

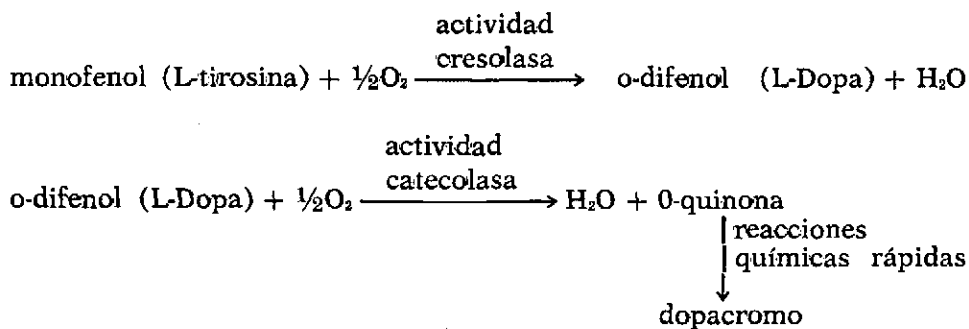
Discusión y mejora del método espectrofotométrico de medida de la oxidación de L-tirosina por tirosinasa

POR

J. Cabanes, F. García-Carmona,
F. García-Cánovas y J. A. Lozano

INTRODUCCION

Tirosinasa (E. C. 1.14.18.1) es una cuproproteína que cataliza las dos reacciones enzimáticas siguientes:



El dopacromo posee un máximo de absorción a 475 nm, por lo que la absorción a esta longitud de onda se ha utilizado para medir la actividad «catecolasa» del enzima, usando L-dopa como sustrato. Sin embargo, no sería, en principio, un buen procedimiento para la cuantificación de la actividad «cresolasa» usando un monofenol como L-tirosina como sustrato, pues el dopacromo formado se debería a la acción secuencial de las dos actividades enzimáticas. Por ello para la medida de la actividad cre-



solasa, se han buscado técnicas radiométricas (1, 2) o técnicas espectrofotométricas utilizando otros sustratos menos fisiológicos (3, 4).

Diversos investigadores han demostrado, sin embargo, que cuando se usa L-tirosina como sustrato, el L-dopa, producto de la acción cresolasa del enzima, queda ligado al mismo, sin liberarse al medio de reacción, por lo cual queda sometido inmediatamente a la acción catecolasa del enzima (5-7), transformándose en dopacromo vía la o-quinona correspondiente. Utilizando este criterio, varios autores (7-9) han utilizado los incrementos de absorbancia a 475 nm como medida de actividad cresolasa cuando el sustrato es la L-tirosina.

Por otra parte, las diversas casas comerciales que han normalizado la medida de la actividad cresolasa, referida, sobre todo, a la preparación enzimática comercial procedente de champiñón, han utilizado como método de medida el incremento de absorbancia a 280 nm. Otros autores (10-12) miden la actividad cresolasa a 280 nm, basándose en la conversión de L-tirosina en L-dopa.

Nosotros proponemos seguir el cambio de absorbancia a 302 nm como una medida más precisa y sensible de la actividad cresolasa del enzima, presentando otras varias ventajas sobre los métodos hasta ahora utilizados, tal como se discutirá posteriormente.

MATERIALES Y METODOS

El enzima tirosinasa se obtuvo de epidermis de rana esculenta ridibunda entre los meses de noviembre a marzo. La extracción y purificación de proenzima, así como la activación de éste, utilizando tripsina unida a Sepharosa 4B-CNBr se ha descrito previamente (13). Tirosinasa de hongo y tirosina se obtuvieron de Sigma Chemical Co.

La medida de la actividad se efectuó a 25° C, en un medio de tampón fosfato 0,01 M pH = 7,0 conteniendo L-tirosina 1 mM, iniciándose la reacción por la adición de aproximadamente 15 mU. de enzima. Una unidad de enzima cataliza la transformación de 1 μ ml de sustrato por minuto.

Los espectros se registraron de forma automática en un espectrofotómetro DW2-Aminco.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se recogen las longitudes de onda que corresponden a los máximos de absorción espectrofotométricas de las diferentes sustancias implicadas en la conversión de L-tirosina a dopacromo.

Los registros espectrofotométricos, a diferentes tiempos, de la transformación de L-tirosina (0,5 mM) catalizada por la enzima tirosinasa de epidermis de rana, se muestran en la figura 1. Se puede observar la presencia de dos máximos de absorción, uno en la región visible a 475 nm, y otro en la ultravioleta a 302 nm., siendo estos máximos los característicos del dopacromo, cuando se aisló a partir de la oxidación de L-dopa (14).

Los espectros están de acuerdo con dos tipos de observaciones conocidas previamente. En primer lugar, que en la oxidación de L-dopa por tirosinasa de champiñón (15) al realizar el análisis matricial de los espectros, no fue posible detectar la aparición de o-dopaquinona ni de leudopacromo, intermedios de la oxidación a pH = 7,0; en segundo lugar, que los pasos químicos entre o-dopaquinona y leucodopacromo correspondientes a su desprotonación ciclación a leucodopacromo y oxidación del leucodopacromo por otra molécula de o-dopaquinona, respectivamente, como se muestra en la fig. 2 (16), sean tan rápidos que impliquen una acumulación de intermedios despreciable. Esto ocurre a pH 6,5-7, donde la constante de transición de todas estas reacciones es superior a 0,14 seg^{-1} (17). Así pues, L-dopa aparece en el medio de reacción según muestra el esquema de la fig. 2, descartándose la posibilidad de que el L-dopa sea liberado directamente por el enzima (18).

El espectro mostrado en la fig. 1 manifiesta un ligero hombro a 284 nm, el cual se puede asignar a la presencia de L-dopa ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$). En los espectros mostrados en la fig. 3 se han repetido en la zona del ultravioleta, los mismos registros de la fig. 1, colocando en la cubeta de referencia L-tirosina (0,5 Mm); los resultados muestran la sola presencia de ese máximo a 278 nm en un primer registro, lo que evidentemente está de acuerdo con la interpretación de la acumulación de L-dopa según la fig. 2; ahora bien, esta acumulación es constante porque el sistema llega al estado estacionario, ya que L-dopa se ve sometido a la actividad catecolasa del enzima.

En la fig. 4 se muestran comparativamente los registros de actividad enzimática a 475 nm y 302 nm. En ambos casos existe el mismo «período de retardo» característico de la actividad cresolasa de tirosinasa (1, 3-9, 19), pero la absorbancia a 302 nm fue 2,6 veces mayor que a la de 475 nm, con un coeficiente de extinción $\epsilon_{302} = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, valor semejante al calculado para el dopacromo a partir de la oxidación desde L-dopa (14). Por ello pensamos que la medida a 302 nm de la actividad cresolasa de tirosinasa presenta claras ventajas sobre la determinación a 475 nm, que ha sido utilizada por diversos autores (7-9).

Por otra parte, tal como se muestra en la tabla 2, diversas casas comerciales que suministran tirosinasa de champiñón, recomiendan medir

la actividad cresolasa a 280 nm por extrapolación de una técnica que se desarrolló primitivamente para medir la oxidación de tirosinas no N-terminales de olipépticos (20), o de proteínas (21), casos en los que estaba claramente impedida su ciclación hasta dopacromo, al estar bloqueado el grupo $-\text{NH}_2$ de la tirosina; sin embargo, cuando se utiliza L-tirosina soluble, se produce la ciclación y conversión en dopacromo. Esta extrapolación ha llevado a algunos autores (10-12) a utilizar el incremento de absorción a 280 nm, como evaluación del paso de L-tirosina a L-dopa, usando un coeficiente de extinción de $1.440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; ahora bien, tal como se observa en la fig. 3, no se produce ningún máximo a 280 nm, sino que la absorción a esa longitud de onda corresponde a la cola del verdadero máximo a 302 nm asignable al dopacromo, por lo cual creemos debe subsanarse en el futuro esta confusión.

Los mismos resultados obtenidos con tirosinasa de epidermis de rana se han reproducido cuando se ha utilizado como fuente del enzima tirosinasa de champiñón.

RESUMEN

Se discuten las diferentes técnicas espectrofotométricas que se utilizan para la medida de la actividad cresolasa de tirosinasa, utilizando L-tirosina como sustrato. Entre estas técnicas están incluidas las utilizadas por diferentes investigadores como la recomendada por las casas comerciales.

Mediante el estudio espectrofotométrico del transcurso de la reacción de oxidación de L-tirosina, se propone la utilización de los incrementos de absorción a 302 nm con un $\epsilon = 9360 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ como forma más sensible, precisa y real de medir la oxidación de L-tirosina a dopacromo, ya que ningún intermedio del sistema de reacción se acumula significativamente con el tiempo de reacción.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se ha subvencionado en parte por un proyecto de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica.

TABLA 1

LONGITUDES DE ONDA DE LOS MAXIMOS DE ABSORCION DE LOS DIFERENTES COMPUESTOS INVOLUCRADOS EN LA CONVERSION DE L-TIROSINA A DOPACROMO, A pH = 7,0

<i>Compuesto</i>	λ_{max} pH = 7,0	<i>Referencia</i>
Dopa	278	(15)
Dopaquinona	395	(15)
Leucodopacromo	296	(15)
Dopaquinona NH ₂ -bloqueada	275,390	(21)
Dopacromo	302,473	(15)

TABLA 2

CASAS COMERCIALES QUE RECOMIENDAN LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CRESOLASA A 280 NM

<i>Casa Comercial</i>	<i>Procedimiento</i>	<i>Definición de unidad</i>
Worthington	Tampón fosfato	Una unidad de enzima es aque-
Sigma	pH = 6,5	lla cantidad que produce un
P. L. Biochemicals	1 mM L-tirosina	incremento de 0,001 unidad de
Mile Research Products	25° C	absorción por min. a 280 nm.
INC Nutritional Biochemical		
Koch-Light		
SERVA		



BIBLIOGRAFIA

1. POMERANTZ, S. H. (1966), *J. Biol. Chem.*, 241, 161-168.
2. NAGASU, T.; LEWITT, M., y UNDEFRIEND, S. (1964), *Anal. Biochem.*, 9, 122-126.
3. KEYES, M. H., y SEMERSKY, F. E. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 256-261.
4. GARCÍA-CARMONA, F.; PEDREÑO, E.; GALINDO, J. D.; GARCÍA-CÁNOVAS, F. (1979), *Anal. Biochem.*, 95,, 433-435.
5. KIM, K. H., y TCHEN, T. T. (1962), *Biochem. Biophys. Acta*, 59, 569-576.
6. OIKAWA, A.; NAKAGASU, M.; NOHARA, M., y TCHEN, T. T. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.*, 148, 548-557.
7. POMERANTZ, S. H., y MURTHY, V. V. (1974), *Arch. Biochem. Biophys.*, 160, 73-82.
8. PAU, R. M., y KELLY, C. (1975), *Biochem. J.*, 147, 565-573.
9. CSUKÁS-SZATLOCZKY, I., y PARÁDI, E. (1972), *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, 23, 107-113.
10. DUCKWORTH, H. W., y COLEMAN, J. E. (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, 1613-1625.
11. ROBB, D. A. (1979), *Biochem. Soc. Trans.*, 7, 131-132.
12. MIKKELSEN, R. B., y TRIPLETT, E. L. (1975), *J. Biol. Chem.*, 250, 638-643
13. LOZANO, J. A.; MONTSERRAT, F.; GALINDO, J. D., y PEDREÑO, E. (1975), *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 21-28.
14. GRAHAM, D. G.; TIFFANY, S. M., y VOGEL, F. S. (1978), *J. Invest. Dermatol.*, 70, 113-116.
15. GRAHAM, D. G.; JEFFS, P. W. (1977), *J. Biol. Chem.*, 252, 5729-5734.
16. GARCÍA-CÁNOVAS, F.; GARCÍA-CARMONA, F.; VERA, J.; IBORRA, J. L., y LOZANO, J. A. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257 8738-8744.
17. GARCÍA-CARMONA, F.; GARCÍA-CÁNOVAS, F.; IBORRA, J. L., y LOZANO, J. A. (1982), *Biochem. Biophys. Acta*, 717, 124-131.
18. CABANES, J. (1982), «Tesina de Licenciatura», Universidad de Murcia.
19. GARCÍA-CARMONA, F.; GARCÍA-CÁNOVAS, F., y LOZANO, J. A. (1980), *Int. J. Biochem.*, 11, 325-327.
20. YASUNOBU, K. T.; PETERSON, E. W., y MASON, H. S. (1959), *J. Biol. Chem.*, 234, 3291-3295.
21. CORY, J. G., y FRIEDEN, E. (1967), *Biochemistry*, 6, 116-120.

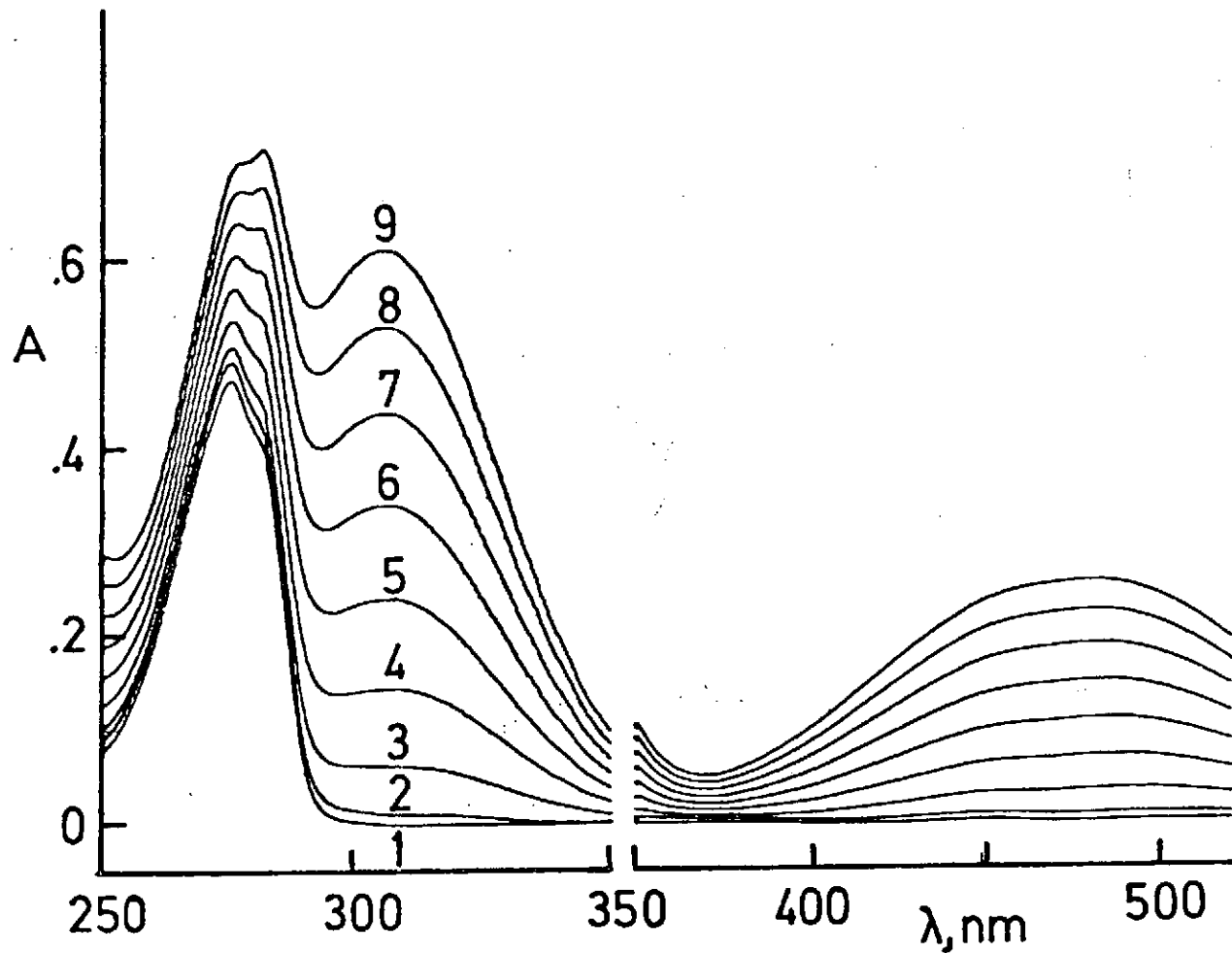


FIGURA 1.—Registros espectrofotométricos de la oxidación de L-tirosina (0,5 mM) a diferentes tiempos, después de añadir 15 mU de enzima, el registro se hace en dos ensayos de 250-350 nm y de 350-520 nm, a los $t = 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700$ y 800 segundos.

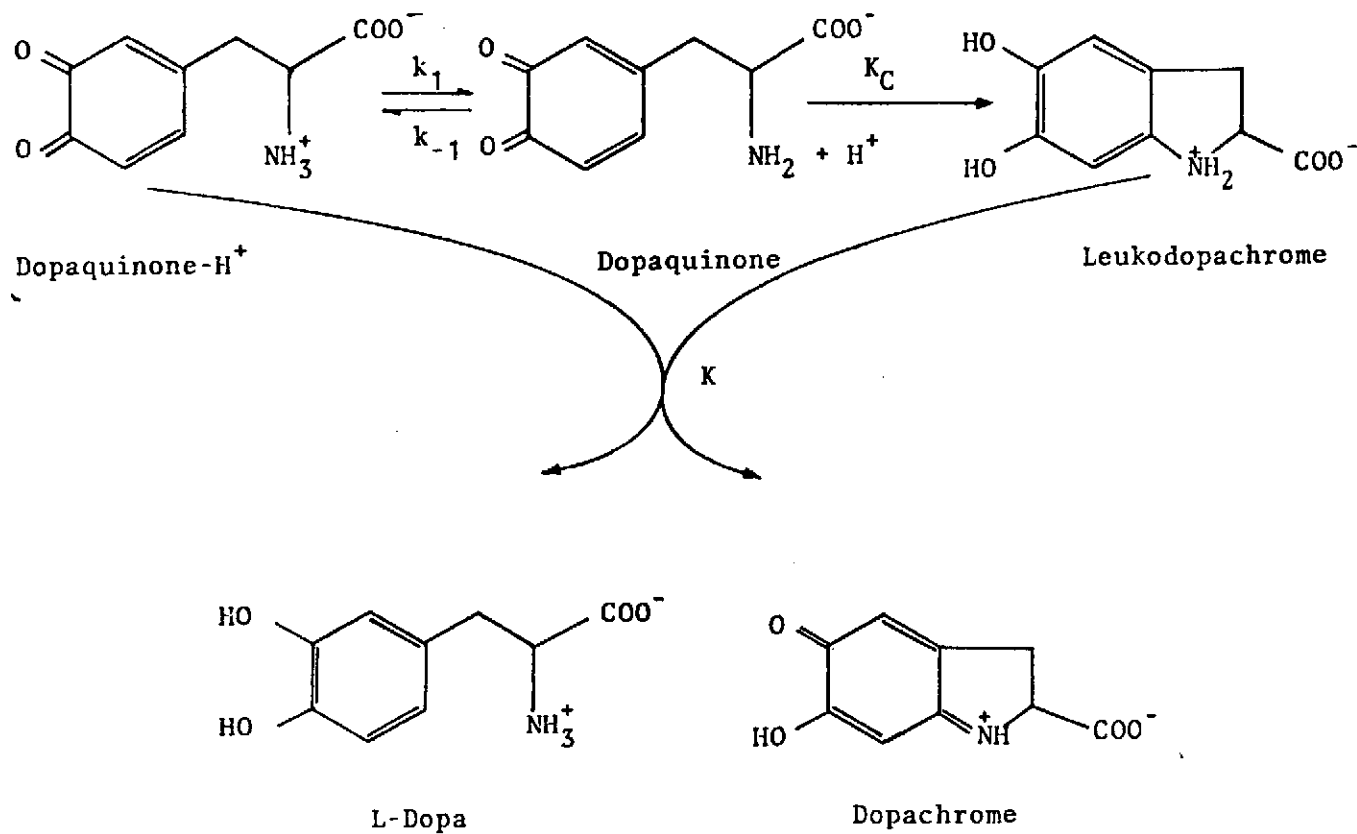


FIGURA 2.—Esquema de reacciones químicas que ocurren desde dopaquinona a dopacromo.

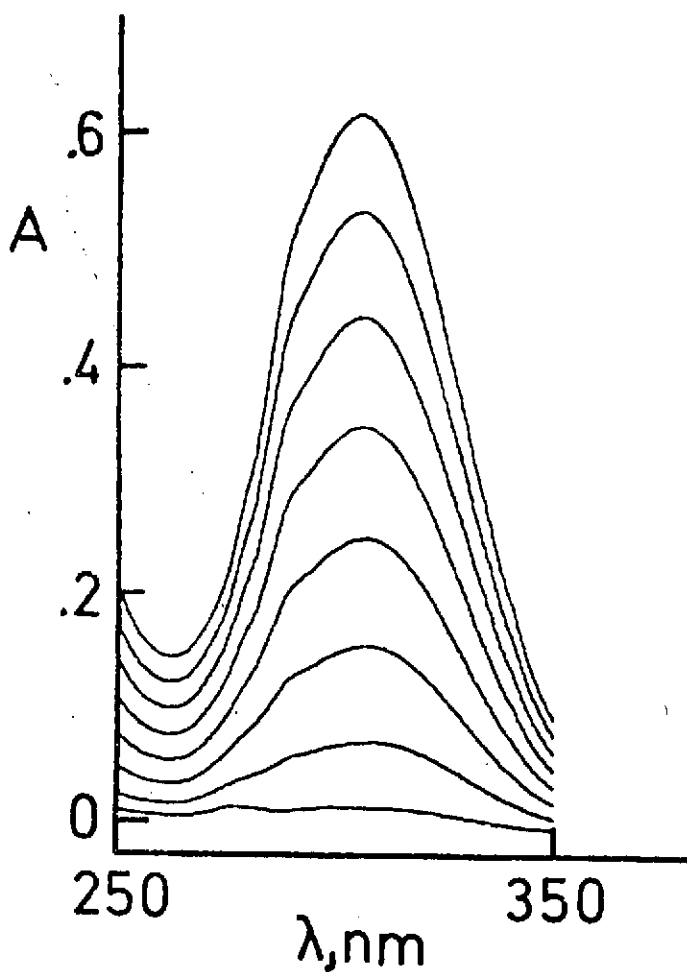


FIGURA 3.—Registros espectrofotométricos de la oxidación de L-tirosina (0,5 mM) a diferentes tiempos, después de añadir 15 mU de enzima, el registro se hace poniendo en la cubeta de referencia L-tirosina (0,5 mM) a $t = 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700$ y 800 segundos.

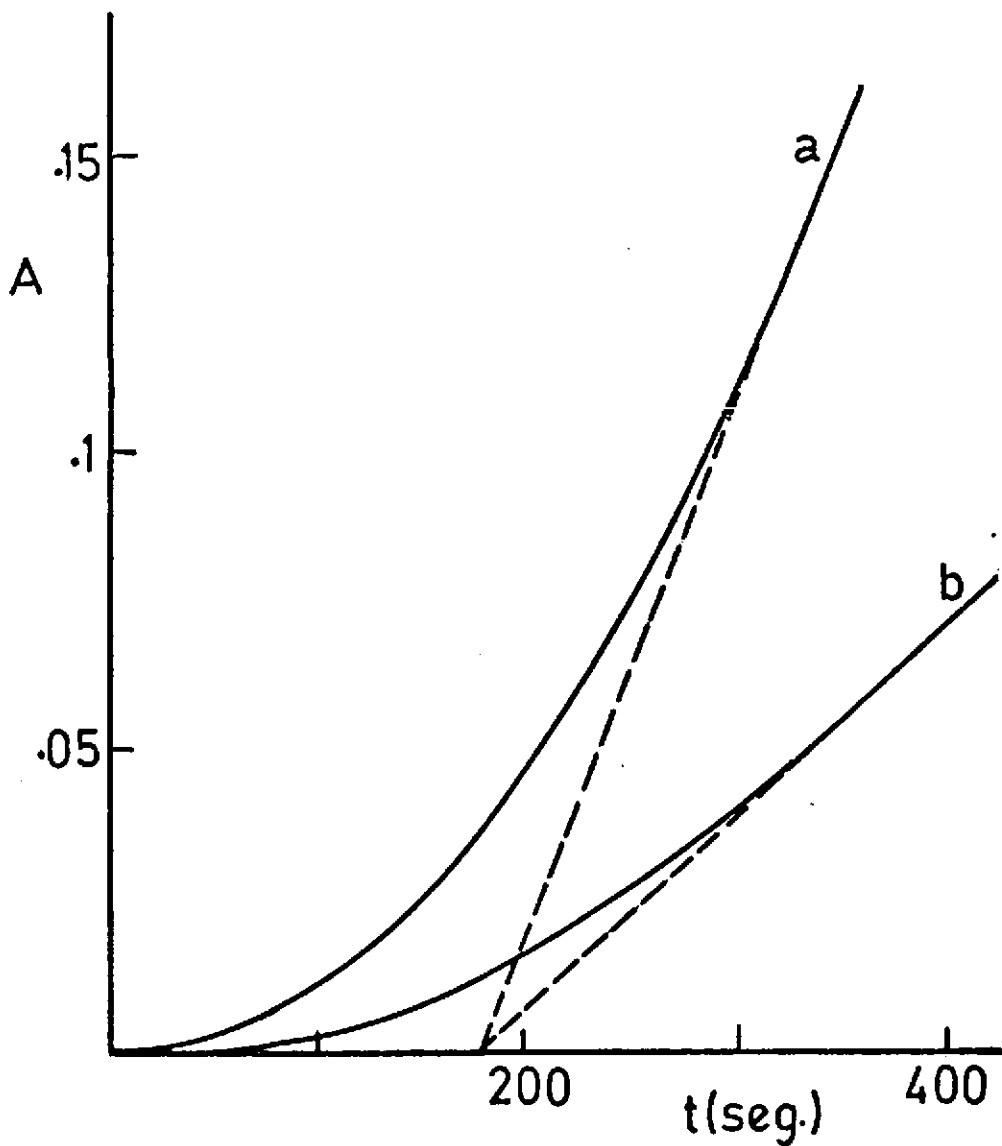


FIGURA 4.—Registros de actividad cresolasa a 302 y 475 nm, L-tirosina (1 mM) en en tampón fosfato 0,01 M pH = 7,0 y 15 mU de enzima.