (vegeu Taula I).

4.8.1.4. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT PNP

La determinació d'activitat de la purín nucleòsid fosforilasa s'efectuà mesurant els decrements d'absorbància a 260 nm, punt isosbèstic de la guanina i la xantina, deguts a la desaparició de la guanosina (vegeu Taula I).

S'ha treballat en aquesta longitud d'ona perquè en els preparats enzimàtics, acompanyant a la PNP es troba la GAH que interferiria en les determinacions.

4.8.2. ALTRES ENZIMS NO PURÍNICIS

4.8.2.1. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT LDH

La determinació de l'activitat de la lactat deshidrogenasa s'efectuà mesurant els decrements d'absorbància a 340 nm, deguts al NADH, en un medi tamponat compost per sacarosa 0,28 M i tris-HCl 30 mM de pH 7,4.

La concentració de piruvat i NADH en la cubeta de l'espectrofotòmetre fou de $8 \cdot 10^{-4}$ M i $8,5 \cdot 10^{-5}$ M respectivament. L'increment de l'absortivitat molar per a aquesta reacció és de 6.220 A/M cm a 340 nm (135).

4.8.2.2. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT MDH

La determinació de l'activitat de la malat deshidrogenasa s'efectuà mesurant els decrements d'absorbància a 340, deguts al NADH, en un medi tamponat idèntic al de la LDH.

La concentració d'oxalacetat i NADH en la cubeta de l'espectrofotòmetre fou de $3,5 \cdot 10^{-4}$ M i $1 \cdot 10^{-4}$ M respectivament. L'increment de l'absortivitat molar per a aquesta reacció és de 6.220 A/M cm a 340 nm (135).

4.8.2.3. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA A pH 7,4

La mesura d'activitat de la fosfatasa s'efectuà de forma discontinua. La mescla de reacció fou:

- 0,8 ml fosfat de p-nitrofenil 18 mM
- 0,1 ml tampó sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 contenint $MgCl_2$ 0,1mg/ml.
- 0,1 ml dissolució enzimàtica.

Després de 10 min s'aturà la reacció afegint 2 ml de NaOH 0,5 M i es mesurà l'absorció a 405 nm en front d'un blanc.

Aquest mètode es basa en el descrit per Walter i Schütt (136). El coeficient d'absortivitat molar del p-nitrofenol és de 18.500 A/M cm (136).

4.9. DETERMINACIÓ DELS PARAMETRES CINÈTICS

Els diversos paràmetres cinètics (constants de Michaelis K_m , velocitat màxima V i constants de inhibició K_i) es determinaren estadísticament, mitjançant un ordinador Tektronix 4051. Les dades experimentals s'ajustaren a la corresponent equació de velocitat de Michaelis-Menten senzilla (137) o estesa al cas de inhibició (138), mitjançant un programa en llenguatge BASIC de regressió no linial sense derivades (139).

4.10. DETERMINACIÓ DE LES CONSTANTS TERMODINÀMIQUES

4.10.1. CÀLCUL DE L'ENERGIA D'ACTIVACIÓ

L'efecte que la temperatura provoca en la majoria de les reaccions ha estat descrit per Arrhenius (140):

$$\frac{d \ln K}{d T} = \frac{\Delta E}{R T^2}$$

K = constant de velocitat

ΔE = energia d'activació

R = constant dels gasos

T = temperatura (K)

De la integració d'aquesta equació i a partir de l'equació de Michaelis-Menten, s'obté l'equació (141):

$$\log V = \frac{-\Delta E}{2,303 R} \frac{1}{T} + \text{constant}$$

La representació de $\log V$ en front de $1/T$ és una recta, i a partir del seu pendent es pot deduir el valor de l'energia d'activació.

4.10.2. CÀLCUL DE L'ENTALPIA STANDARD

L'efecte que la variació de temperatura provoca en la constant d'equilibri K_{eq} del sistema ve descrita per l'equació de Van't Hoff (140):

$$\frac{d \ln K_{eq}}{d T} = \frac{\Delta H^{\circ}}{R T^2}$$

K_{eq} = constant d'equilibri

ΔH° = entalpia standard

R = constant dels gasos

T = temperatura (K)

De la integració d'aquesta equació s'obté:

$$- \log K_{eq} = \frac{\Delta H^{\circ}}{2,303 R} \frac{1}{T} + \text{constant}$$

A partir del pendent de la recta que s'obté en representar $-\log K_{eq}$ en front de $1/T$ s'aconsegueix calcular el valor de l'entalpia standard de la reacció. Per a les reaccions que arriben ràpidament a l'equilibri, la K_{eq} pot identificar-se amb la K_m (141); per a aquestes reaccions la representació gràfica de $-\log K_m$ en front de $1/T$ permet calcular l'entalpia standard del sistema reaccionant.

5. PART EXPERIMENTAL

5.1. DIFERÈNCIES DE LOCALITZACIÓ DE LA 5'N I DE L'ADA RESPECTE A ALTRES ENZIMS PURÍNICIS

Per tal d'observar el diferent comportament de l'ADA i la 5'N respecte a altres enzims purínics i respecte a la lactat i malat deshidrogenasa s'han efectuat els experiments descrits a continuació.

5.1.1. EXTRACCIÓ DELS ENZIMS DE DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA

En les diverses fraccions subcel·lulars es van efectuar els rentats i les extraccions que s'indiquen en les Figures 7 i 8. Les activitats ADA, 5'N, GAH, PNP (vegeu 4.8.1.), LDH (vegeu 4.8.2.1.) i MDH (vegeu 4.8.2.2.) s'han determinat en alguns sobrenedants i residus resuspendos novament.

5.1.1.1. SINAPTOSOMES

Els sinaptosomes i microsomes es van aïllar tal com s'indica en l'apartat (4.2.2.), es van rentar dues vegades (vegeu 4.3.) amb medi A, tamponat de sacarosa 0,28 M, tris-HCl 30 mM, pH 7,4, i es va efectuar, a continuació,

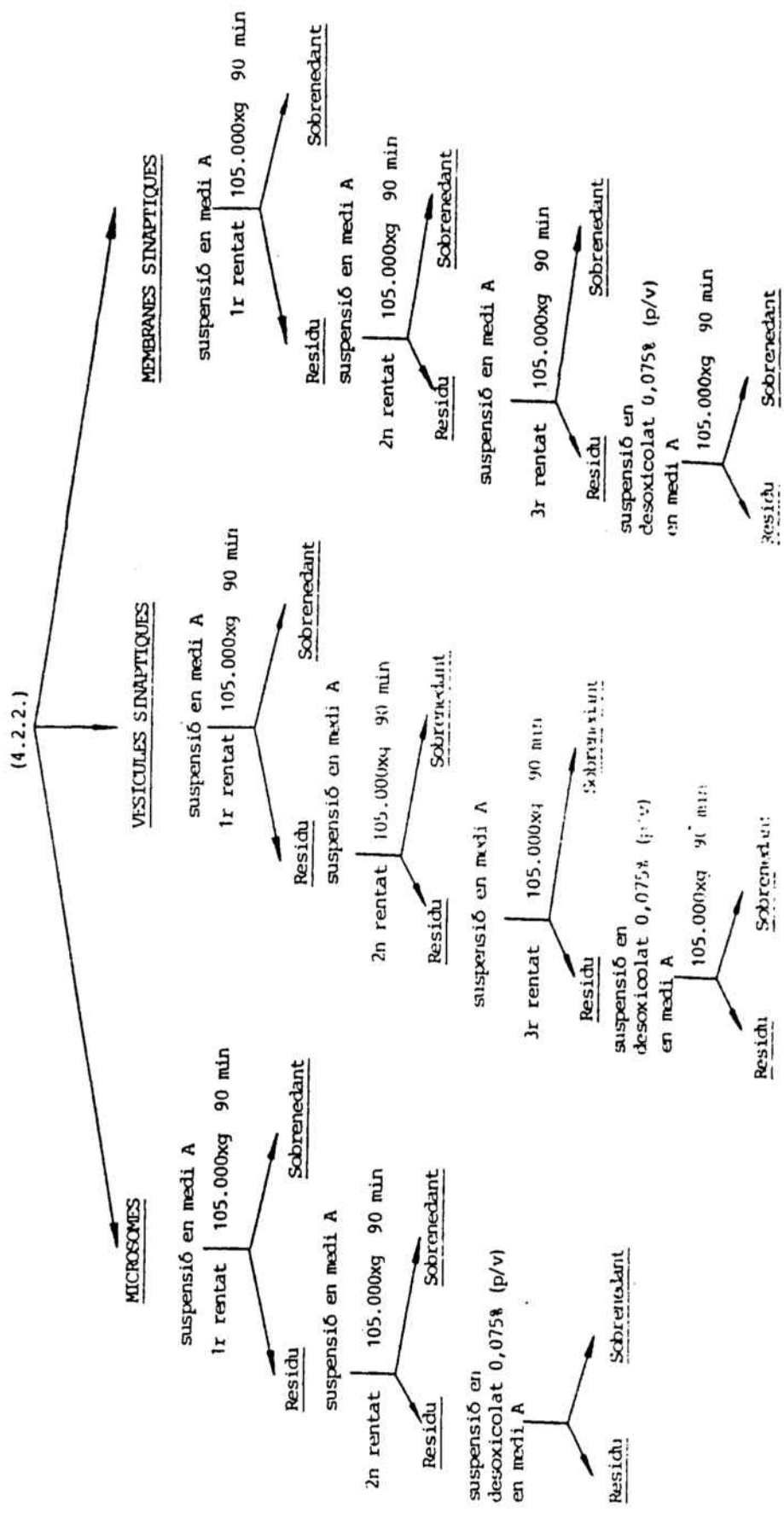


FIGURA 8 .- EXTRACCIÓ DELS ENZIMS DE DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA. S'han obtingut vesícules sinàptiques (vegeu 4.2.2.) i membranes sinàptiques (vegeu 4.2.2.), aprofitant el sobrenedant sense mitocondries per a obtenir també microsomes per centrifugació a 105.000xg durant 90 min.

un tractament amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A per a trencar els orgànuls i per a extreure els enzims lligats a membranes (Fig. 7).

Les activitats ADA (vegeu 4.8.1.1.) i 5'N (vegeu 4.8.1.2.) es van determinar en la suspensió en medi A del segon rentat, en el sobrenedant resultant de la centrifugació d'aquesta suspensió, en la suspensió en desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i en el sobrenedant resultant de la centrifugació d'aquesta suspensió. Els resultats obtinguts s'indiquen en la Taula II. Amb desoxicolat 0,075% es produeix un gran deslliurament de l'ADA lligada als sinaptosomes; l'alliberament de l'activitat 5'N és molt petit.

TAULA II
ACTIVITATS ADA I 5'N EN SINAPTOSOMES

ENZIM	MOSTRA	v 10 ⁴ (µkat/g teixit)
ADA	Suspensió en sacarosa	1,131
	Sobrenedant de sacarosa	0,098
	Suspensió de desoxicolat	0,967
	Sobrenedant de desoxicolat	0,173
5'N	Suspensió en sacarosa	4,542
	Sobrenedant de sacarosa	0,069
	Suspensió en desoxicolat	4,443
	Sobrenedant de desoxicolat	0,073

Les activitats ADA i 5'N es van determinar en diverses suspensions del tractament descrit en la Figura 7. Les velocitats s'expressen en µkat/g teixit. Les concentracions d'adenosina i d'AMP en cúbeta van ésser en tots els casos 5 10⁻⁵ M.

Dissolució de desoxicolat: 0,075% (p/v) en medi A.

Dissolució de sacarosa: medi A (sacarosa 0,28 M tris-HCl 10 mM pH 7,4

Les activitats GAH, PNP (vegeu 4.8.1.), LDH i MDH (vegeu 4.8.2.) es van determinar en el sobrenedant resultant obtingut per centrifugació un cop realitzada l'extracció amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A, tant de microsomes com de sinaptosomes. Aquesta concentració de detergent és suficient per a desorganitzar les membranes.

La Taula III mostra els valors absoluts de l'activitat alliberada de cada enzim en la fracció microsomal. Es van comparar els resultats obtinguts en les dues fraccions particulades donant el valor 100 a cada una de les activitats de la Taula III i els valors obtinguts es mostren en la Taula IV. La 5'N i l'ADA s'alliberen dels sinaptosomes en una proporció molt més elevada que la resta dels enzims, els quals s'alliberen en proporcions similats.

TAULA III
ACTIVITATS ENZIMATIQUES ALLIBERADES DELS MICROSOMES

ENZIM	ACTIVITAT (nmol/s g teixit)
ADA	0,12
GAH	0,47
PNP	0,11
5'N	0,71
LDH	25,5
MDH	53,7

La fracció microsomal es va rentar dues vegades amb medi A, es va tractar amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i es va centrifugar a 105.000xg 90 min per a separar un residu sòlid de la fracció. Les activitats es van determinar en el sobrenedant del tractament amb el detergent.

TAULA IV

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES ALLIBERADES DELS MICROSOMES
I DELS SINAPTOSOMES

ENZIM	SINAPTOSOMES	MICROSOMES
ADA	53,3	100
GAH	6,8	100
PNP	6,0	100
5'N	36,6	100
LDH	7,9	100
MDH	5,8	100

Ambdues fraccions es rentaren dues vegades amb medi A, es tractaren amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i es centrifugaren per tal de separar els orgànuls. Les activitats enzimàtiques es van determinar en els sobrenedants respectius dels tractaments amb detergent. Els resultats son comparatius; es dona el valor 100 a l'activitat de cada enzim alliberada de la fracció microsomal.

5.1.1.2. VESÍCULES SINÀPTIQUES AÏLLADES PEL MÈTODE DE SOLLER ET AL.
(1973)

Les vesícules sinàptiques i els microsomes es van aïllar tal com s'indica en l'apartat (4.2.1.). Les fraccions particulades es van rentar dues vegades en medi A (vegeu 4.3.) i els enzims es van extreure amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A (Fig. 7).

En les vesícules sinàptiques, l'activitat ADA (vegeu 4.3.1.) es determina en la suspensió del medi A del segon rentat, en el sobrenedant resultat de la centrifugació en la suspensió en desoxicolat 0,075% en medi A

i en el sobrenedant resultant de la centrifugació d'aquesta suspensió. Els resultats obtinguts es mostren en la Taula V. Igual que quan es treballà amb sinaptosomes, el desoxicolat al 0,075% produeix un gran deslliurament de l'ADA lligada a les vesícules sinàptiques.

Es van determinar també les activitats 5'N, GAH, PNP (vegeu 4.8.1.), LDH i MDH (vegeu 4.8.2.) en els sobrenedants resultants de l'extracció amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i posterior centrifugació, tant en les vesícules sinàptiques com en els microsomes.

Els resultats obtinguts en vesícules sinàptiques es van comparar amb els obtinguts en microsomes donant a aquests darrers el valor 100 d'activitat de cada un dels enzims. Aquesta comparació es pot veure en la Taula VI. La 5'N i l'ADA s'alliberen en les vesícules sinàptiques en una proporció molt més elevada que la resta dels enzims estudiats, que s'alliberen en unes proporcions similars.

5.1.1.3. VESÍCULES SINÀPTIQUES I MEMBRANES SINÀPTIQUES AÏLLADES PEL MÈTODE DE TAMIR ET AL. (1974)

Les vesícules sinàptiques i membranes sinàptiques aïllades segons (4.2.2.) es van rentar tres vegades (vegeu 4.3.) amb medi A, tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. Els microsomes, en canvi, es van rentar només dues vegades, perquè no contenien diatrizoat.

TAULA V
ACTIVITAT ADA EN VESÍCULES SINÀPTIQUES

MOSTRA	v 10 ⁵ (µkat/g teixit)
Suspensió en sacarosa	2,706
Sobrenedant de sacarosa	0,513
Suspensió de desoxicolat	2,350
Sobrenedant de desoxicolat	1,148

L'activitat ADA es va determinar amb adenosina 5 10⁻⁵ M, en diverses suspensions del tractament descrit en la Figura 7. Les velocitats s'expressen en µkat/g teixit.

Dissolució de desoxicolat: 0,075% (p/v) en medi A.

Dissolució de sacarosa: medi A (sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4)

TAULA VI
ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES ALLIBERADES DELS MICROSOMES
I DE VESÍCULES SINÀPTIQUES

ENZIM	VESÍCULES SINÀPTIQUES	MICROSOMES
ADA	18,6	100
GAH	2,0	100
PNP	1,3	100
5'N	12,6	100
LDH	1,6	100
MDH	1,8	100

Les vesícules sinàptiques i els microsomes, obtinguts segons (4.2.1.) es rentaren dues vegades amb medi A, es tractaren amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i les suspensions se centrifugaren per a separar els organuls. Les activitats enzimàtiques es van determinar en els sobrenedants respectius després dels tractaments amb detergent. Els resultats són comparatius, donant el valor 100 a l'activitat de cada enzim alliberada de la fracció microsomal.

Els residus rentats es van tractar amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A, centrifugant a continuació (vegeu Fig. 8). En els tres sobrenedants d'aquesta centrifugació, que corresponien a vesícules sinàptiques, a membranes sinàptiques i a microsomes, es van determinar les activitats ADA, 5'N, GAH, PNP (vegeu 4.8.1.), LDH (vegeu 4.8.2.1.) i MDH (vegeu 4.8.2.2.). Els valors de velocitats obtinguts es compararen com es mostra a la Taula VII; per a cada enzim el valor corresponent a l'activitat alliberada dels microsomes es prengué com 100.

Tot i que l'activitat 5'N no ha pogut ésser mesurada a causa de l'elevada absorció del diatrizoat tot i haver rentat les partícules tres vegades, sembla que els resultats són anàlegs als obtinguts en l'apartat anterior. De fet, la proporció d'ADA alliberada és més elevada que la dels altres enzims estudiats.

5.1.2. CARACTERITZACIÓ CINÈTICA DE LA 5'N I DE L'ADA EN DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA.

Per a determinar si existeixen analogies entre els enzims 5'N i ADA que es troben en les diverses fraccions subcel·lulars d'escorça de cervell de rata s'ha determinat llurs característiques cinètiques amb AMP (5'N) i adenosina (ADA) com a substrats.

TAULA VII

ACTIVITATS ENZIMÀTIQUES ALLIBERADES
DELS MICROSOMES, DE LES VESÍCULES SINÀPTIQUES
I DE LES MEMBRANES SINÀPTIQUES

ENZIM	VESÍCULES SINÀPTIQUES	MEMBRANES SINÀPTIQUES	MICROSOMES
ADA	4,80	4,80	100
GAH	0,30	1,50	100
LDH	0,15	0,08	100
MDH	0,22	0,33	100
Suspensió en desoxicolat			
ADA	3,40	2,70	100

Les vesícules sinàptiques i les membranes sinàptiques, obtingudes segons (4.2.2.) es van rentar tres vegades; mentre que els microsomes, obtinguts pel mateix mètode es van rentar dues vegades. Els residus es van tractar amb desoxicolat 0,075% (p/v) en medi A i es van centrifugar per a separar de nou els orgànuls. Les activitats enzimàtiques es van determinar en els sobrenedants respectius dels tractaments amb el detergent. Els resultats són comparatius, es dona el valor 100 a l'activitat de cada enzim alliberada de la fracció microsomal. Igualment l'activitat ADA es determinà en les suspensions en desoxicolat, que es va referir també al valor obtingut en microsomes.

El mètode no va ésser prou sensible per a determinar les activitats dels enzims 5'N i FNP degut, probablement, a la presència de traces de diatrizoat.

5.1.2.1. 5'NUCLEOTIDASA

La 5'N és un enzim que pot actuar sobre els quatre nucleotids purinics cel·lulars AMP, GMP, IMP i XMP; si bé l'AMP és el substrat més afí (32). L'enzim no requereix del cation Mg^{2+} per a la seva activitat (32) i per això no s'inclou aquest cation en el tampó per a determinar l'activitat.

5.1.2.1.1. INTERFERÈNCIA DE LES FOSFATASES SOBRE LA 5'N

Les fosfatases catalitzen la ruptura dels enllaços ésters en els que intervé el fosfat. Segons el pH òptim en què actuen es classifiquen en fosfatases àcides o alcalines.

Per tal de comprovar si en les condicions de treball, a pH 7,4, les fosfatases interfereixen en la determinació de l'activitat 5'N, s'efectua el següent experiment:

L'activitat fosfatasa es determinà a pH 7,4 segons es descriu en (4.3.2.3.) utilitzant fosfat de p-nitrofenil com a substrat de la reacció en una concentració de $5 \cdot 10^{-3}$ M. Igualment es determinà l'activitat fosfatasa a pH 7,4 afegint EDTA o AMP en el medi de reacció.

S'ha demostrat que l'EDTA inhibeix la 5'N de cervell de rata (32) i, en cas d'actuar aquest enzim sobre el fosfat de p-nitrofenil, substrat gens preferent, la seva activitat seria molt minsa i es determinaria solament l'activitat fosfatasa, a no ser que la fosfatasa fos també inhibida per

EDTA. Si les fosfatases actuessin sobre l'AMP es veuria una inhibició en afegir AMP en el medi de reacció, i segons es pot observar en la Taula VIII, les fosfatases a pH 7,4 no actuen sobre l'AMP. En la Taula VIII es pot comprovar també que ni l'EDTA ni l'AMP inhibeixen les fosfatases que actuen a pH 7,4; en les condicions assajades.

A causa de l'elevada absorció del fosfat de p-nitrofenil a 265 nm, no és possible mesurar si aquest metabolit inhibeix l'activitat 5'N mesurada segons es descriu en (4.8.1.2.).

TAULA VIII
DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT FOSFATASA

MOSTRA	v 10 ³ (μkat/g teixit)
Control	4,367
EDTA 9,24 10 ⁻⁴ M	4,543
AMP 1,99 10 ⁻⁴ M	4,375
AMP 3,98 10 ⁻⁴ M	4,567

L'activitat fosfatasa de la fracció soluble (vegeu 4.1.) es determinà en tampó tris-HCl 30 mM pH 7,4 amb sacarosa 0,28 M i es comparà amb l'activitat determinada en presència d'EDTA i de dues concentracions diferents d'AMP per a veure si existia inhibició deguda a aquests metabolits. Les velocitats es donen en μkat/g teixit.

5.1.2.1.2. CONSTANTS DE MICHAELIS

La 5'N adapta el seu comportament a la cinètica de Michaelis-Menten en totes les fraccions subcel·lulars estudiades.

Per a determinar els paràmetres cinètics de l'enzim s'obtingueren les diverses fraccions subcel·lulars: fracció soluble, microsomes (vegeu 4.1.), sinaptosomes (vegeu 4.2.2.) i vesícules sinàptiques (vegeu 4.2.1.). Les fraccions particulades (microsomes, sinaptosomes i vesícules sinàptiques) es van rentar dues vegades amb sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 (vegeu 4.3.), i els corresponents residus es van suspendre novament en el mateix medi.

La proporció de 5'N de les fraccions particulades que s'allibera en les condicions de treball es calculà per tal de conèixer si l'enzim resta unit a les membranes en presència dels seus substrats. Per això, es va efectuar una incubació de cada fracció particulada durant 10 min a $30 \pm 0,1$ °C amb AMP $5 \cdot 10^{-5}$ M, essent el contingut en proteïna en les incubacions 0,3 - 2,9 mg/ml. La suspensió s'ultracentrifuga (Ultracentrífuga Beckman L-5-75H, rotor 35 FA) durant 90 min a 105.000xg a 4° C i es determinà l'activitat 5'N en el sobrenedant i en el residu. Paral·lelament es confeccionà un blanc en el qual es va substituir l'AMP per tampó tris-HCl 30 mM, pH 7,4, amb sacarosa 0.28 M. Els resultats es mostren en les Taules IX, X i XI. La quantitat d'enzim alliberada no va arribar en cap cas al 8% i per tant, en els experiments cinètics efectuats a continuació es pot considerar que la 5'N actua lligada a les

membranes de les vesícules particulades en una proporció més elevada del 92%.

El càlcul de la K_m s'efectuà treballant dins d'un marge de concentracions d'AMP de $1 \cdot 10^{-5}$ M a $5 \cdot 10^{-5}$ M en medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4.

TAULA IX
ALLIBERAMENT DE LA 5'N MICROSOMAL
EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'AMP	$5 \cdot 10^{-5}$ M	0 M
Activitat 5'N del residu 10^4 M	7,054-7,054	7,208
Activitat 5'N del sobrenedant 10^4 M	0,470-0,176	0,470
% 5'N RETINGUDA	95,6%	93,9%

La quantitat de 5'N retinguda pels microsomes després d'incubar-los amb AMP $5 \cdot 10^{-5}$ M durant 10 min a $30 \pm 0,1^\circ$ C es calculà determinant l'activitat en els sobrenedants i residus de centrifugar a $105.000 \times g$ 90 min. Aquestes activitats venen donades en $\mu\text{kat/g}$ teixit, i a partir d'elles es determinà el percentatge retingut de 5'N en els microsomes. El contingut de proteïna en la mescla d'incubació fou de 2,94 mg/ml.

TAULA X
 ALLIBERAMENT DE LA 5'N SINAPTOSOMAL
 EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'AMP	5 10 ⁻⁵ M	0 M
Activitat 5'N del residu 10 ⁴ M	1,405-1,500	1,557
Activitat 5'N del sobrenedant 10 ⁴ M	0,026-0,020	0,023
% 5'N RETINGUDA	97,2%	97,4%

La quantitat de 5'N retinguda es determinà de manera anàloga al cas dels microsomes (vegeu peu Taula IX). Les velocitats inicials dels residus i sobrenedants es donen en $\mu\text{kat/g}$ teixit, calculant a partir d'aquestes dades la proporció retinguda de 5'N en els residus sinaptosomals. El contingut de proteïna en la mescla d'incubació fou de 1,71 mg/ml.

TAULA XI
 ALLIBERAMENT DE LA 5'N DE VESÍCULES SINÀPTIQUES
 EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'AMP	5 10 ⁻⁵ M	0 M
Activitat 5'N del residu 10 ⁴ M	1,640-1,614	1,481
Activitat 5'N del sobrenedant 10 ⁴ M	0,148-0,143	0,081
% 5'N RETINGUDA	91,8%	94,8%

La quantitat de 5'N retinguda es calculà com altres vegades (vegeu peus Taules IX i X). Les activitats 5'N dels residus i dels sobrenedants es donen en $\mu\text{kat/g}$ teixit i el càlcul de la proporció de 5'N retinguda en les vesícules sinàptiques s'efectuà a partir de les dades d'activitats. La proteïna en la mescla d'incubació va ésser de 0,22 mg/ml.

A partir de les velocitats inicials de reacció, obtingudes després d'efectuar una mitjana de cinc experiments amb cada concentració, es realitzà la representació d'Eadie-Hoftee (Figs. 9, 10, 11, 12) i es calcularen els paràmetres cinètics tal com es descriu en (4.9.) amb l'obtenció dels resultats que apareixen en la Taula XII. El contingut de proteïna en la cubeta de l'espectrofotòmetre varià entre 0,6 i 0,29 mg/ml. Els resultats indiquen que l'afinitat de la 5'N vers l'AMP és similar en totes les fraccions assajades.

TAULA XII
PARAMETRES CINÈTICS DE LA 5'N EN DIVERSES
FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA

FRACCIÓ	$K_m \cdot 10^5 \text{ M}$	$V \cdot 10^3 \text{ (}\mu\text{kat/g teixit)}$
FRACCIÓ SOLUBLE	1,42 +/- 0,07	1,17 +/- 0,04
MICROSOMES	1,44 +/- 0,06	0,94 +/- 0,03
SINAPTOSOMES	1,5 +/- 0,2	0,55 +/- 0,03
VESÍCULES SINÀPTIQUES	1,63 +/- 0,03	0,32 +/- 0,04

Les concentracions d'AMP van variar entre $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ i $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, en sacarosa $0,28 \text{ M}$ tris-HCl 30 mM pH 7,4.

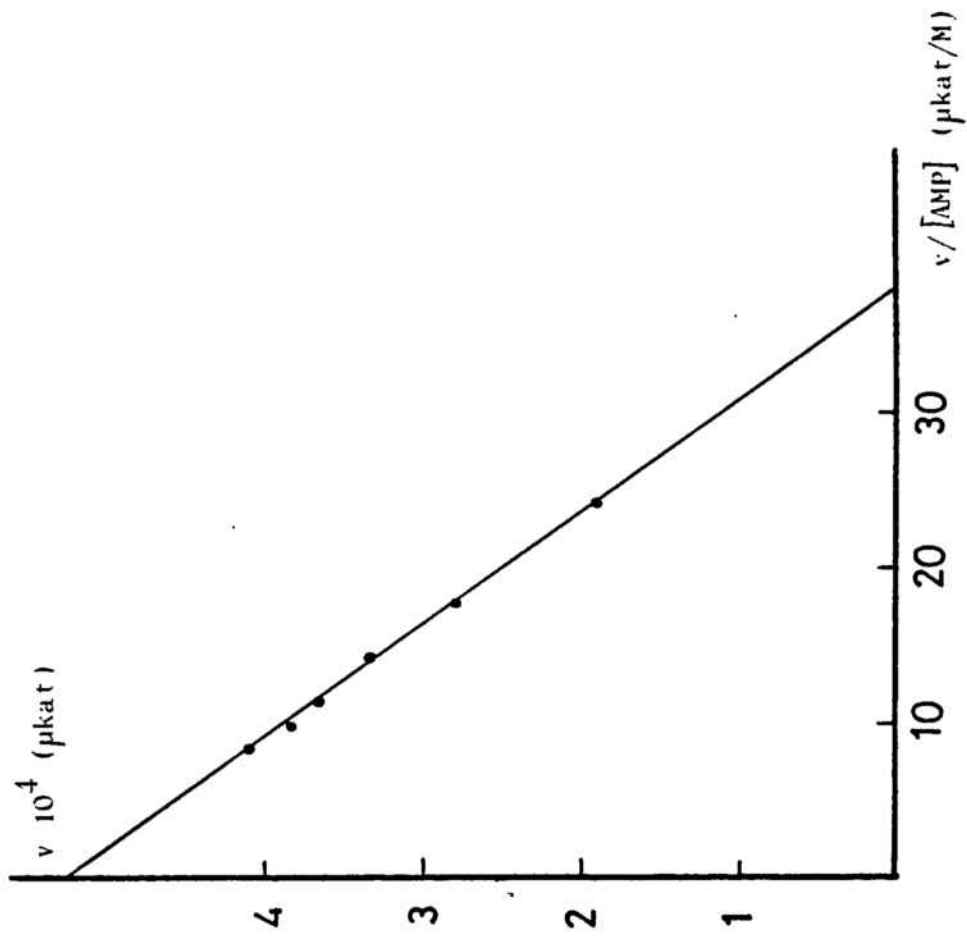


FIGURA 9 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m DE 5'N EN FRACCIO SOLUBLE.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,13 mg/ml, a la temperatura de 30 +/- 0,1°C i al pH de 7,4 proporcionat pel tampó tris-HCl 30 mM amb sacarosa 0,28 M.

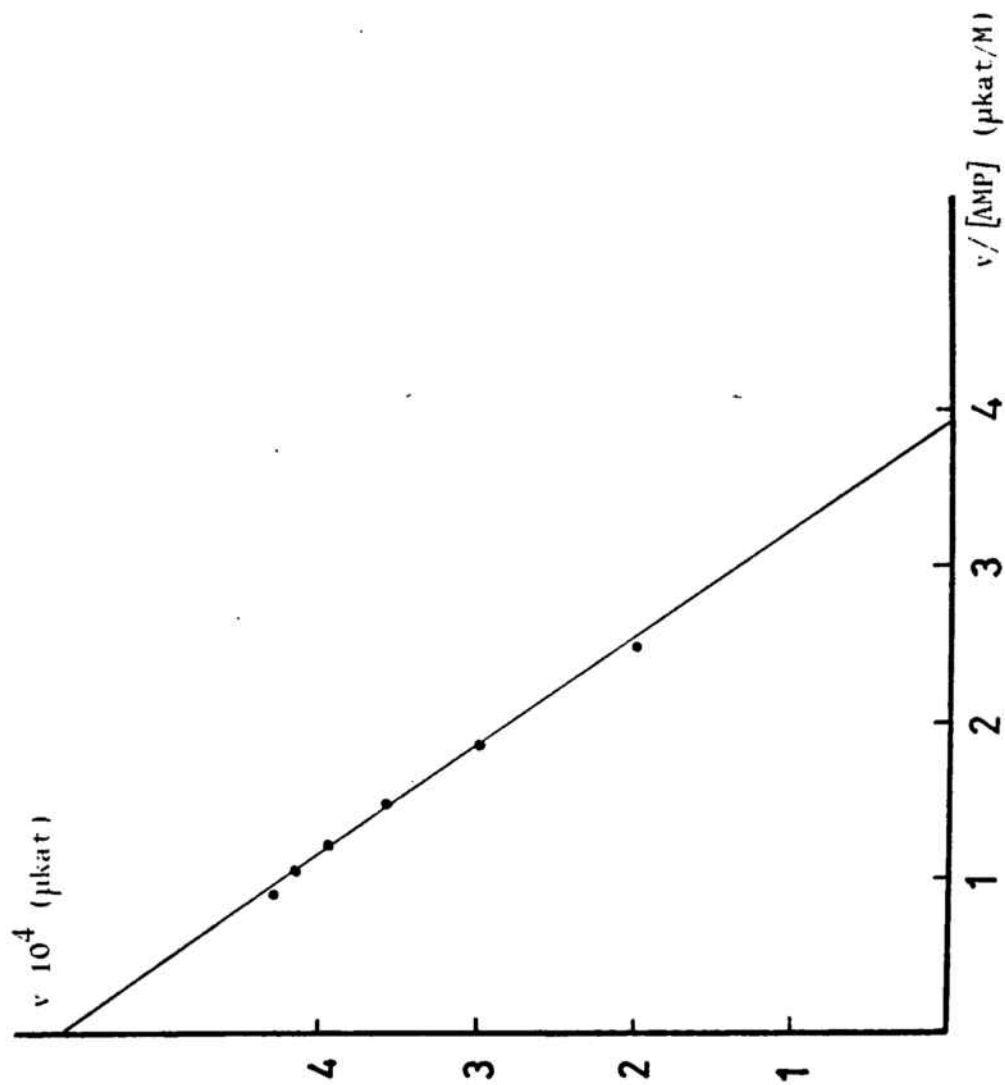


FIGURA 10 .- REPRESENTACIÓ D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m DE 5'N EN MICROSOMES.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,29 mg/ml, a la temperatura de 30 +/- 0,1º C i al pH de 7,4 amb tampó tris-HCl 30 mM i sacarosa 0,28 M.

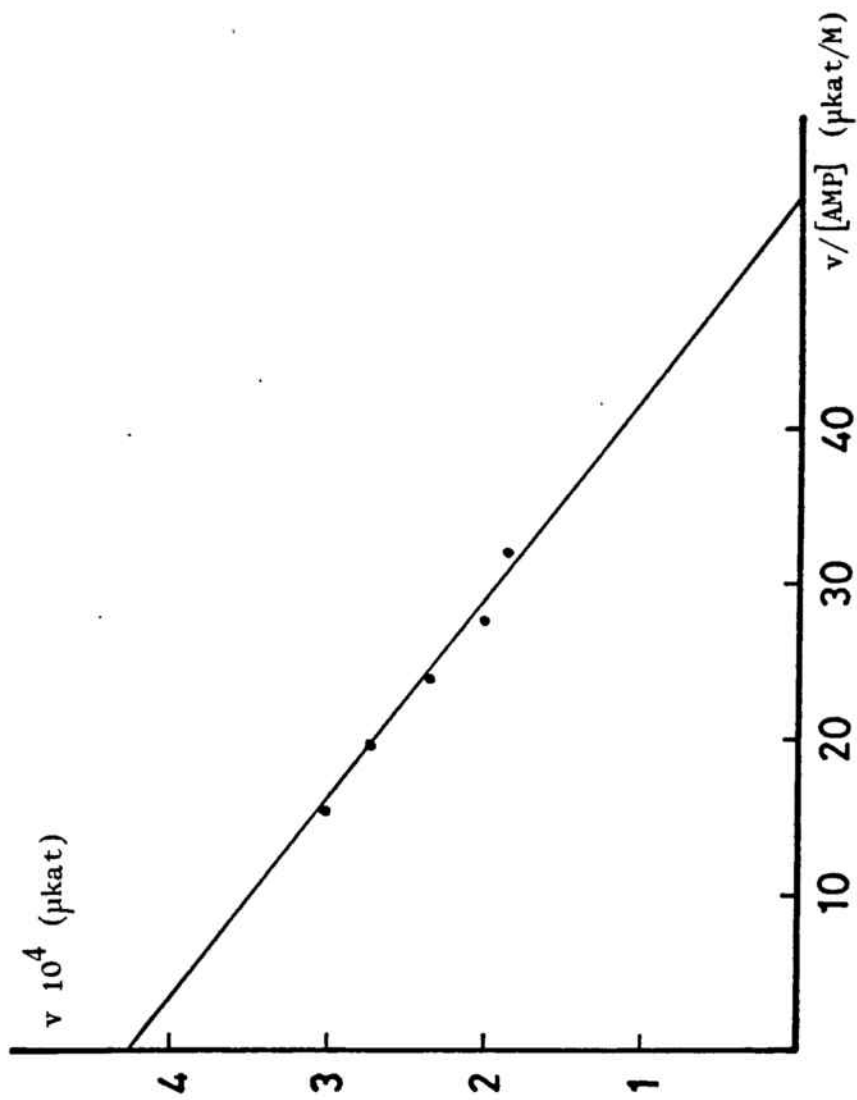


FIGURA 11.- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m DE 5'N EN SINAPTOSOMES.

Les determinacions s'efectuaren a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,16 mg/mL, a la temperatura de 30 +/- 0,1 °C i al pH de 7,4 degut al medi A.

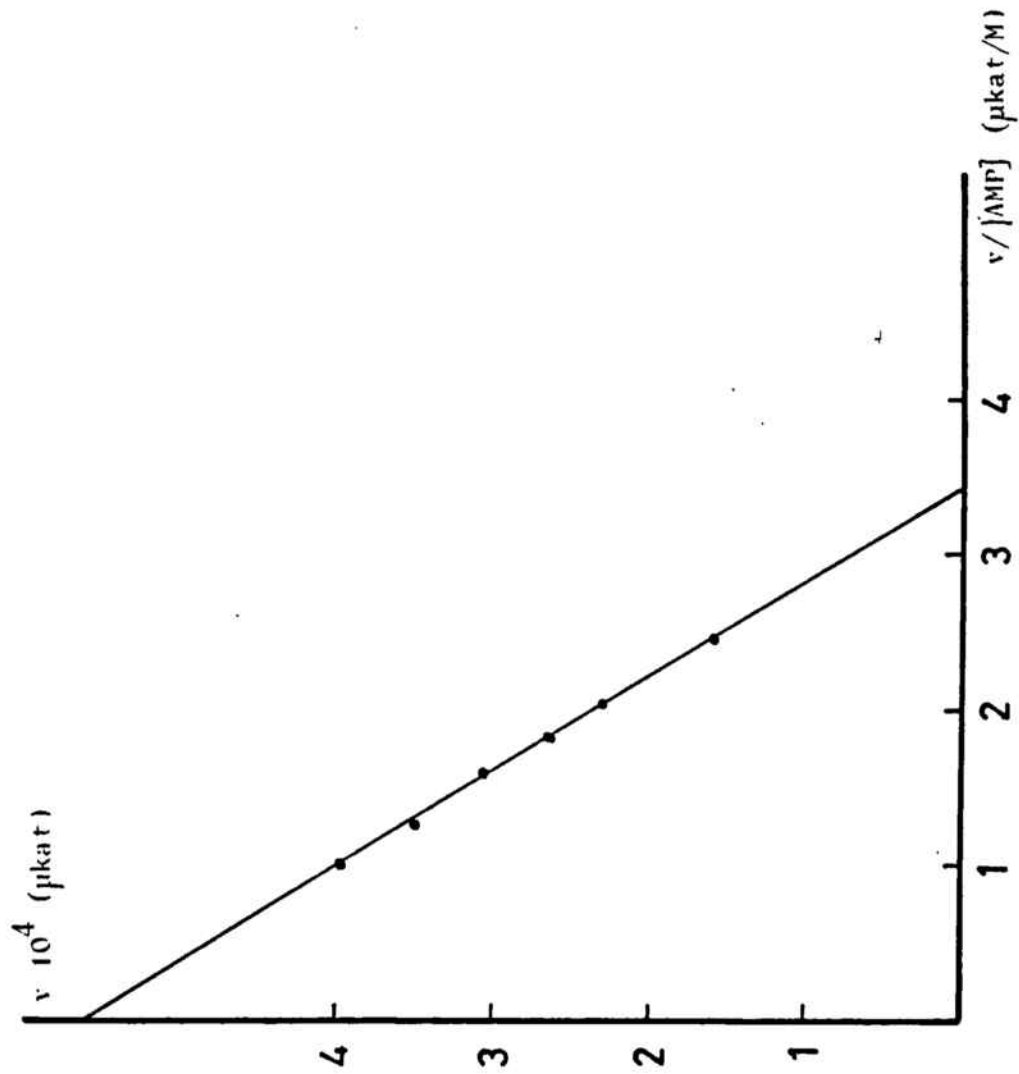


FIGURA 12 .- REPRESENTACIÓ D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m DE 5'N EN VESÍCULES SINÀPTIQUES.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,06 mg/ml, a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ C$ i al pH degut al medi A.

5.1.2.1.3. CONSTANTS D'INHIBICIÓ PER ADP

Per tal d'esbrinar si l'ADP és un substrat de la 5'N s'efectuà un control d'activitat a 265 nm tal com s'indica en (4.8.1.2.) substituint l'AMP per ADP. Dins del marge de concentracions d'ADP fins a $3 \cdot 10^{-6}$ M no s'observà activitat 5'N sobre aquest metabolit.

En totes les fraccions subcel·lulars assajades s'ha demostrat que l'ADP inhibeix de forma competitiva a la 5'N respecte a l'AMP. Aquesta inhibició s'estudià utilitzant un marge de concentracions d'ADP fins a $3 \cdot 10^{-6}$ M i un interval de concentracions d'AMP de $1 \cdot 10^{-5}$ a $6 \cdot 10^{-5}$ M en un medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4.

Els preparats enzimàtics utilitzats s'obtingueren segons (4.1.) (fracció soluble i microsomes), (4.2.2.) (sinaptosomes) i (4.2.1.) (vesícules sinàptiques). Les fraccions particulades es van rentar dues vegades segons es descriu a l'apartat (4.3.) i es van redissoldre en el mateix medi.

Es va realitzar la representació d'Eadie-Hoftee (Figs. 13, 14, 15, 16) i es van calcular els paràmetres cinètics tal com es descriu en (4.9.) amb l'obtenció dels resultats que s'indiquen en la Taula XIII. El contingut de proteïna en la cubeta de l'espectrofotòmetre varià entre 0,2 i 0,8 mg/ml, segons la fracció subcel·lular. De la mateixa manera, els resultats indiquen que la constant d'inhibició de l'ADP es similar en totes les fraccions estudiades.

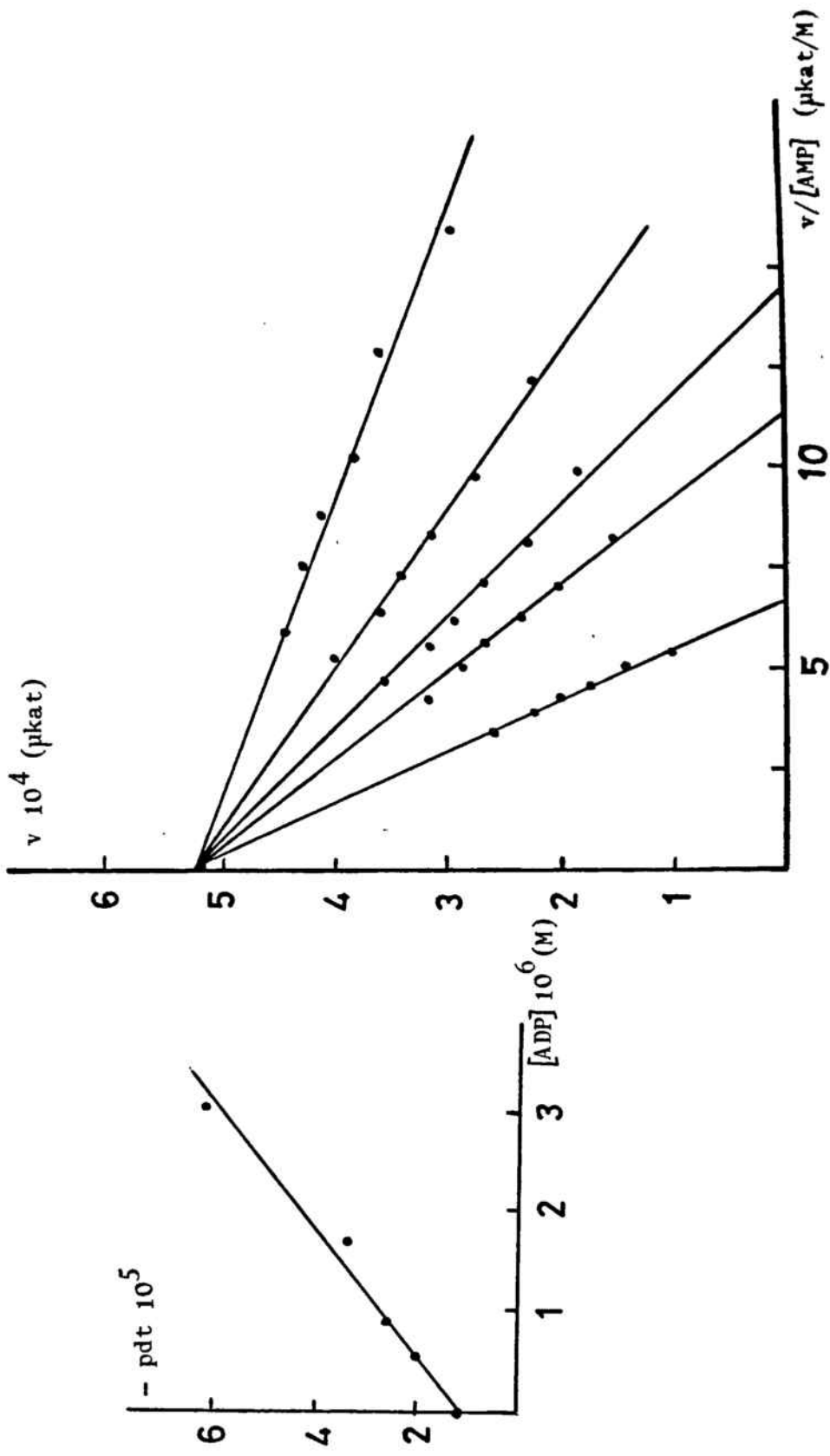


FIGURA 13 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE 5'N DE FRACCIO SOLUBLE PER ADP. Les condicions van ser les mateixes que a la Figura 9. La concentració d'ADP augmenta en el gràfic de dalt a baix: 0 M; 0,57 μM ; 0,95 μM ; 1,71 μM ; 3,04 μM .

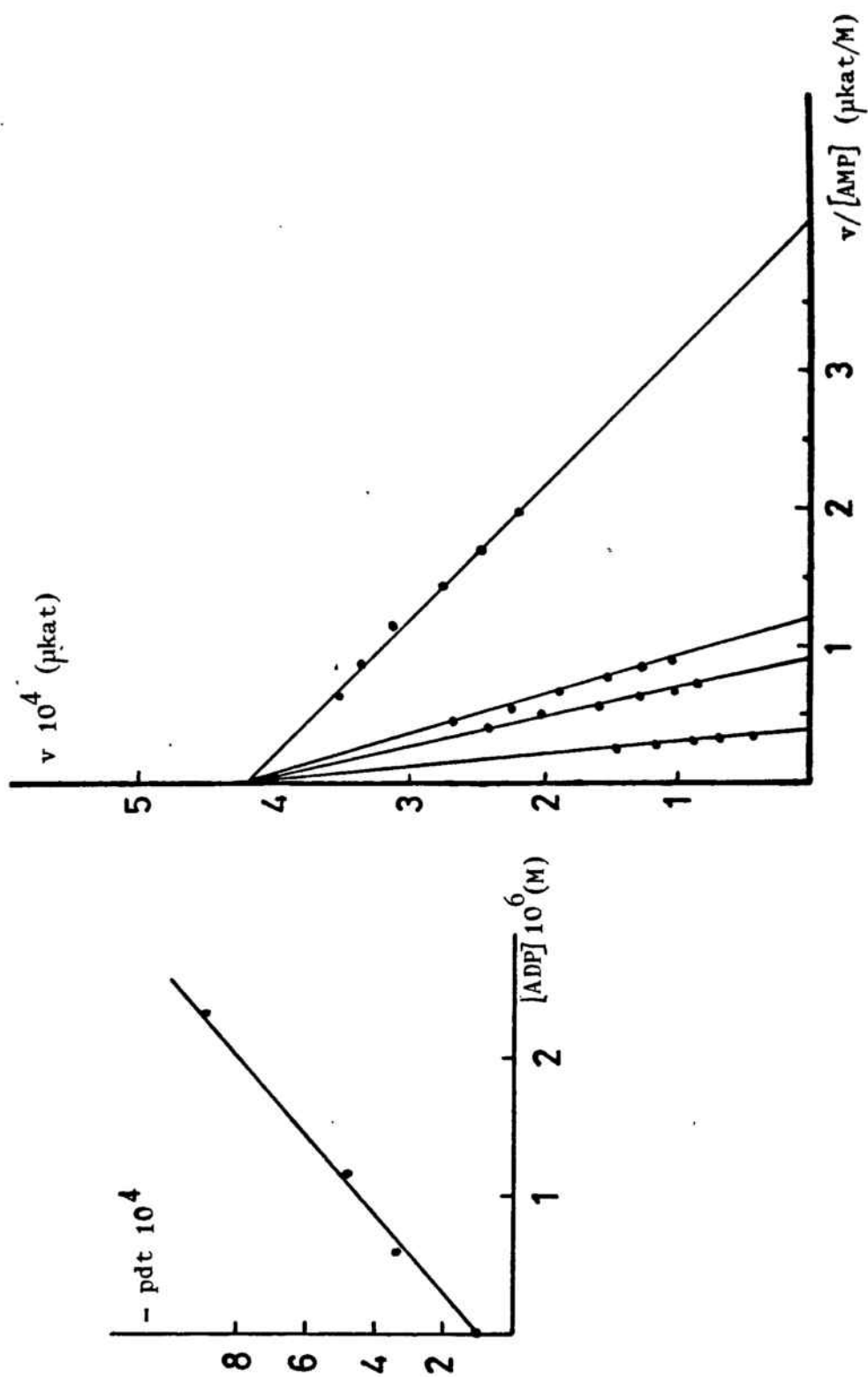


FIGURA 14 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE 5'N DE MICROSOSES PER ADP.

Les condicions van ser les mateixes que a la Figura 10. La concentració d'ADP augmenta de dalt a baix: 0 M; 0,58 μM ; 1,16 μM ; 2,31 μM .

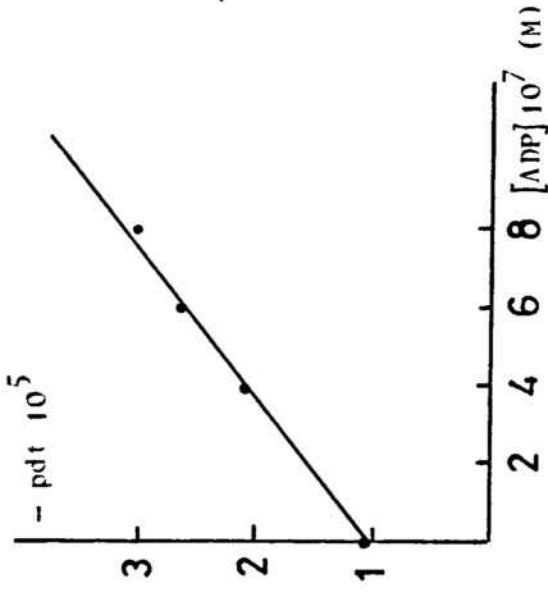
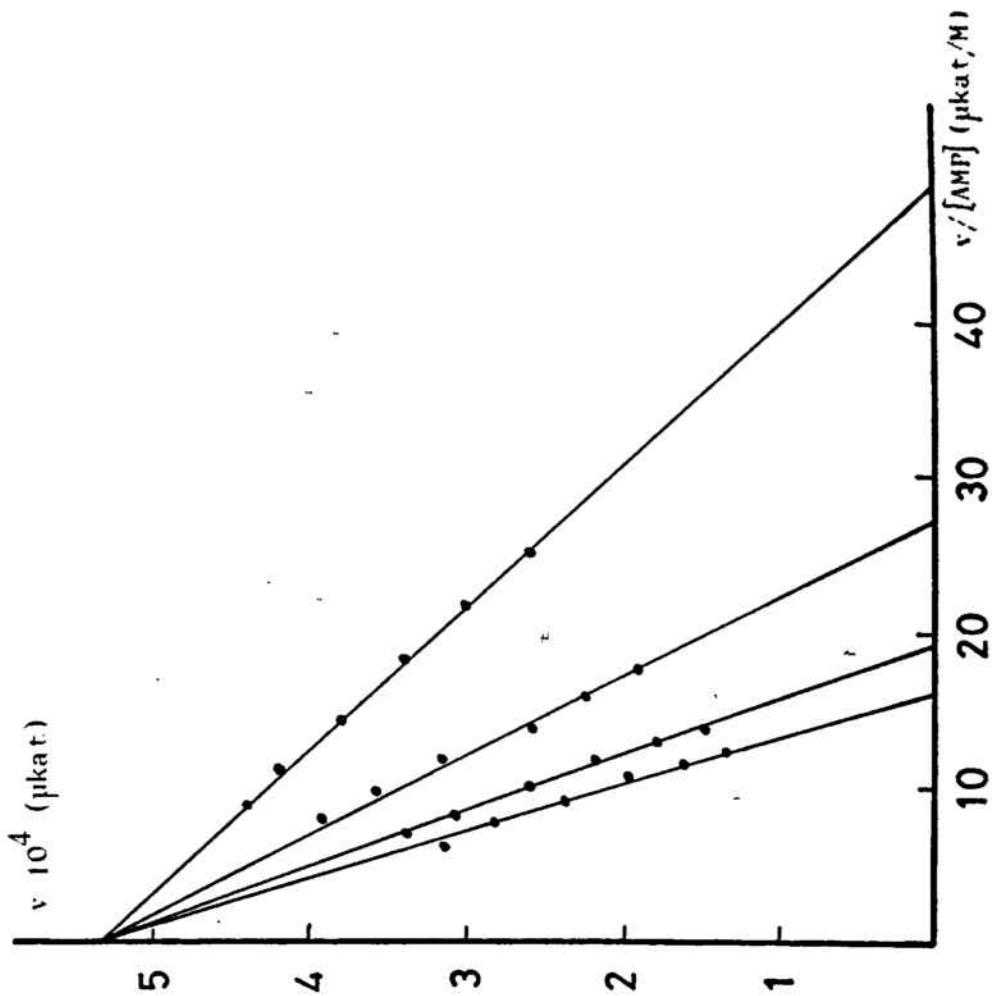


FIGURA 15 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE 5 'N DE SINAPTOSOMES PER ADP. Les condicions van ser les mateixes que a la Figura 11. La concentració d'ADP augmenta de dalt a baix: 0 M; 0,40 μM ; 0,60 μM ; 0,80 μM .

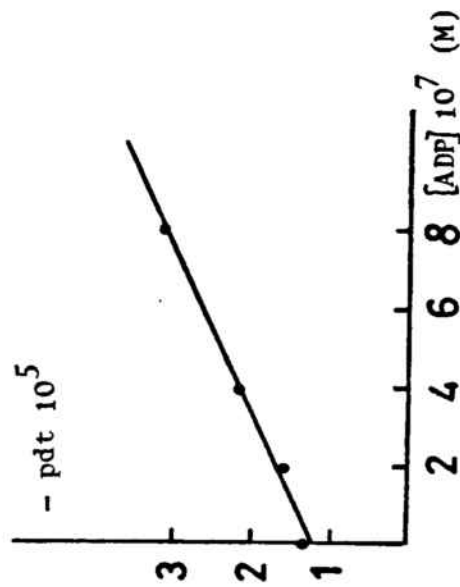
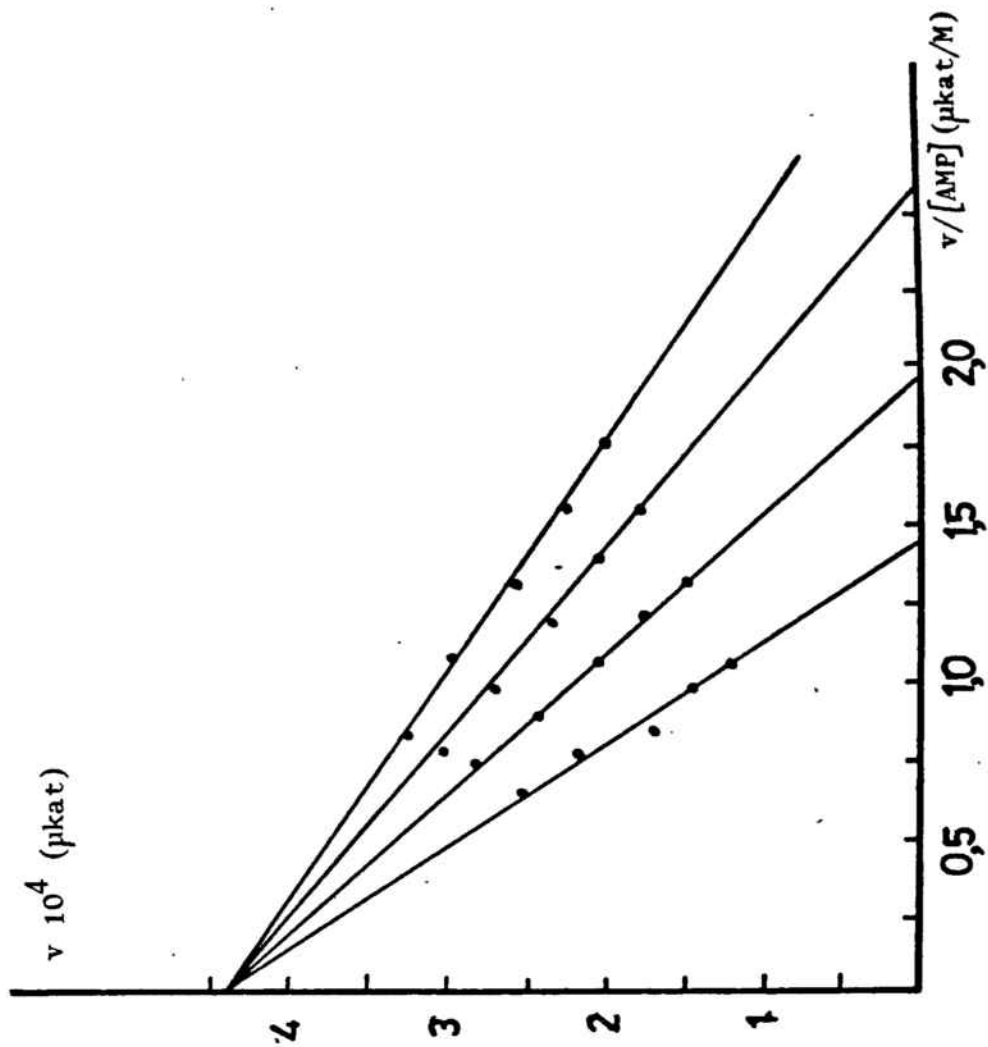


FIGURA 16 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE 5'N DE VESICULES SINAPTICUES PER ADP.

Les concentracions van ser les mateixes que a la Figura 12. La concentració d'ADP augmenta en el gràfic de dalt a baix: 0 M; 0,2 μM ; 0,4 μM ; 0,8 μM .

TAULA XIII

CONSTANTS D'INHIBICIÓ PER ADP DE LA 5'N EN DIVERSES
FRACCIIONS SOLUBLES DE CERVELL DE RATA

FRACCIÓ	$K_i \cdot 10^7 \text{ M}$	$K_m \cdot 10^5 \text{ M}$
FRACCIÓ SOLUBLE	3,7 +/- 0,2	1,03 +/- 0,07
MICROSOMES	6,0 +/- 0,7	1,6 +/- 0,2
SINAPTOSOMES	3,9 +/- 0,3	1,05 +/- 0,08
VESÍCULES SINÀPTIQUES	6,6 +/- 0,2	1,35 +/- 0,05

Les concentracions d'AMP van variar entre $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ i $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ en sacarosa $0,28 \text{ M}$ tris-HCl 30 mM pH 7,4. Les concentracions d'ADP assajades variaren fins a una concentració de $3 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

5.1.2.2. ADENOSINA DESAMINASA

5.1.2.2.1. CONSTANTS DE MICHAELIS

Per a calcular els paràmetres cinètics de l'ADA de fracció soluble, microsomes, sinaptosomes i vesícules sinàptiques, es van obtenir aquestes fraccions subcel·lulars segons (4.1. i 4.2.) i les fraccions particulades es van rentar dues vegades segons (4.3.). En totes les fraccions subcel·lulars estudiades s'observà que l'enzim segueix un comportament Michaelià.

Per a conèixer la proporció d'ADA de les fraccions particulades que s'allibera en les condicions de treball, s'incubaren els microsomes, sinaptosomes o vesícules sinàptiques durant 10 min a $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$ amb adenosina, essent el contingut de proteïna en el medi d'incubació entre 0,2 i 2,1 mg/ml segons la fracció particulada. L'incubat s'ultracentrifugà a continuació a $105.000 \times g$ durant 90 min a 4°C (Ultracentrifuga Beckman L-5-75H, rotor 35 FA) i l'activitat ADA es determinà en el sobrenedant i en el residu. Paral·lelament s'efectuà un blanc en el que l'adenosina es va substituir per tampó tris-HCl 30 mM pH 7,4 amb sacarosa 0,28 M. Els resultats obtinguts s'indiquen en les Taules XIV, XV i XVI.

En una proporció relativament elevada (69-77%) l'ADA queda retinguda en les membranes i actua en gran part lligada a aquestes membranes en els assaigs cinètics descrits.

El marge de concentracions d'adenosina utilitzat en la determinació dels paràmetres cinètics va ésser de $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ a $9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$. Les velocitats inicials de reacció es van determinar tal com s'indica en l'apartat (4.8.1.1.) i a partir de les dades obtingudes s'efectuà la representació d'Eadie-Hoftee (Figs. 17, 18, 19, 20).

Els paràmetres cinètics s'avaluaren segons (4.9.) i es van obtenir els valors que es mostren en la Taula XVII. La quantitat de proteïna en cubeta va ésser de 0,1 - 1,6 mg/ml segons la fracció particulada utilitzada. Els resultats indiquen que l'afinitat de l'ADA vers l'adenosina es similar en totes les fraccions assajades.

TAULA XIV

ALLIBERAMENT DE L'ADA MICROSOMAL
EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'ADENOSINA	5 10^{-5} M	0 M
Activitat ADA del residu 10^3 M	3,282-2,646	2,272
Activitat ADA del sobrenedant 10^3 M	1,212-1,278	1,022
% ADA RETINGUDA	70,2%	69,0%

Es calculà l'ADA retinguda després de tractar els microsomes durant 10 min a $30 \pm 0,1^\circ$ C amb adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M. Es centrifugà a $105.000 \times g$ durant 90 min per a separar el residu i el sobrenedant i es determinaren les respectives activitats ADA. Amb aquestes activitats, donades en $\mu\text{kat/g}$ teixit, es determinà la proporció d'ADA retinguda en els microsomes. La proteïna de la mescla de reacció va ésser de 2,07 mg/ml.

TAULA XV

ALLIBERAMENT DE L'ADA SINAPTOSOMAL
EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'ADENOSINA	5 10^{-5} M	0 M
Activitat ADA del residu 10^4 M	4,232-4,172	4,743
Activitat ADA del sobrenedant 10^4 M	1,513-1,485	1,917
% ADA RETINGUDA	73,7%	71,2%

La quantitat d'ADA retinguda es determinà de manera anàloga al cas dels microsomes (vegeu peu Taula XIV). Les velocitats inicials d'ADA en els residus i sobrenedants es donen en $\mu\text{kat/g}$ teixit, calculant a partir d'aquestes dades la proporció retinguda en els residus sinaptosomals. El contingut de proteïna en la mescla d'incubació fou de 1,71 mg/ml.

TAULA XVI

ALLIBERAMENT DE L'ADA DE VESÍCULES SINÀPTIQUES
EN LES CONDICIONS DE TREBALL

CONCENTRACIÓ D'ADENOSINA	5 10 ⁻⁵ M	0 M
Activitat ADA del residu 10 ⁴ M	1,031-1,225	1,128
Activitat ADA del sobrenedant 10 ⁴ M	0,318-0,487	0,338
% ADA RETINGUDA	74,0%	76,9%

La quantitat d'ADA retinguda es determinà de manera anàloga al cas dels microsomes (vegeu peus Taules XIV i XV). Les activitats de residus i sobrenedants, donades en $\mu\text{kat/g}$ teixit, permeten calcular la proporció d'ADA retinguda en les vesícules sinàptiques. El contingut de proteïna en la mescla d'incubació fou de 0,22 mg/ml.

TAULA XVII

PARÀMETRES CINÈTICS DE L'ADA EN DIVERSES
FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA

FRACCIÓ	K _m 10 ⁵ M	V 10 ³ ($\mu\text{kat/g}$ teixit)
FRACCIÓ SOLUBLE	3,8 +/- 0,2	3,1 +/- 0,9
MICROSOMES	2,9 +/- 0,4	0,25 +/- 0,04
SINAPTOSOMES	3,8 +/- 0,4	0,32 +/- 0,02
VESÍCULES SINÀPTIQUES	2,7 +/- 0,2	0,18 +/- 0,03

Les concentracions d'adenosina van variar entre 1 10⁻⁵ M i 5 10⁻⁵ M, en sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4.

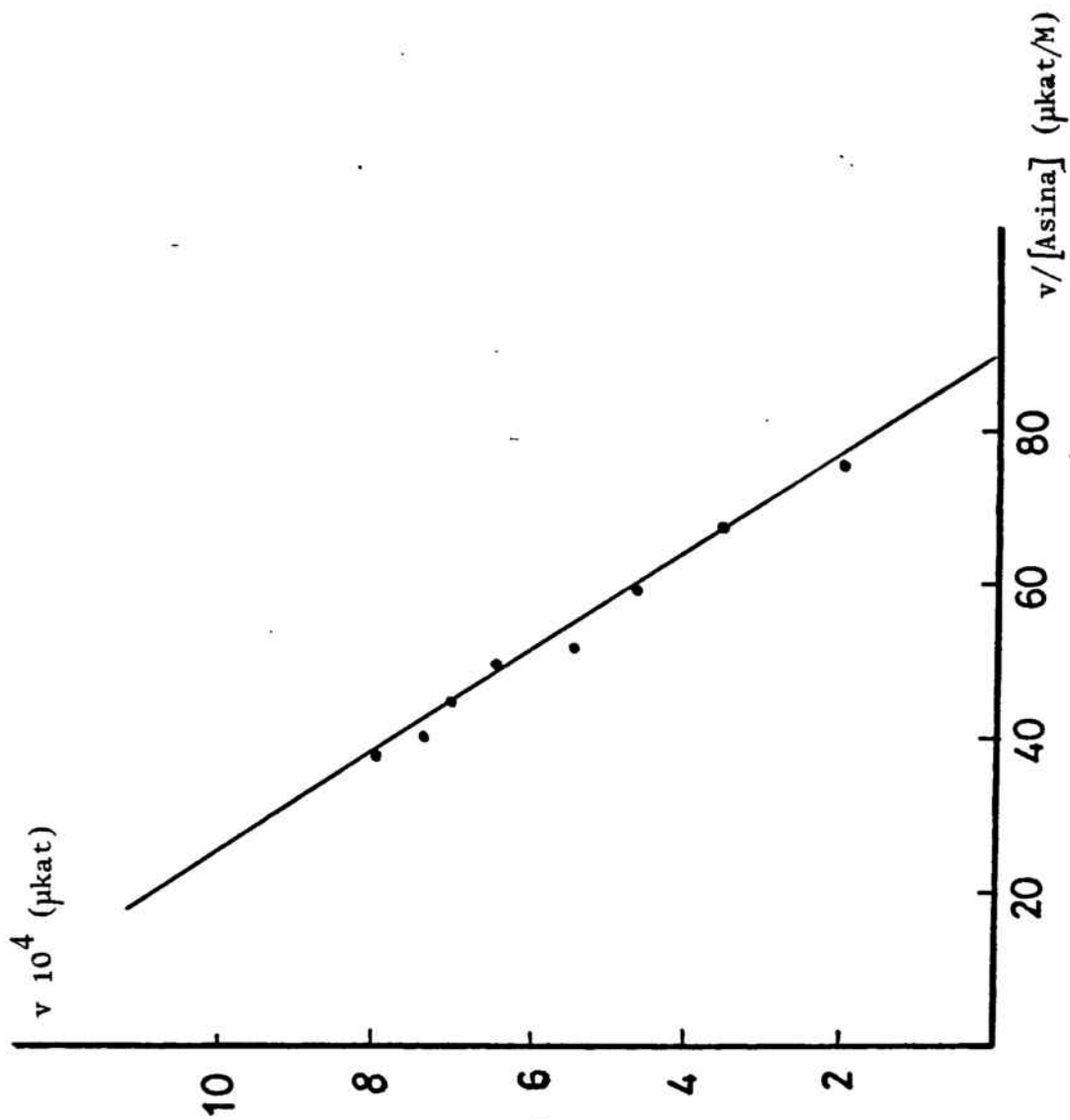


FIGURA 17 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m D'ADA EN FRACCIO SOLUBLE.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,12 mg/ml, a la temperatura de $30 \pm 0,1$ °C i al pH de 7,4 amb tampó tris-HCl 30 mM i sacarosa 0,28 M.

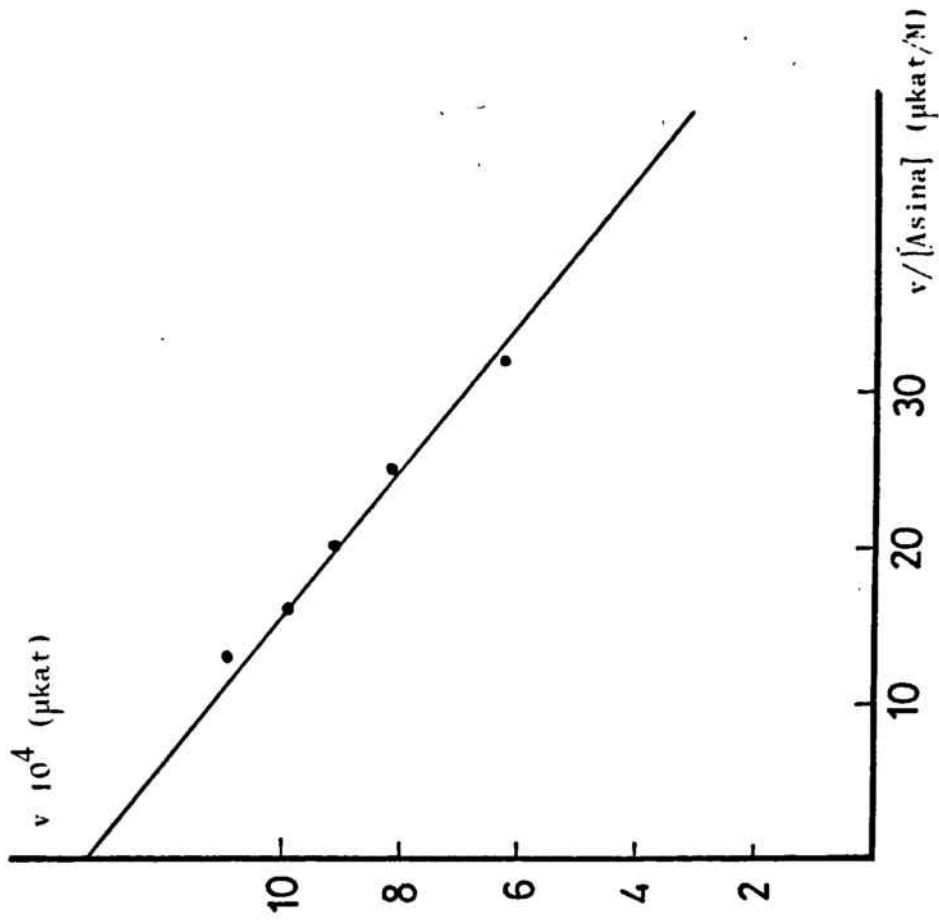


FIGURA 18 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m EN MICROSOMES.

Les mesures de velocitats inicials s'han efectuat a 265 nm, utilitzant cubetes de 10 mm de pas de llum, a la temperatura de $30 \pm 0,1^\circ C$ i al pH de 7,4 proporcionat pel medi A. La concentració de protefina en cubeta fou de 1,60 mg/ml.

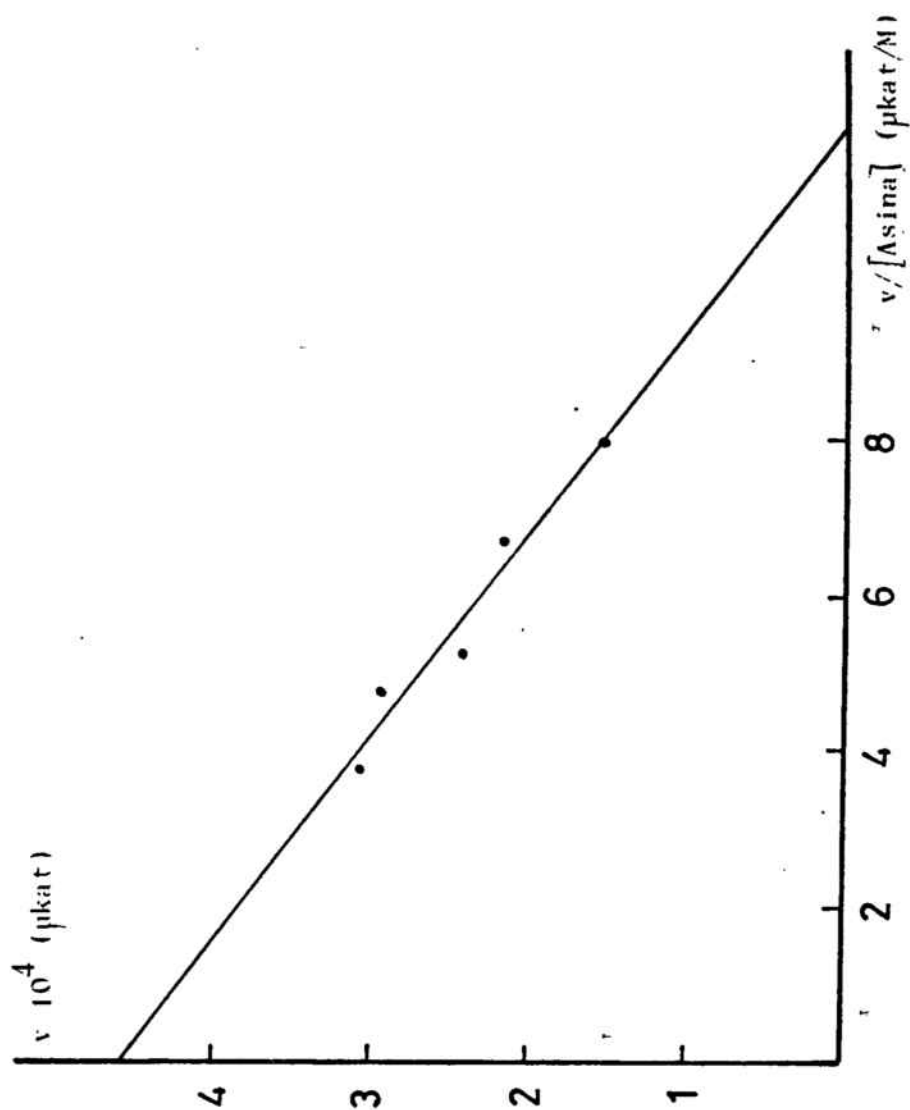


FIGURA 19 .- REPRESENTACIÓ D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m D'ADA EN SINAPTOSOMES.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,15 mg/ml, a la temperatura de 30 +/- 0,1º C i al pH de 7,4 proporcionat pel medi A.

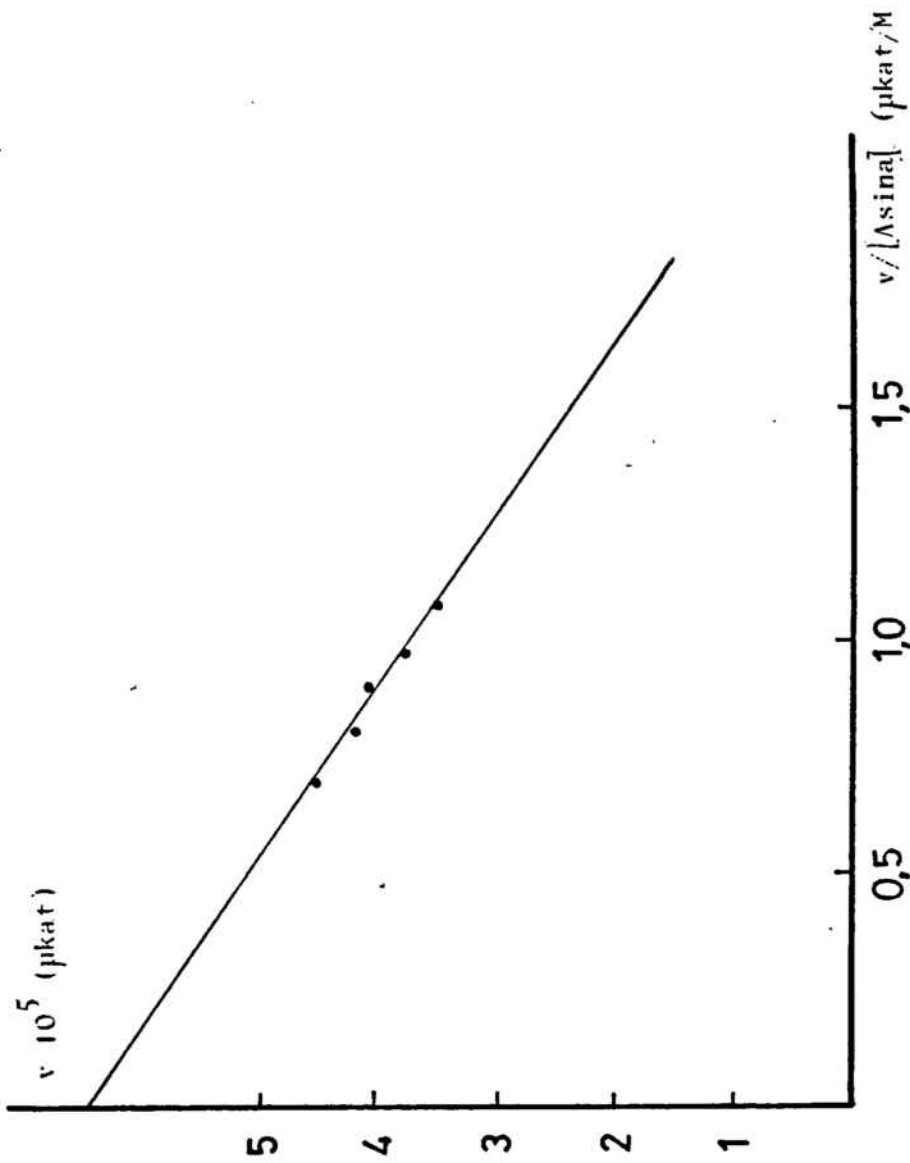


FIGURA 20 .- REPRESENTACIÓ D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m D'ADA EN VESÍCULES SINÀPTIQUES.

Les determinacions s'han efectuat a la longitud d'ona de 265 nm, amb cubetes de 10 mm de pas de llum i una concentració de proteïna de 0,06 mg/ml, a la temperatura de 30 +/- 0,1° C i al pH de 7,4 amb també tris-HCl 30 mM i sacarosa 0,28 M.

5.1.2.2.2. INHIBICIÓ PER ADP

Per tal d'observar que l'ADP no és substrat de l'ADA, s'efectuà un control d'activitat a 265 nm tal com s'indica en (4.8.1.1.) substituint l'adenosina per ADP. Dins del marge de concentracions estudiades, fins a $3,5 \cdot 10^{-5}$ M d'ADP, no s'observà activitat ADA sobre aquest metabolit.

Quant a la inhibició per ADP, no s'ha observat cap tipus de inhibició en fracció soluble ni en microsomes en el marge de concentracions d'ADP estudiat.

5.1.3. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N I DE L'ADA EN DIVERSES FRACCIONS SUBCEL·LULARS DE CERVELL DE RATA

El diferent comportament de la 5'N i de l'ADA respecte a altres enzims suggereix que aquests dos enzims es localitzen en les membranes cel·lulars, mentre que els altres són enzims de la fracció soluble. Si bé la 5'N és constituent de la membrana, sembla que l'ADA s'allibera més fàcilment de les membranes (vegeu 5.1.2.1.2. i 5.1.2.2.1.) i podria tractar-se d'una proteïna perifèrica. En els següents experiments es descriuen diverses tècniques citoquímiques per a la localització de 5'N i d'ADA en diverses fraccions subcel·lulars.

5.1.3.1. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N A MICROSOMES

Els microsomes obtinguts segons (4.1.) es van tractar segons es descriu en l'apartat (4.7.6.) amb el medi histoquímic descrit per Kreutzberg et al. (53) que contenia també tris-maleat 50 mM pH 7,0, AMP 1 mM, $Pb(NO_3)_2$ 2 mM, $Mn(NO_3)_2$ 50 mM i sacarosa 0,25 M. Una altra fracció de microsomes es va tractar amb el medi histoquímic sense AMP o amb ADP $1 \cdot 10^{-5}$ M.

En les Fig. 21 i 22 es pot veure el precipitat degut al P_4 que allibera la 5'N microsomal en reaccionar amb l'AMP. Els microsomes no tractats amb AMP o els tractats amb el inhibidor de la 5'N no presenten el precipitat de fosfat de plom (Fig. 23).

En tots els casos, la 5'N es troba prop de les membranes dels microsomes.

5.1.3.2. LOCALITZACIÓ DE LA 5'N A SINAPTOSOMES

Els sinaptosomes es van obtenir segons es descriu en (4.2.1.), es van tractar segons (4.7.6.) amb el medi histoquímic descrit per Kreutzberg et al. (53) i s'observà al microscopi electrònic.

Les Figs. 24, 25 i 26 mostren els sinaptosomes que presenten un precipitat de fosfat de plom, degut a la presència de 5'N, a les membranes sinaptosomals. Altres sinaptosomes tractats amb el medi histoquímic no presentaven l'esmentat precipitat. Aquest precipitat no s'observa tampoc

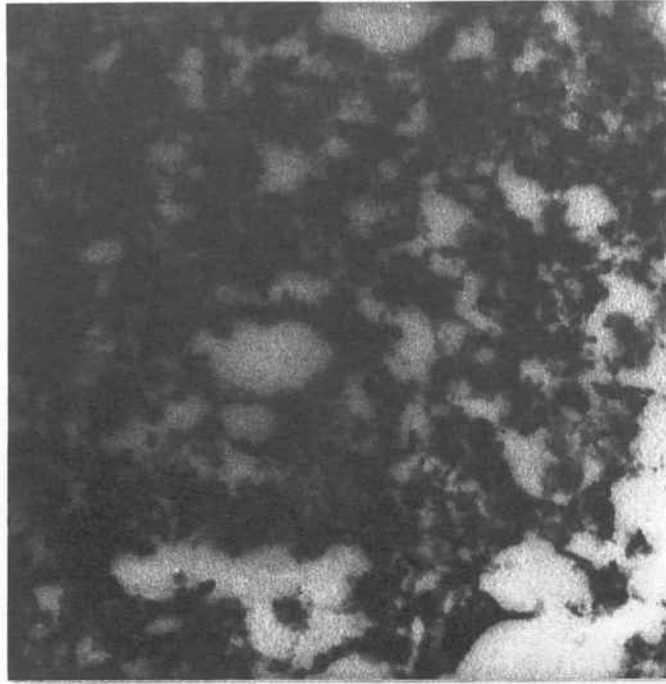


FIGURA 21.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS MICROSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE KREUTZBERG ET AL. (53)
54.000 X

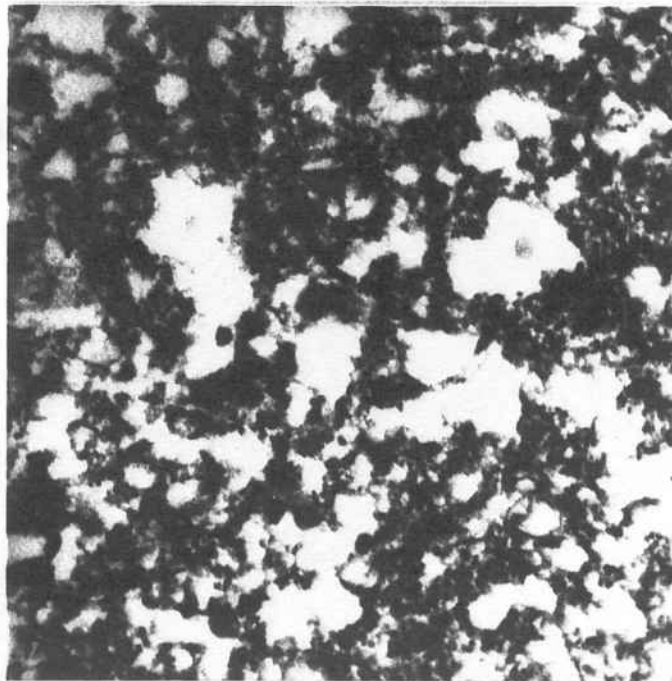


FIGURA 22.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS MICROSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE KREUTZBERG ET AL. (53)
54.000 X

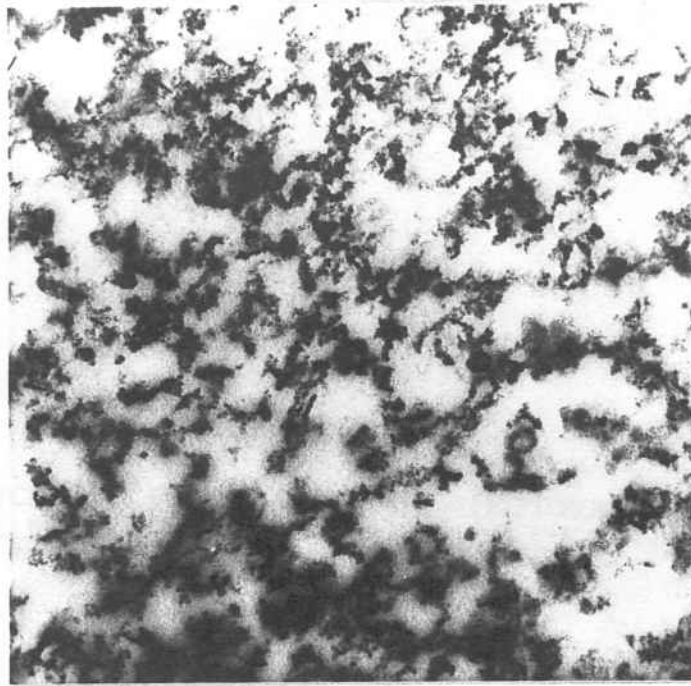


FIGURA 23.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS MICROSOMES NO TRACTATS

54.000 X

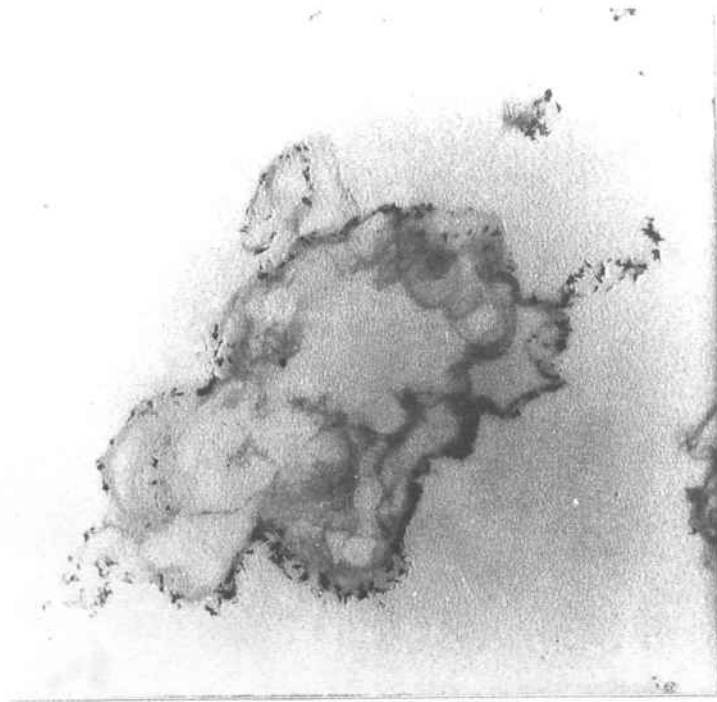


FIGURA 24.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE KREUTZBERG ET AL. (53)
23.500 X

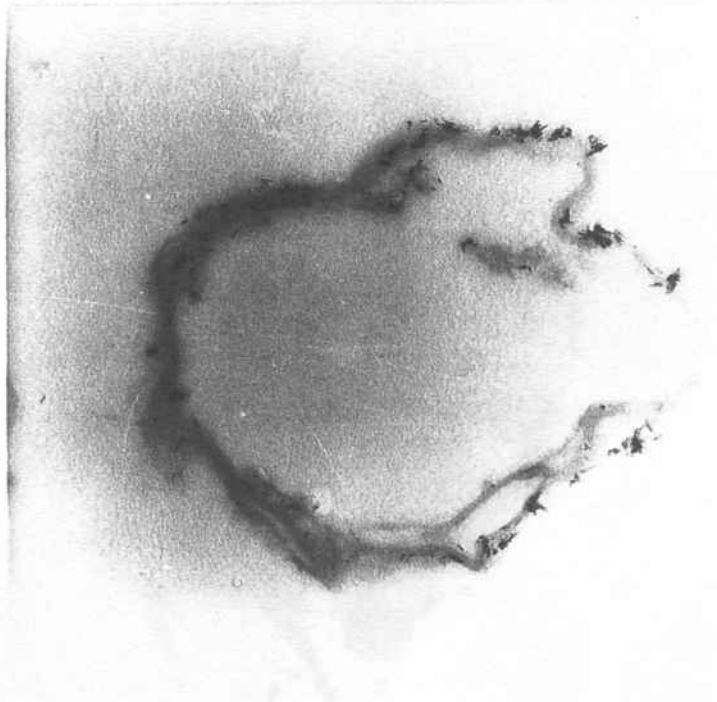


FIGURA 25.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE KREUTZBERG ET AL. (53)
39.000 X

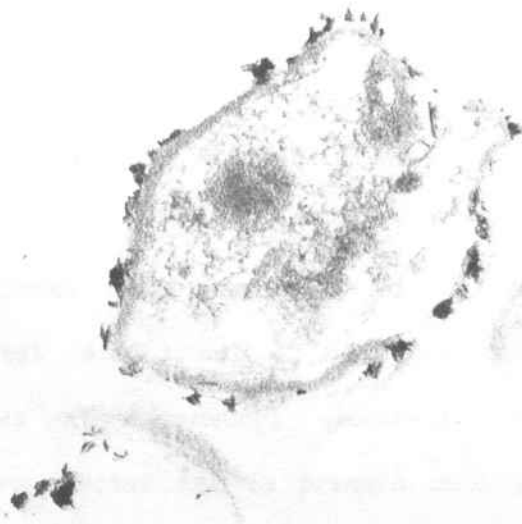


FIGURA 26.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE KREUTZBERG ET AL. (53)
50.000 X

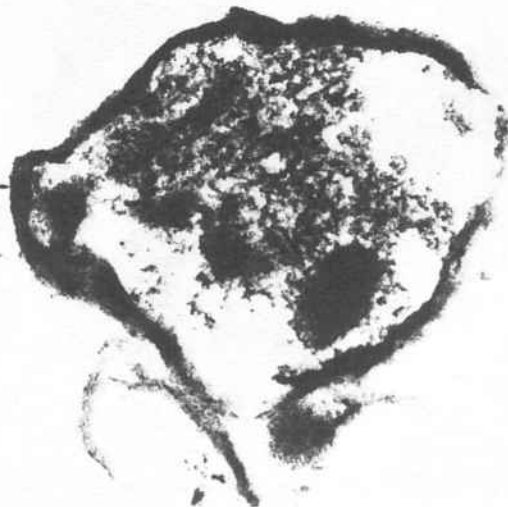


FIGURA 27.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES NO TRACTATS
39.000 X

en presència d'ADP $1 \cdot 10^{-5}$ M o quan la fracció sinaptosomal es tracta amb el medi histoquímic sense AMP, substrat de la 5'N (vegeu Figs. 27).

5.1.3.3. LOCALITZACIÓ DE L'ADA A SINAPTOSOMES

La fracció sinaptosomal obtinguda segons (4.2.1.) es va tractar segons es descriu en l'apartat (4.7.7.) amb el medi histoquímic de Tritsch et al. (131) i s'observà al microscopi electrònic. Una altra fracció de sinaptosomes es va tractar amb la primera solució del medi histoquímic però no es tractà amb la solució de nitrat de plata.

Les Figs. 28 i 29 mostren el precipitat de clorur de plata, a causa de la presència d'ADA prop d'algunes membranes sinaptosomals. Aquest precipitat no s'observà en la fracció sinaptosomal no tractada amb nitrat de plata.

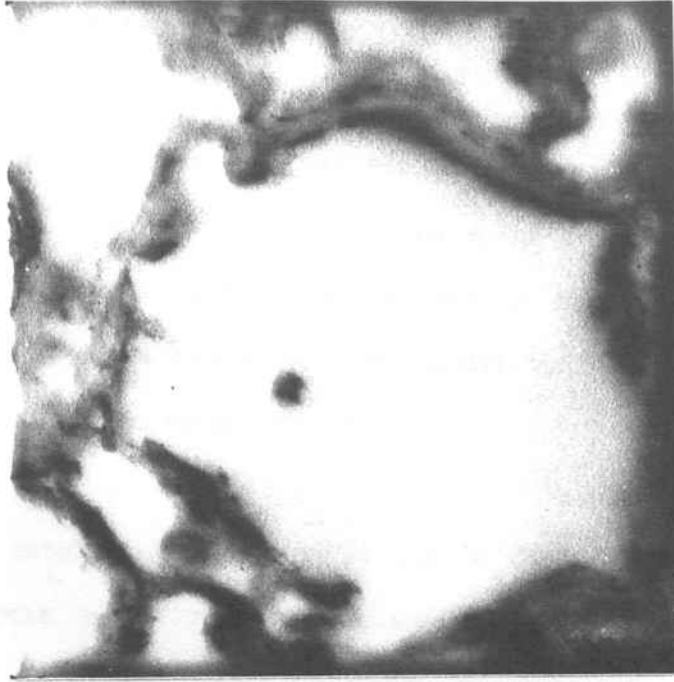


FIGURA 28.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE TRITSCH ET AL. (130)
23.500 X

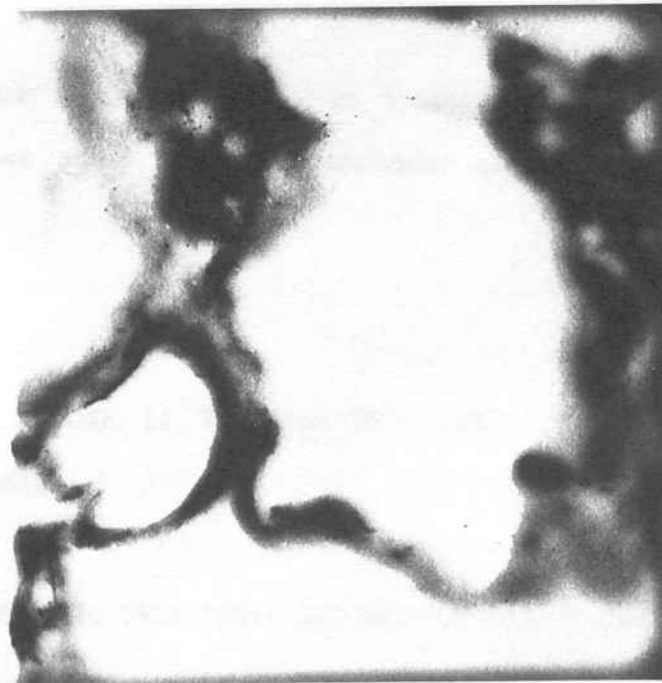


FIGURA 29.- MICROGRAFIA ELECTRÒNICA DELS SINAPTOSOMES TRACTATS AMB
EL MEDI HISTOQUÍMIC DE TRITSCH ET AL. (130)
23.500 X

5.2. ESTUDI DEL TRANSPORT DE L'ADENOSINA

La 5'N i l'ADA són enzims que en els microsomes es troben en la cara exterior de les vesícules que pertanyen a la fracció microsomal (32). Trams i Lauter havien postulat, encara que la demostració inequívoca no fou possible, que l'ADA podia tenir una localització idèntica que la 5'N en cultius de cèl·lules de teixit nerviós (60).

En l'apartat anterior s'ha demostrat que la 5'N i l'ADA es comporten de manera diferent a la resta dels enzims en les diverses fraccions subcel·lulars estudiades (vegeu 5.1.). En els experiments que es descriuen a continuació s'ha estudiat l'actuació de l'ADA en front del seu substrat adenosina, tant treballant amb fraccions subcel·lulars com amb fragments de teixits.

L'adenosina, per acció de l'ADA, es transforma en inosina, que rendeix hipoxantina per acció de la PNP solament quan hi ha P_i en el medi de reacció.

5.2.1. ESTUDI SEGONS LA VARIACIÓ DELS PUNTS ISOSBÈSTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-INOSINA

5.2.1.1. DETERMINACIÓ DELS PUNTS ISOSBÈSTICS ADENOSINA-INOSINA

Per tal de conèixer a quines longituds d'ona coincideixen els coeficients d'absorció molar de l'adenosina i de la inosina en la regió UV s'estudia

la reacció adenosina-inosina utilitzant ADA comercial d'intestí de bou (BOEHRINGER-MANHEIM).

La concentració de l'adenosina, substrat de la reacció, en la cubeta va ésser de $1 \cdot 10^{-4}$ M en medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. La concentració d'ADA va ésser de 0,02 unitats ($1 \cdot 10^{-4}$ mg proteïna/ml).

Després d'afegir l'enzim en el medi es realitzaren lectures d'absorció entre 200 nm i 320 nm a diversos intervals de temps en un espectrofotòmetre Hewlett-Packard 8450 A. Amb això es va obtenir la gràfica de la Figura 30, en la qual es pot observar la presència de tres punts isosbèstics a $\lambda = 221$ nm, $\lambda = 250$ nm i $\lambda = 281$ nm.

5.2.1.2. MICROSOMES

Els microsomes s'aïllaren segons (4.1.) i es rentaren dues vegades en un medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 segons (4.3.). El residu es va suspendre de nou en el mateix medi.

Es realitzà un experiment mesurant l'absorció entre 200 nm i 320 nm a diferents intervals de temps. La cubeta de reacció contenia adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M i microsomes en una concentració de 0,16 mg de proteïna/ml en medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. La gràfica obtinguda es mostra en la Figura 31. En una segona cubeta s'afegí també P_4 en una concentració de $5 \cdot 10^{-2}$ M i es realitza la mateixa operació de

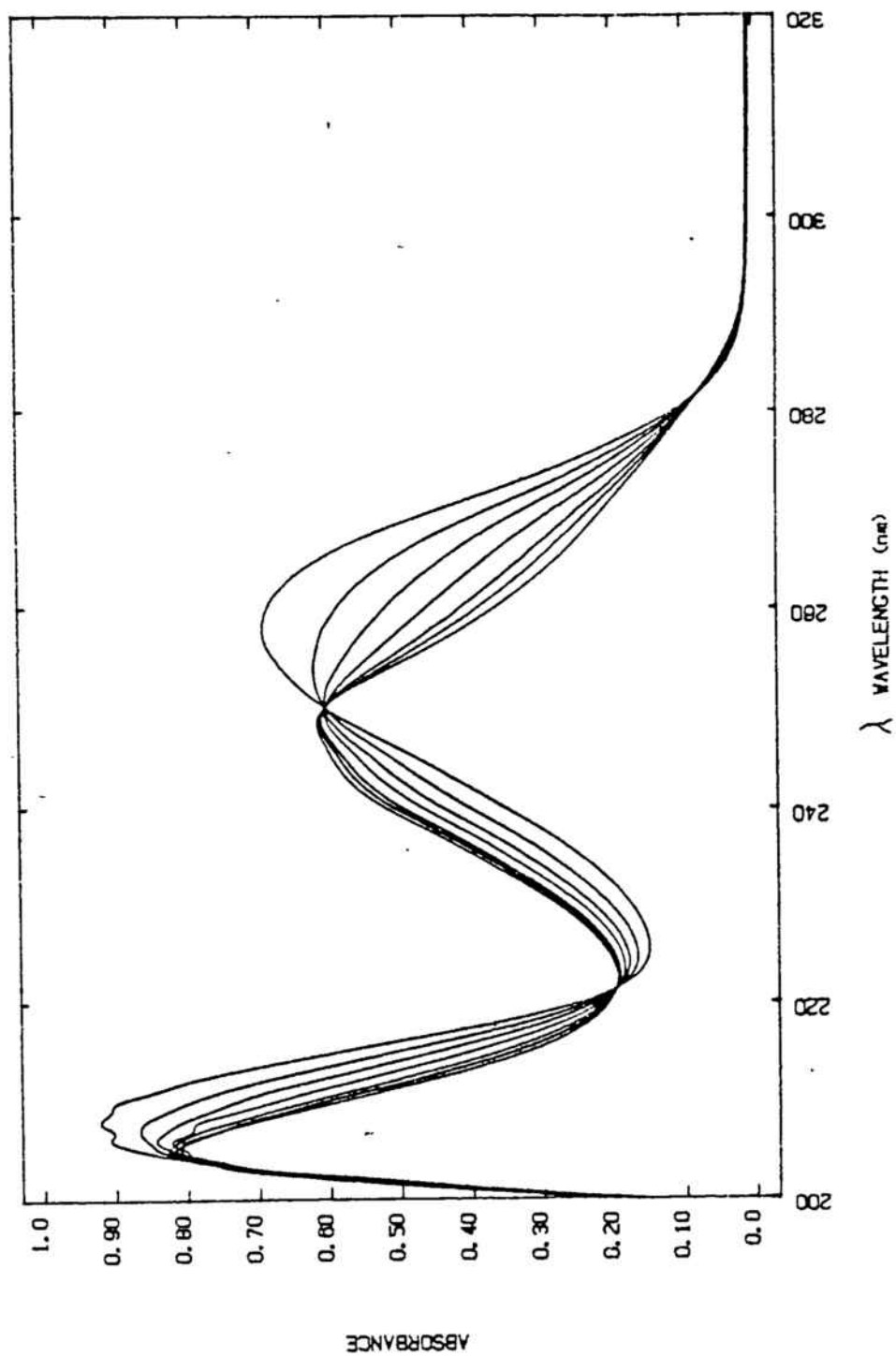


FIGURA 30 .- DETERMINACIO DELS PUNTS ISOBESTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-INOSINA.

El sistema adenosina-inosina s'estudià utilitzant ADA comercial d'intestí de bou (BOEHRINGER-MANHEIM) en una concentració de $1 \cdot 10^{-4}$ mg proteïna/ml. La concentració d'adenosina en cubeta fou de $1 \cdot 10^{-4}$ M. Cal destacar la presència de tres punts isobèstics a $\lambda = 221,5$ nm; $\lambda = 250$ nm i $\lambda = 281$ nm.

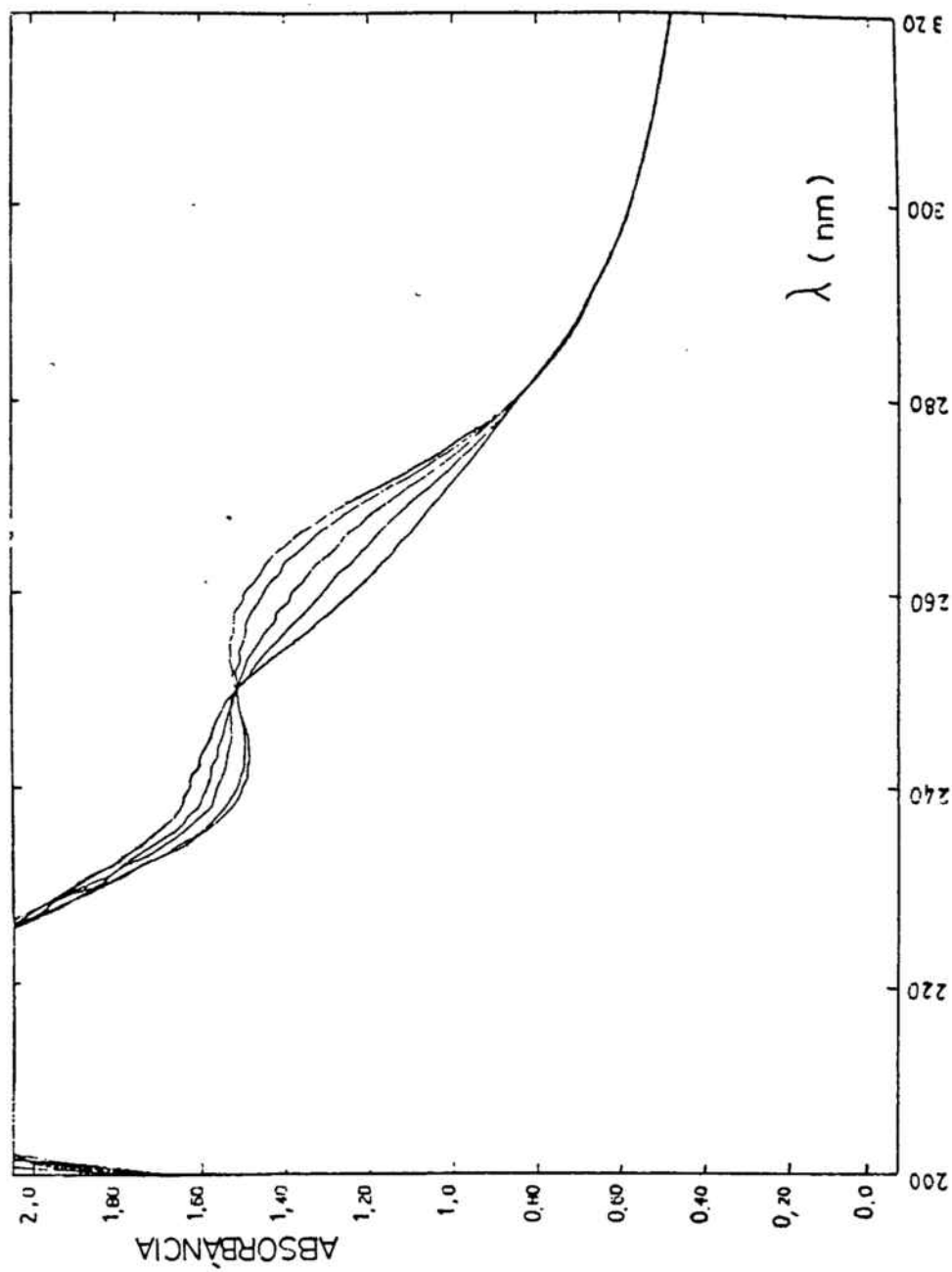


FIGURA 31 .- MANTENIMENT DELS PUNTS ISOSBÈSTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-INOSINA EN MICROSOMES.

Els punts isosbèstics del sistema adenosina-inosina es mantenen quan la cubeta de reacció conté adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M i microsomes en una concentració de 0,16 mg de proteïna/ml. Quan en el medi de reacció s'afegí també P_i en una concentració de $5 \cdot 10^{-2}$ M s'obtingué un gràfic similar en el qual es mantenen també els punts isosbèstics.

fer escombrats a diferents intervals de temps. La gràfica obtinguda va ésser similar a la de la Figura 31.

En ambdós casos s'observà que es mantenen els punts isosbèstics adenosina-inosina calculats amb l'enzim comercial (vegeu 5.2.1.1.).

5.2.1.3. SINAPTOSOMES

Els sinaptosomes es van aïllar segons (4.2.2.), i a continuació es van rentar dues vegades amb sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 segons s'indica en l'apartat (4.3.). El residu rentat es va suspendre de nou en el mateix medi.

Es va seguir la reacció catalitzada per l'ADA en totes les longituds d'ona entre 200 nm i 320 nm essent l'adenosina dins de la cubeta $5 \cdot 10^{-5}$ M i la concentració de sinaptosomes de 0,13 mg de proteïna/ml. S'obtingue la gràfica de la Figura 32. Igualment es realitzà una mesura afegint P_i en el medi en una concentració de $5 \cdot 10^{-2}$ M obtenint resultats idèntics.

La conservació dels punts isosbèstics adenosina-inosina es compleix en ambdós casos. Aquest fet indica la presència d'ADA lligada als sinaptosomes en la part exterior d'aquests orgànuls. La PNP, que també es troba en els sinaptosomes (vegeu Taula IV), no actua degut probablement a que aquest enzim es troba en l'interior dels sinaptosomes.

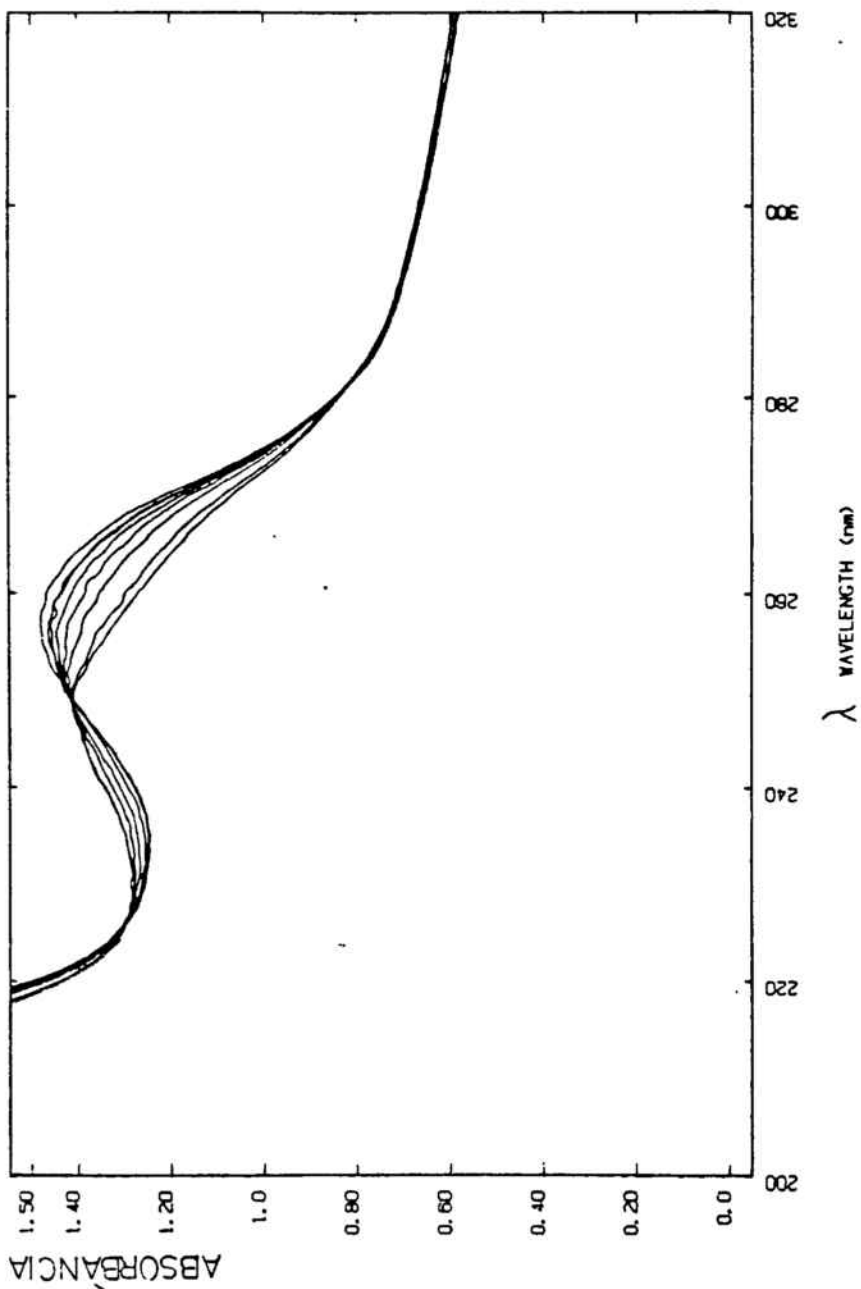


FIGURA 32 .- MANTENIMENT DELS PUNTS ISOSBÈSTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-INOSINA EN SINAPTOSOMES.

Els punts isosbèstics del sistema adenosina-inosina es mantenen quan la cubeta de reacció conté adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M i sinaptosomes en una concentració de 0,13 mg de proteïna/ml. Un gràfic similar, en el que també es mantenen els punts isosbèstics, s'obté quan s'afegeix també P_i $5 \cdot 10^{-2}$ M en el medi de reacció.

5.2.1.4. VESÍCULES SINÀPTIQUES

Les vesícules sinàptiques s'aïllaren segons (4.2.1.) i es van rentar dues vegades en un medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4 (vegeu 4.3.). El residu es va suspendre de nou en el mateix medi.

Tal com s'indica en els apartats anteriors s'efectuaren mesures d'absorció a diferents intervals de temps treballant amb adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M o amb adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M i P_i $5 \cdot 10^{-2}$ M en el medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. El contingut de proteïna en cubeta, degut a les vesícules sinàptiques va ésser de 0,10 mg/ml.

S'observà també en aquest cas que els punts isosbèstics adenosina-inosina es mantenien.

5.2.2. ESTUDI DE BANYS D'ORGANS PER HPLC

5.2.2.1. DETERMINACIÓ DELS TEMPS DE RETENCIÓ DE L'ADENOSINA I LA INOSINA

L'adenosina i la inosina es van separar per HPLC en fase reversa utilitzant una columna μ -Bondapak C_{18} . La fase mòvil utilitzada fou isocràtica i constava de tampó de fosfats d'amoni 50 mM pH 5,9 i metanol 85:15 (v/v).

Els temps de retenció corresponents a les mostres patró d'adenosina i de inosina van ser 12,8 min i 6,0 min respectivament, quan la bomba funcionà a un flux de 1,0 ml/min.

5.2.2.2. BANYS DE FRAGMENTES DE CERVELL

Petits fragments d'escorça de cervell de rata es van rentar durant 5 min en una solució de Krebs, composta per NaCl 133mM, KCl 4,7mM, NaH_2PO_4 1,3mM, NaHCO_3 16,3mM, MgSO_4 0,6mM, glucosa 7,8mM i CaCl_2 2,52mM i a continuació es va tractar amb adenosina $1 \cdot 10^{-4}$ M en solució de Krebs. Es van pendre dues alíquotes de 100 μl de la solució després de 2 min i després de 4 min de tractament del teixit i es van dipositar sobre 100 μl d'àcid perclòric 200 mM. Durant tot el procés es va passar un corrent de carbògen en les solucions que mullaven el fragment de cervell.

Les mostres així preparades es van aplicar a una columna μ -Bondapak C₁₈ per a separar adenosina i inosina i per a determinar les seves quantitats. El tampó utilitzat en la separació fou tampó de fosfats d'amoni 50 mM pH 5,9 que contenia un 15% de metanol. S'observà que la concentració d'adenosina no va variar amb el temps de tractament. Tampoc s'observà un pic corresponent a la inosina en cap de les alíquotes. Probablement, això era degut a la poca activitat de l'enzim a cervell, per tant, es procedí a efectuar el mateix experiment amb fragments de budell prim, teixit amb activitat ADA superior (vegeu 5.5.)

5.2.2.3. BANYES DE FRAGMENTS DE BUDELL PRIM

Petits fragments de budell prim extrets de la primera regió després de l'estòmac es van rentar durant 5 min en la solució de Krebs descrita en l'apartat anterior i, a continuació, es van tractar amb adenosina $1 \cdot 10^{-4}$ M en la mateixa solució de Krebs. Es van prendre mostres de 100 μ l de la solució després de 1 min, 2 min, 3 min i 4 min de tractament del teixit i es van recollir sobre 100 μ l d'àcid perclòric (concentració final 0,1 M).

Les mostres així preparades es van aplicar a una columna μ -Bondapak C₁₈ per a separar adenosina i inosina i per a quantificar-les. El tampó utilitzat en la separació fou el mateix descrit en els apartats anteriors. En aquest cas s'observà la transformació d'adenosina en inosina amb el temps; fet que indica que l'enzim es localitza en les membranes enfocat cap a l'exterior (vegeu 5.1.).

A continuació es va estudiar l'efecte de l'eritro-9-(2-hidroxi-3-nonil)adenina (EHNA) i del dilazep, inhibidors de l'enzim i del transport d'adenosina respectivament, sobre la disminució de la concentració d'adenosina i augment de la concentració de inosina amb el temps.

Els fragments de budell prim, després de rentar-los 5 min amb la solució de Krebs, que contenia respectivament dilazep 10 μ M o EHNA 1 μ M, es van tractar amb adenosina $1 \cdot 10^{-4}$ M en la mateixa solució i es van prendre mostres després de 1 min, 2 min, 3 min i 4 min, que es van recollir sobre àcid perclòric.

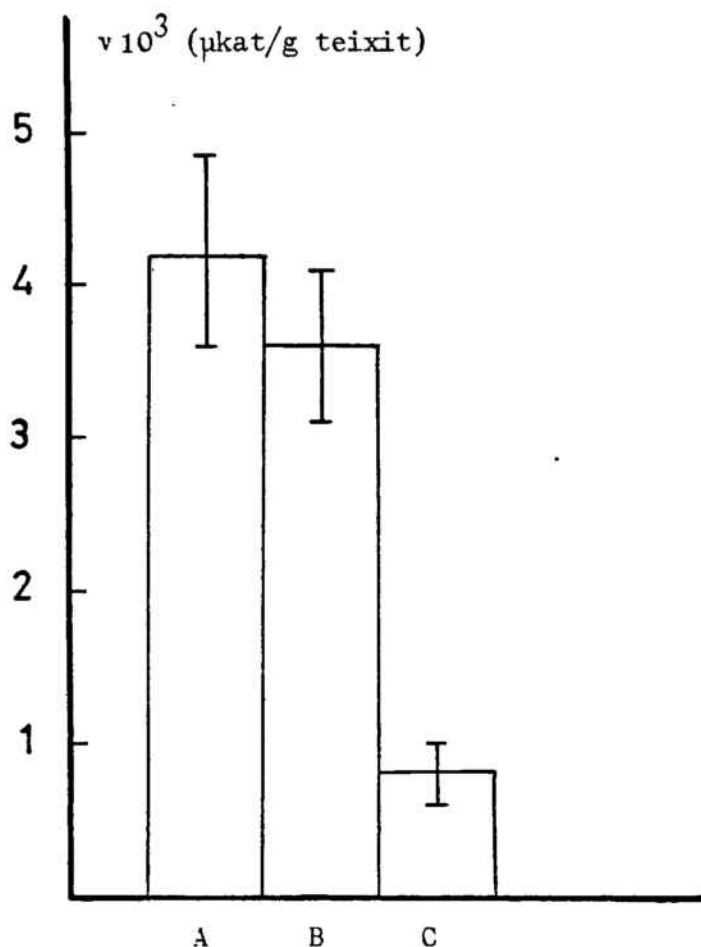


FIGURA 33._ EFECTE DEL DILAZEP I DE L'EHNA SOBRE L'ADENOSINA DESAMINASA

Es prengueren diverses alíquotes amb el temps per a analitzar l'adenosina i la inosina per HPLC.

- A) Mostra control (Adenosina $1 \cdot 10^{-4} M$)
- B) Adenosina $1 \cdot 10^{-4} M$ + Dilazep $10 \mu M$
- C) Adenosina $1 \cdot 10^{-4} M$ + EHNA $1 \mu M$

La cromatografia per μ -Bondapak C₁₈ va mostrar una disminució d'adenosina i de inosina en ambdós casos. Ara bé, l'efecte del dilazep no va ser tan marcat com l'efecte de l'EHNA, que va disminuir molt la concentració d'inosina formada. La Fig. 33 mostra l'efecte que les esmentades drogues tenen sobre l'activitat de L'ADA.

5.3. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA

Per a caracteritzar l'enzim d'escorça cerebral i comparar-lo amb l'enzim caracteritzat d'altres procedències es purificà l'adenosina desaminasa de l'esmentat origen. En la purificació es partí de fracció soluble perquè s'havia observat que el comportament cinètic de l'enzim en les diverses fraccions particulades estudiades era similar al de la fracció soluble (vegeu 5.1.2.2.) i perquè l'enzim era més abundant en l'esmentada fracció.

5.3.1. PURIFICACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA

Es proposa un mètode de purificació de l'enzim que consta de les etapes següents:

- 1) Obtenció de la fracció citoplasmàtica.- L'escorça dels cervells de rata es va homogeneïtzar amb 6,5 volums de sacarosa 0,28 M en tampó tris-HCl 30 mM de pH 7,4 i es procedí tal com es descriu en l'apartat 4.1. per a obtenir la fracció soluble.
- 2) Tractament tèrmic.- La fracció soluble de la primera etapa s'escalfa durant 30 min a 60° C en un bany d'aigua termostatitzat. A continuació, la solució es refreda ràpidament fins a 4° C i es centrifugà a 20.000xg durant 30 min per tal d'eliminar les proteïnes desnaturalitzades amb el tractament tèrmic.

- 3) Fraccionament amb sulfat d'amoni.- El sobrenedant de l'etapa anterior es portà al 80% de saturació amb sulfat d'amoni sòlid. El residu obtingut per centrifugació a 20.000xg 20 min es va dissoldre amb la mínima quantitat possible de tampó imidazola-HCl 50 mM pH 6,2 i es dessalà utilitzant una columna de Sephadex G-25 equilibrada amb el mateix tampó (vegeu 4.5.1.).

- 4) Cromatografia en DEAE-Sepharosa.- La fracció obtinguda en l'etapa anterior es cromatografià a través de DEAE-Sepharosa tal com es descriu en l'apartat (4.5.2.). L'enzim s'eluí mitjançant un gradient de NaCl de 0 M a 0,4 M en el mateix tampó d'equilibrat. La Fig. 34 mostra el perfil d'elució de l'enzim.

- 5) Electroforesi preparativa.- Els eluïts de l'etapa anterior es van unir, es van dessalar (vegeu 4.5.1.) i s'aplicaren a una electroforesi preparativa (vegeu 4.6.2.). L'enzim es col·lectà utilitzant una bomba peristàltica a un flux de 25 ml/h, i només es detectà un únic pic amb activitat adenosina desaminasa.

En la Taula XVIII es presenta un resum dels valors d'activitat adenosina desaminasa i la quantitat de proteïna a través de la purificació. Totes les etapes s'efectuaren a una temperatura de 0-4° C.

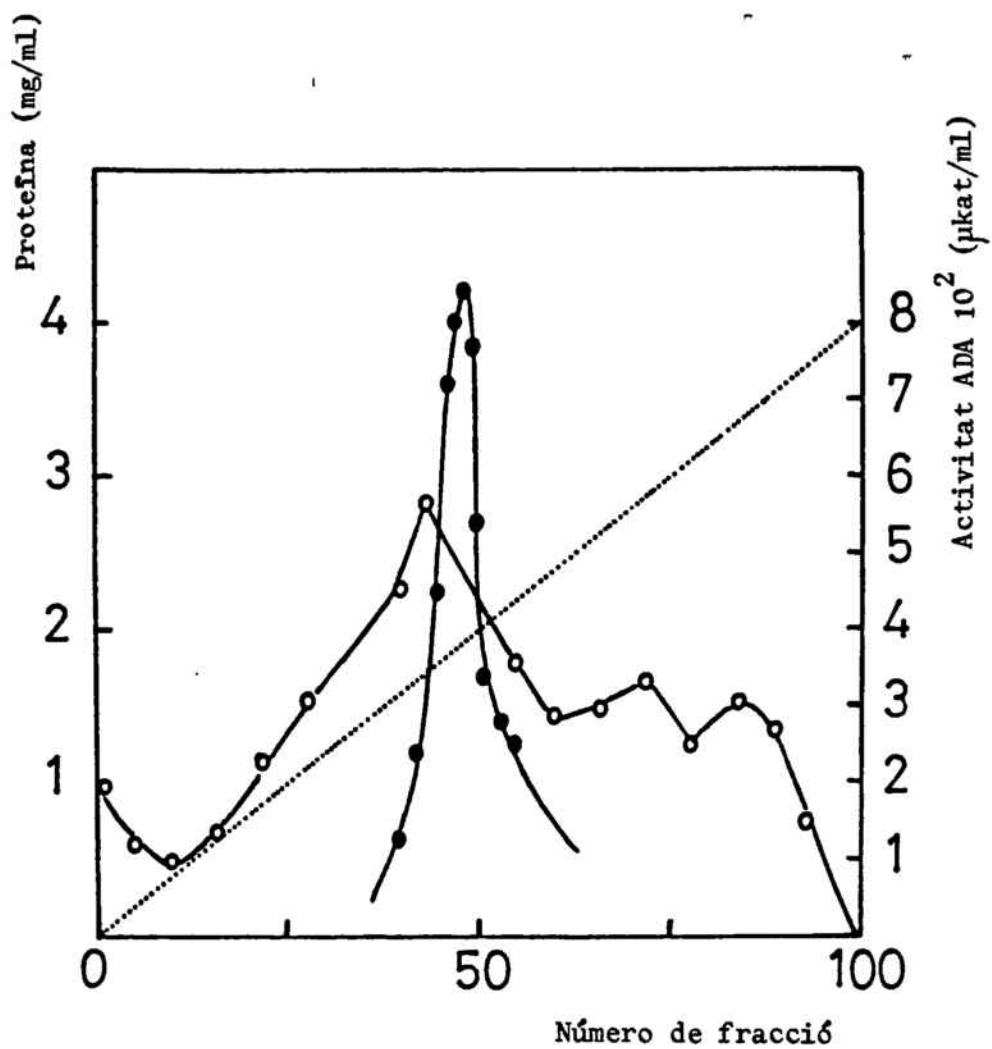


FIGURA 34.- CROMATOGRAFIA EN DEAE-SEPHAROSA A pH 6,2

L'eluent fou tampó imidazola-HCl 50 mM pH 6,2 i el gradient d'elució de NaCl 0 - 0,4 M en el mateix tampó.

(●) Activitat adenosina desaminasa

(○) Proteïna

(....) Gradient de NaCl

TAULA XVIII

PURIFICACIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA DE CERVELL DE RATA

	Volum (ml)	Activitat enzimàtica 10 ³ (unitats/g teixit)	Proteïna (mg/g teixit)	Activitat específica 10 ⁴ (unitats/mg)	Factor de purificació	Rendiment
1. Homogenat	138	1,71	15,5	1,1	1,0	100,0%
2. Tractament tèrmic	130	1,63	5,0	3,3	3,0	95,3%
3. Sulfat d'amoni	20	1,20	2,9	4,1	3,8	70,2%
4. DEAE-Sepharosa	20	0,77	0,06	12,4	11,3	45,0%
5. Electroelució	10	0,44	0,006	733,3	666,7	25,7%

5.3.2. ELECTROFORESI DEL PURIFICAT D'ADA

S'efectuà una electroforesi en gels de poliacrilamida sobre el preparat purificat d'ADA d'escorça de cervell de rata (vegeu 5.3.1.) segons es descriu en l'apartat (4.6.1.).

S'aplicaren 200 μ l del purificat, que contenia $2,4 \cdot 10^{-3}$ mg proteïna i $1,76 \cdot 10^{-4}$ μ kat d'activitat adenosina desaminasa.



FIGURA 35.- REVELAT ESPECÍFIC DE L'ADA PURIFICADA DE CERVELL DE RATA

L'electroforesi es realitza segons (4.6.1.) i s'observa la presència d'una única banda.

TAULA XIX

COMPARACIO DE LA COMPOSICIO AMINOACIDA DEL PURIFICAT AMB L'ENZIM PURIFICAT D'ALTRES PROCEDENCIES

AMINOACID	Cervell de rata	Budell de conill (82)	Budell de bou (80)	Limfoblasts B d'home (84)	Eritròcits d'home (85)
CySO ₃ H	8	4	6	—	—
Asp	28	23	31	33	37
Thr	17	15	18	17	17
Ser	24	11	18	18	21
Glu	48	35	38	45	38
Pro	11	15	20	22	14
Gly	46	15	19	24	30
Ala	18	19	22	30	35
Val	7	25	25	24	18
Met	3	—	6	8	8
Ile	8	10	13	15	14
Leu	22	26	26	34	28
Tyr	5	8	12	16	7
Phe	11	11	11	10	10
His	11	7	9	10	6
Lys	15	14	22	23	20
Arg	8	9	12	17	10
Trp	—	—	3	—	—

Per revelat específic d'ADA (vegeu 4.6.6.) s'obtingué només una banda (Fig. 35) que coincideix en movilitat amb la única banda que apareix per revelat general de proteïnes (vegeu 4.6.5.).

5.3.3. COMPOSICIÓ AMINOÀCIDA

El purificat es dialitzà en front d'aigua per a eliminar els ions que podien interferir, s'evaporà a sequedat i es va sotmetre a una hidròlisi amb HCl 6 N durant 24 hores a 110° C i en atmosfera de nitrògen. La mostra s'aplicà finalment a un autoanalitzador d'aminoàcids Beckman 119C.

La Taula XIX mostra els resultats obtinguts, que es comparen amb l'enzim d'altres procedències (80,82,85).

5.3.4. RADI DE STOKES

El radi de Stokes de l'adenosina desaminasa purificada es determinà per cromatografia en gel de Sephacril S-300 (vegeu 4.5.3.). La columna s'equilibrà en tampó tris-HCl 50 mM NaCl 0,1 M pH 7,4 a un flux de 6,5 ml/h (125).

En la Fig. 36 es mostra la recta de calibrat que permet estimar un valor de R_s per l'ADA de cervell de rata de 27,3 Å. La Fig. 37 permet la determinació del pes molecular aparent de l'enzim, que té un valor de 39.000.

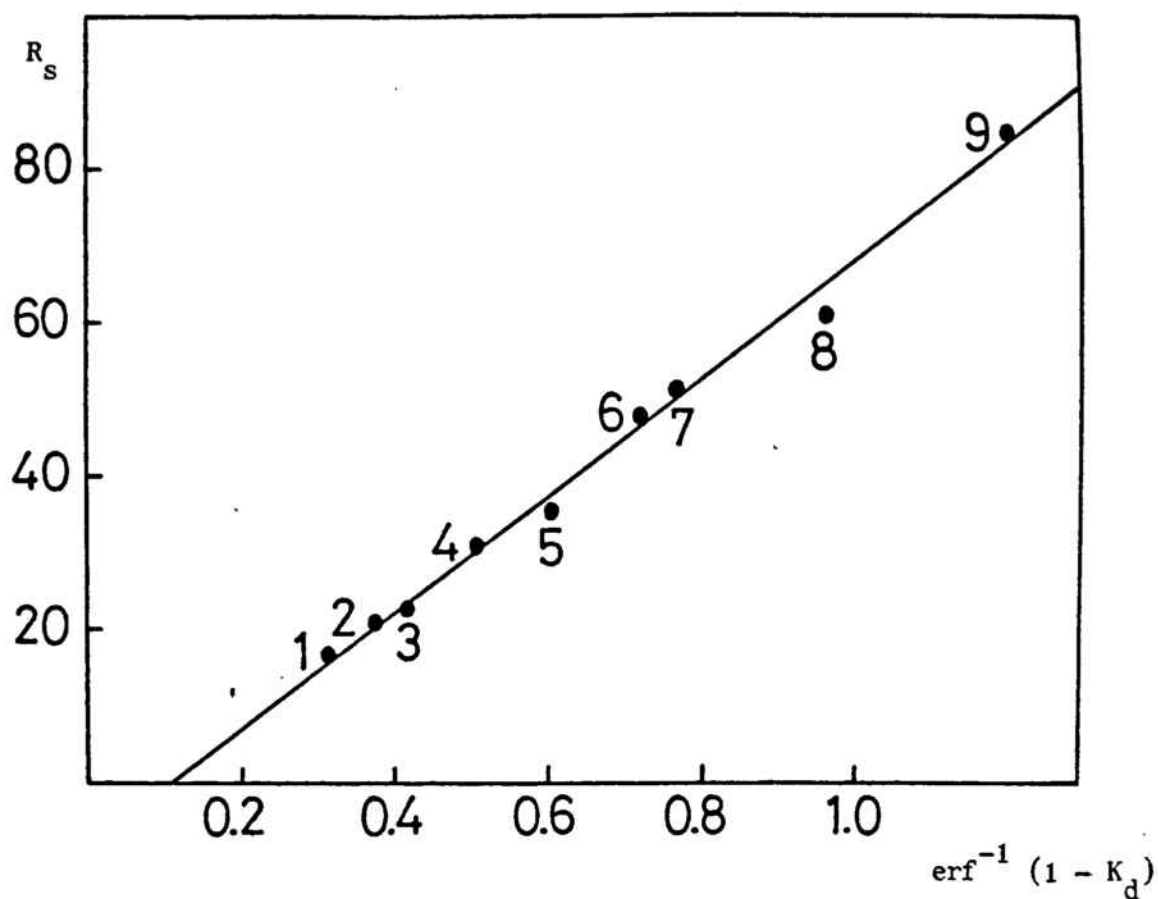


FIGURA 36.- CORBA DE CALIBRAT DE LA COLUMNA SEPHACRIL S-300

Les proteïnes patró van ser:

- 1.- Citocrom c (Pes mol.lecular = 13.000, $R_s = 16,5 A$)
- 2.- Mioglobina (Pes mol.lecular = 17.800, $R_s = 20,8 A$)
- 3.- Quimotripsinògen (Pes mol.lecular = 25.000, $R_s = 22,4 A$)
- 4.- Ovoalbúmina (Pes mol.lecular = 43.000, $R_s = 30,5 A$)
- 5.- Seroalbúmina bovina (Pes mol.lecular = 67.000, $R_s = 35,5 A$)
- 6.- Aldolasa (Pes mol.lecular = 158.000, $R_s = 48,1 A$)
- 7.- Catalasa (Pes mol.lecular = 232.000, $R_s = 52,2 A$)
- 8.- Ferritina (Pes mol.lecular = 440.000, $R_s = 61,0 A$)
- 9.- Tiroglobulina (Pes mol.lecular = 669.000, $R_s = 85,0 A$)

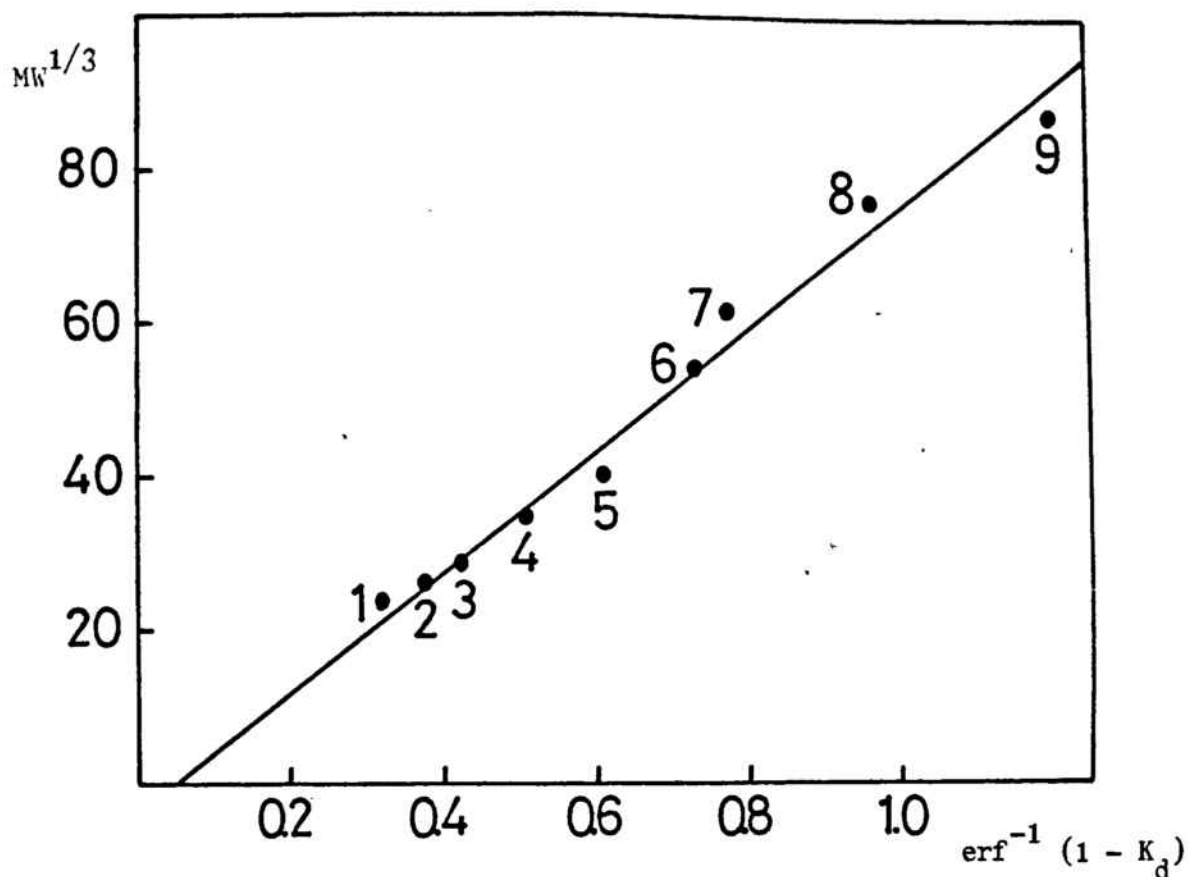


FIGURA 37.- CORBA DE CALIBRAT DE LA COLUMNA SEPHACRIL S-300

Les proteïnes patró van ser:

- 1.- Citocrom c (Pes mol.lecular = 13.000, $R_m = 16,5$ A)
- 2.- Mioglobina (Pes mol.lecular = 17.800, $R_m = 20,8$ A)
- 3.- Quimotripsinògen (Pes mol.lecular = 25.000, $R_m = 22,4$ A)
- 4.- Ovoalbúmina (Pes mol.lecular = 43.000, $R_m = 30,5$ A)
- 5.- Seroalbúmina bovina (Pes mol.lecular = 67.000, $R_m = 35,5$ A)
- 6.- Aldolasa (Pes mol.lecular = 158.000, $R_m = 48,1$ A)
- 7.- Catalasa (Pes mol.lecular = 232.000, $R_m = 52,2$ A)
- 8.- Ferritina (Pes mol.lecular = 440.000, $R_m = 61,0$ A)
- 9.- Tiroglobulina (Pes mol.lecular = 669.000, $R_m = 85,0$ A)

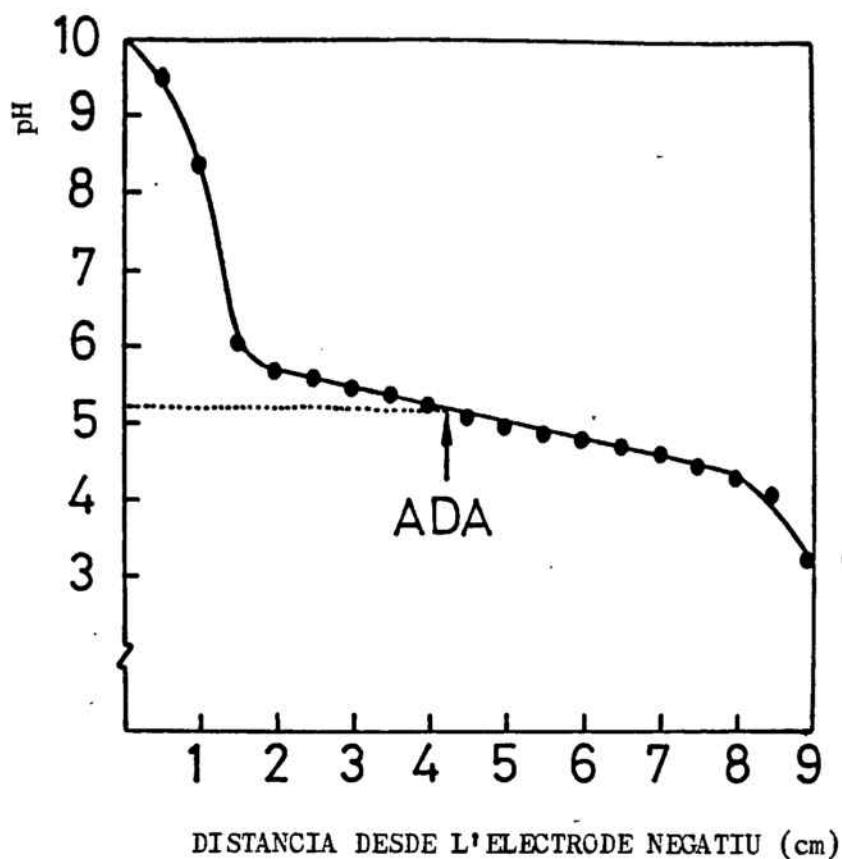


FIGURA 38.- DETERMINACIÓ DEL pI DE L'ADENOSINA DESAMINASA D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA

El punt isoelèctric es va determinar per electroenfocament isoelèctric (vegeu 4.6.3.). Marge d'anfolits 3-10

5.3.5. PUNT ISOELÈCTRIC

El punt isoelèctric de l'adenosina desaminasa purificada es determinà per electroenfocament isoelèctric (vegeu 4.6.3.). El revelat general de proteïnes (vegeu 4.6.5.) i l'específic (vegeu 4.6.6.) mostraren una única banda que correspongué a un pH de 5,2 +/- 0,2 (Figura 38).

5.3.6. ESTUDIS CINÈTICS DEL SISTEMA ADENOSINA-ADA-INOSINA

5.3.6.1. DETERMINACIÓ DE LA K_m I DE LA V DEL PURIFICAT

Per a calcular la K_m i la V de l'enzim purificat es va utilitzar un marge de concentracions d'adenosina entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M. La quantitat de proteïna en cubeta va ésser de 0,3 µg. Les velocitats inicials de reacció es van determinar tal com s'indica en l'apartat (4.8.1.1.) i a partir de les dades obtingudes s'efectuà la representació d'Eadie-Hoftee (Figura 39).

Els paràmetres cinètics s'avaluaren segons (4.9.) i es van obtenir els següents valors:

$$V = 1,98 \cdot 10^{-3} \pm 0,03 \cdot 10^{-3} \text{ } \mu\text{kat}$$

$$K_m = 4,7 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

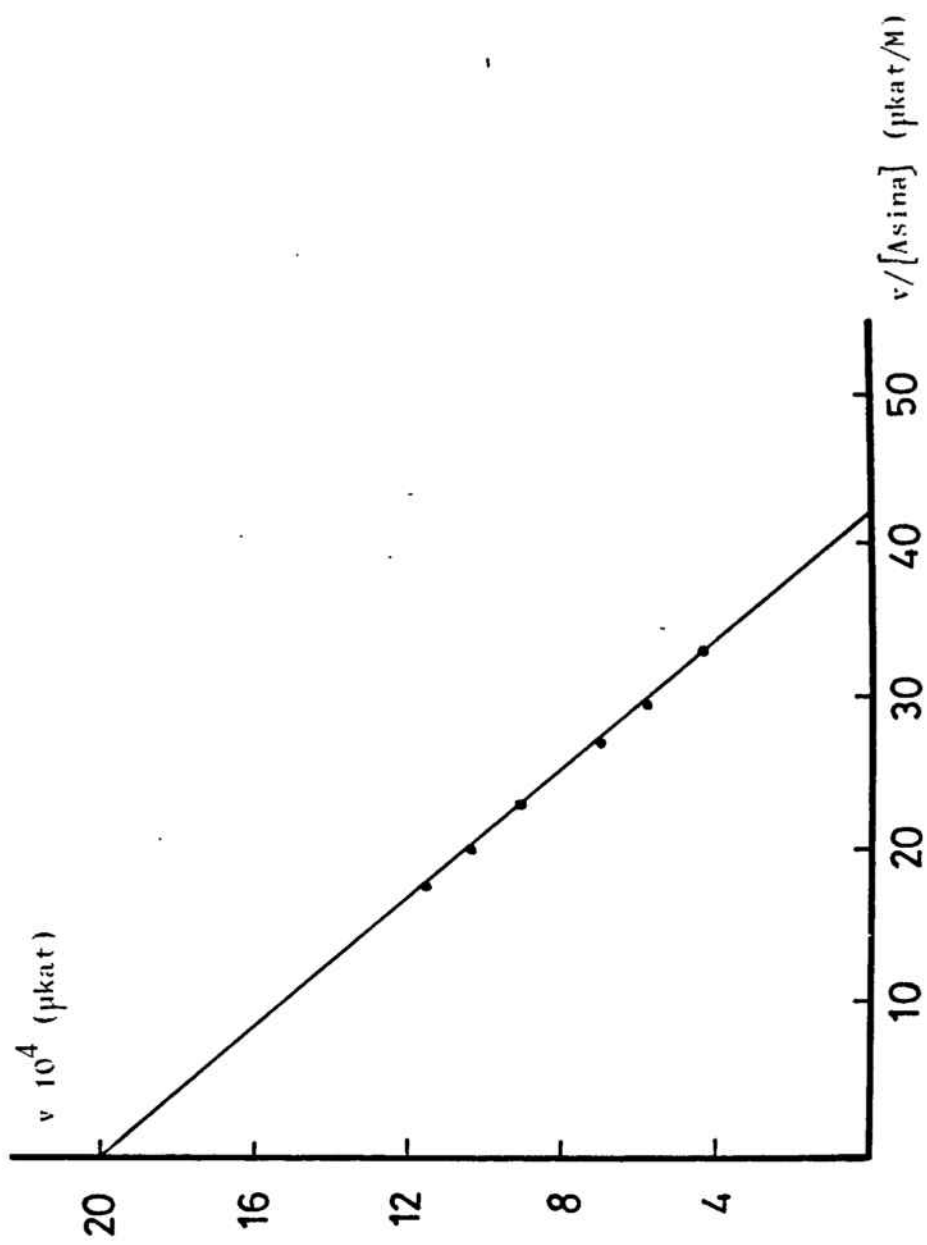


FIGURA 39 .- REPRESENTACIÓ D'EADIE-HOFTEE PER AL CALCUL DE K_m D'ADA PURIFICADA D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA. La concentració d'adenosina en cubeta varià entre 10 μM i 90 μM en tampó tris-HCl 30 mM amb sacarosa 0,28 M pH 7,4 a la temperatura de 30 \pm 0,1 $^\circ$ C.

A causa de l'elevada absorció a 265 nm no és possible determinar si l'adenosina, substrat de la reacció, inhibeix l'enzim a concentracions elevades.

5.3.6.2. INHIBICIÓ PER DIVERSOS METABOLITS PURÍNICS

La inhibició pels diferents metabolits purínics s'efectuà mesurant les velocitats inicials de reacció segons (4.8.1.1.). La concentració d'adenosina utilitzada varià entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M. El purificat d'ADA utilitzat no presentà activitat en front de cap dels metabolits dels que s'estudià la inhibició.

La quantitat de proteïna en cubeta va ésser de 0,3 µg.

5.3.6.2.1. INHIBICIÓ PER PURINES

La inhibició per adenina s'efectuà utilitzant un marge de concentracions fins a $7,2 \cdot 10^{-4}$ M. En aquestes condicions l'adenina provocà una inhibició no competitiva (Fig. 40) amb un valor de $K_{i1} = 2,5 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$ M.

La hipoxantina (fins $1,5 \cdot 10^{-4}$ M) inhibeix també de forma no competitiva (Fig. 41), amb un valor de $K_{i1} = 4,1 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ M.

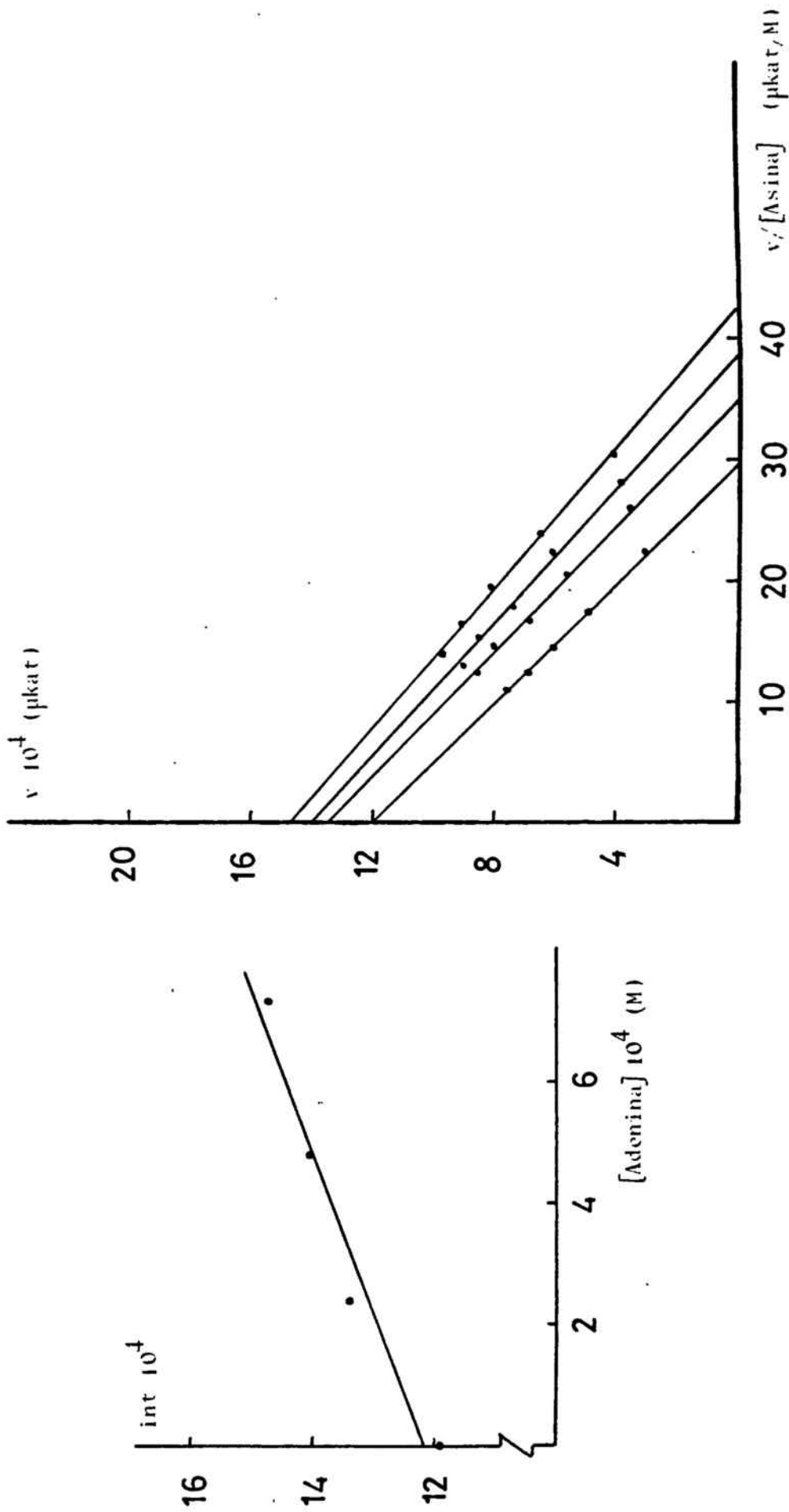


FIGURA 40 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE L'ADA PER ADENINA.

La concentració d'adenina augmenta de dalt a baix: 0 M; $2,42 \cdot 10^{-4}$ M; $4,83 \cdot 10^{-4}$ M; $7,25 \cdot 10^{-4}$ M. El tampó utilitzat fou tris-HCl 30 mM, sacarosa 0,28 M de pH 7,4 i la temperatura $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

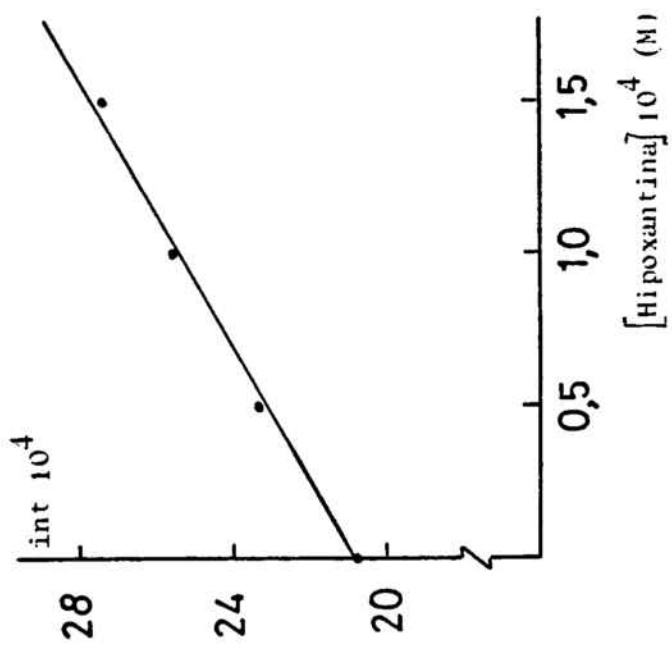
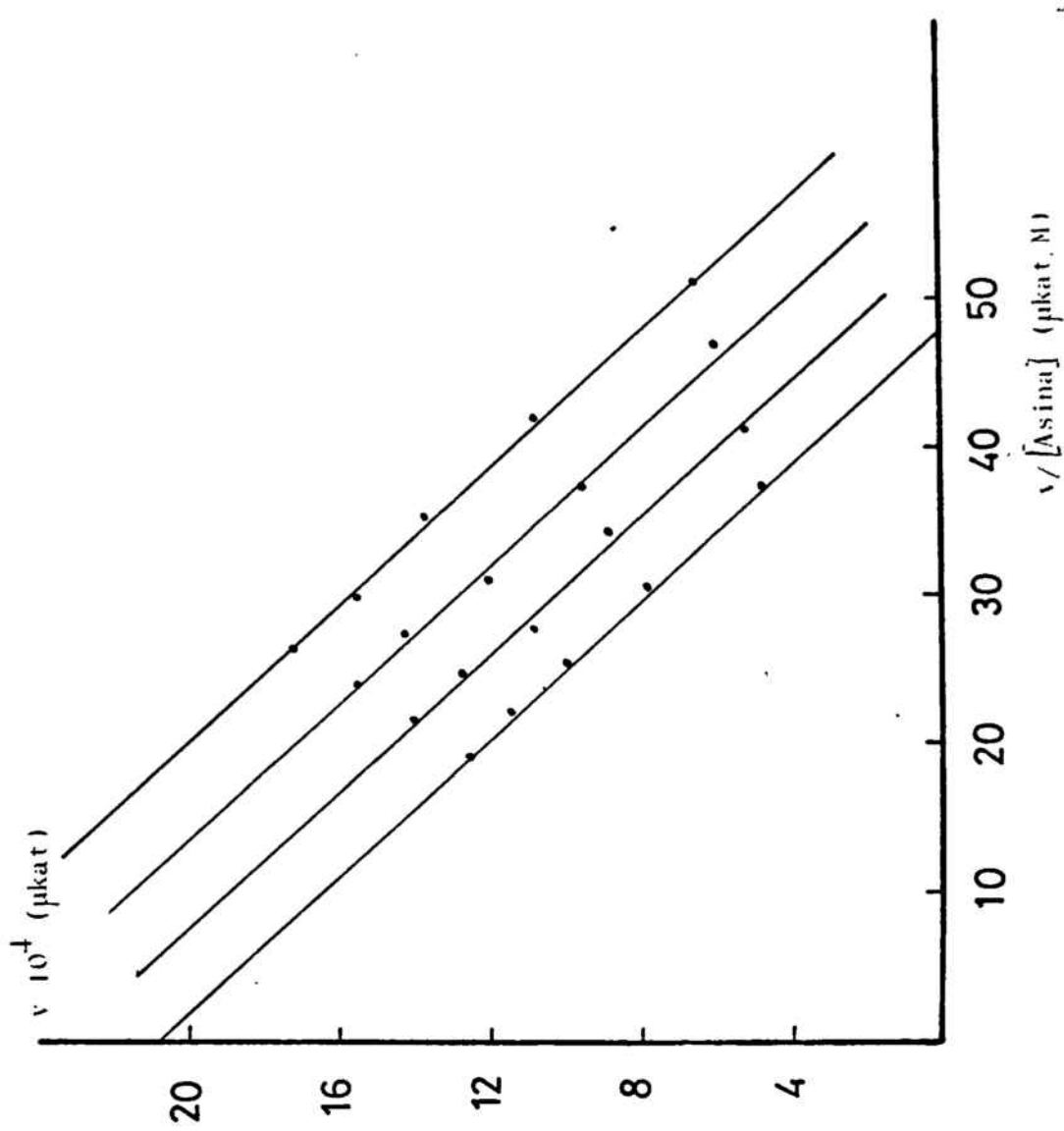


FIGURA 41 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE L'ADA PER HIPOXANTINA.

La concentració d'hipoxantina augmenta de dalt a baix: 0 M; $5,0 \cdot 10^{-5}$ M; $1,0 \cdot 10^{-4}$ M; $1,5 \cdot 10^{-4}$ M. L'experiment es va realitzar amb tampó tris-HCl 30 mM i sacarosa 0,28 M de pH 7,4 a $30 \pm 0,1^{\circ}$ C.

La xantina (fins $7,2 \cdot 10^{-4}$ M), la guanosina (fins $1,5 \cdot 10^{-4}$ M) i l'àcid úric (fins $7,2 \cdot 10^{-4}$ M) no afecten l'activitat ADA, i no s'observa inhibició deguda a aquests metabolits en les condicions de treball.

5.3.6.2.2. INHIBICIÓ PER NUCLEÒSIDS

La inosina, producte alliberat en la reacció de l'adenosina desaminasa sobre l'adenosina, actua com a inhibidor competitiu de l'enzim tal com s'observa en la Figura 42. Les concentracions d'inosina utilitzades en aquesta inhibició variaren fins a $6,8 \cdot 10^{-5}$ M. El valor de la constant d'inhibició obtinguda fou: $K_{iP} = 1,53 \cdot 10^{-4} \pm 0,09 \cdot 10^{-4}$ M.

La xantosina (fins $7,2 \cdot 10^{-4}$ M) no presentà cap tipus d'inhibició en les condicions de treball. La guanosina (fins $5,0 \cdot 10^{-5}$ M), en canvi, ofereix una inhibició competitiva (Fig. 43) amb un valor de constant d'inhibició de $K_{iP} = 1,9 \cdot 10^{-4} \pm 0,1 \cdot 10^{-4}$ M.

5.3.6.2.3. INHIBICIÓ PER NUCLEÒTIDS

Cap dels nucleòtids monofosfats (AMP, IMP, XMP i GMP) inhibeix l'enzim en les condicions de treball (concentracions dels nucleòtids fins $7 \cdot 10^{-4}$ M). L'ADP tampoc afecta l'activitat de l'enzim a concentracions fins $5,3 \cdot 10^{-5}$ M.

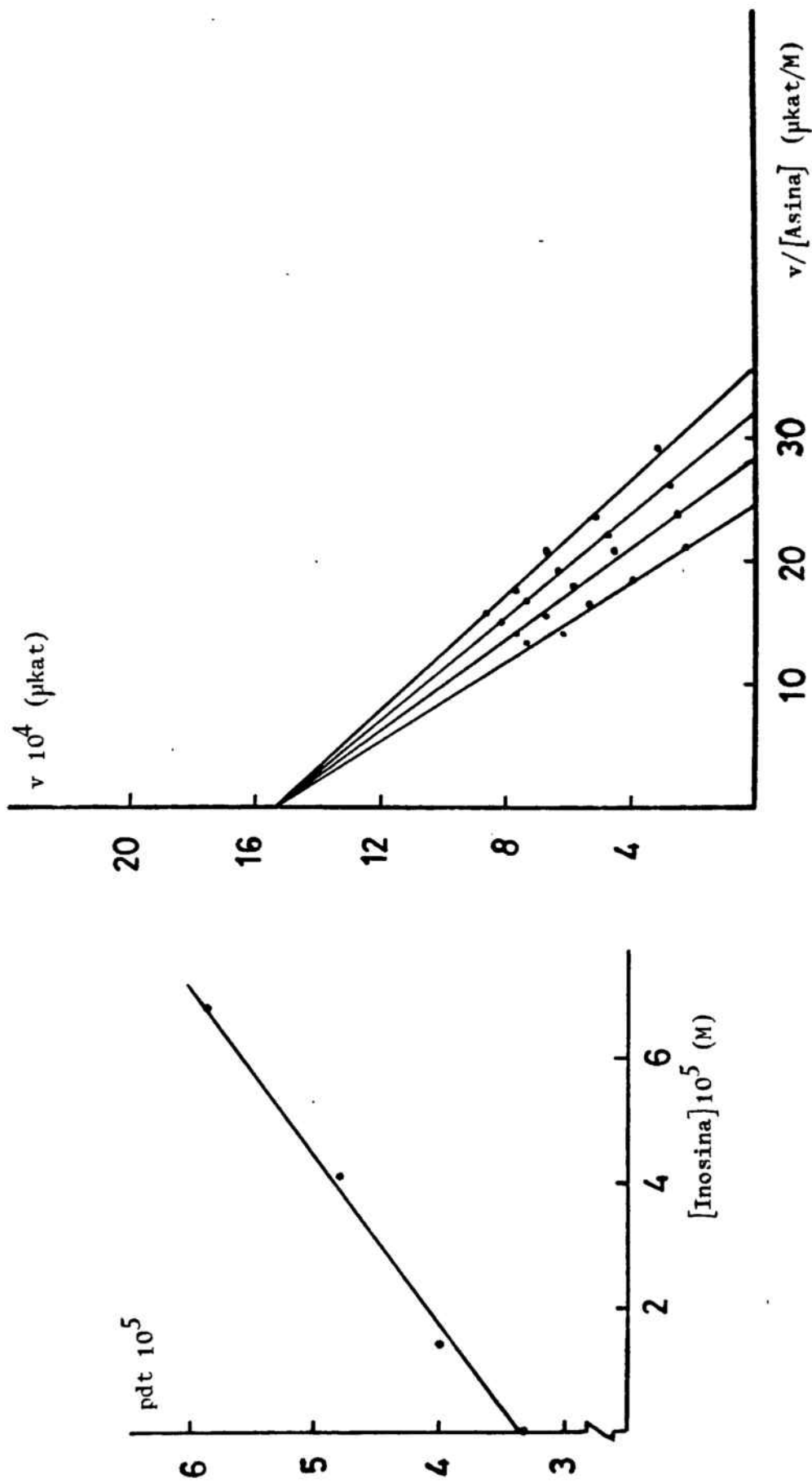


FIGURA 42 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE L'ADA PER INOSINA.

La concentració de inosina augmenta de dalt a baix: $0 M$; $1,37 \cdot 10^{-5} M$; $4,10 \cdot 10^{-5} M$; $6,83 \cdot 10^{-5} M$. El tampó utilitzat fou tris-HCl 30 mM amb sacarosa $0,28 M$ pH $7,4$ i la temperatura $30 \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$.

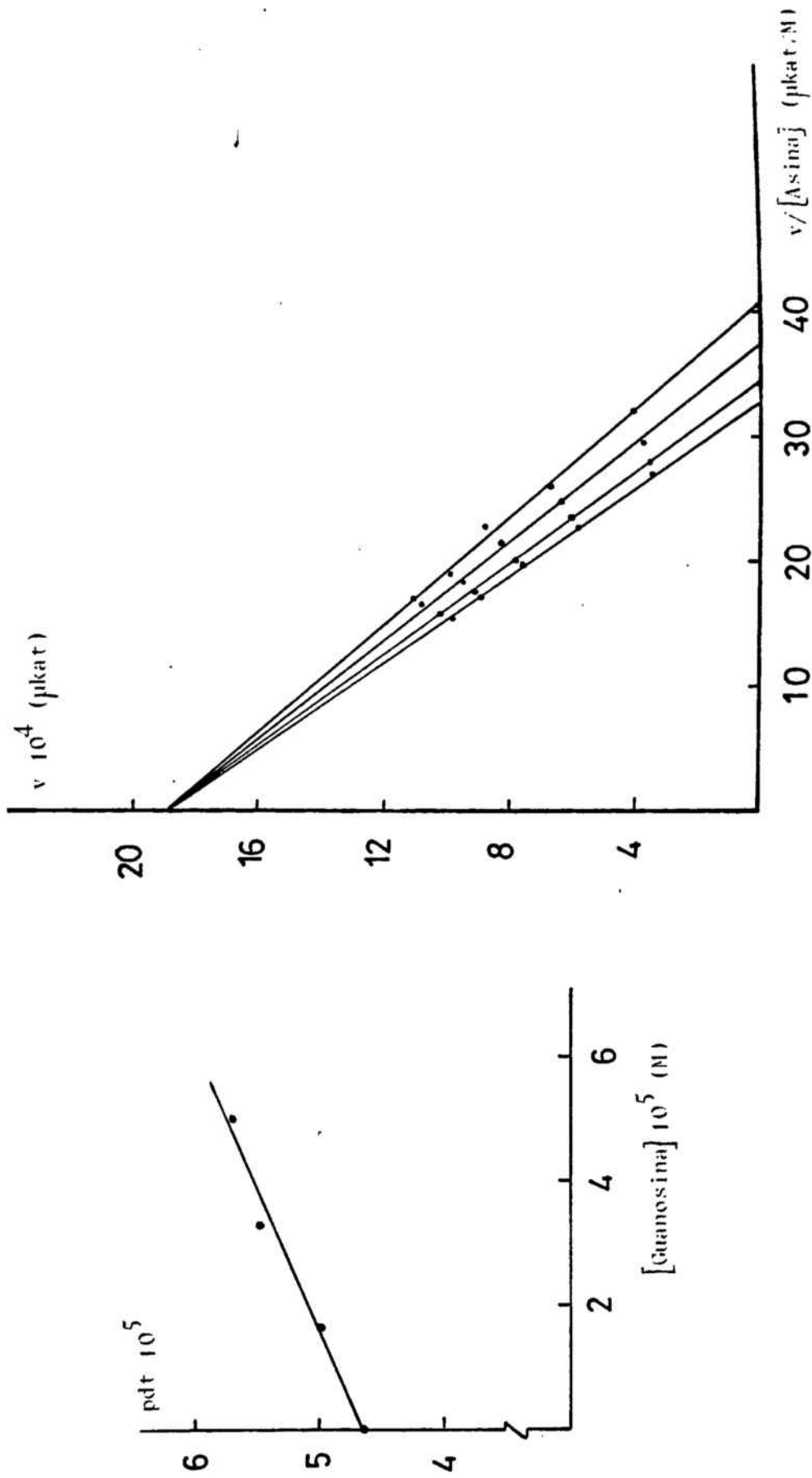


FIGURA 43 .- REPRESENTACIO D'EADIE-HOFTEE DE LA INHIBICIO DE L'ADA PER GUANOSINA.

La concentració de guanosina augmenta de dalt a baix: 0 M; $1,67 \cdot 10^{-5}$ M; $3,33 \cdot 10^{-5}$ M; $5,00 \cdot 10^{-5}$ M. El temps utilitzat fou tris-HCl 30 mM sacarosa 0,28 M pH 7,4 i la temperatura de treball $30 \pm 0,1^\circ \text{C}$.

5.3.6.3. EFECTE DE DIVERSES DROGUES SOBRE L'ACTIVITAT ADA

Phillis i Wu (142) van estudiar l'efecte de diverses drogues amb propietats ansiolítiques, antidepressives, antihistamíniques, vasodilatadores, antiinflamatòries i antibiòtiques sobre l'entrada d'adenosina a les cèl·lules cerebrals i van comprovar que el nivell extracel·lular d'adenosina augmentava. Per a veure l'efecte d'aquestes drogues sobre l'ADA i comprovar si l'augment d'adenosina podria ésser també degut a una inhibició de l'enzim s'estudià l'efecte d'aquestes drogues sobre l'activitat de l'enzim i es determinaren els paràmetres cinètics.

En primer lloc s'estudià la inhibició de l'etanol i del DMSO sobre l'enzim purificat, ja que moltes de les drogues assajades, degut a la seva estructura química, no són solubles en aigua i en canvi ho són en aquests dissolvents orgànics. L'etanol (fins 1,1 M) i el DMSO (fins 1,9 M) inhibeixen de forma competitiva a l'ADA amb uns valors de K_{ip} de $0,50 \pm 0,08$ M i $1,2 \pm 0,1$ M respectivament. La concentració d'adenosina en cubeta va variar entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M i la quantitat de proteïna va ésser de 0,3 µg.

L'efecte de les diverses drogues ansiolítiques, antidepressives, antihistamíniques, vasodilatadores, antiinflamatòries, antibiòtiques, broncodilatadores, estimulants i antivomitives es va estudiar utilitzant concentracions de les drogues fins a $2,5 \cdot 10^{-4}$ M.

Les solucions de cinnarizina, lorazepam, imipramina, diazepam, medazepam, nitrazepam, clozapina, sulpirida, oxazepam i lidoflazina es van realitzar en etanol, mentre que les altres drogues eren solubles en un medi tamponat de sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. En les inhibicions efectuades amb les solucions de drogues dissoltes amb etanol es va mantenir la concentració de l'etanol constant en la mescla de reacció (0,34 M).

La Taula XX mostra l'efecte que tenen les diverses drogues assajades en l'activitat de l'ADA. S'observa que la tripelenamina, cafeïna i teobromina no inhibeixen ni activen l'enzim en les condicions assajades. La lidoflazina, la fenilbutazona, el clordiazepòxid, la rifampicina i el dipiridamol són els inhibidors més potents; en canvi, la sulpirida, el diazepam, el medazepam, la cinnarizina i la ouabaina activen l'ADA.

5.3.7. EFECTE DE LA TEMPERATURA EN L'ACTIVITAT ADA

L'estudi de l'efecte de la temperatura en la velocitat de reacció proporciona dades sobre l'estabilitat de l'enzim i sobre la reacció que aquest enzim catalitza. La variació de la temperatura afecta l'estabilitat de l'enzim i la del substrat, l'afinitat de l'enzim pel substrat, les constants de velocitat del procés i les constants de ionització dels components del sistema, degut a una variació de pK originada pels calors de ionització (141).

TAULA XX

EFFECTE DE DIVERSES DROGUES SOBRE L'ACTIVITAT ADA

CATEGORIA TERAPÈUTICA	CLASSE DE DROGA	DROGA	EFFECTE	K _i o K _a
ANTIPSICÒTICS	FENOTIAZINES	2-CLORPROMAZINA	INHIBIDOR NO COMPETITIU	1,18 10 ⁻³ +/- 0,09 10 ⁻³
	DIBENZODIAZEPINES	CLOZAPINA	INHIBIDOR ACOMPETITIU	2,1 10 ⁻⁴ +/- 0,4 10 ⁻⁴
	SULFAMOILBENZAMIDES	SULPIRIDA	ACTIVADOR ACOMPETITIU	2,8 10 ⁻⁴ +/- 0,5 10 ⁻⁴
ANSIOLÍTICS HIPNÒTICS SEDANTS	BENZODIAZEPINES	NITRAZEPAM	INHIBIDOR COMPETITIU	3,0 10 ⁻⁴ +/- 0,2 10 ⁻⁴
		LORAZEPAM	INHIBIDOR COMPETITIU	1,6 10 ⁻³ +/- 0,2 10 ⁻³
		DIAZEPAM	ACTIVADOR COMPETITIU	4,7 10 ⁻⁴ +/- 0,6 10 ⁻⁴
		MEDAZEPAM	ACTIVADOR COMPETITIU	3,2 10 ⁻⁴ +/- 0,3 10 ⁻⁴
		CLORDIAZEPÒXID	INHIBIDOR COMPETITIU	8,3 10 ⁻⁵ +/- 0,5 10 ⁻⁵
	NO-BENZODIAZEPINES	OXAZEPAM	INHIBIDOR COMPETITIU	5 10 ⁻⁴ +/- 2 10 ⁻⁴
		MEPROBAMAT	INHIBIDOR COMPETITIU	2,9 10 ⁻³ +/- 0,2 10 ⁻³
ANTI-DEPRESSIUS	TRICÍCLICS	IMIPRAMINA	INHIBIDOR COMPETITIU	6,4 10 ⁻⁴ +/- 0,6 10 ⁻⁴
ANTI-HISTAMINES		CINNARIZINA	ACTIVADOR COMPETITIU	3,6 10 ⁻⁴ +/- 0,9 10 ⁻⁴
		TRIPLENNAMINA	NO TE EFFECTE	-----
VASODILATADORS CORONARIS		LIDOFLAZINA	INHIBIDOR ACOMPETITIU	3,0 10 ⁻⁵ +/- 0,7 10 ⁻⁵
		DIPIRIDAMOL	INHIBIDOR NO COMPETITIU	1,8 10 ⁻⁴ +/- 0,1 10 ⁻⁴
		OUABAINA	ACTIVADOR ACOMPETITIU	9,6 10 ⁻⁴ +/- 0,7 10 ⁻⁴
ANTI-INFLAMATORIS NO-ESTEROIDALS		ACETAMINOFEN	INHIBIDOR ACOMPETITIU	3,2 10 ⁻⁴ +/- 0,3 10 ⁻⁴
		FENILBUTAZONA	INHIBIDOR ACOMPETITIU	5,4 10 ⁻⁵ +/- 0,2 10 ⁻⁵
		NAPROXEN	INHIBIDOR ACOMPETITIU	4 10 ⁻³ +/- 1 10 ⁻³
ANTIBIÒTICS		RIFAMPICINA	INHIBIDOR ACOMPETITIU	1,2 10 ⁻⁴ +/- 0,1 10 ⁻⁴
BRONCODILATADORS		ALBUTEROL	INHIBIDOR MIXTE	K _{1i} 0,0016 +/- 0,0006
			K _{1p} 0,005 +/- 0,004	
		CETOTIFEN	INHIBIDOR MIXTE	K _{1i} 2,7 10 ⁻⁴ +/- 0,4 10 ⁻⁴
			K _{1p} 6 10 ⁻⁴ +/- 1 10 ⁻⁴	
ESTIMULANTS		CAFEÏNA	NO TE EFFECTE	-----
		TEOBROMINA	NO TE EFFECTE	-----
		TEOFILINA	INHIBIDOR ACOMPETITIU	2,0 10 ⁻⁴ +/- 0,1 10 ⁻⁴
ANTIEMÈTICS		DIMENHIDRINAT	INHIBIDOR ACOMPETITIU	4,1 10 ⁻⁴ +/- 0,3 10 ⁻⁴

La cinnarizina, el lorazepam, la imipramina, el diazepam, el medazepam, el nitrazepam, la clozapina, la sulpirida, l'oxazepam i la lidoflazina es van dissoldre en etanol; mentre que les altres drogues es van dissoldre en un medi tamponat de sacarosa 0,32 M tris-HCl 30 mM pH 7,4

En els apartats següents s'estudia la temperatura òptima d'actuació del sistema adenosina-ADA-inosina i l'efecte de la temperatura en els valors de K_m i V del sistema.

5.3.7.1. TEMPERATURA ÒPTIMA D'ACTUACIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA

Per tal d'establir la temperatura òptima d'actuació de l'ADA purificada es van determinar les velocitats inicials de reacció del sistema adenosina-ADA-inosina a temperatures compreses entre 21 i 52° C, utilitzant una concentració d'adenosina de $5 \cdot 10^{-5}$ M. La corba de temperatures obtinguda apareix a la Fig. 44.

En la zona de temperatures estudiada, la velocitat inicial de reacció augmenta en augmentar la temperatura i no s'observaren símptomes de desnaturalització.

5.3.7.2. VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V EN VARIAR LA TEMPERATURA. DETERMINACIÓ DE ΔH° I ΔE

L'estudi de la variació de la K_m en variar la temperatura permet calcular el valor de l'entalpia standard de la reacció si s'aplica l'equació de Van't Hoff (vegeu 4.10.2.). A partir de la variació de la V amb la temperatura i mitjançant l'equació d'Arrhenius (vegeu 4.10.1.) es pot determinar el valor de l'energia d'activació.

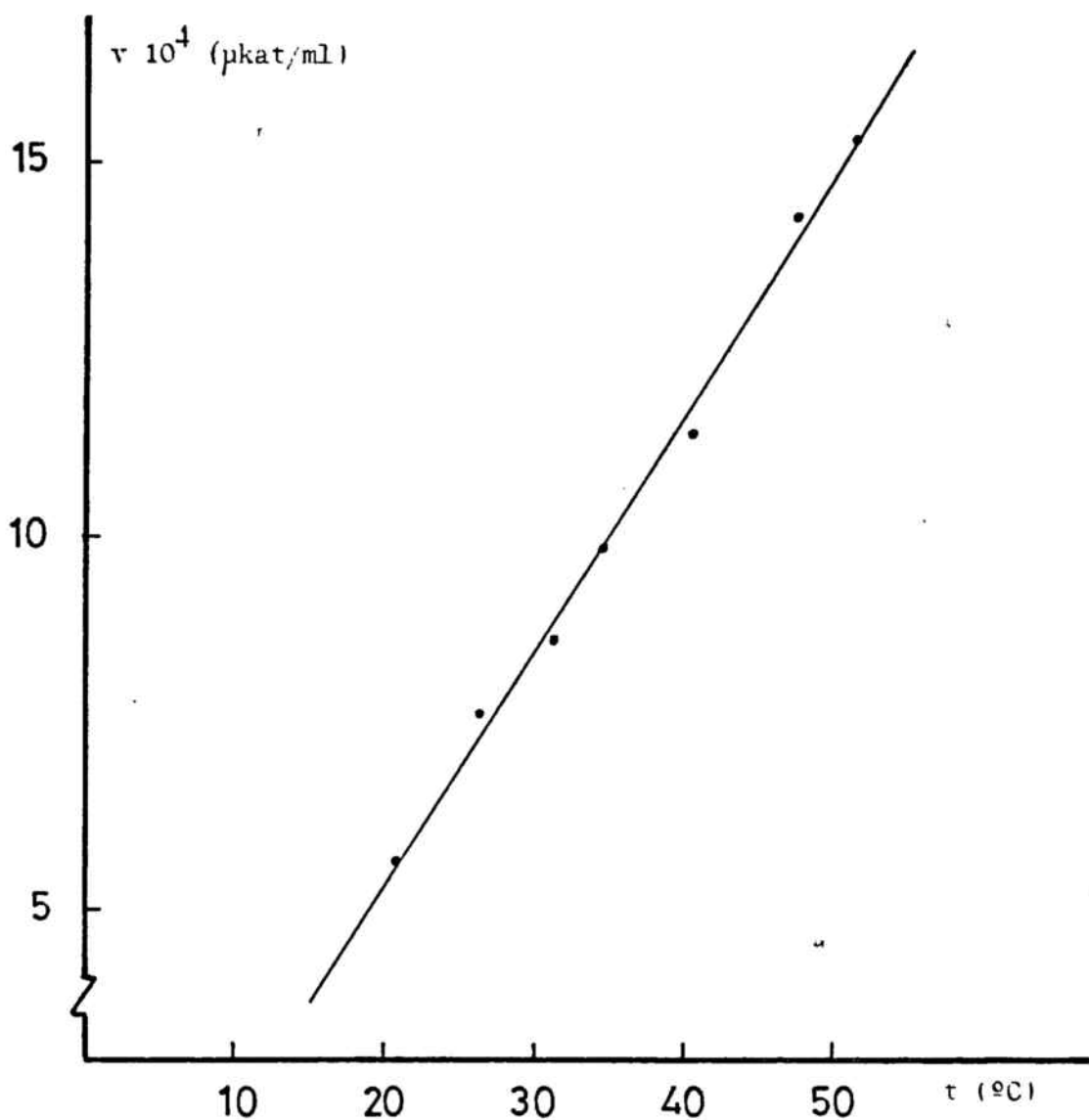


FIGURA 44.- VARIACIÓ DE L'ACTIVITAT ADENOSINA DESAMINASA D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA AMB LA TEMPERATURA

L'activitat es mesurà amb una concentració d'adenosina de $5 \cdot 10^{-5} M$ en un tampó tris-HCl 30 mM, sacarosa 0,28 M pH 7,4.

La determinació de les K_m i V a les diverses temperatures s'efectuà utilitzant un marge de concentracions d'adenosina entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M. La Taula XXI resumeix els valors obtinguts de K_m i V a les diverses temperatures.

El pendent de la recta que resulta de representar $-\log K_m$ en front de $1/T$ (K^{-1}) permet determinar el valor de l'entalpia standard de la reacció: $\Delta H^\circ = 5,0 \pm 0,2$ Kcal/mol (vegeu Fig. 45a).

TAULA XXI
VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V AMB LA TEMPERATURA

TEMP, (° C)	K_m (M)	$-\log K_m$	V (μ kat)	$\log V$
21,0	$3,6 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,44	$1,08 \cdot 10^{-3} \pm 0,02 \cdot 10^{-3}$	-2,97
26,5	$4,2 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,38	$1,57 \cdot 10^{-3} \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$	-2,80
31,5	$4,6 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	4,34	$1,90 \cdot 10^{-3} \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$	-2,72
34,5	$5,1 \cdot 10^{-5} \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$	4,29	$2,2 \cdot 10^{-3} \pm 0,7 \cdot 10^{-3}$	-2,66
40,5	$6,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,20	$2,93 \cdot 10^{-3} \pm 0,05 \cdot 10^{-3}$	-2,53
47,5	$7,2 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	4,14	$3,98 \cdot 10^{-3} \pm 0,09 \cdot 10^{-3}$	-2,40
51,5	$8,0 \cdot 10^{-5} \pm 1,0 \cdot 10^{-5}$	4,10	$4,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$	-2,34

La concentració d'adenosina varià entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M en tampó tris-HCl 30 mM pH 7,4, sacarosa 0,28 M.

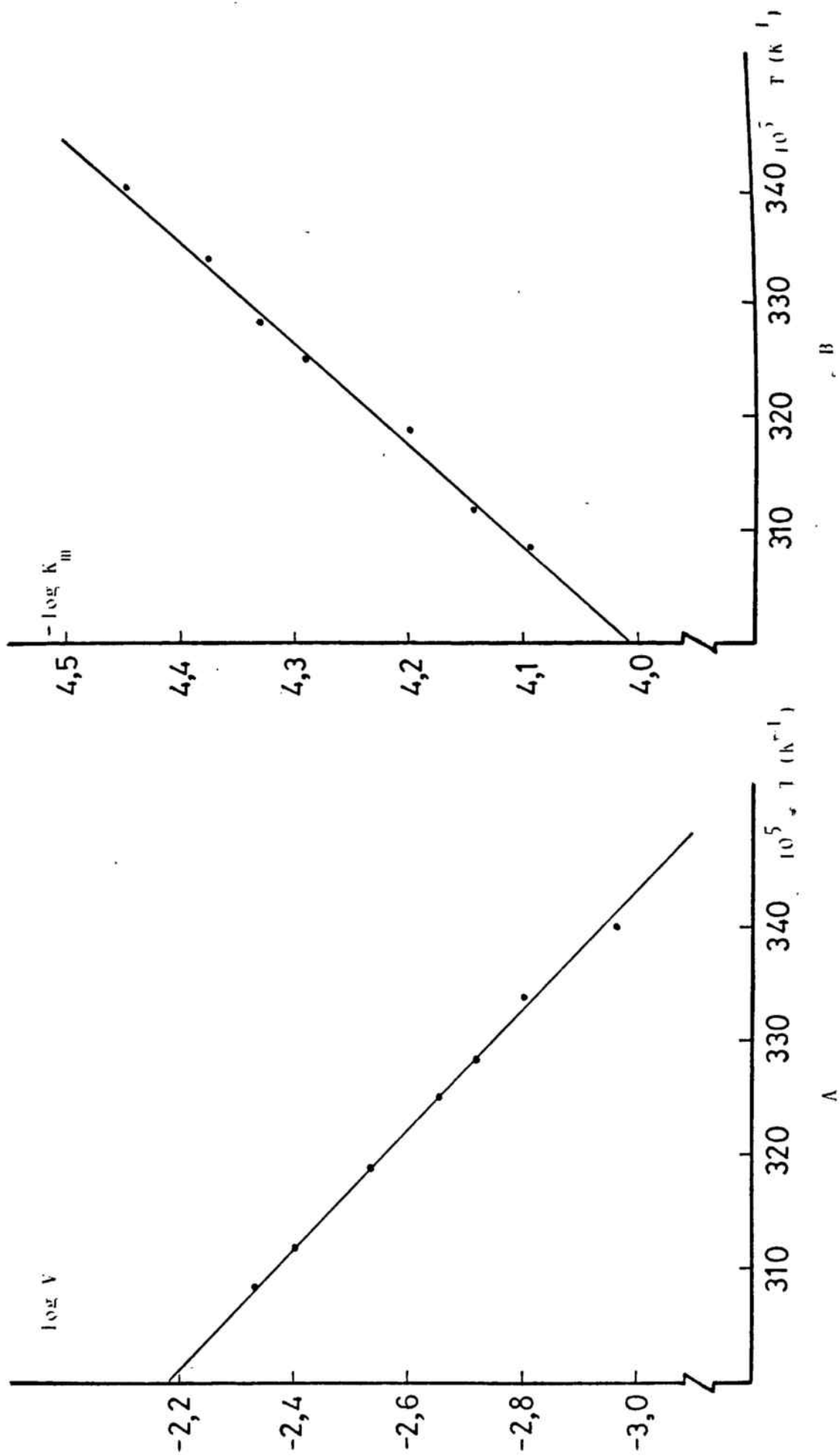


FIGURA 45 .- A) REPRESENTACIO D'ARRHENIUS PER AL CALCUL DE L'ENERGIA D'ACTIVACIO
 B) REPRESENTACIO DE VAN'T HOFF PER AL CALCUL DE L'ENTALPIA STANDARD DE REACCIO

El tampó utilitzat fou de pH 7,4 proporcionat per tris-HCl 30 mM amb sacarosa 0,28 M.

A partir de la representació de $\log V$ en front de $1/T$ (K^{-1}) es pot determinar el valor de l'energia d'activació: $\Delta E = 8,9 \pm 0,2$ Kcal/mol (vegeu Fig. 45b).

5.3.8. EFECTE DEL pH EN L'ACTIVITAT ADA

L'efecte de la concentració de H^+ en l'activitat de l'enzim purificat de fracció soluble de cervell de rata es determinà en l'interval de valors de pH 5,0 a 8,5 proporcionat pel tampó tris 30mM acetat-acètic 38mM.

Es preparà una dissolució 5 mM d'adenosina en aigua destil·lada i a partir d'aquesta i per dilucions amb els diferents tampons s'obtingué la dissolució 0,2 mM d'adenosina en cada un dels tampons tris-acètic-acetat de pH variable. Es comprovà el pH de cada dissolució, així com el de cada una de les mescles d'incubació amb l'enzim.

En els apartats següents s'estudià el pH òptim d'actuació del sistema adenosina-ADA-inosina i l'efecte del pH en els valors de K_m i V del sistema.

5.3.8.1. pH ÒPTIM D'ACTUACIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA

Per a determinar el pH òptim de reacció de l'adenosina desaminasa s'utilitza una concentració d'adenosina en cubeta de $5 \cdot 10^{-5}$ M. El gràfic de la Fig. 46 mostra la variació de la velocitat de reacció amb el pH:

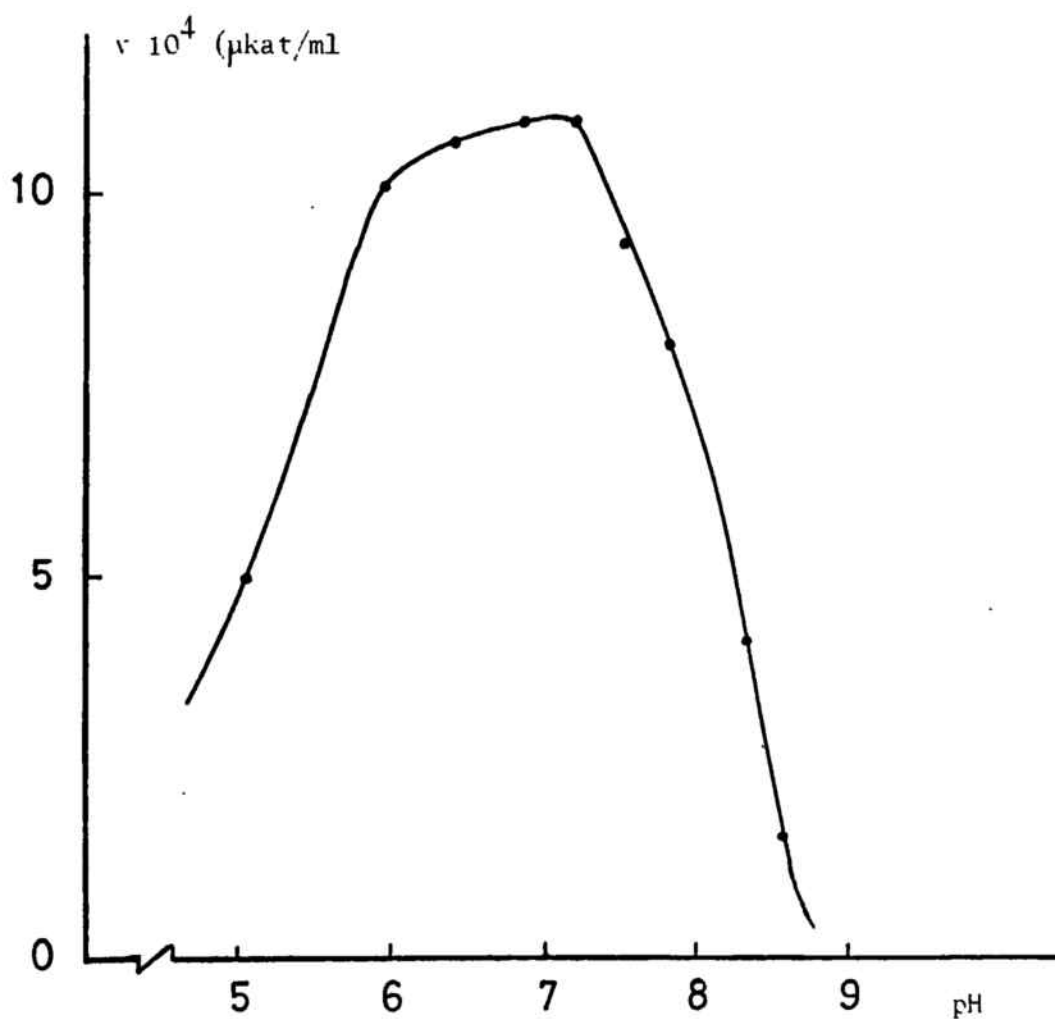


FIGURA 46.- VARIACIÓ DE L'ACTIVITAT ADENOSINA DESAMINASA D'ESCORÇA CEREBRAL DE RATA AMB EL pH

L'activitat es mesurà amb una concentració d'adenosina de $5 \cdot 10^{-5}$ M en diversos tampons tris-acètic-acetat 30 mM en tris i 38 mM en acètic-acetat a una temperatura de $30,0 \pm 0,1^\circ$ C.

en ell es pot observar que l'adenosina desaminasa purificada de fracció soluble de cervell de rata presenta un pH òptim comprès entre 6,8 i 7,2.

L'efecte del pH sobre l'enzim és reversible, ja que s'ha observat que després de tractar durant 30 min l'enzim amb els dos tampons extrems, l'activitat a pH 7,4 es manté i és la mateixa que quan l'enzim no ha estat en contacte amb aquests tampons.

5.3.8.2. VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V EN VARIAR EL pH

La determinació de les K_m i V als diferents valors de pH s'efectuà utilitzant un marge de concentracions d'adenosina entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M. Els valors dels paràmetres cinètics determinats als diferents pH es recullen en la Taula XXII.

La representació gràfica dels valors expressats en aquesta Taula, segons el mètode proposat per Dixon (143), apareix en la Fig. 47. En representar els valors de $\log V$ per a cada valor de pH es poden apreciar els grups ionitzables amb valors de pK que oscil·len entre 6,5 i 6,15; 7,0 i 7,2 i entre 8,2 i 8,3. Aquests grups han de pertànyer al complex enzim-substrat, ja que en variar el pH canvia la seva dissociació i afecta al valor de la V .

En la representació de pK_m per a cada valor de pH s'aprecien grups ionitzables en els mateixos valors de pK . Els valors de pK trobats suggereixen l'existència en el centre actiu de l'enzim d'un grup imidazola

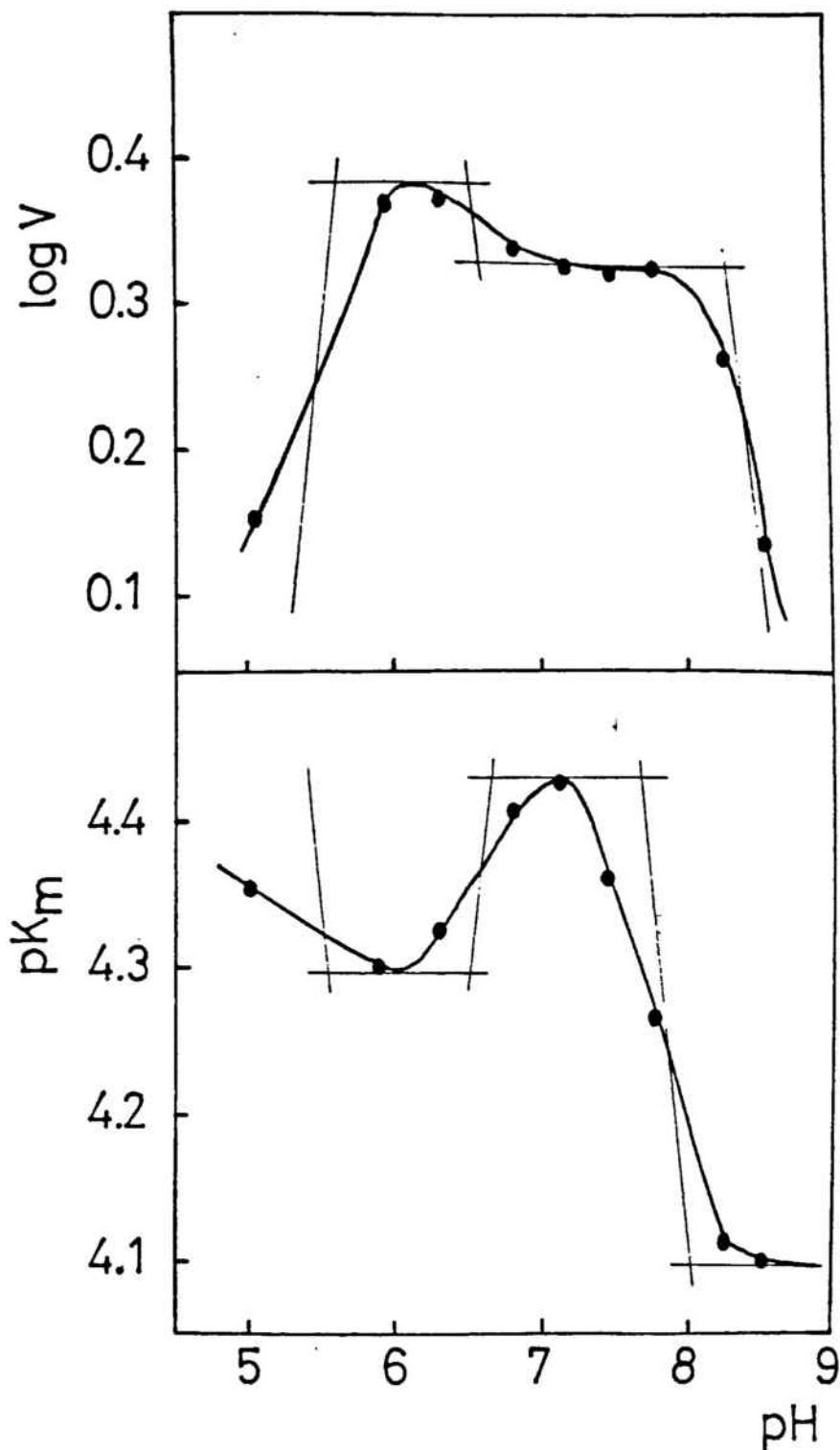


FIGURA 47.- VARIACIÓ DE LA K_m I LA V AMB EL pH

La concentració d'adenosina varià entre $1 \cdot 10^{-5} M$ i $9 \cdot 10^{-5} M$ en diversos tampons tris 30 mM acètic-acetat 38 mM. La temperatura fou de $30,0 \pm 0,1^\circ C$.

procedent d'un reste d'histidina, amb $pK = 6,0$; d'un grup d'un reste amb $pK = 7$ i d'un grup sulfhidril d'un reste de cisteïna, amb $pK = 8,33$. A la zona bàsica no es pot descartar l'existència d'un grup α -amino, amb pK entre 7,5 i 8,5 (144).

TAULA XXII
VARIACIÓ DE LA K_m I DE LA V AMB EL pH

pH	K_m (M)	$-\log K_m$	V (μ kat)	$\log V$
5,05	$4,4 \cdot 10^{-5} \pm 0,5 \cdot 10^{-5}$	4,36	$2,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	-2,70
5,95	$5,0 \cdot 10^{-5} \pm 0,5 \cdot 10^{-5}$	4,30	$3,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	-2,48
6,35	$4,7 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,33	$3,35 \cdot 10^{-3} \pm 0,06 \cdot 10^{-3}$	-2,47
6,85	$3,9 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,41	$3,07 \cdot 10^{-3} \pm 0,08 \cdot 10^{-3}$	-2,51
7,20	$3,7 \cdot 10^{-5} \pm 0,3 \cdot 10^{-5}$	4,43	$3,01 \cdot 10^{-3} \pm 0,09 \cdot 10^{-3}$	-2,52
7,50	$4,3 \cdot 10^{-5} \pm 0,1 \cdot 10^{-5}$	4,37	$2,97 \cdot 10^{-3} \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$	-2,52
7,80	$5,4 \cdot 10^{-5} \pm 0,6 \cdot 10^{-5}$	4,27	$3,0 \cdot 10^{-3} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$	-2,52
8,30	$7,7 \cdot 10^{-5} \pm 0,4 \cdot 10^{-5}$	4,11	$2,61 \cdot 10^{-3} \pm 0,03 \cdot 10^{-3}$	-2,58
8,55	$7,9 \cdot 10^{-5} \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$	4,10	$1,94 \cdot 10^{-3} \pm 0,04 \cdot 10^{-3}$	-2,71

La concentració d'adenosina varià entre $1 \cdot 10^{-5} M$ i $9 \cdot 10^{-5} M$ en tampó tris 30 mM acetat-acètic 38 mM. La temperatura de treball fou $33,0 \pm 0,1^\circ C$.

5.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA L'ADA DE CERVELL DE RATA

L'adenosina desaminasa purificada segons (5.3.1.) s'injectà a dues conilles albines (raça New Zealand) per tal d'obtenir l'anticòs anti-ADA. El programa de les injeccions efectuades fou el que s'indica a l'apartat (4.4.).

Un cop obtingut el sèrum, que contenia una activitat ADA de $8 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{mol} / \text{seg ml}$ sèrum, es procedí a la purificació de la fracció immunoglobulínica, segons el mètode descrit en (4.4.). Aquesta purificació va permetre eliminar l'activitat adenosina desaminasa del sèrum de conill, que interfereix en les determinacions de l'adenosina desaminasa de cervell de rata.

La Taula XXIII mostra un resum de les etapes de la purificació, on s'indiquen la quantitat d'anticòs i de proteïna corresponent a cada etapa. Per a la confecció d'aquesta Taula es va definir una unitat d'anticòs com la quantitat d'anticòs que, en tractar-la 30 min amb una quantitat igual d'enzim amb una activitat de $1 \cdot 10^{-4}$ $\mu\text{mol} / \text{seg}$ redueix un 10% l'activitat adenosina desaminasa (és a dir, baixa l'activitat de $5 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{mol} / \text{seg}$ a $4.5 \cdot 10^{-5}$ $\mu\text{mol} / \text{seg}$).

TAULA XXIII

PURIFICACIO DELS ANTICOSSOS ANTI-(ADENOSINA DESAMINASA DE CERVELL DE RATA)

	Volum (ml)	Unitats d'anticòs	Proteïna (mg)	Activitat específica (unitats/mg)	Factor de purificació	Rendiment
1. Sèrum inicial	16	12,0	707,04	0,0170	1,00	100%
2. Sulfat d'amoni	10	11,5	190,2	0,0605	3,56	95,8%
3. DEAE-Sepharosa	20	10,2	106,0	0,0962	5,66	85,0%

5.4.1. IMMUNOELECTROFORESI DELS ANTICOSSOS PURIFICATS

Per a seguir el procés de purificació de les immunoglobulines del sèrum de conill es va realitzar una immunoelectroforesi sobre agar de les diverses fraccions obtingudes a mesura que avança el procés de purificació, utilitzant com a anticòs un sèrum de cabra anti- sèrum complet de conill comercial (vegeu 4.6.4.).

La Figura 48 mostra la desaparició de bandes no-immunoglobulíniques a mesura que avança la purificació, així com la presència d'una única banda (la de les immunoglobulines) en l'etapa final de la purificació.

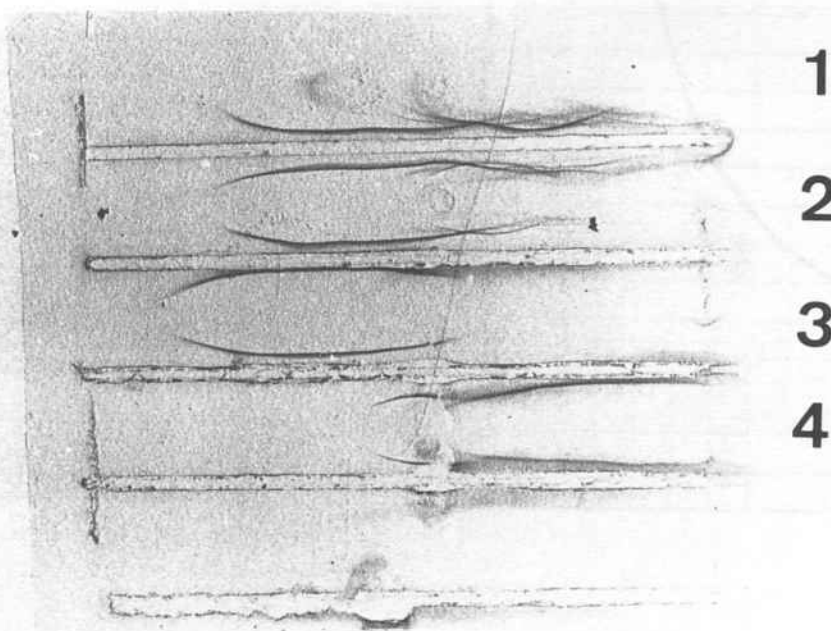
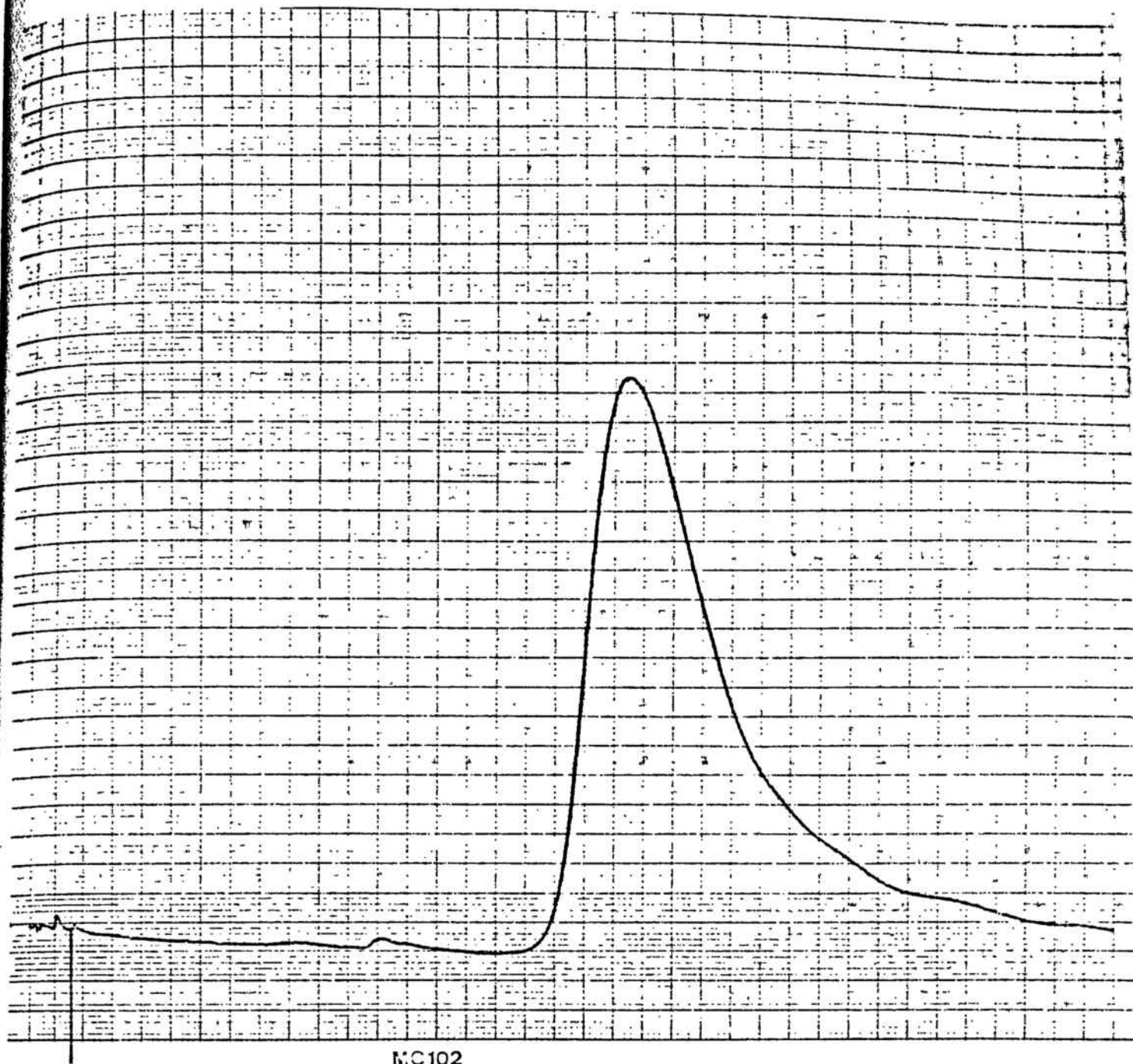


FIGURA 48.- IMMUNOELECTROFORESI PER A SEGUIR LA PURIFICACIÓ DELS ANTICOSSOS

- 1.- Sèrum complet
- 2.- Precipitat amb $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 3.- Eluït de la DEAE-Sepharosa
- 4.- Rentat de la DEAE-Sepharosa amb NaCl 4 M



M.C102

FIGURA 49.- CROMATOGRAFIA PER HPLC DE LA FRACCIÓ IMMUNOGLOBULÍNICA

Per HPLC es va obtenir un únic pic en treballar amb una columna Protein Pack 300-SW amb un tampó de fosfats de sodi 50 mM pH 7,0 i a un flux de 0,5 ml/min.

5.4.2. CROMATOGRAFIA PER HPLC

Les immunoglobulines purificades s'aplicaren a una columna tipus Protein Pack 300-SW de 300 x 7.5 mm (Millipore Waters) amb un suport silica-glicerilpropilsilà, de partícules esfèriques de 10 µm de diàmetre i de 250 Å de diàmetre de porus. La solució de tampó utilitzada fou de fosfats de sodi 50 mM de pH 7.0 i el flux de la bomba fou de 0.5 ml/min.

La Figura 49 mostra el pic que apareix en la cromatografia, que indica que el purificat d'immunoglobulines només conté proteïnes en la zona immunoglobulínica, fet que concorda amb la immunoelectroforesi que mostra una única banda de immunoglobulines (vegeu 5.4.1.).

5.4.3. INHIBICIÓ DE L'ADA DE CERVELL DE RATA PELS ANTICOSSOS

La unió dels anticossos a l'enzim va provocar una inhibició de l'activitat adenosina desaminasa, que podia ser observada fàcilment quan s'utilitzava la fracció immunoglobulínica purificada. Aquesta fracció immunoglobulínica no posseïa activitat adenosina desaminasa, ja que l'enzim del sèrum de conill es va separar de les immunoglobulines en la columna DEAE-Sepharosa. Es va comprovar mitjançant un control de sèrum de conill abans d'injectar l'antigen, que el sèrum de conill no inhibeix l'adenosina desaminasa de cervell de rata; la inhibició trobada és, per tant, deguda a l'anticòs anti- ADA de cervell de rata.

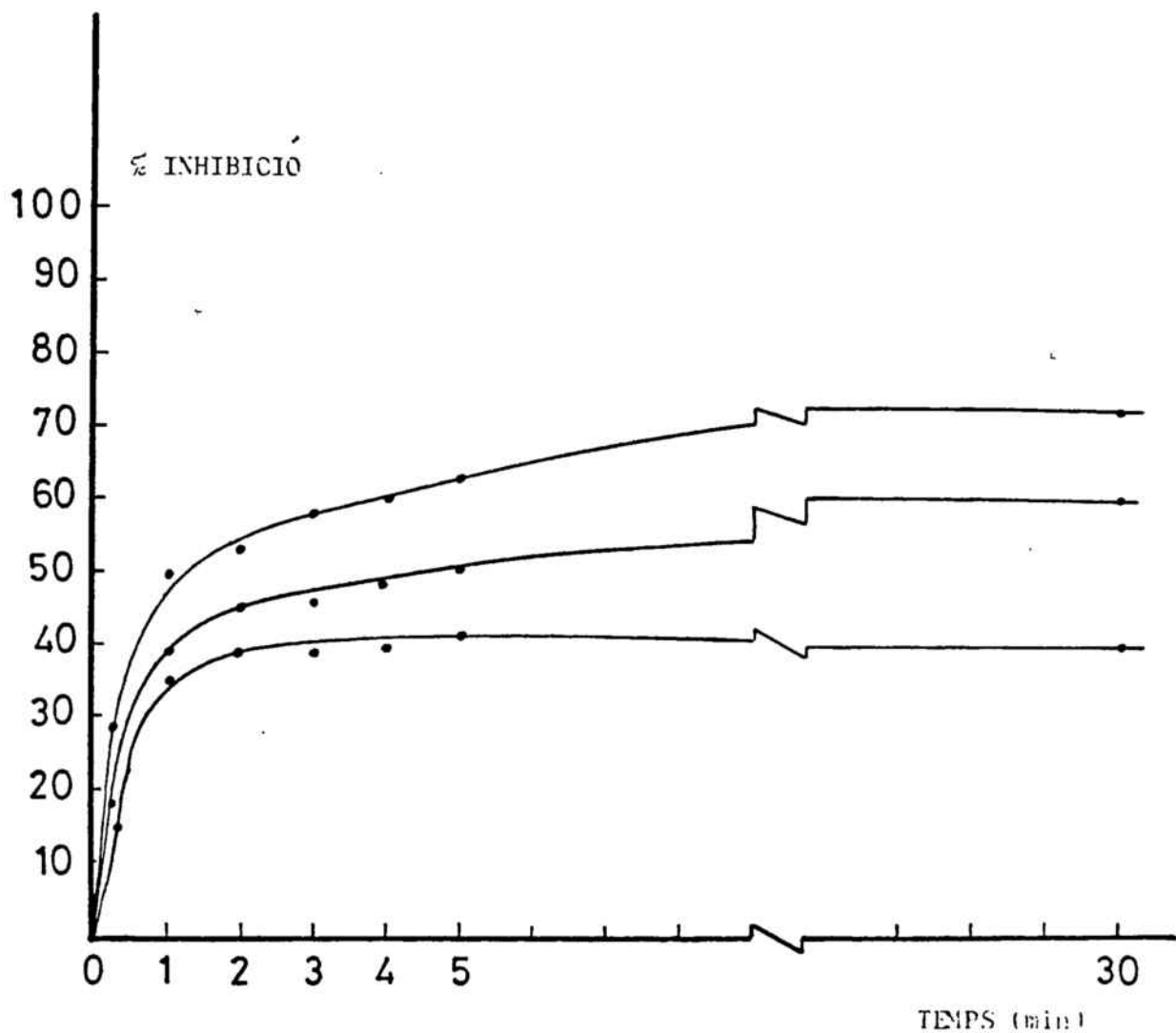


FIGURA 50.- INHIBICIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA D'ESCORÇA DE CERVELL DE RATA PELS ANTICOSSOS SEGONS EL TEMPS DE CONTACTE

Els anticossos s'incubaren amb l'enzim durant intervals de temps variables a $30,0 \pm 0,1^{\circ} \text{C}$. A partir dels 30 min de contacte, la inhibició és la mateixa. De dalt a baix, la concentració de l'enzim fou: $1 \cdot 10^{-3} \text{ U}$, $2,5 \cdot 10^{-3} \text{ U}$ i $5 \cdot 10^{-3} \text{ U}$.

En els estudis que es descriuen a continuació, s'utilitzà la fracció immunoglobulínica purificada (5.3 mg proteïna/ml) i adenosina desaminasa de cervell de rata purificada (3 µg proteïna/ml).

5.4.3.1. INHIBICIÓ DE L'ADA PELS ANTICOSSOS SEGONS EL TEMPS DE CONTACTE ANTÍGEN-ANTICÒS

La inhibició de l'adenosina desaminasa de cervell de rata per l'anticòs depén del temps en què l'enzim està en contacte amb l'anticòs. Per a comprovar aquest fet es van barrejar 0.1 ml de la solució d'immunoglobulines purificades amb 0.1 ml de diferents solucions d'adenosina desaminasa de cervell de rata, i es van incubar a 30° C durant diverses etapes de temps.

La Figura 50 mostra que el grau de inhibició és més elevat als primers 5 minuts de contacte enzim-anticòs a 30° C, i després de 30 min de contacte la inhibició és la mateixa. També s'observa al gràfic que la inhibició és més petita com més alta és l'activitat de l'enzim. La concentració d'adenosina utilitzada per a determinar l'activitat de l'enzim fou $5 \cdot 10^{-5}$ M.

5.4.3.2. TIPUS D'INHIBICIÓ DE L'ANTICÒS

Un cop observat que la inhibició és màxima als 30 min de contacte antigen-anticòs a 30° C, es procedí a determinar el tipus de inhibició. Es

van mesclar diverses quantitats d'anticòs amb la mateixa quantitat d'enzim i s'incubaren durant 30 min a 30° C. La mesura d'activitat s'efectuà a continuació, utilitzant una concentració d'adenosina que variava entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M, entre 0 i 9 unitats d'anticòs i una concentració d'ADA de $3,7 \cdot 10^{-3}$ μ kat.

Com s'observa al gràfic de Lineweaver-Burk (Fig. 51), la inhibició és de tipus no-competitiva, amb els següents paràmetres cinètics:

$$V = 6.3 \cdot 10^{-3} \pm 0.3 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol/s ml}$$

$$K_m = 3.6 \cdot 10^{-5} \pm 0.4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

$$K_i = 0.044 \pm 0.002 \text{ unitats}$$

5.4.3.3. INHIBICIÓ SEGONS LA CONCENTRACIÓ DE L'ADA I DE L'ANTICÒS

La dependència amb el temps d'un procés inhibitor és un indicatiu d'una inhibició irreversible. Tanmateix, els inhibidors irreversibles poden donar una il·lusió d'una cinètica inhibitora no competitiva, amb valors de " K_i " que depenen de la concentració enzimàtica i del temps de contacte enzim-inhibidor (141).

Per a comprovar si la inhibició era irreversible es procedí amb el mètode de les dilucions enzim-inhibidor; ja que la diàlisi no separaria l'enzim de les immunoglobulines encara que aquesta inhibició fos reversible.

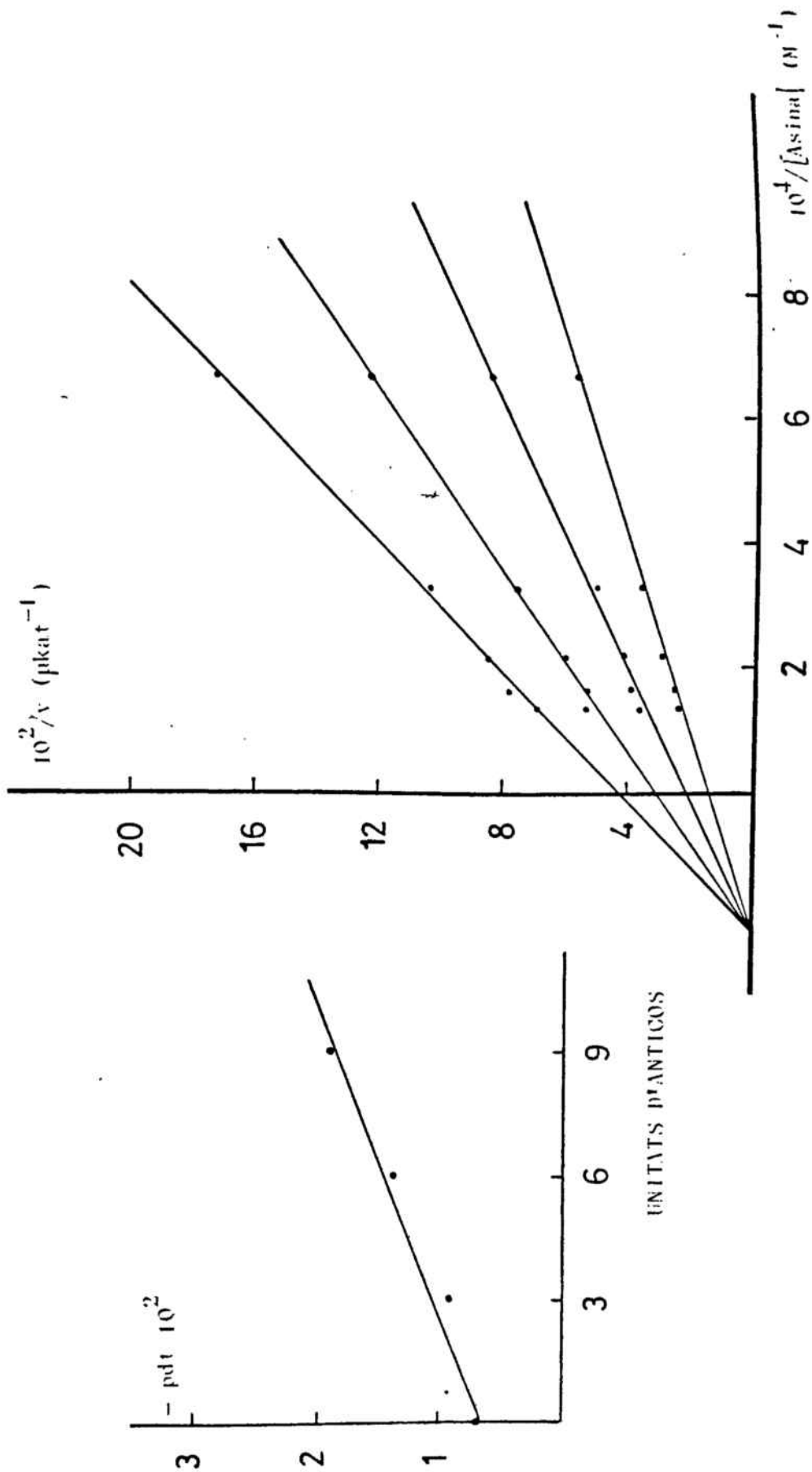


FIGURA 51.- REPRESENTACIÓ DE LINEWEAVER-BURK DE LA INHIBICIÓ DE L'ADENOSINA DESAMINASA PER LA FRACCIÓ IMMUNOGLOBULÍNICA

La concentració d'adenosina varià entre $10 \mu\text{M}$ i $90 \mu\text{M}$ i el temps de contacte antígen-anticòs fou de 30 min a $30 \pm 0,19^\circ\text{C}$. La concentració d'anticòs augmenta de baix a dalt: 0 unitats, 3 unitats, 6 unitats i 9 unitats.

Es van preparar solucions amb barreges diferents d'enzim i d'anticòs purificats, completant fins a un volum final de 1 ml amb tampó imidazola-HCl 30 mM pH 7.2. Aquestes barreges es van incubar 30 min a 30° C i es va determinar l'activitat adenosina desaminasa utilitzant una concentració d'adenosina de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

La Figura 52 mostra l'activitat de l'enzim en funció del volum de la solució enzimàtica. S'observa que per a una concentració determinada de immunoglobulines, en augmentar la concentració de l'enzim, la recta tendeix al paral·lelisme amb la recta control (sense immunoglobulines). Aquest fet és també característic dels inhibidors irreversibles.

A la Figura 53 es representa l'activitat de l'enzim en funció de les unitats d'anticòs. En aquest gràfic s'observa també que com més elevada és la concentració de l'enzim més acusat es el pendent de la corba de inhibició. Així, la inhibició produïda per una mateixa quantitat d'immunoglobulines és més elevada com més activa és la solució enzimàtica.

Per a acabar de confirmar la irreversibilitat de la inhibició s'estudià l'efecte de les dilucions sobre barreges d'enzim i anticòs que s'havien tractat prèviament durant 30 min a 30° C. Els valors de la Taula XXIV confirmen que la inhibició de les IgGs anti- ADA de cervell de rata sobre l'enzim és irreversible ja que en diluir 1/2 diverses mescleres d'enzim i anticòs, les activitats no passen a ser la meitat. Mentre que a activitats elevades aquesta relació s'acosta a 2, a concentracions d'enzim baixes aquesta relació s'allunya bastant.

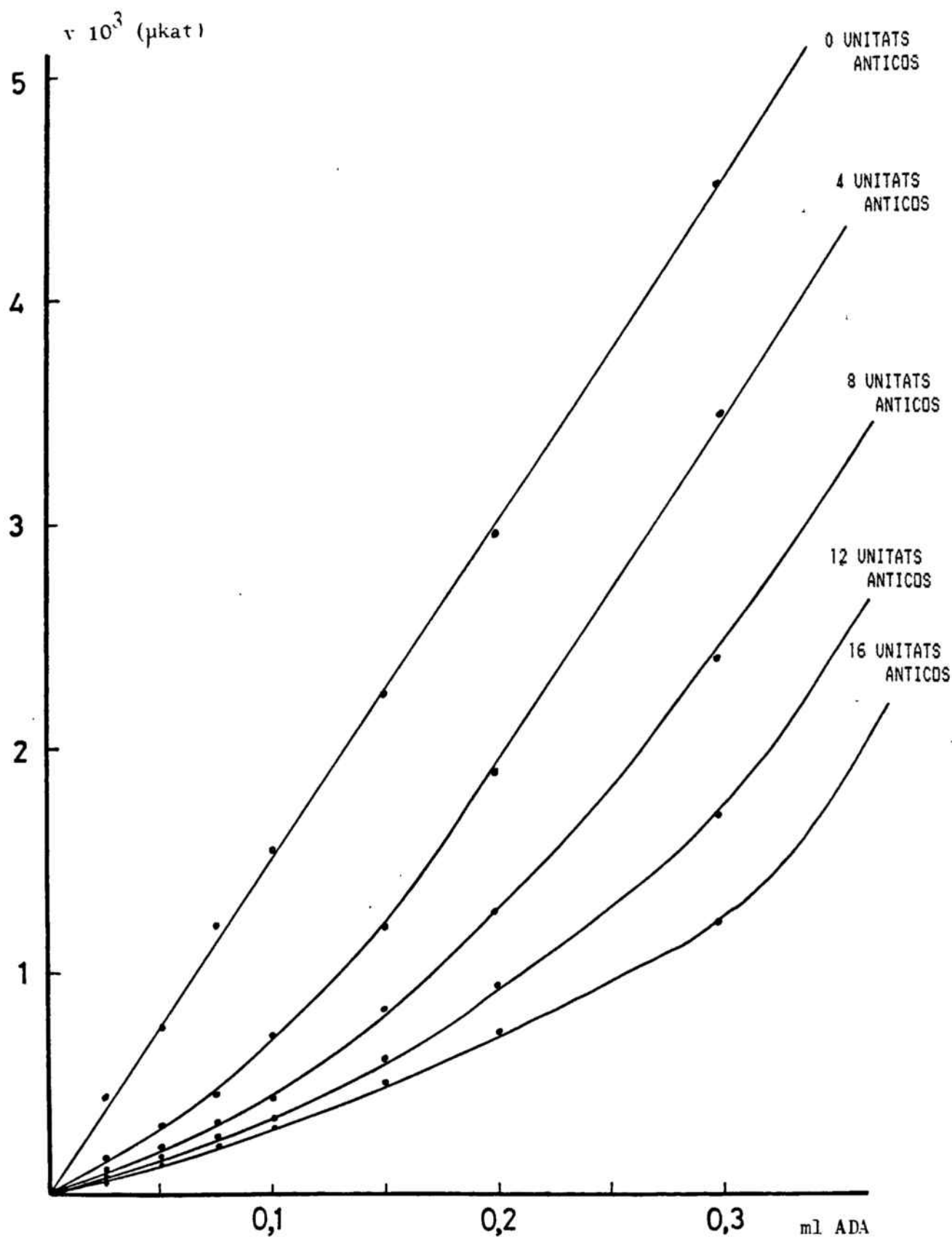


FIGURA 52.- REPRESENTACIÓ DE L'ACTIVITAT DE L'ENZIM EN FUNCIÓ DEL VOLUM DE LA SOLUCIÓ ENZIMÀTICA EN VARIAR LA CONCENTRACIÓ DE L'ANTICÒS.

La concentració d'adenosina en cubeta va ser de $5 \cdot 10^{-5} M$ i el temps de contacte antígen-anticòs, de 30 min a $30 \pm 0,1$ °C.

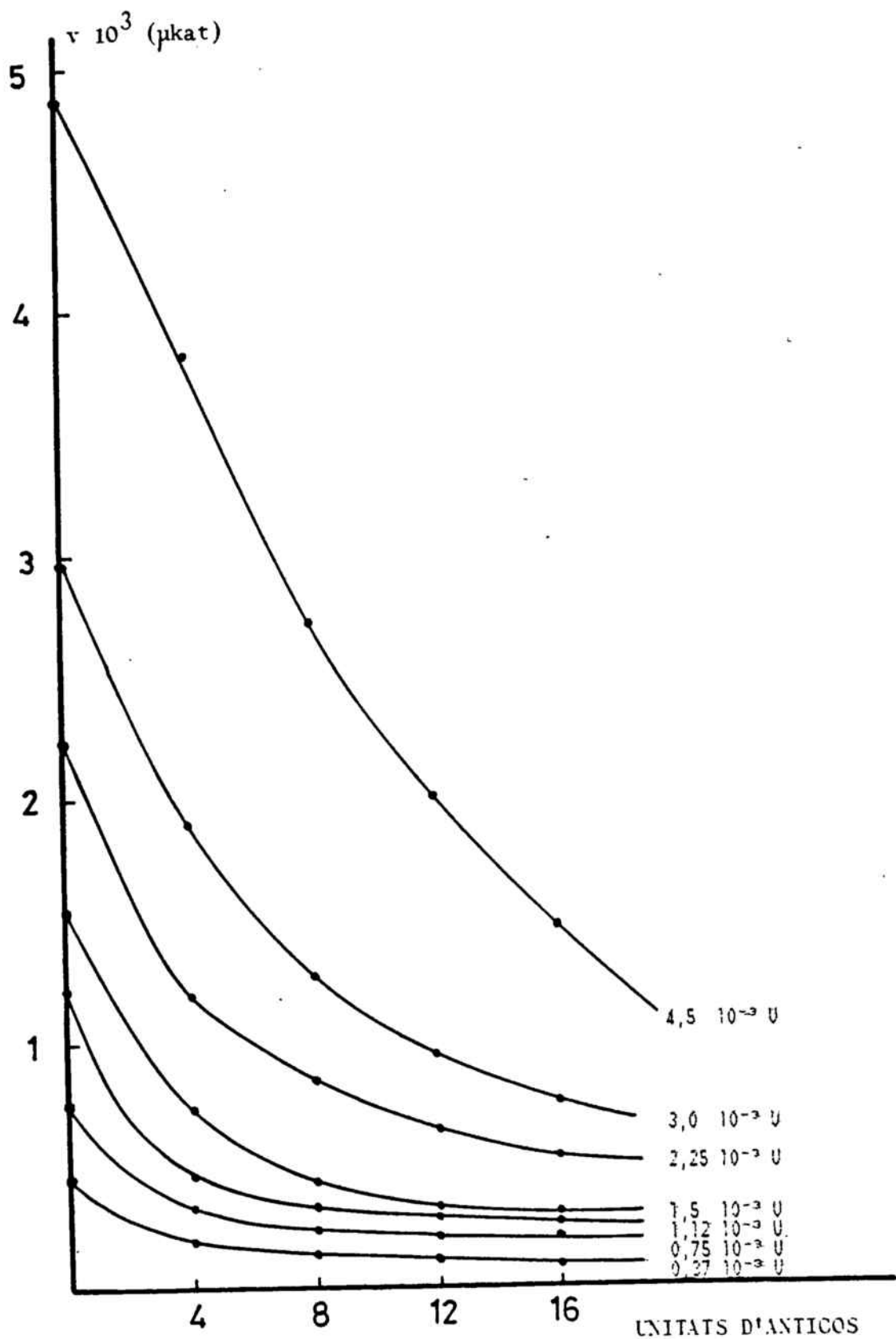


FIGURA 53.- REPRESENTACIÓ DE L'ACTIVITAT DE L'ENZIM EN FUNCIÓ DEL VOLUM DE LA SOLUCIÓ IMMUNOGLOBULÍNICA EN VARIAR LA CONCENTRACIÓ DE L'ADA.

La concentració d'adenosina en cubeta va ser de $5 \cdot 10^{-5}$ M i el temps de contacte antigen-anticòs de 30 min a 30 ± 0.1 °C.

TAULA XXIV

METODE DE LES DILUCIONS PER A COMPROVAR
LA IRREVERSIBILITAT DE LA
INHIBICIÓ PER IgGs

MOSTRA SENSE DILUIR (μ kat)	MOSTRA DILUIDA 1/2 (μ kat)	RELACIÓ
0,02461	0,01326	1,86
0,01246	6,731 10^{-3}	1,85
6,538 10^{-3}	3,077 10^{-3}	2,12
4,461 10^{-3}	2,244 10^{-3}	1,99
3,077 10^{-3}	1,667 10^{-3}	1,84
2,244 10^{-3}	1,090 10^{-3}	2,06
1,308 10^{-3}	8,974 10^{-4}	1,46
5,961 10^{-4}	3,846 10^{-4}	1,55
4,250 10^{-4}	3,205 10^{-4}	1,33
3,846 10^{-4}	3,077 10^{-4}	1,25
3,077 10^{-4}	2,244 10^{-4}	1,37
2,244 10^{-4}	1,846 10^{-4}	1,21

Es va determinar l'activitat de diverses barreges d'enzim i d'anticòs i de les mateixes mostres diluïdes 1/2. La concentració d'adenosina utilitzada fou $5 \cdot 10^{-5}$ M.

5.5. CARACTERÍSTIQUES DE L'ADA DE DIVERSOS TEIXITS DE RATA

5.5.1. ACTIVITATS ADA DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES

Les fraccions solubles de cervell, cerebel, fetge, ronyó, melsa, cor, budell prim, pulmó, múscul -esquelètic i estómac es van obtenir segons (4.1.); si bé per a obtenir homogeneïtzats de pulmó, estómac i múscul esquelètic s'utilitzà un homogeneïtzador d'aspes amb ganivetes. L'activitat ADA de les diverses fraccions solubles es va determinar un cop dessalades aquestes fraccions mitjançant una columna PD-10 (vegeu 4.5.1.). La Taula XXV mostra l'activitat de l'enzim (vegeu 4.8.1.1.) a cada fracció soluble. La concentració d'adenosina en la determinació d'activitat fou $5 \cdot 10^{-5}$ M.

5.5.2. ELECTROFORESI DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES

S'efectuà l'electroforesi de les diverses fraccions solubles (vegeu 4.6.1.) i per tinció específica (vegeu 4.6.6.) s'observà la presència d'una única banda corresponent a una única forma de l'enzim. Aquesta banda de l'adenosina desaminasa presentava la mateixa mobilitat en totes les fraccions considerades, ja que barreges de les diverses fraccions van donar lloc a una sola banda per revelat específic.

TAULA XXV

ACTIVITAT ADENOSINA DESAMINASA DE
DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES DE RATA

TEIXIT	$v \cdot 10^3$ ($\mu\text{kat/g teixit}$)
Pulmó	70 +/- 1
Melsa	62 +/- 3
Budell prim	55 +/- 9
Estómac	42 +/- 8
Ronyó	30,6 +/- 0,2
Cor	8,9 +/- 0,6
Fetge	8,3 +/- 0,1
Múscul esquelètic	3,4 +/- 0,5
Cerebel	1,5 +/- 0,1
Cervell	1,2 +/- 0,2

L'activitat adenosina desaminasa es determinà segons (4.8.1.1.), amb adenosina $5 \cdot 10^{-5}$ M.

5.5.3. ESTUDIS CINÈTICS DE L'ADA DE LES DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES

5.5.3.1. DETERMINACIÓ DE LA K_m I DE LA V

Per a calcular els paràmetres cinètics de l'enzim de les diverses fraccions solubles, es va utilitzar un marge de concentracions d'adenosina entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M. Les velocitats inicials es determinaren segons es descriu en (4.8.1.1.) i a partir d'aquestes velocitats es determinaren

els paràmetres cinètics segons (4.9.). Els valors de K_m i V per a les diverses fraccions solubles es presenten en la Taula XXVI.

TAULA XXVI
PARAMETRES CINÈTICS DE L'ADA DE
DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES DE RATA

TEIXIT	$V \cdot 10^3$ ($\mu\text{kat/g teixit}$)	$K_m \cdot 10^5$ (M)
Pulmó	125 +/- 13	4,9 +/- 0,8
Melsa	123 +/- 42	4,7 +/- 0,3
Budell prim	115 +/- 38	4,1 +/- 0,2
Estómac	95 +/- 13	4,0 +/- 0,2
Ronyó	61 +/- 10	4,1 +/- 0,2
Cor	19 +/- 2	4,3 +/- 0,4
Fetge	17 +/- 2	4,5 +/- 0,1
Múscul esquelètic	7 +/- 1	4,3 +/- 0,5
Cerebel	3,2 +/- 0,7	4,0 +/- 0,6
Cervell	3,1 +/- 0,9	3,8 +/- 0,2

La concentració d'adenosina utilitzada varià entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M.

5.5.3.2. INHIBICIÓ PER ETANOL

La inhibició per etanol de l'ADA de les diverses fraccions solubles s'efectuà utilitzant un marge de concentracions d'adenosina entre $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M i unes concentracions d'etanol fins 1,1 M. L'etanol inhibeix de

forma competitiva l'adenosina desaminasa de les diferents fraccions solubles de rata considerades.

La Taula XXVII mostra les constants d'inhibició per a les diverses fraccions dels teixits de rata considerats.

5.5.3.3. INHIBICIÓ PER DMSO

Per a observar la inhibició de les diverses fraccions solubles amb dimetil sulfòxid es van utilitzar unes concentracions d'adenosina en l'interval $1 \cdot 10^{-5}$ M i $9 \cdot 10^{-5}$ M; mentre que les concentracions del dimetil sulfòxid variaren fins a 1,9 M.

El DMSO és inhibidor competitiu de l'adenosina desaminasa en tots els teixits assajats. Els valors dels paràmetres cinètics corresponents a les diferents fraccions es recullen a la Taula XXVII.

5.5.4. CARACTERÍSTIQUES DE L'ANTICÒS DE L'ADA DE CERVELL DE RATA

5.5.4.1. ESPECIFICITAT DE L'ANTICÒS EN FRONT DE TEIXITS DE RATA

Per tal d'observar l'especificitat de l'anticòs s'analitzà l'efecte d'aquest anticòs anti-ADA de cervell de rata sobre l'adenosina desaminasa d'altres procedències.

TAULA XXVII

INHIBICIÓ DE L'ADA DE DIVERSES FRACCIONS
SOLUBLES DE RATA PER ETANOL I DMSO

TEIXIT	K ₁ (ETANOL) (M)	K ₁ (DMSO) (M)
Pulmó	0,58 +/- 0,05	1,36 +/- 0,07
Melsa	0,60 +/- 0,06	1,7 +/- 0,1
Budell prim	0,69 +/- 0,06	1,40 +/- 0,07
Estómac	0,71 +/- 0,05	1,26 +/- 0,09
Ronyó	0,78 +/- 0,09	1,5 +/- 0,1
Cor	0,58 +/- 0,06	1,4 +/- 0,1
Fetge	0,50 +/- 0,08	1,2 +/- 0,1
Múscul esquelètic	0,54 +/- 0,04	1,10 +/- 0,09
Cerebel	0,66 +/- 0,07	1,1 +/- 0,1
Cervell	0,48 +/- 0,09	0,99 +/- 0,06

La concentració d'adenosina utilitzada varià entre 1 10⁻⁵ M i 9 10⁻⁵ M. Les concentracions d'etanol i de DMSO arribaren fins 1,1 M i 1,9 M, respectivament.

Per això es determinà l'activitat ADA de diverses fraccions solubles a les que s'afegiren 5 unitats de l'anticòs purificat i es van deixar en contacte durant 30 min.

De totes les fraccions solubles assajades, només aquelles que provenien de rata eren inhibides per l'anticòs. L'anticòs anti-ADA de cervell de rata no va afectar l'activitat adenosina desaminasa de les fraccions solubles d'escorça cerebral de bou, de budell de bou ni d'eritrocits humans. La Taula XXVIII presenta l'efecte de l'anticòs sobre l'adenosina desaminasa de les diverses fraccions solubles de rata estudiades.

TAULA XXVIII

INHIBICIÓ DE L'ADA DE DIVERSES FRACCIONS SOLUBLES DE RATA
PER IMMUNOGLOBULINES ANTI-(ADA DE CERVELL DE RATA)

TEIXIT	ESPÈCIE	% INHIBICIÓ
Pulmó	Rata	64 +/- 2
Melsa	Rata	56 +/- 14
Budell prim	Rata	70 +/- 2
Estómac	Rata	72 +/- 7
Ronyó	Rata	80 +/- 2
Cor	Rata	74 +/- 6
Fetge	Rata	69 +/- 4
Múscul esquelètic	Rata	62 +/- 20
Cerebel	Rata	43 +/- 7
Cervell	Rata	48 +/- 8
Cervell	Bou	0
Budell	Bou	0
Eritròcits	Home	0

La concentració d'adenosina utilitzada va ser de $5 \cdot 10^{-5}$ M. Les mostres enzimàtiques es van diluir fins una activitat de $1,0 \cdot 10^{-4}$ - $1,8 \cdot 10^{-4}$ μ kat i es van tractar durant 30 min amb 5 unitats d'anticòs per a determinar la inhibició resultant.

El conjunt de resultats presentats en l'apartat 5.5., pel que fa als estudis cinètics i immunològics, sembla indicar que l'adenosina desaminasa de les diverses fraccions solubles dels teixits de rata considerats és, si no el mateix enzim a tots els teixits, similar pel que fa a l'estructura del centre actiu i del centre immunogeniu a l'enzim de cervell.

6. DISCUSSIÓ

6.1. DIFERENCIES DE LA 5'N I DE L'ADA RESPECTE A ALTRES ENZIMS

El desoxicolat desorganitza les membranes i això permet extreure els enzims associats a les membranes i alliberar els enzims que es troben dins dels orgànuls rodejats per membranes. Això s'ha demostrat en fraccions subcel·lulars d'escorça cerebral de rata (145).

L'activitat ADA de la suspensió de vesícules sinàptiques en sacarosa i la de la suspensió en desoxicolat són molt similars; això suggereix que l'enzim es troba en la cara externa de les vesícules sinàptiques. La presència de la 5'N a les membranes ha estat descrita per diversos autors (34,35,36,46,47,52). Es suggereix que la 5'N, igual que l'ADA, es localitza en la cara externa de les vesícules sinàptiques. Això concorda amb els resultats obtinguts per Franco (32). En altres enzims, en tractar amb desoxicolat s'observa un augment d'activitat. Aquesta aparició d'activitat es deu probablement al fet que en desorganitzar les membranes degut a l'acció del detergent, s'han alliberat els enzims de l'interior dels orgànuls. Això val per a la PNP, GAH, LDH i MDH.

En els sinaptosomes, igual que en les vesícules sinàptiques i en els microsomes, l'ADA i la 5'N es troben també en la cara externa dels orgànuls. Això també s'observa comparant les corresponents activitats de

les suspensions amb sacarosa i amb desoxicolat. Ara bé, si es considera que les vesícules sinàptiques es troben en l'interior dels sinaptosomes, els resultats també indiquen que l'activitat ADA i 5'N en l'interior es molt menor en front de l'activitat exterior.

Aquesta diferència d'ADA i de 5'N respecte als altres enzims estudiats LDH, MDH, PNP i GAH es fa notòria encara si s'observen les activitats globals després del tractament amb desoxicolat en sinaptosomes, vesícules sinàptiques i microsomes. És important, doncs, el fet que, mentre la relació entre la quantitat dels enzims LDH, MDH, PNP i GAH en sinaptosomes, vesícules sinàptiques i microsomes es identifica per a tots ells, l'ADA i la 5'N es troben proporcionalment en quantitats més elevades que la resta dels enzims, tant en vesícules sinàptiques com en sinaptosomes. En el present treball es confirmen els resultats obtinguts per Franco en vesícules sinàptiques (32) i s'extenen els resultats als sinaptosomes. La proporció més elevada d'ADA i 5'N sobre els altres enzims és un altre indicatiu que aquests enzims siguin enzims de membrana.

Això està d'acord amb que la possible inactivació de l'adenosina, considerada com a neurotransmissor (146), s'ha d'efectuar mitjançant l'ADA, enzim que es suposa localitzat en la superfície de les cèl·lules cerebrals (60). Si l'adenosina juga un paper com a neurotransmissor o neurohormona en el sistema nerviós central (146), l'ADA s'hauria de localitzar en determinades zones de les neurones, per exemple, en les sinapsis; i això estaria d'acord amb el fet que l'activitat ADA és elevada en sinaptosomes i en vesícules i membranes sinàptiques (vegeu Taules IV, V i VII).

En el present treball s'ha estudiat també els valors de les constants de Michaelis de la 5'N en front d'AMP i de l'ADA en front d'adenosina, de diversos orgànuls membranosos i de fracció soluble.

Pel que fa referència als paràmetres cinètics de la 5'N, cal destacar que els resultats són similars en totes les fraccions subcel·lulars estudiades, cosa que no concorda amb la presència de dos enzims diferents (en fracció soluble i en orgànuls membranosos). En els experiments cinètics efectuats sobre fraccions particulades es va establir la proporció de l'enzim unit a les membranes de les partícules. L'activitat 5'N solubilitzada per acció de l'AMP va ser molt baixa, un 8% com a màxim (vegeu Taules IX, X i XI). En el cas de l'ADA, l'alliberació de l'enzim particulat per acció de l'adenosina, en canvi, va ser més elevada respecte a l'alliberació de la 5'N, i varià entre un 20 i un 30% segons la fracció particulada (vegeu Taules XIV, XV i XVI). Malgrat això, l'enzim de totes les fraccions particulades, igual que el de fracció soluble, exhibeix en tots els casos una cinètica de Michaelis-Menten. Tampoc s'observen discrepàncies entre els valors de K_m determinats per a l'ADA dels diferents orgànuls subcel·lulars.

A pH 7,4 i 30° C, els valors de K_m per la 5'N utilitzant AMP com a substrat és de $1,4 \cdot 10^{-5}$ M - $1,6 \cdot 10^{-5}$ M segons la fracció estudiada (vegeu Taula XII). Els valors de K_m de 5'N de fracció soluble, de microsomes, de sinaptosomes i de vesícules sinàptiques són anàlegs i això suggereix que es tracta d'un únic enzim. El valor de K_m determinat concorda amb el donat per Purti (147) utilitzant un homogenitzat de cervell de rata $K_m = 1,3 \cdot 10^{-5}$ M), o amb el donat per Segal (148) per a l'enzim de fetge de

rata ($K_m = 1,1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). També concorda amb el valor donat per Mallol per a la 5'N de fracció soluble de cervell de bou (149) ($K_m = 9,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), però difereix del de membranes de tiroides bovina (150) ($K_m = 8,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$).

Els dinucleòtids i els trinucleòtids, i principalment l'ATP, l'ADP i el GTP modulen la 5'N de diversos orígens. En aquest treball i per a l'enzim de cervell de rata s'ha observat que la inhibició per ADP és de tipus competitiu, tant en les fraccions membranoses com en el citoplasma, amb un valor de K_{iP} similar en totes les fraccions subcel·lulars estudiades ($K_{iP} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ M} - 6 \cdot 10^{-7} \text{ M}$) (vegeu Taula XIII). Aquests valors de K_{iP} són molt petits, la qual cosa indica que l'ADP és un potent inhibidor de l'enzim. La petita variació entre els valors de K_{iP} , trobats pels diferents orgànuls subcel·lulars pot ser deguda, per tant, a variacions en l'entorn de l'enzim unit a les diverses fraccions membranoses. La inhibició per ADP té sentit fisiològic si considerem la reacció de l'adenilat quinasa que a partir d'AMP i d'ATP genera dues mol·lècules d'ADP. Quan en una cèl·lula hi ha excés d'ADP és degut sovint a un defecte d'ATP. Llavors és lògic que s'eviti la pèrdua d'AMP pel camí de degradació de purines (inhibint la 5'N) i que s'obtingui més ADP via adenilat quinasa per a fosforilar-lo a continuació per a obtenir energia. El fet que es metabolitzi més AMP per una ruta (via adenilat quinasa) fa que no es metabolitzi tant AMP per una altra ruta (via 5'N). L'enzim de cervell de bou (151) i el de porc (30) són també inhibits fortament i de forma competitiva per l'ADP.

En la present memòria s'ha trobat activitat ADA en les fraccions particulades estudiades, i segons els experiments d'alliberació sembla que l'ADA podria trobarse lligada a les membranes com a proteïna perifèrica. Es pot pensar, degut a la relació que té amb la 5'N i a la diferent facilitat amb la qual s'allibera de les membranes per acció del desoxicolat 0,075%, que es trobessin unides en les membranes; la 5'N com a proteïna constituent i l'ADA com a proteïna perifèrica.

Trams i Lauter van proposar l'any 1975 la hipòtesi de l'existència d'una ADA particulada associada a la membrana plasmàtica en cultius de cèl.lules (60), si bé no van poder demostrar-ho. S'ha observat en diversos teixits que l'activitat ADA es troba lligada a una proteïna anomenada proteïna d'unió de l'ADA, que està associada a les membranes (92). L'ADA s'allibera, en les condicions de treball, en més proporció de les membranes i això podria induir a pensar que es tractés d'un enzim que tingués dues formes en equilibri: una unida a membrana i l'altra no (29,152,153). Això té una importància relativa a l'hora de determinar els paràmetres cinètics, perquè les K_m són del mateix ordre per a totes les fraccions ($K_m = 2 \cdot 10^{-5} \text{ M} - 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) (vegeu Taula XVII), i es pot considerar igual que en el cas de la 5'N que es tracta d'un únic enzim que es localitza en totes aquestes fraccions estudiades.

Franco (32) ha demostrat per igualtat en el recorregut electroforètic que l'ADA de fracció soluble i la de microsomes de cervell de rata correspon a la mateixa forma molecular, dada que concorda amb els resultats esmentats. Els valors de K_m per l'ADA obtinguts en el present treball concorden amb els de l'enzim de cervell de mono (154) ($K_m = 3,2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$

i de eritròcits humans ($K_m = 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) (155), però difereixen del de l'enzim de fetge de bou ($K_m = 8 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) (156). En fetge de bou s'observa que l'ADA no és afectada per la presència de productes de la síntesi de novo ja que l'ATP, el GMP, l'XMP i l'IMP no manifesten la més mínima inhibició (156). En la present memòria s'observa que l'ADA de cervell de rata no és inhibida per ADP.

Cal considerar que els paràmetres cinètics calculats, tant per la 5'N com per l'ADA són paràmetres aparents, donat que considerem que l'aigua, segon substrat de les dues reaccions, es troba en concentració saturant. Les dades cinètiques obtingudes per a ambdós enzims de les diverses fraccions subcel·lulars de cervell de rata són indistinguibles i probablement representen diferents localitzacions dels mateixos enzims. Com que la 5'N i l'ADA de fraccions soluble i microsomal venen principalment del pool intracel·lular, mentre que en sinaptosomes i en vesícules sinàptiques venen de les membranes plasmàtiques (presinàptiques); aquestes similituds suggereixen que és factible el moviment dels dos enzims entre la superfície cel·lular i intracel·lular. Aquest moviment s'ha demostrat per a la 5'N en hepatocits i limfòcits (157) i en fibroblasts (158).

Pel que fa als estudis de microscòpia electrònica per a observar la localització de la 5'N i de l'ADA s'observa que ambdós enzims es troben associats a les membranes de sinaptosomes. Aquests resultats estan d'acord amb els descrits per Kreutzberg i Hussain (159) per a la 5'N. Ara bé, no tots els sinaptosomes tenen 5'N unida a les membranes, la qual cosa indica que no tots els sinaptosomes presents al cervell provenen de nervis purinèrgics. Evidentment, els sinaptosomes que no pertanyessin als

nervis purinèrgics no precisarien l'ADA ni la 5'N units a la seva superfície, ja que no tenen com a neurotransmissor l'adenosina, o l'ATP, i no necessiten metabolitzar-los un cop utilitzats. Però això no està molt clar, perquè l'ATP també es llibera com a cotransmissor en sinaptosomes obtinguts a partir de l'òrgan elèctric del peix Torpedo marmorata, que consta solament de nervis colinèrgics (160).

6.2. ESTUDI DEL TRANSPORT DE L'ADENOSINA

En l'apartat anterior s'ha descrit el diferent comportament de l'ADA i la 5'N en diverses fraccions subcel·lulars respecte als altres enzims estudiats (vegeu 6.1.). S'ha explicat també que aquesta diferència pot ser deguda a que l'ADA i la 5'N es trobin associades a les membranes dels orgànuls subcel·lulars.

La causa de que aquests dos enzims estiguin cap a l'exterior de les cèl·lules és desconeguda. Si s'observés el transport de substrats relacionats amb l'ADA i/o amb la 5'N cap a l'interior dels orgànuls membranosos, es podria pensar en una actuació coordinada de l'ADA i la 5'N com a transportadors de membrana captant adenosina cap a l'interior de la cèl·lula. Tanmateix, les activitats d'aquests dos enzims, juntament amb la de l'adenosina quinasa, regulen la concentració de l'adenosina (161).

En haver treballat sempre en medi que contenia sacarosa 0,28 M, els microsomes, sinaptosomes i vesícules sinàptiques eren sencers o compostos

de membranes tancades de nou. Els sistemes que contenen aquests orgànuls mantenen amb el temps els punts isobèstics adenosina-inosina, tant treballant amb adenosina com amb adenosina i P_i en el medi. En cap cas va disminuir o augmentar l'absorció dels punts isobèstics. Això indica que l'adenosina no entra en les condicions d'assaig dins les partícules. Igualment tampoc entra inosina. Si aquests metabolits haguessin entrat dins dels orgànuls s'hauria observat una variació d'absorció en els punts isobèstics degut a la disminució de concentració en l'exterior d'aquests orgànuls.

Ara bé, es possible que la funcionalitat del sistema de transport sigui molt reduïda o bé que s'hagi perdut completament degut al procés d'homogeneïtzació per a obtenir la fracció particulada. No és possible, però, un tractament més prolongat de les partícules per veure un canvi d'absorció dels punts isobèstics perquè, transcorregut un cert temps a 30°C , es produeix una precipitació d'aquestes partícules.

Degut a la no aparició d'hipoxantina, es confirma que no existeix PNP en l'exterior de les fraccions particulades com ja s'havia observat en l'apartat (6.1.). Si existís PNP es formaria hipoxantina i desapareixeria inosina produint una variació d'absorció en els punts isobèstics en aquells casos en que hi havia P_i en el medi, ja que el sistema inosina-hipoxantina no té els mateixos punts isobèstics que el sistema adenosina-inosina.

Respecte als estudis per HPLC, en cervell sencer tampoc s'observa un transport d'adenosina, així com tampoc es possible observar aparició de

inosina per efecte de l'enzim. Això pot ser degut a la poca activitat de l'enzim a cervell (vegeu 5.5.), ja que en treballar amb budell l'activitat és ben visible.

L'ADA de budell de rata degrada continuament l'adenosina extracel.lular en una proporció bastant elevada. L'enzim es localitza a la cara extracel.lular de la membrana plasmàtica, ja que no s'observen signes de disrupció cel.lular durant els banys de teixits. No s'observa tampoc la presència d'hipoxantina, que podria aparèixer per acció de la PNP sobre la inosina formada i el P_i de la solució de Krebs. De fet, la suma de l'adenosina i de la inosina coincideixen en tot moment amb la concentració d'adenosina inicial.

Aquests resultats concorden amb els estudis efectuats sobre fraccions subcel.lulars de rata observant la no variació dels punts isosbèstics (resultats discutits en aquest mateix apartat). El fet que l'enzim s'uneixi amb la proteïna d'unió de l'ADA, proteïna intrínseca de membrana (92) i la demostració d'una topologia similar entre la 5'N i l'ADA (vegeu 5.1.) també estan d'acord amb els fets aquí descrits.

El dilazep és un inhibidor del transport d'adenosina, mentre que l'EHNA és un potent inhibidor de l'ADA, tal com es pot veure en l'apartat (5.2.). En el present estudi s'ha observat que els dos compostos estudiats inhibeixen l'enzim. Això podria suggerir que l'ADA actués com a transportador de l'adenosina, donat que els compostos que inhibeixen el transport també inhibeixen l'enzim, amb més o menys potencia. Aquest fet està d'acord amb Green, que suggereix que el transport d'adenosina i l'ADA

no actuen independentment, ja que l'EHNA afecta la cinètica del transport de l'adenosina (162). Ara bé, per a veure si l'enzim és el responsable del transport de l'adenosina caldrien estudis més extensos. Seria, doncs necessari recórrer a compostos marcats radioactivament en l' NH_2 del C_6 de l'adenosina.

6.3. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE L'ADA DE FRACCIÓ SOLUBLE DE CERVELL DE RATA

La similitud en les característiques cinètiques de l'ADA de les diverses fraccions subcel.lulars d'escorça cerebral de rata (vegeu 5.1.2.2.) justifica que s'utilitzi com a material de partida en la purificació el sobrenedant de la ultracentrifugació a 105.000xg d'un homogeneïtzat de cervell de rata en sacarosa 0,28 M tris-HCl 30 mM pH 7,4. En la electroforesi d'aquesta fracció soluble apareix només una banda d'activitat ADA per revelat específic. L'electroforesi del purificat mostra també una única banda, tant per revelat específic com per revelat general de proteïnes (vegeu 5.5.2.).

Pel mètode de Andrews (123) es determinà el pes mol.lecular aparent del purificat (35.000). D'acord amb la classificació de Fisher (75, 78), la única forma que apareix en cervell de rata és la forma C, de pes mol.lecular petit. El valor de pes mol.lecular obtingut és similar al de la forma C de granota (75), pollastre (78), mamífers (65, 79, 83) i teixits humans (84).

La composició d'aminoàcids del purificat és similar a la de la forma C d'altres mamífers (80, 82, 84, 85), si bé la GLY és bastant elevada i la VAL disminuïda (vegeu Taula XIX). Pel que es pot veure a la Taula XIX l'enzim presenta una proporció bastant elevada de GLU i ASP; per això el seu punt isoelectric és a la zona àcida ($pI = 5,2 \pm 0,2$). Aquest valor concorda amb el punt isoelectric de la forma C de budell de conill ($pI = 4,94-5,12$) (86), de mucosa de budell de bou ($pI = 4,8-4,9$) (163, 164), de duodè de pollastre ($pI = 5,0$) (72), de fetge de bou ($pI = 4,8$) (83) i de eritròcits humans ($pI = 4,7-5,05$) (165).

L'energia d'activació de la forma C determinada segons la representació d'Arrhenius és de 8,9 Kcal/mol. Aquest valor es comparable amb el de l'enzim d'eritròcits humans (165) (8 Kcal/mol) i el de fetge de bou (8,85 Kcal/mol) (83) i indica que es necessita relativament poca energia per a provocar la reacció d'hidròlisi. El valor d'energia d'activació es troba dins del límit establert per Ma i Fisher per als mamífers (166). La forma C de fetge de pollastre mostra un valor lleugerament superior: 17 Kcal/mol (78).

Dels estudis amb el pH es suggereix que el grup imidazola d'un rest de histidina i el grup sulfhidril d'un rest de cisteïna estan involucrats en la unió del substrat amb l'enzim. Aquest fet està d'acord amb els resultats descrits per Maguire i Sim per l'enzim de placenta de bou (65).

L'enzim pot actuar en un marge de pH òptim entre 5 i 7,4, valors molt pròxims al seu pI ; i això suggereix que l'adenosina no s'uneix al centre actiu per carregues electrostàtiques sino per ponts d'hidrogen i per

atraccions de tipus hidrofòbic, fet que concorda amb el mecanisme d'actuació de l'enzim proposat per Maguire i Sim (65).

S'ha estudiat també el comportament cinètic de l'enzim purificat, utilitzant adenosina com a substrat de la reacció. Els valors de K_m i V de la reacció a 30° C i pH 7,4 són $4,5 \cdot 10^{-5}$ M i 1,98 nmol/s ml respectivament. Aquest valor de K_m coincideix amb els determinats per els diferents orgànuls subcel·lulars estudiats (vegeu 5.1.), així com també amb els valors de K_m de l'enzim d'altres procedències: cervell de mono ($K_m = 3,2 \cdot 10^{-5}$ M) (154), eritròcits humans ($K_m = 2,5 \cdot 10^{-5}$ M) (155); però difereix del de l'enzim de melsa de bou, que posseeix una afinitat més baixa cap a l'adenosina ($K_m = 4 \cdot 10^{-4}$ M) (167). Totes les dades de K_m donades corresponen a la forma C de l'enzim.

La inhibició de l'ADA és útil per tal d'augmentar els nivells d'adenosina, produint un augment en la depressió basal de les neurones (168). En aquest aspecte és important conèixer l'efecte de diversos compostos en l'activitat de l'enzim. Dins dels metabolits purínics, només l'adenina, la hipoxantina, la guanosina i el producte de la reacció: la inosina inhibeixen l'enzim (vegeu Figs. 46, 47, 48 i 49). La inosina és un inhibidor competitiu del purificat de cervell de rata ($K_{ip} = 1,53 \cdot 10^{-4}$ M). L'adenina i la hipoxantina són inhibidors no competitius de l'ADA: la guanosina és un inhibidor competitiu, amb una força similar a la inosina, producte de la reacció. Els altres metabolits purínics no alteren l'activitat del purificat de cervell de rata. Aquests resultats concorden amb els descrits per Fonoll (83) i Franco (32).

La inhibició per etanol i per dimetil sulfòxid és de tipus competitiva. Tot i no ser anàlegs de l'adenosina, l'etanol i el dimetil sulfòxid inhibeixen l'enzim probablement perquè competeixen amb l'aigua, l'altre substrat de la reacció. La inhibició per etanol pot estar relacionada amb l'efecte depressiu que segueix a una ingestió d'alcohol. Considerant que la K_i de l'etanol val 0,48 M, es pot arribar a més d'un 20% de inhibició en els nivells més elevats d'intoxicació alcohòlica (més de 2 g d'etanol/l). Ara bé, aquest valor pot arribar encara a ser més elevat si es considera que la difusió de l'etanol a través de les membranes del sistema nerviós central és alta. Els símptomes d'alcoholisme crònic poden ser paral·lels a la no funcionalitat de l'adenosina desaminasa. La inhibició de l'enzim per aquests disolvents orgànics (DMSO i etanol) pot ser deguda a la modulació de l'activitat dels enzims units a membrana quan es produeixen canvis en la composició lipídica de les membranes (169). Com que l'ADA es localitza a la cara externa de les membranes (32, 60), la inhibició produiria un excés d'adenosina extracel·lular i aquesta adenosina actuaria com a neuromodulador de la transmissió nerviosa en cervell.

Per la mateixa raó, s'ha estudiat l'efecte que diverses drogues antidepressives tenen sobre l'activitat ADA. Les metilxantines cafeïna i teobromina no afecten l'activitat de l'enzim, i això suggereix que l'efecte terapèutic d'aquests dos compostos només es deu a la unió als receptors d'adenosina del sistema nerviós central. En canvi, l'efecte de la teobromina és doble, ja que antagonitza l'acció de l'adenosina mitjançant una interacció amb els receptors F_1 (170) i també inhibeix l'enzim que degrada l'adenosina (ADA) (vegeu Taula XX). La inhibició dels diversos fàrmacs sobre l'ADA és paral·lela a l'acció inhibidora del transport

d'adenosina estudiada per Phillis i Wu en el sistema nerviós central (142).

6.4. PURIFICACIÓ I CARACTERITZACIÓ DELS ANTICOSSOS CONTRA L'ADA DE CERVELL DE RATA

L'ADA de cervell de rata és capaç d'actuar com a antigen en el conill, la qual cosa indica que l'enzim de rata, tot i les similituds de pI i composició aminoàcida amb el de conill (82, 86) és diferent de l'enzim de conill, al menys en quant a zones antigèniques.

La unió d'aquest anticòs amb l'ADA produeix una inhibició en l'activitat de l'enzim. Això suggereix que, o bé el centre antigènic i el centre actiu es troben molt a prop i la unió de l'anticòs produeix un lleuger impediment estèric a l'entrada del substrat cap al centre actiu, o bé que la unió antigen-anticòs fa canviar lleugerament la conformació de l'enzim i aquest canvi lleuger afecta al centre actiu creant certs problemes per a la unió enzim-substrat.

Les IgGs anti- ADA de cervell de rata es van purificar 5,7 vegades amb un rendiment del 85%. L'únic pic obtingut per HPLC i la única banda obtinguda per immunoelectroforesi indiquen que la fracció immunoglobulínica és homogènia i que altres proteïnes no interaccionen amb l'enzim provocant la inhibició. Aquest fet es confirma observant que el serum d'un conill no-immunitzat no produeix inhibició sobre l'ADA.

L'estudi cinètic sobre l'ADA de les IgGs purificades mostra que la inhibició depèn del temps de contacte enzim-immunoglobulines, indicí d'una inhibició irreversible (141). La irreversibilitat de la inhibició de les IgGs es confirma mitjançant el mètode de les dilucions (vegeu Taula XXIV). La " K_i " de la inhibició no competitiva no té doncs, cap valor, ja que aquesta "constant" depèn del temps de contacte enzim-IgGs i de la concentració d'ADA utilitzada.

Cal esmentar que estudis recents han mostrat que altres anticossos no inhibeixen el seu antígen enzimàtic. Així, Aran, treballant amb l'ADA d'eritròcits humans ha observat que les IgGs anti-ADA d'eritròcits no inhibeixen l'ADA de eritròcits (171), la qual cosa indicaria que l'enzim de rata i l'enzim humà tenen diferents centres amb diferent potencia antigènica. Per altra banda, Daddona i Kelley (84) van observar que l'anticòs anti-ADA de budell de bou precipita l'ADA d'eritròcits humans i això indicaria una similitud entre els centres antigènics dels enzims d'eritròcits humans i de budell de bou. L'enzim de cervell de rata, en canvi, com ja s'ha descrit anteriorment, no presenta similituds antigèniques amb el de budell de bou ni amb el d'eritròcits humans, ja que l'anticòs anti-ADA de cervell de rata no inhibeix cap d'aquests dos enzims esmentats.

6.5. CARACTERÍSTIQUES DE L'ADA DE DIVERSOS TEIXITS DE RATA

Es determinà la distribució de l'ADA en les diverses fraccions citoplasmàtiques dels teixits de rata i s'observà que l'activitat

disminuia en el següent ordre: pulmó > melsa > budell prim > estómac > ronyó > cor > fetge > múscul esquelètic > cerebel > cervell.

La baixa activitat ADA en els teixits del sistema nerviós és lògica considerant que aquest teixit és molt deficient en la síntesi "de novo" (2). Una activitat més baixa dels enzims del catabolisme purínic i una més alta recuperació de les purines establiria la deficient síntesi "de novo".

és curiós observar que, en els òrgans que tenen una comunicació directa amb el medi ambient (pulmó, estómac, budell prim), l'activitat ADA sigui molt més elevada que en els òrgans interns (ronyó, cor, fetge). El nivell elevat de l'enzim en melsa, teixit productor de limfòcits, pot estar relacionat amb el sistema immune; doncs s'ha observat que sovint, la immunodeficiència va lligada a una deficiència d'ADA (98). Numerosos autors han observat la toxicitat de l'adenosina i la 2'desoxiadenosina en presència d'inhibidors de l'ADA. Així, en injectar inhibidors de l'enzim s'observen inhibicions de la citolisi mediada per limfòcits, de la limfoblastogènesi i de la transformació de monòcits a macròfags (172).

Conway i Cooke (173), treballant amb l'enzim de teixits de conill, van trobar que l'ADA es troba en proporcions bastant elevades en melsa i en part del tracte intestinal, mentre que en el ronyó, fetge, múscul esquelètic, cor, pulmons i cervell els valors eren menors. En els teixits humans, el nivell de l'enzim és elevat més de 1 U/g teixit en el tracte digestiu (excepte en el budell gruixut i en la melsa; mentre que l'activitat es baixa menys de 0.5 U/g teixit en múscul esquelètic.

bufeta, pulmó, ronyó, cor i cervell. Aquestes similituds entre els enzims de rata, conill i home suggereixen que l'ADA té un paper important en la funció d'alguns teixits.

L'alta activitat de l'enzim al budell prové, principalment, de la làmina pròpia com es pot veure dels estudis immunohistoquímics realitzats per Chechik (174, 175). Aquesta localització específica pot estar relacionada amb l'efecte dels inhibidors de l'ADA sobre l'acció relaxant de l'adenosina en el múscul llis del budell. En les fraccions subcel·lulars de cervell, l'enzim es localitza, juntament amb la 5'N, en la cara externa de les vesícules sinàptiques i sinaptosomes (145). D'aquesta manera, tot i que l'activitat de l'ADA es baixa en el sistema nerviós central (tant en cervell com en cerebel), la localització específica de l'enzim pot tenir un paper important en la degradació de l'adenosina en determinades zones.

Les inhibicions per DMSO i per etanol són competitives i això pot ser degut a que l'inhibidor competeixi amb l'aigua, l'altre substrat de la reacció. La inhibició per etanol pot estar relacionada amb els efectes que produeix la ingestió d'alcohol. Com que l'enzim està probablement i en part, localitzat a la cara externa de les cel·lules (vegeu 5.1.), la seva inhibició augmentaria el nivell extracel·lular de l'adenosina. L'adenosina té un efecte depressor en el teixit cerebral, però també té un efecte vasodilatador, augmentant el flux de la sang al cervell (176) i estimulant la secreció de insulina (132, 177).

En l'apartat (6.3.) ja s'ha discutit que l'ADA purificada de cervell de rata es presenta en una forma molecular que correspon a la forma C

descrita per Ma i Fisher (75, 78). Els estudis cinètics, immunoquímics i electroforètics indiquen que l'ADA és similar en tots els teixits estudiats i que en tots ells es troba només la forma C de l'enzim. Això està d'acord amb el fet que Ma i Fisher, quan van descriure les diferents formes de l'enzim de diversos orígens, van observar que en fetge de rata apareixia principalment com a forma C (79).

7. CONCLUSIONS

1ª.- En la fracció soluble, en sinaptosomes i en vesícules sinàptiques de cervell de rata es troben tots els enzims del catabolisme purínic: 5'Nucleotidasa, Adenosina desaminasa, Purín nucleòsid fosforilasa i Guanín amino hidrolasa i també la Lactat deshidrogenasa i la Malat deshidrogenasa. Els esmentats orgànuls subcel·lulars són, doncs, uns bons medis per a l'estudi del catabolisme purínic.

2ª.- En les fraccions particulades estudiades, l'ADA i la 5'N es comporten de manera diferent dels enzims: LDH, MDH, PNP i GAH:

- L'ADA i la 5'N es troben proporcionalment en quantitats més elevades en sinaptosomes, vesícules sinàptiques i membranes sinàptiques respecte als altres enzims.

- Les activitats ADA i 5'N de les suspensions de les fraccions membranoses tractades amb desoxicolat 0.075% no varien respecte a les suspensions en tampó tris-HCl 30 mM, sacarosa 0.32 M pH 7.4; mentre que els altres enzims augmenten notablement.

3ª.- De la conclusió anterior i dels estudis de localització per microscòpia electrònica se suggereix que l'ADA i la 5'N es troben lligades a les membranes en la cara exterior dels orgànuls subcel·lulars estudiats. La 5'N és una proteïna constituent de membrana i se suggereix que l'ADA, que s'allibera més fàcilment de les membranes que la 5'N, es una proteïna perifèrica.

4^a.- Els valors de K_m de 5'N per AMP dels diferents orgànuls d'escorça cerebral de rata estudiats són similars. Aquest fet succeeix també amb els valors de K_{iP} a causa de l'ADP, que inhibeix de forma competitiva l'enzim. Es pot pensar, doncs, que es tracti del mateix enzim en totes les fraccions subcel·lulars. Les fosfatases no interfereixen en la determinació d'activitat 5'N en les condicions de treball.

5^a.- Els valors de K_m d'ADA per adenosina dels diferents orgànuls subcel·lulars estudiats en cervell de rata són similars. En tots aquests orgànuls l'ADP no inhibeix l'ADA. Es pot pensar, doncs, que es tracti del mateix enzim en totes les fraccions subcel·lulars.

6^a.- El sistema adenosina-inosina posseeix tres punts isobèstics a les longituds d'ona $\lambda = 221.5$ nm, $\lambda = 250$ nm i $\lambda = 281$ nm. Aquests punts isobèstics es mantenen en estudiar microsomes, sinaptosomes i vesícules sinàptiques tant amb adenosina com amb adenosina i P_i en el medi de reacció. L'ADA es troba doncs a l'exterior d'aquests orgànuls subcel·lulars i la PNP a l'interior.

7^a.- L'activitat ADA de cervell de rata després de l'homogeneïtzació es localitza principalment en la fracció citosoluble i per això es purifica a partir d'aquesta fracció. El purificat s'efectua per calefacció a 60° C durant 30 min, precipitació amb $(NH_4)_2SO_4$ al 80% de saturació, cromatografia en DEAE-Sepharosa i electroelució. S'obté un únic pic d'activitat ADA, amb un pes molecular de 35.000 i un punt isoelèctric de 6,0.

8ª.- L'ADA purificada de cervell de rata presenta un comportament michaelià i és inhibida de manera competitiva per la inosina i per la guanosina. La hipoxantina i l'adenina la inhibeixen de forma no competitiva, mentre que els altres metabolits purínics no tenen cap efecte sobre l'enzim. L'etanol i el dimetil sulfòxid són també inhibidors competitius de l'enzim; diverses drogues amb efectes antihistamínics, vasodilatadors, antidepressius,... es comporten també com a inhibidors de l'enzim. Això suggereix que aquests compostos poden modular l'acció neurodepressora de l'adenosina mitjançant la inhibició de l'ADA.

9ª.- L'estudi termodinàmic del sistema ha estat fet mitjançant la mesura de ΔH i E_a , magnituds que controlen en part la reacció. L'energia d'activació no és molt elevada ($E_a = 8.9$ Kcal/mol) i el procés és, doncs, bastant favorable. L'entalpia standard té també un valor baix i positiu ($\Delta H = 5.0$ Kcal/mol).

10ª.- Dels estudis amb el pH se suggereix que en el centre actiu de l'enzim intervenen en la unió de l'adenosina i l'enzim un grup imidazola d'un reste histidina i un grup sulfhidril d'un reste de cisteïna.

11ª.- La fracció immunoglobulínica anti - ADA de cervell de rata inhibeix l'enzim de diversos teixits de rata. Aquesta inhibició, palesada en cervell de rata, augmenta amb el temps de contacte antígen-anticòs, i és constant a partir dels 30 min de contacte. La inhibició és pseudoirreversible i el gràfic de Lineweaver-Burk té l'aspecte de una inhibició no competitiva.

12ª.- La distribució de l'activitat ADA en els diferents teixits de rata estudiats és la següent: pulmó > melsa > budell prim > estómac > ronyó > cor > fetge > múscul esquelètic > cerebel > cervell.

13ª.- Els valors de K_m d'ADA per adenosina de les diverses fraccions solubles dels diferents teixits de rata estudiats, els valors de les K_{ip} de les inhibicions per etanol i per dimetil sulfòxid, així com la inhibició que l'anticòs produeix en l'enzim de totes les fraccions solubles dels teixits estudiats, suggereixen que es tracta del mateix enzim en tots els casos. Així mateix, l'electroforesi demostra que l'enzim és presenta en la forma C en tots els teixits en les condicions d'experimentació que s'han descrit.

8. BIBLIOGRAFIA

- (1) SCHRADER, J.; NESS, S. i GERLASCH, E. (1977)
Pflugers Arch., 369, 251-257
- (2) HOWARD, W.J.; KERSON, L.A. i APPEL, S.H. (1970)
J. Neurochem., 17, 121-123
- (3) LESCH, M. i NYHAM, W.L. (1964)
Am. J. Med., 36, 361-370
- (4) MARKLEY, H.G.; FAILLACE, L.A. i HEZEY, E. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 309, 23-31
- (5) HENDERSON, J.F.; LOWE, J.K. i BARANKIEWICZ, J.
"Purine and pyrimidine metabolism. C.I.B.A. foundation" Symposium 48
(new series) pg. 3-21
- (6) STERN, H. (1952)
J. Gen. Physiol., 35, 557
- (7) METZER, R.M.; RUBIO, R. i BERNE, R.M. (1975)
Am. J. Physiol., 229, 1625-1631

- (8) PRITCHARD, J.B.; O'CONNOR, N.; OLIVER, J.M. i BERLIN, R.D. (1975)
Am. J. Physiol., 229, 967-972
- (9) LERNER, M.H. i LOWY, B.A.
J. Biol. Chem., 249, 959-966
- (10) RONCHETTI, R.; LUCARINI, N.; LUCARELLI, P.; MARTINEZ, F.; MACRI, F.;
CARAPPELLA, E. i BOTTINI, E. (1984)
J. Allergy Clin. Immunol., 74, 81-84
- (11) SNYDER, F.F. i HENDERSON, J.F. (1973)
J. Biol. Chem., 248, 5899-5904
- (12) SCHRADER, J.; BERNE, R.M. i RUBIO, R. (1972)
Am. J. Physiol., 223, 159-166
- (13) MUSTAFA, S.J.; RUBIO, R. i BERNE, R.M. (1975)
Am. J. Physiol., 228, 62-67
- (14) BERNE, R.M. (1964)
Physiol. Rev., 44, 1
- (15) BERNE, R.M. (1963)
Am. J. Physiol., 204, 317-322
- (16) ROCKWELL, M. i MAGUIRE, M.H. (1966)
Mol. Pharmacol., 2, 574

- (17) BURNSTOCK, G. (1972)
Pharmacol. Rev., 24, 509-581
- (18) BURNSTOCK, G. (1976)
J. Theor. Biol., 62, 491-503
- (19) BURNSTOCK, G. (1975)
En "Neuroregulators and Hypothesis of Psychiatric disorders", pg.
470-477. (Ed. Usdin E., Hamborg D. i Barchas J.D.) Oxford Univ.
Press. London.
- (20) HANSEN, O. i KOUDI, M.D. (1974)
British J. Psychiatry, 125, 268-274
- (21) HALCAK; PECHAN i ERGEB (1974)
Exp. Med., 17, 65-73
- (22) FORMENTO, M.L.; BORSA, M. i ZONI, G. (1975)
Pharmacol. Res. Commun., 7, 247-257
- (23) CAPITO, K. i HEDESKOV, C.J. (1976)
Biochem. J., 158, 335-340
- (24) JAIN, K. i LOGOTHETOPOULOS (1978)
Biochem. J., 170, 461-467

- (25) NORDEEN, S.K. i YOUNG, D.A. (1976)
J. Biol. Chem., 251, 7295-7303
- (26) ISRAELSSON, B.; TENGRUP, I. (1980)
Experientia, 36, 257-258
- (27) SCHNEIDER, W.C. i HOGEBOOM, G.H. (1952)
J. Biol. Chem., 195, 161-166
- (28) KUMAR, S. i TEWARI, K.K. (1965)
Biochem. J., 95, 797-802
- (29) MASTERS, C.J. (1978)
Trends in Biochem. Science, pg N233-N234
- (30) PULL, I. i McILWAIN, H. (1974)
Biochem. J., 144, 37-41
- (31) BRDICZA, D.; KREBS, W. i KLOOCK, P. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 297, 203-212
- (32) FRANCO, R. (1982)
Tesis Doctoral. Barcelona.
- (33) SCHNEIDER, W.C. i HOGEBOOM, G.H. (1950)
J. Biol. Chem., 183, 123-128

- (34) BRAKE, E.T.; WILL, P.C. i COOK, J.S. (1978)
 Membrane Biochemistry, 2, 17-45
- (35) DEPIERRE, J.W. i KARNOVSKY, M.L. (1974)
 J. Biol. Chem., 249, 7121-7129
- (36) EVANS, W.H. i GURD, J.W. (1973)
 Biochem. J., 133, 189-199
- (37) TJERNSHAUGEN, H. i FRITZSON, P. (1976)
 Biochem. J., 154, 77-80
- (38) REID, E.; EL-AASER, A.A.; TURNES, M.K. i SCHEBERG, J. (1964)
 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 339, 135
- (39) SONG, C.S. i BODANSKY, O. (1967)
 J. Biol. Chem., 242, 694-699
- (40) DOSS, R.C.; CAROTHERS CARRAWAY, C.A. i CARAWAY, K.L. (1979)
 Biochim. Biophys. Acta, 570, 96-106
- (41) WIDNELL, C.C. i UNKELES, J.C. (1968)
 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 65, 1153-1157
- (42) VAN DEN BERGHE, G.; VAN POTTELSBERGHE, J. i HERS, H.G. (1977)
 Biochem. J., 162, 611-616

- (43) NAITO, Y. i TSUSHIMA, K. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 438, 159-168
- (44) ITOH, R.; USAMI, C.; NISHIMO, T. i TSUSHIMA, K. (1978)
Biochim. Biophys. Acta, 526, 154-162
- (45) FRITZON, P. (1968)
Biochim. Biophys. Acta, 151, 716-718
- (46) RIEMER, B. i WIDNELL, C.C. (1975)
Arch. Biochem. Biophys., 171, 343-347
- (47) DEPIERRE, J.W. i KARNOVSKY, M.L. (1974)
J. Biol. Chem., 249, 7111-7120
- (48) ZACHOWSKI, A. i AUBRY, J. (1977)
FEBS Letters, 75, 197-200
- (49) STANLEY, K.K.; EDWARDS, M. i LUZIO, S.P. (1980)
Biochem. J., 186, 59-69
- (50) SONG, C.S. i BODANSKY, O. (1966)
Biochem. J., 101, 5c-6c
- (51) TANAKA, R.; MORITA, H. i TERUYA, A. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 298, 842-849

- (52) ZACHOWSKI, A.; EVANS, W.H. i PARAF, A. (1981)
Biochim. Biophys. Acta, 644, 121-126
- (53) KREUTZBERG, G.W.; BARRON, K.D. i SCHUBERT, P. (1978)
Brain Research, 158, 247-257
- (54) KREUTZBERG, G.W. i BARRON, K.D. (1978)
J. Neurocytol., 7, 601-610
- (55) KREUTZBERG, G.W. i HUSSAIN, S.T. (1982)
J. Neurocytol., 11, 53-64
- (56) STERN, H. i MIRSKY, A.E. (1953)
J. Gen. Physiol., 37, 177
- (57) JORDAN, W.K.; MACH, R.; HOUCHEIN, O.B. i POPP, E. (1959)
J. Neurochem., 4, 170-174
- (58) MUSTAFA, S.J. i TEWARI, C.P. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 198, 93-100
- (59) VAN DER WEYDEN, M.B. i KELLEY, W.N. (1976)
J. Biol. Chem., 251, 5443-5456
- (60) TRAMS, E.G. i LAUTER, C.J. (1975)
Biochem. J., 152, 681-687

- (61) BRADY, T.G. i O'DONOVAN, C.I. (1961)
Biochem. J., 80, 17p
- (62) CHASSY, B.M. i SUHADOLNIK, R.J. (1967)
J. Biol. Chem., 242, 3655-3658
- (63) BAER, H.P. i DRUMMOND, G.I. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Comm., 24, 584
- (64) ORSI, B.A.; McFERRAN, N.; HILL, A. i BINGHAM, A. (1972)
Biochemistry, 11, 3386-3392
- (65) MAGUIRE, M.H. i SIM, M.K. (1971)
Eur. J. Biochem., 23, 22-29
- (66) ACS, G.; REICH, E. i MORI, M. (1964)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 52, 493
- (67) CORY, J.G. i SUHADOLNIK, R.J. (1965)
Biochemistry, 4, 1729-1732
- (68) FREDERIKSEN, S. (1966)
Arch. Biochem. Biophys., 113, 383-388
- (69) YORK, J.L. i LE PAGE, G.A. (1966)
Can. J. Biochem., 44, 331-337

- (70) SIMON, L.N.; BAUER, R.J.; TOLMAN, R.L. i ROBINS, R.K. (1970)
Biochemistry, 9, 573-576
- (71) ROCWELL, M. i MAGUIRE, M.H. (1966)
Mol. Pharmacol., 2, 574-584
- (72) HOAGLAND, V.D. i FISHER, J.R. (1967)
J. Biol. Chem., 242, 4341-4351
- (73) KOCH, A.L. i VALLEE, G. (1959)
J. Biol. Chem., 234, 1213-1218
- (74) BRAVERMAN, G. i CHARGAFF, E. (1954)
J. Biol. Chem., 210, 445-454
- (75) MA, P.F. i FISHER, J.P. (1968)
Comp. Biochem. Physiol., 27, 105-112
- (76) HARBISON, G.R. i FISHER, J.R. (1973)
Comp. Biochem. Physiol., 46B, 283-293
- (77) AIKAWA, T.; UMEMORI-AIKAWA, Y. i FISHER, J.R. (1977)
Comp. Biochem. Physiol., 53B, 357-364
- (78) MA, P.F. i FISHER, J.R. (1968)
Biochim. Biophys. Acta, 159, 153-159

- (79) MA, P.F. i FISHER, J.P. (1972)
Comp. Biochem. Physiol., 41B, 469-474
- (80) PHELAN, J.; McEVOY, F.; ROONEY, S. i BRADY, T.G. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 200, 370-377
- (81) TRITSCH, G.L. i ROSENFELD J.L. (1976)
J. Medicine, 7, 263-273
- (82) PIGGOTT, C.O. i BRADY, T.G. (1976)
Int. J. Biochem., 7, 559-564
- (83) FONOLL, C.; CANELA, E.I. i BOZAL, J. (1982)
Int. J. Biochem., 14, 679-683
- (84) DADDONA, P.E. i KELLEY, W.N. (1977)
J. Biol. Chem., 252, 110-115
- (85) DADDONA, P.E.; SHEWACH, D.S.; KELLEY, W.N.; ARGCS, P.; MARKHAM, A.F. i
ORKIN, S.H. (1984)
J. Biol. Chem., 259, 12101-12106
- (86) PIGGOTT, C.O. i BRADY, T.G. (1976)
Biochim. Biophys. Acta, 429, 600-607
- (87) BRADY, T.G. i O'SULLIVAN, M. (1967)
Biochim. Biophys. Acta, 32, 227-237

- (88) GIUSTI, G. (1974)
En "Methods of Enzymatic Analysis", 2, p-1092 (Ed. Bergmeyer H.U.)
Verlag Chemie Weinheim, Academic Press, Inc. New York.
- (89) AKEDO, H.; NISHIHARA, H.; SHINKAI, K. i KOMATSU, K. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 212, 189-191
- (90) TROTTA, P.P.; PETERFREUND, R.A.; SCHONBERG, R. i BALIS, M.E. (1979)
Biochemistry, 18, 2953-2959
- (91) NISHIHARA, H.; ISHIKAWA, S.; SHINKAI, K. i AKEDO, H. (1973)
Biochim. Biophys. Acta, 302, 429-442
- (92) ANDY, R.J. i KORNFELD, R. (1982)
J. Biol. Chem., 257, 7922-7925
- (93) HIRSCHHORN, R. i LEVYTSKA, V. (1974)
Cell Immunol., 12, 387
- (94) VAN DER WEYDEN, M.B.; BAILEY, L. i GARSON, O.M. (1978)
Experientia, 34, p531
- (95) TROTTA, P.P. i BALIS, M.E. (1973)
Biochemistry, 12, 270-278
- 96 SWALLOW, D.M.; EVANS, L. i HOPKINSON, D.A. (1977)
Nature, 264, 361-362

- (97) MUSTAFA, S.J. i TEWARI, C.P. (1970)
Biochim. Biophys. Acta, 220, 326-337
- (98) ACKERET, C.; PLUSS, H.J. i HILZIG, W.H. (1976)
Pediat. Res., 10, 67-70
- (99) DINESCU-ROMALO, G.; MIHAI, C. i VLAD, L. (1977)
Rev. Roum. Biochim., 14, 161-165
- (100) EDWARDS, N.L.; MAGILAVY, D.B.; CASSIDY, J.T. i FOX, I.H. (1978)
Science, 201, 628-630
- (101) KLUGE, H.; HARTMANN, W.; WIECZOREK, V. i ZAHLTEN, W. (1974)
Acta Biol. Med. Ger., 33, 49-56
- (102) ISRAELSSON, B. i TENGRUP, I. (1980)
Experientia, 36, 257-258
- (103) LEE, P.C.; NICKELS, J.S. i FISHER, J.R. (1973)
Arch. Biochem. Biophys., 158, 677-680
- (104) VALENTINE, W.N.; PAGLIA, D.E.; TARTAGLIA, A.P. i GILSANZ, F. (1977)
Science, 195, 783-785
- (105) KOEHLER, L.M. i BENZ, E.J. (1962)
Clin. Chem., 2, 133

- (106) BURRIDGE, P.W.; PAETKAU, V. i HENDERSON, J.F. (1977)
J. Immunol., 119, 675-678
- (107) MEVWISSEN, H.J.; MOORE, E. i POLLARA, B. (1973)
Pediat. Res., 7, 362
- (108) SCHMALSTIEG, F.C.; MILLS, G.C.; NELSON, J.A.; MAY, L.T.; GOLDMAN, A.S.
i GOLDBLUM, R.M. (1978)
J. Pediat., 93, 597-603
- (109) TISCHFIELD, J.A.; CREAGAN, R.P.; NICHOLS, E. i RUDDLE, F.H. (1974)
Human Hered., 24, 1-11
- (110) JENKINS, T.; RABSON, A.R.; NURSE, G.T.; LANE, A.B. i HOPKINSON, D.A.
(1976)
J. Pediat., 89, 732-736
- (111) FISHER, D.; VAN DER WEYDEN, M.B.; SNYDERMAN, R. i KELLEY, W.N.
(1976)
J. Clin. Invest., 58, 399-407
- (112) GREEN, H. i CHAN, T.S. (1973)
Science, 182, 836-837
- (113) HIRSCHHORN, R. i SELA, E. (1977)
Cell. Immunol., 32, 350-360

- (114) MURRAY, J.F.; LOFTIN, K.C.; MUNN, C.G.; REUBEN, J.M.; MANSELL, P.W.A. i
HERSH, E.M. (1985)
Blood, 65(6), 1318-1323
- (115) BERLIN, R.D. i OLIVER, J.M. (1975)
Int. Rev. Cytol., 42, 287-336
- (116) STRAUSS, P.R.; SHEEHAN, J.M. i KASHKET, E.R. (1976)
J. Exp. Med., 114, 1009-1021
- (117) RUBIO, R. i BERNE, R.M. (1969)
Circ. Res., 25, 407-415
- (118) SOUNESS, J.E. i DAVIS, J.I. (1977)
Biochem. Soc. Trans., 5, 997-999
- (119) SOLLER, M.; KOENIG, H.; MYBROIE, R.; HUGHES, C. i LU, C.Y. (1973)
J. Neurochem., 21, 557-572
- (120) WHITTAKER, V.P.; MICHAELSON, I.A. i KIRKLAND, R.J.A. (1964)
Biochem. J., 90, 293-303
- (121) TAMIR, H.; RAPPORT, M.M.; ROIZIN, L.; HUANG, Y.L. i LIU, J.C. (1974)
J. Neurochem., 23, 943-949
- (122) VAITUKAITIS, J.L. (1981)
En "Methods in Enzymology", 73, pp. 46-52

- (123) ANDREWS, P. (1964)
Biochem. J., 91, 222-233
- (124) HORIIKE, K.; TOJO, H.; YAMANO, T. i NOZAKI, M. (1983)
J. Biochem. (Tokio), 93, 99-106
- (125) CABRE, F.
Tesis Doctoral. Barcelona
- (126) PHARMACIA FINE CHEMICALS (1980)
"Isoelectric Focusing. Principles and methods".
- (127) BERTOLINI, M.J.; TANKERSLEY, D.L. i SCHROEDER, D.O. (1976)
Anal. Biochem., 71, 6-13
- (128) SPENCER, N.; HOPKINSON, D.A. i HARRIS, H. (1968)
Ann. Hum. Genet. London, 32, 9-14
- (129) WATSON, M.L. (1958)
J. Biophys. Biochem. Cytol., 4, 727-730
- (130) REYNOLDS, E.S. (1963)
J. Cell. Biol., 17, 208-212
- (131) TRITSCH, G.L.; PAOLINI, N.S. i BIELAT, K. (1985)
Histochemistry, 32, 281-285

- (132) KALCKAR, H.M. (1947)
J. Biol. Chem., 167, 445-459
- (133) KALCKAR, H.M. (1947)
J. Biol. Chem., 167, 461-475
- (134) KALCKAR, H.M. (1947)
J. Biol. Chem., 167, 429-443
- (135) NETHELER, H.G. (1974)
En "Methods of enzymatic analysis", 10, pp 187 (ed. Bergmeyer, H.U.)
Academic Press. New York.
- (136) WALTER, K. i SCHUTT, C. (1974)
En "Methods of enzymatic analysis", 1, pp 495-496 (ed. Bergmeyer,
H.U.) Academic Press. New York.
- (137) MICHAELIS, L. i MENTEN, M.L. (1913)
Biochem. Z., 49, 333
- (138) CLELAND, W.N. (1963)
Biochim. Biophys. Acta, 67, 173-187
- (139) CANELA, E. (1983)
Int. J. Biomedical Computing, 15, 121-130

- (140) GLASSTONE, S.; LAIDER, K.J. i EYRING, H. (1941)
En "The Theory of Rate Processes". New York. McGraw Hill Book.
- (141) DIXON, M i WEBBS, E.C. (1958)
En "Enzymes". Academic Press, New York.
- (142) PHILLIS, J.W. i WU, P.H. (1983)
En "Physiology and Pharmacology of adenosine derivatives" pp. 219-236. (ed. John W. Daly et al.) Raven Press, New York.
- (143) DIXON, M. (1953)
Biochem. J., 55, 161
- (144) SEGEL, I.H. (1975)
En "Enzyme Kinetics", Chapter 11 (ed. J. Wiley).
- (145) FRANCO, R.; CANELA, E.I. i BOZAL, J. (1986)
Neurochem. Res., 11(3), 407-422
- (146) DALY J.W.; PHILLIS, J.W.; KURODA, Y. i UI, M. eds (1983)
En "Physiology and Pharmacology of adenosine derivatives" Raven Press, New York.
- (146) PURTÍ, J. (1978)
Tesina. Barcelona.

- (148) SEGAL, H.L. i BRENNER, B.M. (1980)
J. Biol. Chem., 235, 471
- (149) MALLOL, J. (1980)
Tesis Doctoral. Barcelona.
- (150) PEETERS, C.; DE WOLF, M.; LAGROU, A.; VAN DESSEL, G.; HILDERSON, J. i
DIERICK, W. (1981)
Arch. Intern. Physiol. Biochim., 89, B123-B124
- (151) MALLOL, J. i BOZAL, J. (1983)
J. Neurochem., 40, 1205-1211
- (152) MASTERS, C.J. (1977)
Trends in Biochem. Science, pp. 66-67
- (153) MASTERS, C.J. (1978)
Trends in Biochem. Science, pp. 206-208
- (154) TRITSCH, G.L.; NISWANDER, P.R.; ROSENFELD, Y.; NECHAEV, A. i
MITTELMAN, A. (1976)
Mol. Cell. Biochem., 12, 93-101
- (155) HADDEN, W.J. (1975)
En "Combined immunodeficiency disease and adenosine deficiency" pp.
173-199. Academic Press. New York.

- (156) SISTACH, M.C. (1978)
Tesina. Barcelona.
- (157) STANLEY, K.K.; EDWARDS, M.R. i LUZIO, J.P. (1980)
Biochem. J., 186, 59-69
- (158) WIDNELL, C.C. (1982)
Cell, 28, 61-70
- (159) KREUTZBERG, G.W. i HUSSAIN S.T. (1984)
Neuroscience, 11, 857-866
- (160) MOREL, N i MEUNIER, F-M.
J. Neurochem., 36, 1766-1773
- (161) ARCH, J.R.S. i NEWSHOLME, E.A. (1978)
Biochem. J., 174, 965-977
- (162) GREEN, R.D. (1980)
Biochim. Biophys. Acta, 598, 366-374
- (163) MURPHY, P.M.; NOONAN, M.; COLLINS, P.; TULLY, E. i BRADY, T.G. (1969)
Biochim. Biophys. Acta, 171, 157-166
- (164) BRADY T.G. i J'CONNELL, W. (1962)
Biochim. Biophys. Acta, 62, 216-229

- (165) OSBORNE W.R.A. i SPENCER, N. (1973)
Biochem. J., 133, 117-123
- (166) MA, P.F. i FISHER, J.P. (1966)
Comp. Biochem. Physiol., 19, 799-807
- (167) PFROGNER, N. (1967)
Arch. Biochem. Biophys., 119, 141-154
- (168) McILWAIN, H. (1973)
En "Central Nervous System - Studies on Metabolic Regulation and Function" (Genazzari, E. i Herken, H. eds.) pp. 3-11. Springer Verlag. New York.
- (169) SZAMELL, M. i RESCH, K. (1981)
J. Biol. Chem., 256, 11618-11623
- (170) BURNSTOCK, G. (1985)
En "Adenosine: Receptors and modulation of cell function" (V. Stefanovich, K. Rudolphi i P. Schubert eds.) pp. 3-14 IRL Press. Oxford.
- (171) ARAN, J.M.
Tesina. Barcelona.
- (172) FOX, I.H. i KELLEY, W.N. (1978)
Ann. Rev. Biochem., 47, 655-686

(173) CONWAY, E.J. i COOKE, R. (1939)

Biochem. J., 33, 479-492

(174) CHECHIK, B.; BAUMAL, R., i SENGPUTA, S. (1984)

En "Purine Metabolism in Man" IV part B * (C.H.M.M. Debruyne, H.A. Simmonds i M.M. Muller eds.) Plenum Publishing Corporation.

(175) CHECHIK B.E.; SENGPUTA, S.; HIBI, T. i FERNANDEZ, B. (1985)

Histochem. J., 17, 153-170

(176) WINN, H.R.; RUBIO, G.R. i BERNE, R.M. (1981)

J. Cereb. Flow Metab., 1, 239-244

(177) WARBURG, O. i CHRISTIAN, W. (1942)

Biochem. Z., 310, 384-421