

03081



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**

12  
24

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE LA  
S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEÍNA  
HIDROLASA EN CORAZÓN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A  
M. EN C. PLABLO JORGE SUÁREZ MUNGUÍA**

MÉXICO D.F.

1996

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**  
**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**  
**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Bioenergética del Instituto de Fisiología Celular de la U.N.A.M. y en el Departamento de Farmacología del Instituto Nacional de Cardiología.

La directora de tesis fue la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez.

## AGRADECIMIENTOS

-A la Dra. Victoria Chagoya de Sánchez por su valiosa dirección, por su apoyo y por su actitud como Tutor en un gran sentido de la palabra.

-A los Doctores Rolando Hernández Muñoz y Mauricio Díaz Muñoz, compañeros de laboratorio y amigos que aportaron comentarios importantes para la culminación de esta tesis.

-A todos mis maestros.

-A todos mis amigos.

-A mis padres Amparo y Lindorfo

-A mis hermanos

-A mi familia política

MIEMBROS DEL JURADO

**DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ**  
**DR. ROBERTO CORIA ORTEGA.**  
**DR. BRUNO ALFONSO ESCALANTE ACOSTA**  
**DRA. M. CARMEN GOMEZ EICHELMANN**  
**DR. ROLANDO HERNANDEZ MUÑOZ**  
**DR. FEDERICO MARTINEZ MONTES**  
**DR. CARLOS VALVERDE RODRIGUEZ**

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis especialmente a mi esposa Esperanza por su comprensión para mi y mi trabajo. Por su ayuda. Por su amor.

A mis hijos:

Jorge Adolfo

y Angélica Esperanza

Por el tesoro que representan para mi

## INDICE

Introducción	1
S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa	6
propiedades	6
mecanismo de reacción	7
papel en el metabolismo intermediario	10
distribución y niveles tisulares	12
Planteamiento del problema	14
objetivo	15
hipótesis	15
Metodología	17
Resultados	19
Discusión	26
Conclusiones	31
Referencias	32
Apéndice: MANUSCRITO PARA PUBLICACION	

## RESUMEN

La enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa parece tener un papel clave en la regulación de la fisiología celular ya que se encarga de remover al compuesto S-adenosil-L-homocisteína que es producto de las reacciones de metilación y al mismo tiempo es inhibidor de estas mismas. Por otra parte, esta enzima produce adenosina en su reacción de hidrólisis con lo que contribuye a la homeostasis de este compuesto de gran importancia biológica. La S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa también es importante en la terapéutica humana porque es blanco en el diseño de drogas anticancerígenas y antivirales.

A pesar de lo anterior, no se conocen los mecanismos de regulación de esta enzima en los organismos superiores ni se sabe el papel fisiológico que tiene en la función orgánica. En esta tesis se exploraron algunos aspectos fisiológicos de la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa en el corazón de cobayo. Para este fin se trató de dar respuesta a dos preguntas: 1) ¿Existen condiciones fisiológicas que estén relacionadas con cambios en la actividad de la enzima? y 2) ¿Que alteraciones se presentan al inhibir la actividad de la enzima con un inhibidor específico?

Se utilizaron como modelos el músculo papilar de cobayo aislado y perfundido y el animal íntegro. Los músculos papilares fueron perfundidos con agonistas adrenérgicos y con efectores de calcio. Se investigó el efecto de estas sustancias en la actividad contractil del músculo papilar y actividad enzimática en un extracto crudo de la enzima. Adicionalmente se realizaron experimentos *in vitro* con una fracción más purificada de la enzima para estudiar el efecto directo del calcio sobre la actividad enzimática. En el animal íntegro se valoró el efecto del inhibidor de la enzima, el dialdehído de adenosina, en la respuesta vagal provocada por estimulación alfa adrenérgica. Además se exploró el efecto de la inhibición de la enzima en la respuesta contractil de aurículas aisladas de animales tratados con el dialdehído de adenosina.

Los resultados demostraron que los músculos papilares perfundidos con adrenalina presentan una actividad de la enzima más baja que los controles y este efecto inhibitorio es dependiente de la concentración de la adrenalina. Cuando se relaciona el efecto inhibitorio de la catecolamina sobre la actividad de la enzima con el efecto conocido sobre la contracción, se encuentra una clara relación



inversa. El efecto inhibitorio de la adrenalina sobre la actividad de la hidrolasa parece depender de receptores  $\beta$ -adrenérgicos porque el propranolol bloqueó el efecto de la adrenalina y el isoproterenol actúa en forma semejante a la hormona. El calcio tiene un efecto modulador sobre las acciones de la adrenalina ya que la perfusión de los músculos con el bloqueador de canales de calcio, verapamil, evitó el efecto de la adrenalina y un aumento en la concentración de calcio en el medio de perfusión provocó la inhibición de la enzima. Al ensayar la enzima obtenida de músculos control o tratados con adrenalina en concentraciones crecientes de calcio libre, ambas son inhibidas en función de la concentración de calcio. Sin embargo, la enzima obtenida de músculos perfundidos con adrenalina es más sensible a la inhibición por calcio. Esto sugiere que la adrenalina pudiera inducir una modificación en la enzima que la haga más sensible a calcio.

Para investigar si la enzima tiene que ver con la contracción cardíaca como lo sugiere la correlación entre contracción y actividad de la enzima en los músculos papilares perfundidos con adrenalina, valoramos la respuesta contractil de aurículas aisladas de los animales tratados con el inhibidor de la enzima. Estas presentaron una respuesta contractil a la adrenalina disminuida con respecto a los controles.

La estimulación alfa adrenérgica en el animal íntegro provoca una respuesta vagal caracterizada por una caída importante de la frecuencia cardíaca. En los animales tratados con el inhibidor de la enzima no se observó la caída en la frecuencia cardíaca indicando una alteración en la respuesta vagal. Sin embargo, al estimular eléctricamente el nervio vago de los animales tratados, se encontró una respuesta aumentada. Estos datos sugieren que la alteración causada por el inhibidor de la enzima puede encontrarse a nivel central.

En conclusión puede decirse que la S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa es inhibida por adrenalina a través de la estimulación de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Este efecto inhibitorio es modulado por calcio. La actividad de la enzima está relacionada con la contracción cardíaca y su inhibición causa alteración en la respuesta contractil y en la respuesta vagal. Los eventos relacionados con la actividad de la enzima que llevan a un fenómeno funcional tienen que ser estudiados más ampliamente. Lo que es indudable es que esta enzima participa en forma importante en la fisiología cardiovascular. Por

último, el entendimiento del papel fisiológico de esta enzima ayudaría al uso más racional de los fármacos que la toman como blanco de inhibición para sus efectos terapéuticos.

## ABSTRACT

Purified S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum* or rabbit erythrocytes is inactivated when incubated with cAMP. The aims of this study were to investigate whether adrenaline, which increases cytosolic cAMP and calcium concentrations, is able to modify *in vivo* the activity of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in the heart and to investigate if inhibition of the enzyme *in vivo* could affect the cardiovascular function.

The enzyme was assayed in a crude extract obtained from perfused guinea pig papillary muscles with the different tested substances.

Adrenaline was found to inhibit S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in papillary muscles in a concentration-dependent fashion. This inhibition was associated with an increase in the concentration of S-adenosyl-L-homocysteine (326%), decrease of adenosine (40%), and a lower transmethylation rate (17.6 control vs. 6.3 adrenaline).  $\beta$ -adrenoceptors are involved in the effect of adrenaline, since isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic agonist, inhibited the enzyme whereas the  $\beta$ -adrenergic blocker, propranolol, prevented this inhibition. Participation of calcium in the inhibitory effect of adrenaline was suggested because the calcium channel blocker, verapamil, suppressed this inhibition and high calcium in the perfusion medium inhibited the enzyme. *In vitro* experiments with calcium were performed in a semi-purified fraction of the enzyme, resulted in a concentration-dependent inhibition of the enzyme. Calcium concentration that inhibited the enzyme in 50% was in the mM range

for control and in the  $\mu\text{M}$  range for the enzyme obtained from adrenaline-treated muscles, indicating a different sensitivity to calcium.

*In vivo* experiments were performed inhibiting S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase by using the adenosine analog: adenosine dialdehyde which was injected 1h before studies to the animals. Results from this experiment shown that inhibition of the enzyme resulted in an impairment of the auricular contraction and failure in the ability of alpha-stimulation to droop the cardiac frequency after increase in blood pressure.

We conclude that adrenaline inhibits S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase *in vivo*, probably by a calcium-modulated mechanism and the physiological role of the enzyme is involved with the cardiovascular function

## ABREVIATURAS

Ado = adenosina

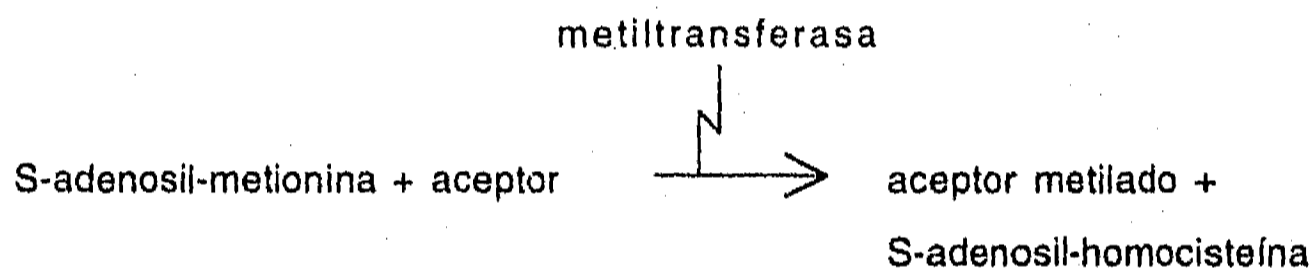
AdoHcy = S-adenosil-L-homocisteína

AdoMet = S-adenosil-L-metionina

AdoHcy hidrolasa = S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa

## INTRODUCCION

La función de la metionina como donador de metilos en la metilación enzimática requiere de la presencia de ATP para formar la versión activada de la metionina (2,3,8). Este compuesto fue identificado como S-adenosil-L-metionina (AdoMet) por Cantoni en 1952 (4). El AdoMet parece ser el donador de metilos más versátil prácticamente en todos los organismos incluidas las bacterias, mientras el ácido 5-metiltetrahidrofolato (60), la metilcobalamina (37) y la betaina (60) funcionan como donadores de metilos solo en algunos casos. La reacción general de metilación es la siguiente:



Existe una gran variedad de sustancias de bajo peso molecular que sirven como sustrato para las metiltransferasas dependientes de AdoMet (67). Estas incluyen a catecoles, norepinefrina, histamina, serotonina y triptamina. Existe un interés especial en la metilación de fosfolípidos de la membrana como la fosfatidiletanolamina que requiere de tres metilaciones subsecuentes y de la acción de dos metiltransferasas (metiltransferasa I y metiltransferasa II) diferentes para convertirse en fosfatidilcolina. Se sabe que la

metiltransferasa I la cual tiene como sustrato a la fosfatidiletanolamina se encuentra colocada hacia el lado citoplásmico de la membrana celular mientras la metiltransferasa II que tiene como sustratos a los productos de la primera y segunda metilación, dando origen a la fosfatidilcolina, se encuentra orientada hacia el lado extracelular de la membrana (25a). La distribución asimétrica de las dos enzimas implica que durante las reacciones de metilación de estos fosfolípidos, existan movimientos de translocaciones rápidas de los compuestos que alteran la estructura y fluidez de la membrana (25a). Estos eventos se han relacionado con procesos celulares de membrana que involucran estructura y función (6a,25, 25a). Así, en membranas de corazón de perro se demostró que la estimulación de receptores beta adrenérgicos estimula la metilación de fosfolípidos y la metilación de fosfolípidos aumenta el pegado de agonistas beta adrenérgicos (40). Otro hecho que pone de manifiesto un papel importante del fenómeno de metilación es que existan variaciones luz oscuridad de la concentración de fosfolípidos metilados en la membrana celular y estén relacionados con cambios en los sustratos y las enzimas involucradas en estas reacciones (6a). El ARNt y el ARNm son metilados por metiltransferasas específicas dependientes de AdoMet. La metilación de ácidos ribonucleicos la han relacionado con la regulación de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal (50,58). El ADN de diferentes fuentes contiene bases metiladas y se han descrito enzimas específicas que catalizan estas reacciones. El papel de la metilación del ADN en eucariotes no ha sido establecido pero se relaciona con procesos de regulación de la expresión

genética carcinogénesis, crecimiento y diferenciación celular. También se ha descrito la incorporación de grupos metilo en los aminoácidos de proteínas como la lisina, arginina, histidina, aspártico, glutámico y grupos carboxilo catalizados por metiltransferasas dependientes de AdoMet (42). La carboximetilación parece jugar un papel en procesos de quimiotaxis y secreción (1,41). Por lo anterior, la metilación de componentes celulares podría ser de gran utilidad en la regulación biológica y se ha comparado con los procesos de fosforilación.

La formación de S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy) a partir de AdoMet en las reacciones de metilación la demostraron Cantoni y Scarano en 1954 (6). Gibson (18), estudiando la síntesis enzimática de fosfatidilcolina en hígado de rata, reportó la inhibición de reacciones de metilación dependientes de AdoMet por AdoHcy. Esta observación fue confirmada por otros autores y extendida a otras reacciones de metilación demostrando que AdoHcy es un inhibidor potente de la mayoría de metiltransferasas (35,68), como por ejemplo: catecol O-metiltransferasa (9), metiltransferasa de ADN nuclear (10,32), metiltransferasa de ARNt (20,32,44), la (guanina-7-)metiltransferasa de ARNm viral (45), fosfatidiletanolamina microsomal (28) y de hígado de rata (55), la guanidinoacetato metiltransferasa (33), la tiramina metiltransferasa de plantas (38). La constante de inhibición para AdoHcy (1-35  $\mu$ M, ref. 4a) frecuentemente es igual o más baja que la Km para AdoMet (1.4-570  $\mu$ M, ref. 4a); indicando que los sitios catalíticos de muchas



metiltransferasas tienen la misma o mayor afinidad para AdoHcy que para AdoMet.

Los niveles tisulares de AdoHcy en varios tejidos de mamíferos varían de 0.5 a 30 nmol/g en cambio el contenido de AdoMet puede ser 5-10 veces más alto (4-70 nmol/g, ref. 13). La relación entre el contenido celular de AdoHcy y AdoMet junto con las  $K_i/K_m$  reportadas para las metiltransferasas señalan la posibilidad de que AdoHcy sea un inhibidor *in vivo* de las reacciones de metilación dependientes de AdoMet (6a). Se ha cuestionado si AdoHcy puede ejercer una inhibición de metiltransferasas en condiciones fisiológicas; sin embargo, se ha demostrado que bajo condiciones en que se encuentra elevada la concentración intracelular de AdoHcy en células intactas, hígado perfundido y animal íntegro existe también inhibición de las metiltransferasas (53,54,6a).

Dada la capacidad de la AdoHcy de inhibir a las metiltransferasas y por consiguiente a las reacciones de metilación se esperaría un sistema de remoción de este compuesto que permita que se lleven a cabo dichas reacciones. Este sistema consiste en la conversión de AdoHcy en adenosina (Ado) y homocisteína (Hcy). La reacción es catalizada por la enzima S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa (EC 3.3.1.1), la cual se demostró primero en el hígado por de la Haba y Cantoni en 1959 (19). La actividad de esta enzima alostérica puede jugar un papel crítico controlando los niveles tisulares de AdoHcy y por consiguiente influenciando las reacciones de metilación (6a).

La participación de las reacciones de metilación en una gran variedad de fenómenos biológicos, sugiere la posibilidad de que los

compuestos que inhibieran estas reacciones pudieran tener actividad farmacológica. La investigación para encontrar inhibidores de la metilación biológica se ha desarrollado en tres líneas. 1) Se han sintetizado diversos análogos de la AdoHcy y algunos de estos compuestos son inhibidores potentes de ciertas metiltransferasas, entre ellos tenemos a: L-AdoHcy, D-AdoHcy, AdoHcy sulfona, AdoHcy sulfóxido, N<sup>6</sup>-metil-AdoHcy, 8-Aza-AdoHcy, 3-Deaza-AdoHcy, 2'-Deoxi-AdoHcy y 3'-Deoxi-AdoHcy, 2) inhibidores o inactivadores de la AdoHcy hidrolasa pueden perturbar las metilaciones biológicas bloqueando la degradación de AdoHcy (tabla 1) 3) análogos de AdoHcy biológicamente activos pueden ser sintetizados a partir de análogos sintéticos de adenosina (tabla 1) cuando son utilizados como sustrato por la AdoHcy hidrolasa en la célula intacta.

**TABLA 1**  
**Análogos de adenosina como sustratos, inhibidores o inactivadores de la S-adenosil-homocisteína hidrolasa**

NOMBRE	SUSTRATO	INHIBIDOR	INACTIVADOR
Adenosina	+++	+++	+
Análogos de adenosina modificados en la base:			
3-Deaza-adenosina	+++	+++	+
2-Aza-3-deaza-adenosina	+++	+	
Nebularina	++	+	
Formicina	+	+	+
N <sup>6</sup> -Metil-adenosina	+	+	+
8-Aza-adenosina	+	+	+
Pirazamicina	+	+	++
2-Cloro-adenosina			+++
Análogos de adenosina modificados en el azúcar:			

Adenina-arabinósido	+	++	+++
(±) Aristeromicina	+	++++	+++
2'-Deoxi-adenosina			+
9-(S)-(2,3-dihidroxi-propil) adenina		++	
D-Eritadenina		+++	+++
Dialdehido de Adenosina		+++	+++
Análogos modificados en la base y el azúcar:			
Ara-3-deaza-adenina		+	
3-Deaza-adenosina carbocíclica	+	+++	

---

Como se ha mencionado y como puede deducirse de lo planteado hasta ahora, uno de los puntos de regulación de los procesos de metilación en general, lo constituye la actividad de la AdoHcy hidrolasa. Por lo tanto revisaré algunos puntos de esta enzima que considero relevantes para la mejor comprensión de esta tesis.

## **S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA HIDROLASA**

### **PROPIEDADES**

1.- Propiedades fisicoquímicas. La enzima purificada de varias especies tiene un peso molecular de 180,000 a 190,000 Da. con un coeficiente de sedimentación de 9S y está compuesta de 4 subunidades de 45,000 a 48,000 Da.

La AdoHcy hidrolasa contiene una molécula de NAD<sup>+</sup>/subunidad fuertemente unida, la cual participa en el ciclo catalítico. El punto isoeléctrico de la AdoHcy hidrolasa de ratón (61), rata (17,34),

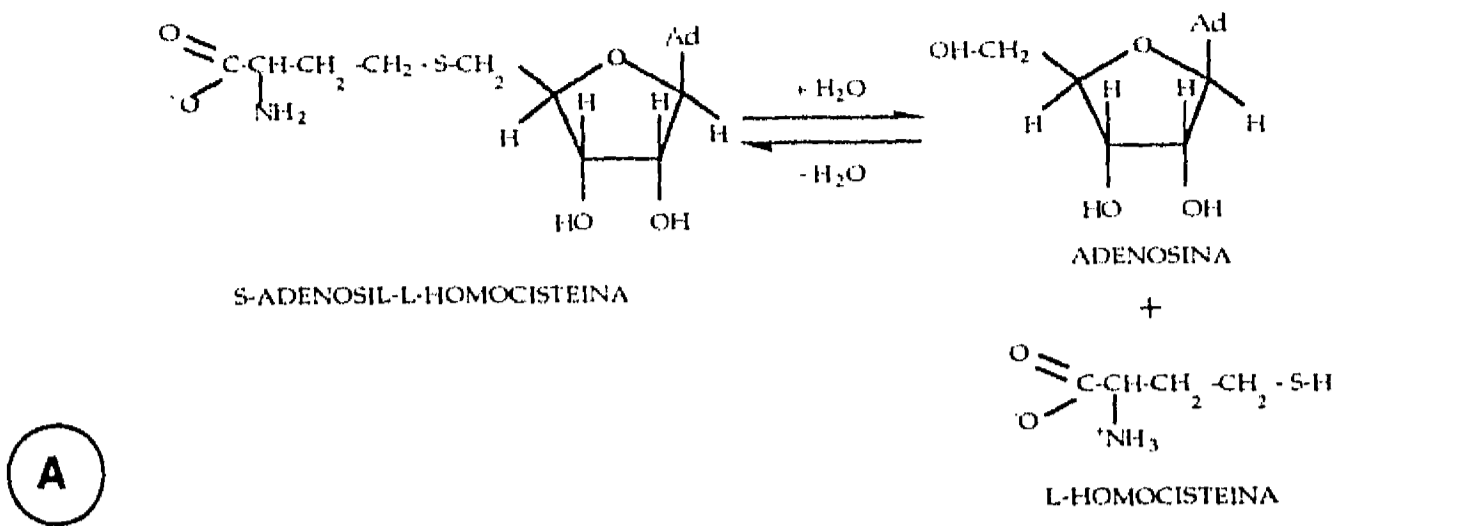
ternera e hígado bovino (49), corteza suprarrenal y cerebro de rata (52) está en el intervalo de pH de 5.35 a 6.0.

2.- Propiedades cinéticas. Los valores de Km reportados en la literatura para diferentes tejidos y especies de mamíferos varían en el intervalo de 0.2 a 420  $\mu\text{M}$  para adenosina y de 0.75 a 60  $\mu\text{M}$  para AdoHcy.

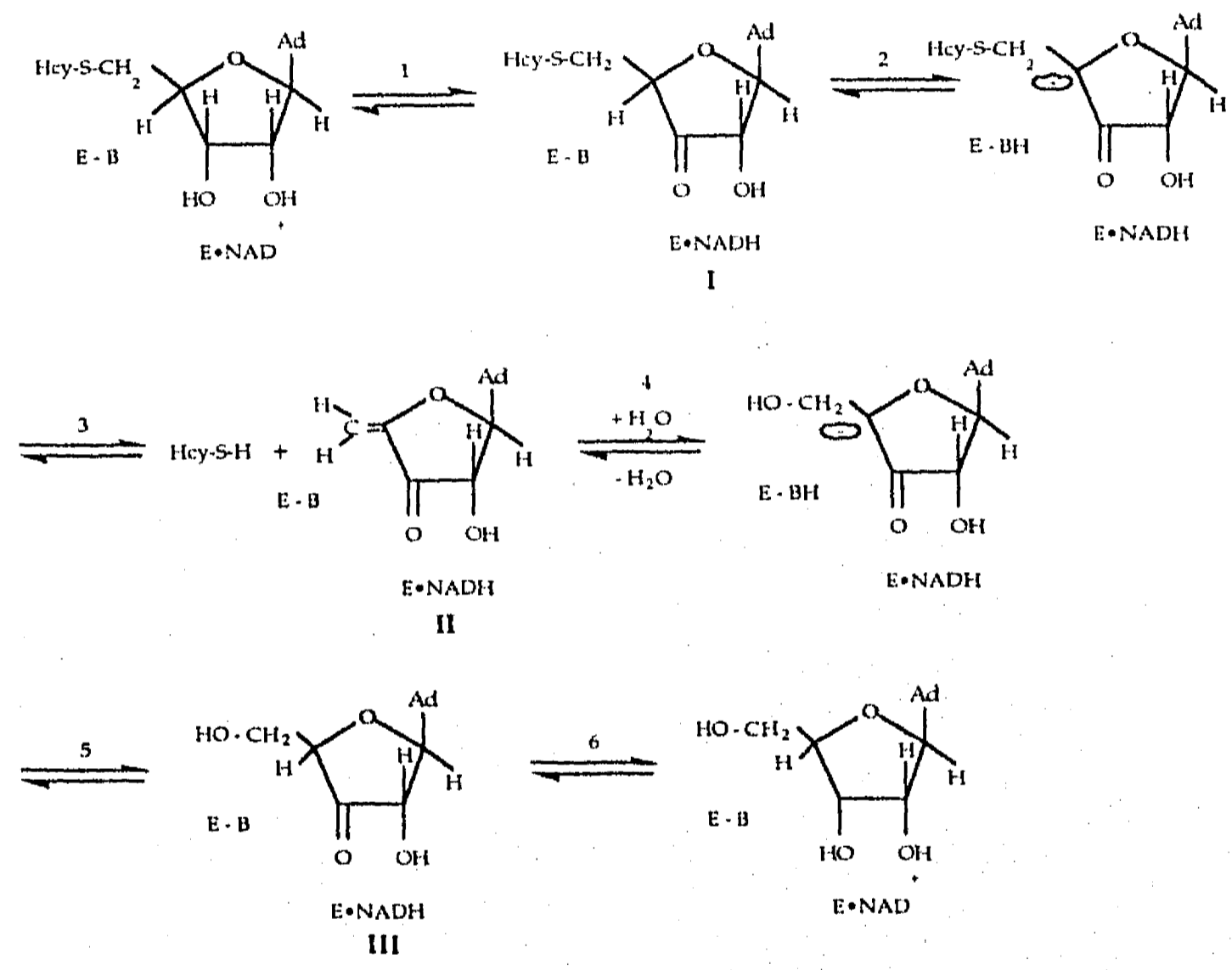
3.- Localización genómica. La AdoHcy hidrolasa ha sido localizada en el humano en el cromosoma 20. El gen para la adenosina desaminasa ha sido mapeado en este mismo gen. Se ha sugerido que la ocurrencia de estos dos genes en el mismo cromosoma pudiera tener un carácter evolutivo. La adenosina desaminasa cataliza el metabolismo de adenosina y de 2-deoxiadenosina y por consiguiente crea condiciones favorables para la actividad de la AdoHcy hidrolasa. Además, la adenosina desaminasa es una enzima presente en procariotes y en eucariotes mientras la AdoHcy hidrolasa es exclusiva de eucariotes. La evolución de la AdoHcy hidrolasa pudo haber ocurrido después de la adenosina desaminasa. El hecho de que la AdoHcy hidrolasa pueda formar un complejo estable con adenosina, un nucleótido de adenina y contenga un  $\text{NAD}^+$  unido fuertemente, sugiere la posibilidad de que la evolución del gen de la AdoHcy hidrolasa involucró una recombinación de parte del gen de la adenosina desaminasa con la secuencia de DNA para los dominios de unión del  $\text{NAD}^+$  y los nucleótidos de adenina (22).

#### **MECANISMO DE REACCION**

La AdoHcy hidrolasa cataliza la reacción de la hidrólisis reversible de AdoHcy a Ado y Hcy (fig. 1).

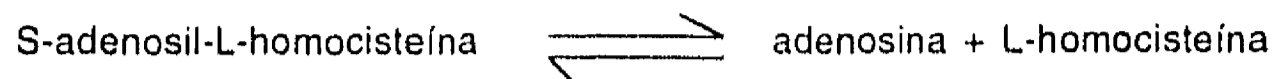


A



B

**FIGURA 1. Mecanismo catalítico de la AdoHcy hidrolasa.** Reacción general panel A, mecanismo de reacción panel B. E-B = base en el sitio activo, E•NAD<sup>+</sup> = NAD<sup>+</sup> unido a la enzima, Ad = adenina, Hcy = homocisteína.



Cuando la concentración de sustratos es mayor al rango micromolar, la reacción favorece la síntesis de AdoHcy (19). Esto se expresa más precisamente por la constante de equilibrio (K<sub>eq</sub>) de la reacción, la cual está definida por la ecuación:

$$K_{eq} = \frac{[\text{Ado}] \times [\text{Hcy}]}{[\text{AdoHcy}]} = 10^{-6} \text{ M}$$

Tanto la Ado como la Hcy son inhibidores potentes de la reacción hidrolítica y la catálisis de la reacción puede dirigirse hacia la hidrólisis removiendo a la adenosina o a la homocisteína. El flujo metabólico *in vivo* es muy probablemente hacia la hidrólisis porque la adenosina y la homocisteína son removidas rápidamente. Sin embargo, el metabolismo de estos compuestos presenta variaciones luz-oscuridad lo que hace más complejo el proceso (6a)

La Ado intracelular ( $\approx 10 \mu\text{M}$ ) forma un complejo estable con la AdoHcy hidrolasa de varios tejidos, de hecho, en condiciones basales no existe adenosina libre intracelular (7,21,34,62). Una fracción muy pequeña de Ado unida fuertemente a la enzima de hígado es convertida a adenina por la misma enzima en una reacción reversible (59). La Ado que se encuentra fuertemente unida a la enzima no se libera fácilmente o se disocia lentamente (21,62) por incubación con exceso de adenosina fría pero puede ser disociada rápidamente en

ebullición o con tratamiento de la enzima con dodecil sulfato o etanol. La Ado que está en complejo con la enzima no es metabolizada por la adenosina deaminasa (59). Este fenómeno se ha llamado "secuestro de adenosina" e indica un posible papel fisiológico de este proceso.

Concentraciones altas de adenosina son capaces de inactivar a la AdoHcy hidrolasa de linfocitos humanos, placenta (23) e hígado de rata (34,6a

). La cinética de inactivación es consistente con un mecanismo "suicida" (23,34), lo cual implica que el complejo inactivo se forma de un complejo reversible Ado-enzima (66). La inactivación de la enzima por Ado y el secuestro de Ado probablemente son dos fenómenos relacionados. Así, la enzima que forma un complejo inestable con adenosina es catalíticamente inactiva.

El mecanismo catalítico de la AdoHcy hidrolasa puede observarse en la fig. 1. La enzima contiene una molécula de  $\text{NAD}^+$  unido firmemente, el cual participa en el ciclo catalítico. El mecanismo que se sugiere se basa en la oxidación/reducción en el C-3' del residuo de ribosa de la adenosina o la AdoHcy, con la reducción/oxidación concomitante del  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . La oxidación del sustrato activa el protón del C-4' y de esta manera se facilita la eliminación del sustituyente del C-5' (OH de la adenosina o el grupo homocistinil del AdoHcy). De esta manera, la hidrólisis del AdoHcy involucra la oxidación del grupo 3'-hidroxil de AdoHcy por el  $\text{NAD}^+$  unido a la enzima. Posterior a la oxidación, se elimina la L-homocisteína para dar 3'-ceto,4'-5'-dihydroadenosina. Este

compuesto reacciona con el agua para formar 3'-cetoadenosina, la cual es entonces reducida a adenosina.

#### *PAPEL DE LA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA HIDROLASA EN EL METABOLISMO INTERMEDIARIO*

A pesar de que el equilibrio de la reacción catalizada por la AdoHcy hidrolasa favorece la síntesis, la actividad de la enzima debe ser en el sentido de hidrólisis en la célula intacta ya que la adenosina y Hcy son removidas rápidamente como se describe más adelante.

El papel de la AdoHcy hidrolasa como fuente de adenosina en varios tejidos no se ha evaluado completamente. Se ha propuesto que tiene un papel primordial en la producción de adenosina por el corazón (56,57); sin embargo, la adenosina puede provenir de la desfosforilación del AMP o del espacio extracelular. La adenosina es metabolizada por dos caminos: la desaminación a inosina por la adenosina desaminasa y la fosforilación a AMP por la adenosina cinasa.

El otro producto formado a partir de AdoHcy es la L-homocisteína. Es interesante que en los vertebrados esta es la única fuente de Hcy (5). La L-homocisteína es convertida a L-metionina por dos enzimas: la 5-tetrahidrofolato:L-homocisteína metiltransferasa o la betaína:L-homocisteína S-metiltransferasa. La Hcy también reacciona con serina para formar cistationina.



Cuando la adenosina o la Hcy o ambos compuestos se acumulan en la célula intacta, la reacción catalizada por la AdoHcy hidrolasa se dirige hacia la síntesis de AdoHcy y la degradación de este compuesto se inhibe. Por lo anterior, se pueden obtener niveles elevados de AdoHcy suplementando con adenosina o AdoHcy exógenos o con ambos compuestos incluso sin inhibición de las enzimas que metabolizan a la adenosina.

Se ha mencionado anteriormente que la Ado puede encontrarse compartamentalizada en la célula intacta uniéndose a la AdoHcy hidrolasa. La implicación fisiológica de este hecho puede deducirse del papel que juega el nucleósido en ciertos aspectos metabólicos. Así, la adenosina es un regulador de la lipólisis en tejido adiposo, sin embargo parte de la adenosina intracelular está unida a proteínas intracelulares (16) (Por ejemplo la AdoHcy hidrolasa). Además, la adenosina presenta variaciones luz-oscuridad en su concentración en diferentes tejidos de la rata (5a) y en sangre de humanos (5b). Igualmente, el efecto vasodilatador del nucleósido en el corazón se atribuye a la fracción extracelular de adenosina libre. Una porción de la adenosina intracelular podría estar unida a la AdoHcy hidrolasa u otras proteínas (57). En general, el secuestro de adenosina se debe tomar en cuenta cuando se trata de correlacionar los efectos fisiológicos o farmacológicos del compuesto con la concentración del nucleósido.

Otra molécula que se une a la AdoHcy hidrolasa es el AMPc. Se ha reportado que el AMPc inhibe a la enzima por disociar el grupo prostético  $\text{NAD}^+$  de la subunidad catalítica en *Dictyostellium discoideum* pudiendo ser un regulador de la enzima en este

microorganismo participando en la regulación de procesos de quimiotaxis (31). El papel que juega el AMPc en la enzima de animales superiores no se ha investigado.

#### *DISTRIBUCION Y NIVELES TISULARES DE LA S-ADENOSIL-L-HOMOCISTEINA HIDROLASA*

Walker y Durre (65) investigaron los niveles de AdoHcy hidrolasa en tejidos de vertebrados; de pollo, perro, rata y conejo. En la rata por ejemplo, la actividad más alta se encontró en hígado, páncreas y riñón (0.91, 0.35, 0.4 nmol/min/mg de prot. respectivamente), intermedia en el bazo y testículos (0.33, 0.15 nmol/min/mg de prot. respectivamente) y baja en el cerebro y corazón (0.09, 0.08 nmol/min/mg prot. respectivamente). Estos datos han correlacionado muy bien con lo reportado por otros autores para tejidos de rata y ratón. El riñón y las glándulas suprarrenales contienen entre el 20 y 40% de los valores del hígado y páncreas. El cerebro presenta valores intermedios y se han reportado actividades bajas de la enzima en corazón, testículos, músculo, próstata, bazo y pulmones (13,14,51).

Un punto importante es que existen diferencias de especie en la actividad de la AdoHcy hidrolasa (Tabla 2). La actividad encontrada en el hígado de rata es 5 veces más alta que la del hígado humano y la actividad de la enzima de corazón de cobayo es cerca de 20 veces más alta que la de corazón de perro (56).

La actividad específica de la AdoHcy hidrolasa purificada a homogeneidad de varios tejidos es del mismo orden de magnitud (= 0.1-1.0  $\mu$ mol/min/mg de prot. ref.17,43,49,63).

**TABLA 2**

**Actividad de la AdoHcy hidrolasa en varias especies de mamíferos.**

REF.	ORGANO	ESPECIE	ACTIVIDAD DE LA AdoHcy HIDROLASA. (nmol/min/mg de prot.)
56	Corazón	Cobayo	1.29±0.17
56		Gato	0.27±0.05
65		Pollo	0.10
56		Rata	0.21±0.04
65		Rata	0.08
56		Conejo	0.092±0.01
65		Conejo	0.16
56		Perro	0.079±0.011
65		Perro	0.05
65	Hígado	Rata	0.91
65		Perro	0.30
65		Conejo	0.92

La AdoHcy hidrolasa en hígado de rata parece ser influenciada por factores nutricionales, hormonales y variaciones luz-oscuridad. La actividad específica se incrementa con una dieta rica en proteínas. La inyección de hidrocortisona o estradiol resulta en un

ligero incremento en la actividad de la enzima mientras el tratamiento con tiroxina inhibe su actividad. En ratas depletadas de hormonas testiculares y prostáticas se ha observado un decremento severo de la actividad de la enzima después de hipofisectomía pero se restaura con la administración de testosterona por un mecanismo desconocido (39).

Localización subcelular. Se ha reportado que la mayor cantidad de AdoHcy hidrolasa se recupera en la fracción postmicrosomal de hígado de rata pero una fracción considerable puede recuperarse en la fracción nuclear (14). En el humano y en el hígado de rata se ha localizado en la fracción citosólica. Igualmente, la AdoHcy hidrolasa de cerebro de rata y de corazón de varias especies es una proteína soluble (56).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Por lo que se ha expuesto, resulta evidente que la AdoHcy hidrolasa pudiera ser una enzima muy importante en la regulación de muchos procesos biológicos en animales eucariotes. Por una parte es la enzima encargada de remover el principal inhibidor de las reacciones de metilación (AdoHcy) con lo que pudiera ser un factor importante en la regulación de estos procesos. Por otra parte esta enzima cataliza una de las reacciones que producen adenosina que es un compuesto con una gran actividad biológica. Además, las vías metabólicas relacionadas con la AdoHcy hidrolasa presentan variaciones con el ciclo luz-oscuridad lo cual habla de la importancia fisiológica de este sistema. Sin embargo, faltan

estudios para definir el papel de esta enzima en la función de organismos superiores y los mecanismos que *in vivo* pudieran modular a la AdoHcy hidrolasa. A pesar de esto, uno de los blancos terapéuticos en contra del cáncer y algunos virus lo constituye la inhibición de esta enzima (11,12,36) y se utilizan ya algunos fármacos de esta naturaleza con el desconocimiento de las alteraciones que pudieran provocar.

El **objetivo** de este trabajo fue explorar el papel de la enzima en algunos aspectos fisiológicos del corazón de cobayo que como se recordará, presenta niveles altos en la actividad de la enzima con respecto al de otras especies y en el cual además se ha descrito que la producción de adenosina depende principalmente de la actividad de la AdoHcy hidrolasa (26,57).

El abordaje que se siguió fue el buscar respuesta a dos preguntas básicas 1) ¿ Existen condiciones fisiológicas que estén relacionadas con cambios en la actividad de la enzima? y 2) ¿ Que alteraciones fisiológicas se presentan al inhibir la actividad de la AdoHcy hidrolasa?.

Para contestar la primera pregunta se planteó la siguiente **hipótesis:**

***Puesto que el AMPc inhibe la actividad de la enzima purificada de Dictyostellum discoideum y la estimulación adrenérgica aumenta las concentraciones intracelulares de este nucleótido, la administración de agonistas y antagonistas adrenérgicos, al variar los niveles de AMPc, deberán modificar la actividad de la enzima.***

En esta parte del trabajo utilizamos como modelo el músculo papilar del corazón de cobayo el cual fue perfundido y sometido *in vivo* a la acción de la adrenalina y diferentes sustancias para después medir la actividad en un extracto de la enzima. Algunos experimentos se realizaron *in vitro* en una fracción más pura de la enzima del músculo papilar.

La segunda pregunta la contestamos inhibiendo a la enzima en el animal íntegro por medio del análogo de adenosina, dialdehído de adenosina. La hipótesis que nos planteamos fue muy simple:

***Inhibiendo la actividad de la enzima in vivo podemos estudiar las alteraciones funcionales que se producen e inferir el papel que juega la enzima en las funciones exploradas.***

El inhibidor fue administrado por vía intraperitoneal al animal íntegro y posteriormente se analizó el efecto en algunos parámetros cardiovasculares en el animal íntegro o en aurículas aisladas y perfundidas.

Los resultados que obtuvimos demuestran en primer lugar que: a) la adrenalina inhibe la actividad de la enzima b) esta inhibición es por estimulación  $\beta$ -adrenérgica c) la inhibición es modulada por calcio y en segundo lugar que: 1) al inhibir la enzima *in vivo* se altera la respuesta presora vagal y 2) la actividad contractil de las aurículas aisladas es mucho menor.

Concluimos que la AdoHcy hidrolasa es susceptible de inhibirse por condiciones que pueden presentarse fisiológicamente y que juega

un papel importante en algunas funciones cardiovasculares exploradas.

La parte del trabajo que estudia la inhibición de la enzima por adrenalina ha sido preparada para publicación por lo que se anexa una copia del manuscrito y en la tesis me referiré a él, en algunos detalles de metodología y de resultados.

## **METODOLOGIA**

Se utilizaron cobayos machos de 400-500 g de peso alimentados ad libitum y adaptados al ciclo natural de luz-oscuridad.

***Experimentos con músculo papilar aislado y perfundido.*** El método de aislamiento y perfusión de los músculos papilares, la obtención del extracto para el ensayo de la AdoHcy hidrolasa y la cuantificación de la actividad de la enzima se encuentran descritos en el manuscrito anexo. También se encuentran los detalles de los experimentos realizados y la metodología para medir la concentración de Ado, Hcy y AdoHcy. Los detalles más importantes se encuentran además en los pies de las figuras.

**Experimentos con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa.**

**Preparación del adenosina-2'-3'-dialdehído.** El inhibidor se preparó por el método descrito por Hoffman (27). Una suspensión de 2.5 mmol de adenosina en 5ml H<sub>2</sub>O se ajustó a pH 4.0 con ácido acético. A esta suspensión se le agregó 5 ml de NaIO<sub>4</sub> 0.51 M gota a

gota. La adenosina se disuelve completamente. Esta mezcla de reacción se coloca en la oscuridad durante una hora al final de la cual se ajusta el pH a 7.0 con NaOH. Se mantiene en el refrigerador durante la noche y el precipitado contiene al inhibidor el cual se lava y se liofiliza para utilizarse en los experimentos. En estas condiciones la conversión de adenosina a dialdehído de adenosina es casi total, sin embargo, algún remanente de adenosina o de ácido periódico es removido con las lavadas ya que estos dos compuestos son solubles a pH 7.0 y el análogo no lo es. La solución a inyectar por vía intraperitoneal se prepara fresca cada día en sol. salina isotónica.

***Aurícula aislada.*** Para estos experimentos se disecó la aurícula izquierda ya sea de cobayos controles o tratados durante una hora con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa (200mg/Kg de peso corporal, intraperitoneal). Las aurículas fueron colocadas en una cámara de incubación de órganos aislados conteniendo sol. de Tyrode con un volumen final de 18 ml y fueron estimuladas con un par de electrodos de campo a 5Hz. Se realizaron curvas de concentración respuesta con concentraciones crecientes acumulativas de adrenalina. Se registro la tensión desarrollada por la aurícula utilizando un transductor de tensión Grass partiendo de una tensión inicial de 1g. Los resultados se expresan como porcentaje de la tensión desarrollada en ausencia de adrenalina.

***Efecto del inhibidor de la AdoHcy hidrolasa en el animal íntegro.*** Cobayos de 400-500 g fueron inyectados intraperitonealmente con 200mg/Kg de peso del dialdehído de



adenosina y anestesiados una hora después con 80/20 mg de ketamina/xilazina. Se monitoreó la presión arterial por medio de un catéter insertado en la carótida izquierda conectado a un transductor de presión. La adrenalina y el propranolol se inyectaron a través de un catéter insertado en la vena yugular derecha. Se colocaron electrodos de aguja para monitoreo de electrocardiograma. Los registros fueron realizados en un polígrafo VR6 (Electronics for Medicine Inc., Pleasantville, New York USA).

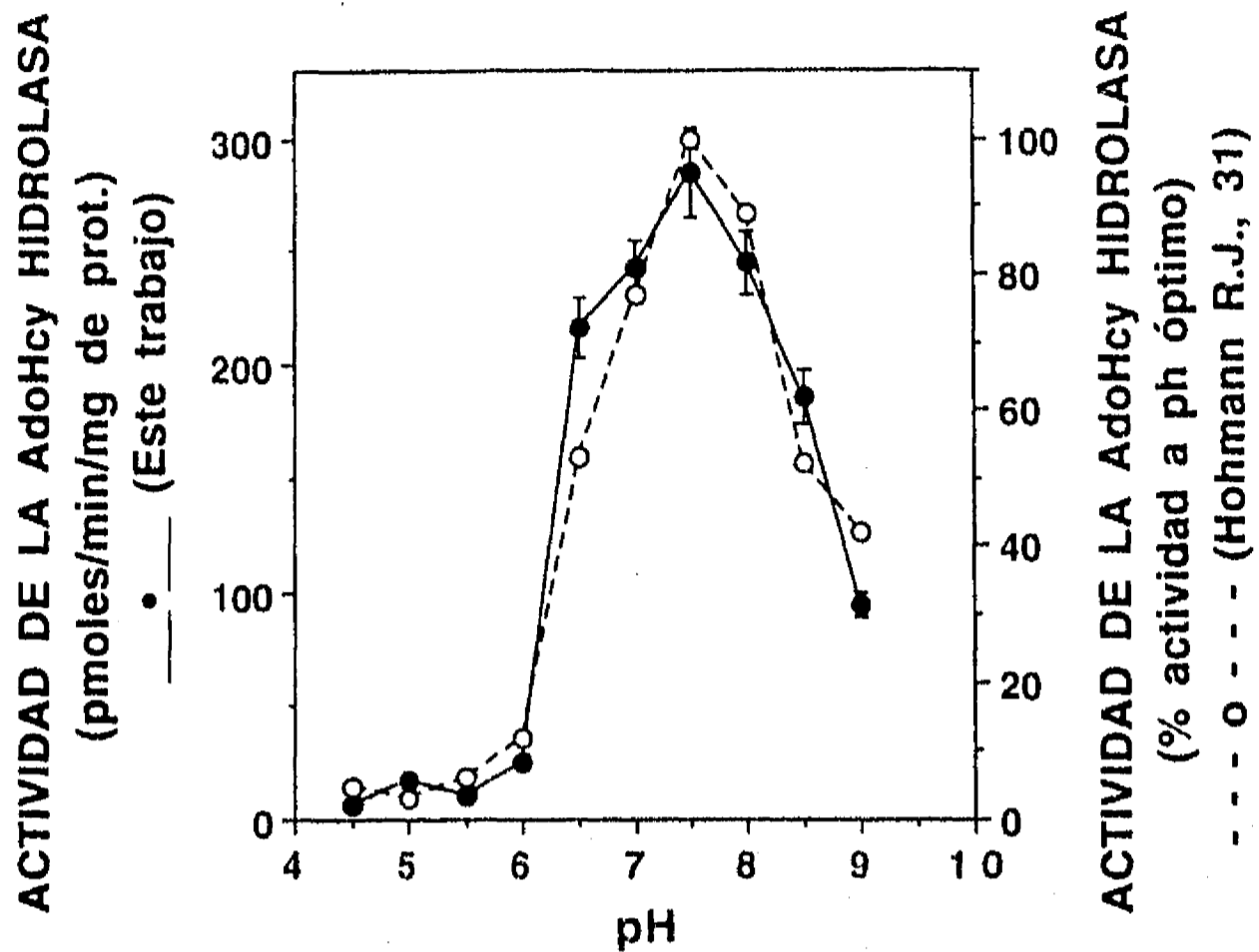
Estadística.- Los valores en donde se indica son el promedio de al menos 4 experimentos  $\pm$  Error estandar. El análisis estadístico se realizó con la prueba de t'Student. Se aceptó un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

En la figura 2 se muestra el efecto del pH sobre la actividad de la enzima AdoHcy hidrolasa en el extracto crudo de músculo papilar aislado y perfundido. El comportamiento es similar al reportado para enzimas obtenidas de otras fuentes con un valor de pH óptimo de 7.5 (31).

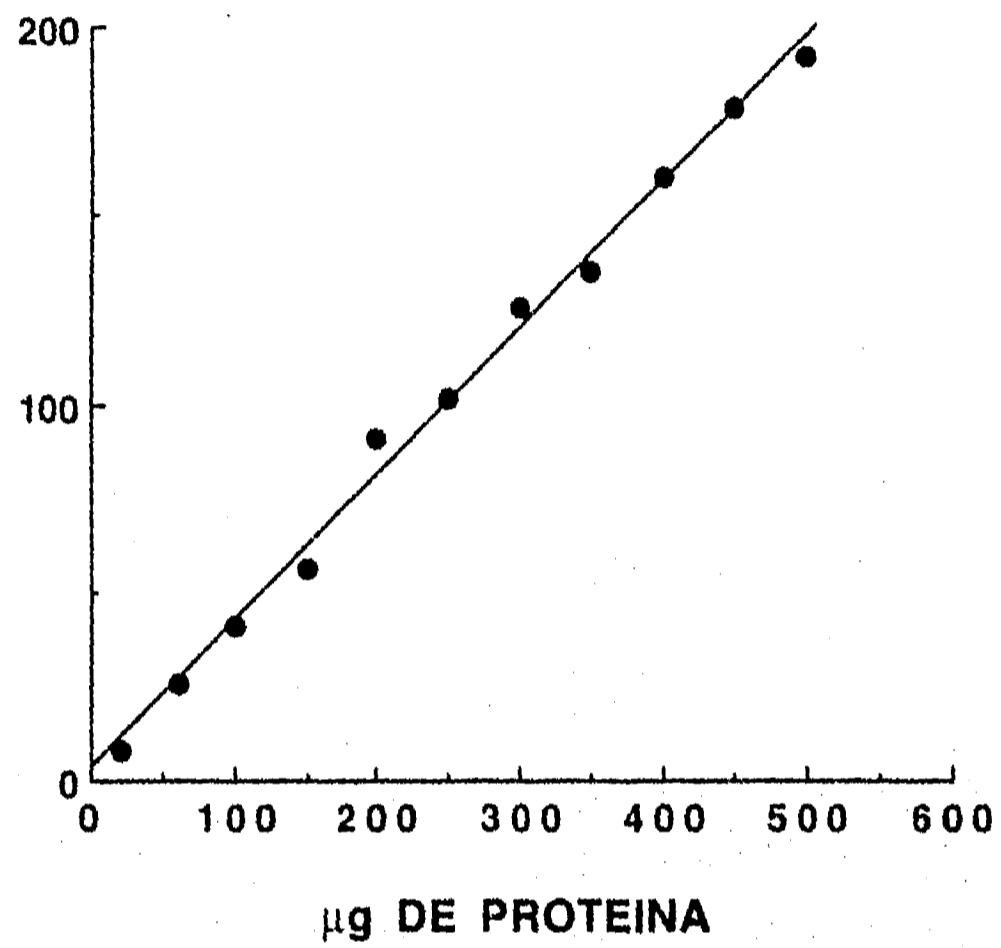
La figura 3 muestra la dependencia de la actividad de la AdoHcy hidrolasa con la concentración de proteína, la cual es lineal en las concentraciones de proteína utilizadas para este estudio (de 25 a 600  $\mu$ g).

**Efecto de la adrenalina en la actividad de la AdoHcy hidrolasa en músculo papilar.** Se ha reportado que el AMPc tiene un efecto inhibitor en la actividad de la enzima en *Dictyostelium*



**FIGURA 2.** Efecto del pH sobre la actividad de la AdoHcy hidrolasa. En extractos crudos de la enzima se enzó la actividad de la AdoHcy hidrolasa en buffers con diferentes valores de pH. Los punto representan el promedio de 4 experimentos individuales. Se sobrepuso una gráfica tomada de la literatura para comparar el comportamiento de la enzima extraída de corazón con la de otras fuentes en este caso de *D. discoideum* (31).

**ACTIVIDAD DE LA AdoHcy HIDROLASA**  
(pmoles/min de SAH hidrolizado)

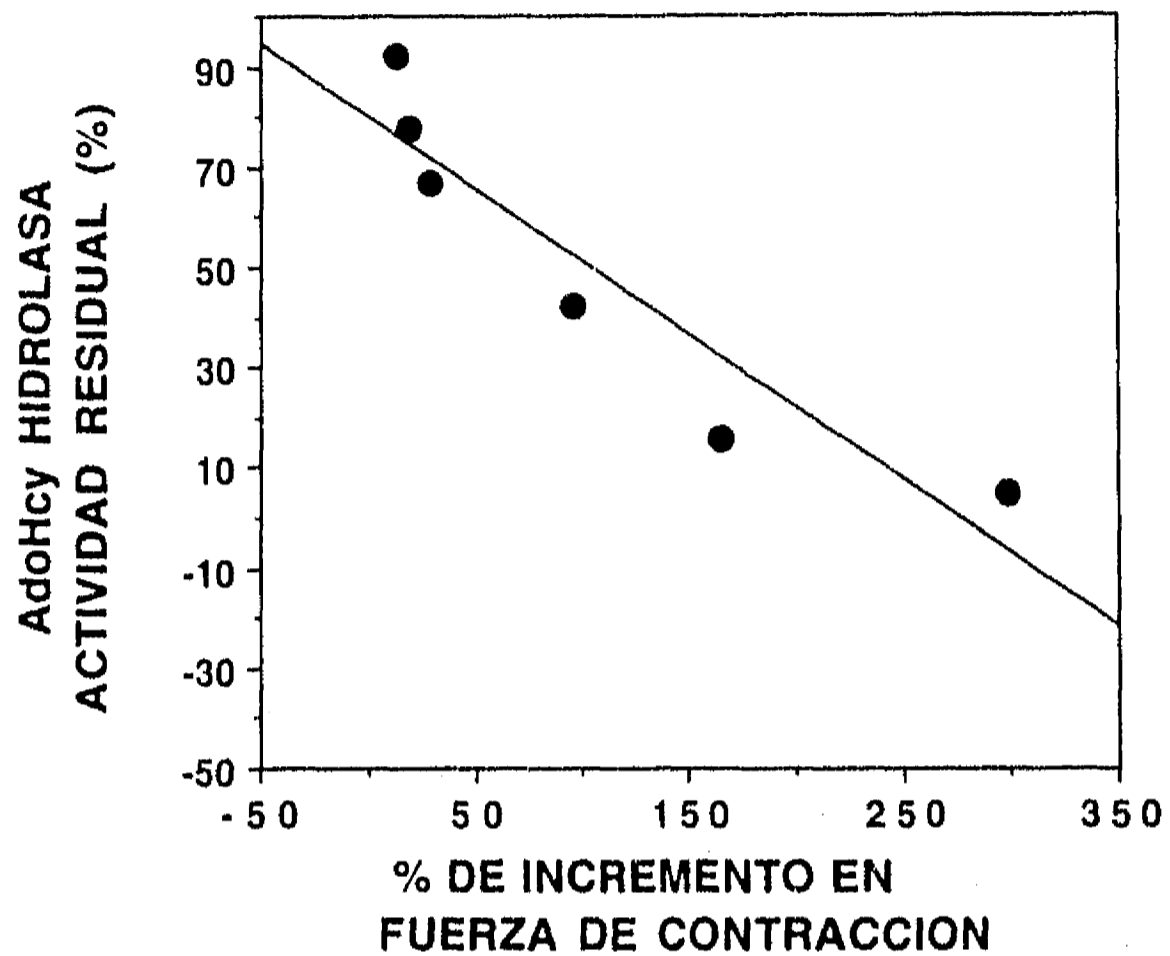


**FIGURA 3.** Efecto de la concentración de proteína en la actividad de la AdoHcy hidrolasa.

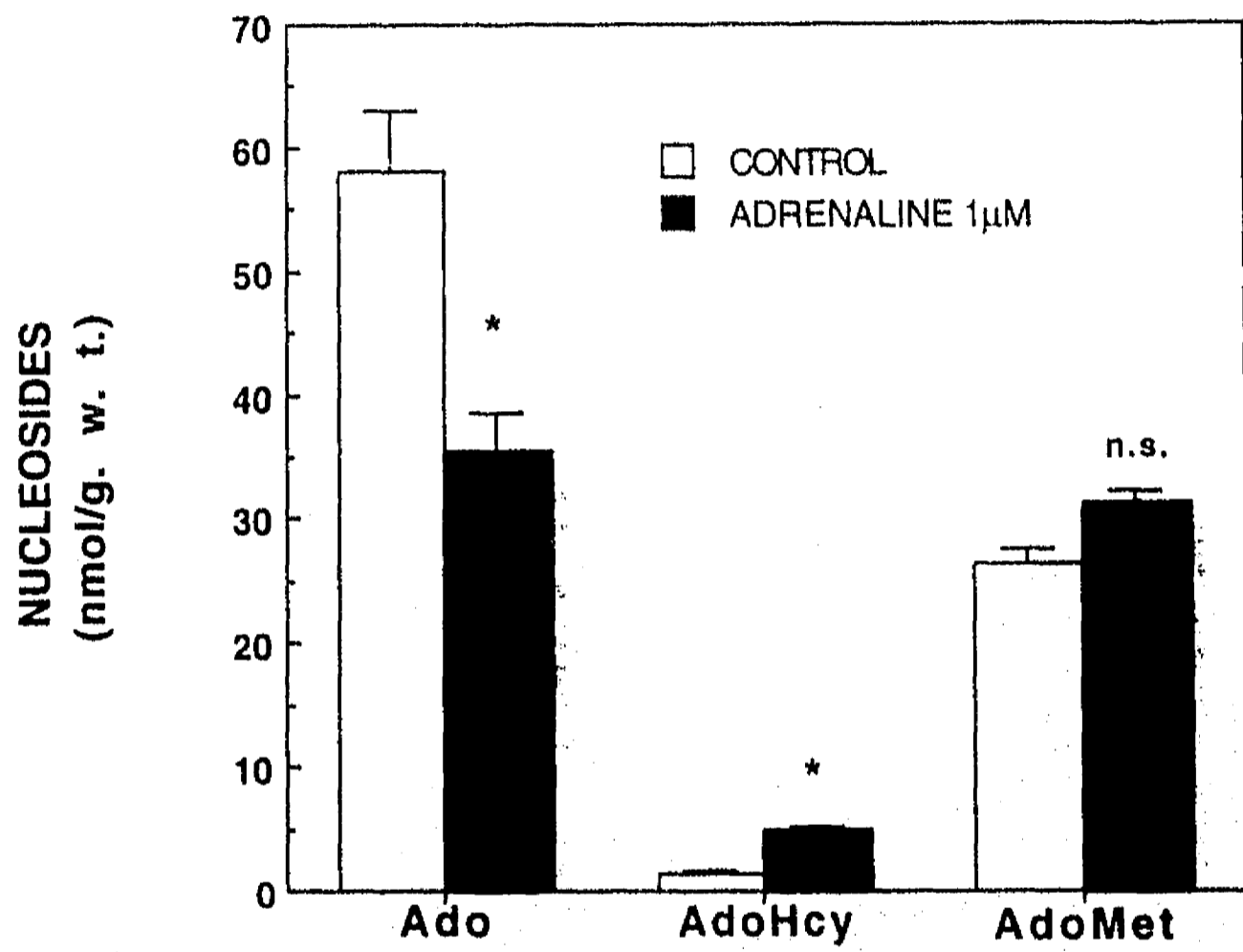
*discoideum* (30,31). En este trabajo se exploró si la adrenalina, la cual aumenta los niveles de AMPc intracelular, pudiera afectar la actividad de la AdoHcy hidrolasa. Los resultados obtenidos fueron que la adrenalina tiene un efecto inhibitorio de la actividad de la AdoHcy hidrolasa dependiente de la dosis (Fig. 4, curva con los círculos llenos), este efecto inhibitorio es inverso al efecto estimulador de la adrenalina sobre la contracción (Fig. 4, curva de los cuadros vacíos).

La figura 5 presenta la gráfica de regresión lineal para mostrar la correlación entre el efecto de la adrenalina sobre la contracción del músculo papilar y la actividad de la AdoHcy hidrolasa. Existe una clara correlación inversa ( $r=0.87$ ).

**Efecto de la adrenalina en el índice de metilación en el músculo papilar.** Si el efecto de la adrenalina sobre la actividad de la enzima observado hasta ahora se reflejara en el tejido, la enzima al ser inhibida no podría remover a la AdoHcy causando su acumulación y además se alteraría el índice de metilación. Decidimos utilizar la concentración de  $1 \mu\text{M}$  porque la enzima se encuentra inhibida en más de un 80% (Fig. 4) y de esta manera pudiera ser más claro el cambio en la concentración de los metabolitos involucrados en la vía. La figura 6 (2 del manuscrito) muestra los niveles Ado, AdoHcy y AdoMet en músculo papilar tratado 15 min. con  $1 \times 10^{-6}$  de adrenalina. La adrenalina ( $1 \mu\text{M}$ ) incrementó significativamente los valores de AdoHcy en 326% comparado con el control (control;  $1.5 \pm 0.07$  vs. adrenalina;  $4.9 \pm 0.18$  nmol/g peso húmedo) y provocó la disminución de la concentración de la Ado en 40% ( $58.1 \pm 5$  vs.  $35.4 \pm 3$  nmol/g peso húmedo) La concentración de AdoMet



**FIGURA 5.** Gráfica que muestra la correlación entre la actividad de la AdoHcy hidrolasa y el incremento en la fuerza de contracción bajo el efecto de concentraciones crecientes de adrenalina. (construida con los datos de la figura 4, coeficiente de correlación = 0.87).

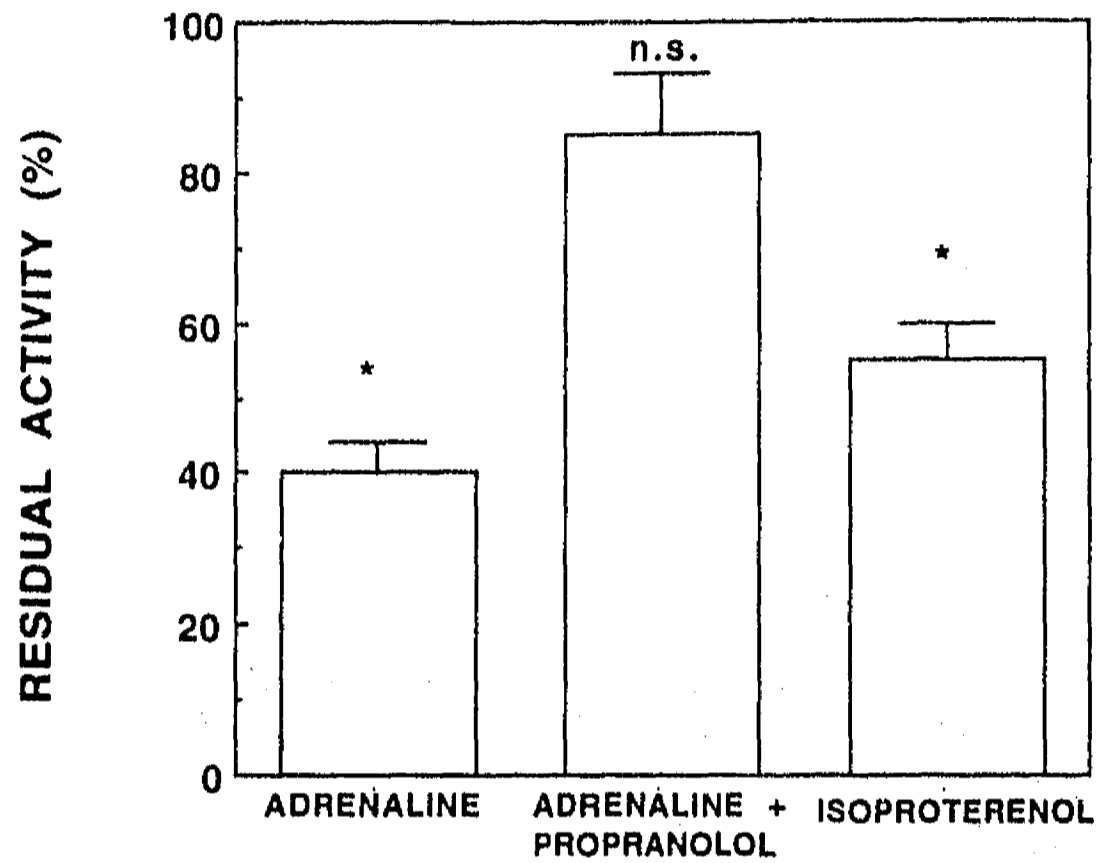


**FIGURA 6.** Efecto de la adrenalina en la concentración tisular de Ado, AdoHcy y AdoMet. Los nucleósidos se midieron en extractos perclóricos de músculos control y tratados con adrenalina (1µM) por HPLC como se describe en metodología. \* $p \leq 0.01$  vs control. Los valores se expresan como promedio  $\pm$  Error estándar,  $n=6$ , n.s = no significativo (reproducida del manuscrito anexo, fig. 2).

no cambió significativamente (adrenalina;  $26.4 \pm 1.2$  vs. control;  $31.3 \pm 1.0$  nmol/g peso húmedo). El índice de metilación calculado por la relación AdoMet/AdoHcy fue menor para el músculo tratado con adrenalina con respecto al control (17.6, control vs 6.3, adrenalina). Estos resultados nos indican que la adrenalina está afectando la actividad metilante en el corazón por inhibir a la enzima AdoHcy hidrolasa *in vivo*.

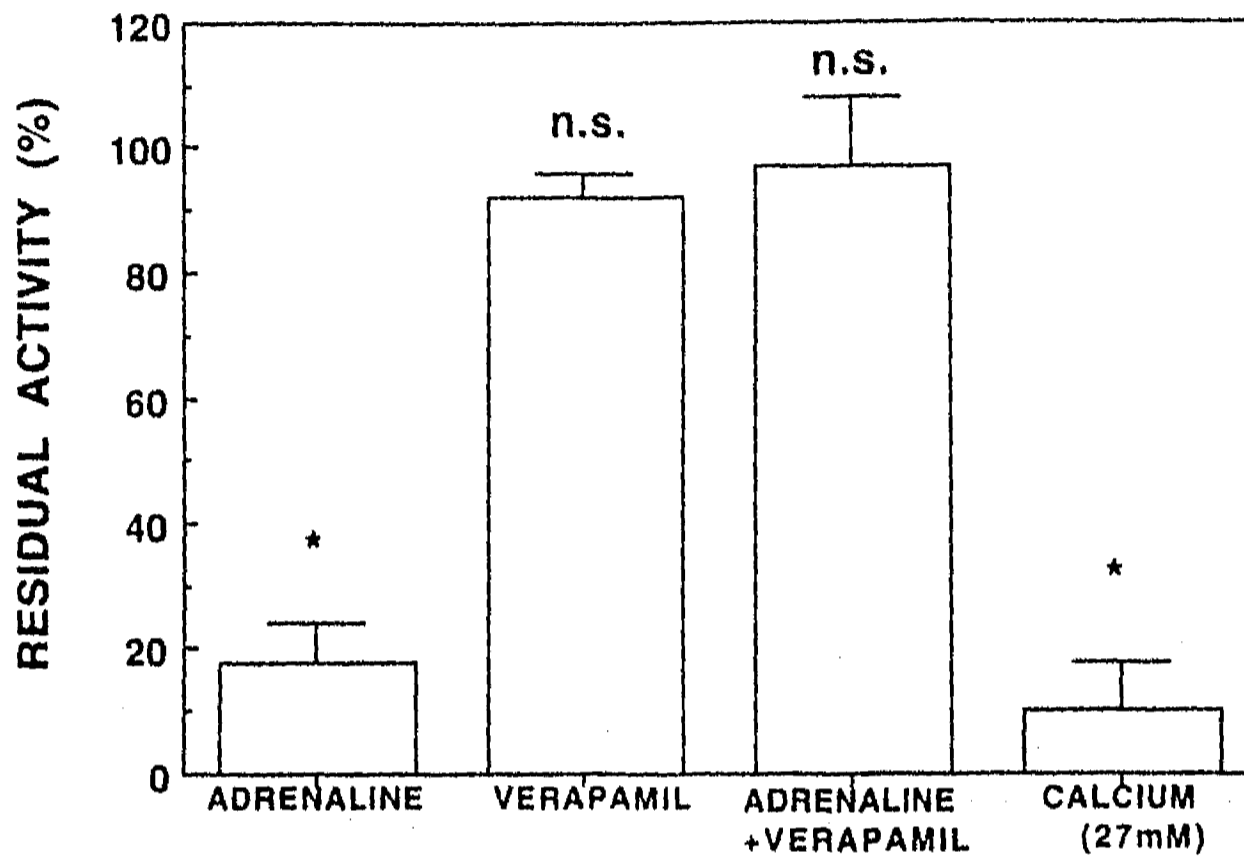
**Papel del AMPc en la inhibición de la AdoHcy hidrolasa.** La figura 7 (3 del manuscrito) muestra el efecto inhibitorio de adrenalina ( $0.1 \mu\text{M}$ , es la concentración que inhibe en un 50% a la enzima) en la actividad de la AdoHcy hidrolasa en el músculo papilar perfundido. Este efecto fue bloqueado parcialmente por el antagonista  $\beta$ -adrenérgico, propranolol ( $10 \mu\text{M}$ ). El agonista  $\beta$ -adrenérgico, isoproterenol a concentración de ( $0.01 \mu\text{M}$ ) tuvo un efecto similar al de la adrenalina.

**Papel del  $\text{Ca}^{2+}$  en la actividad de la enzima AdoHcy hidrolasa.** Los efectos de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el corazón son mediados por un aumento citosólico de calcio (46,47,48) Se exploró la participación del  $\text{Ca}^{2+}$  en el efecto inhibitorio de la actividad de la AdoHcy hidrolasa inducido por adrenalina utilizando efectores de calcio. Los resultados se muestran en la figura 8 (Fig. 4 del manuscrito). El bloqueador de canales de calcio, verapamil, no tuvo ningún efecto sobre la actividad basal de la enzima pero si bloqueó totalmente el efecto inhibitorio de la adrenalina. Un incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medio de perfusión de 2.7 mM (concentración normal) a 27mM causó una inhibición completa de la enzima. Estos resultados sugieren la posibilidad de



**FIGURA 7.** Influencia de efectores adrenérgicos en la actividad de la A<sub>2</sub>Hcy hidrolasa. La actividad de la A<sub>2</sub>Hcy hidrolasa fue medida en músculos papilares que fueron perfundidos con adrenalina (0.1  $\mu$ M), adrenalina (0.1  $\mu$ M) + propranolol (0.01  $\mu$ M) o isoproterenol (0.01  $\mu$ M) como se indica en la metodología. \* $p < 0.01$  vs control, n.s.= no significativo. Los valores son el promedio  $\pm$  error estándar, n=6.





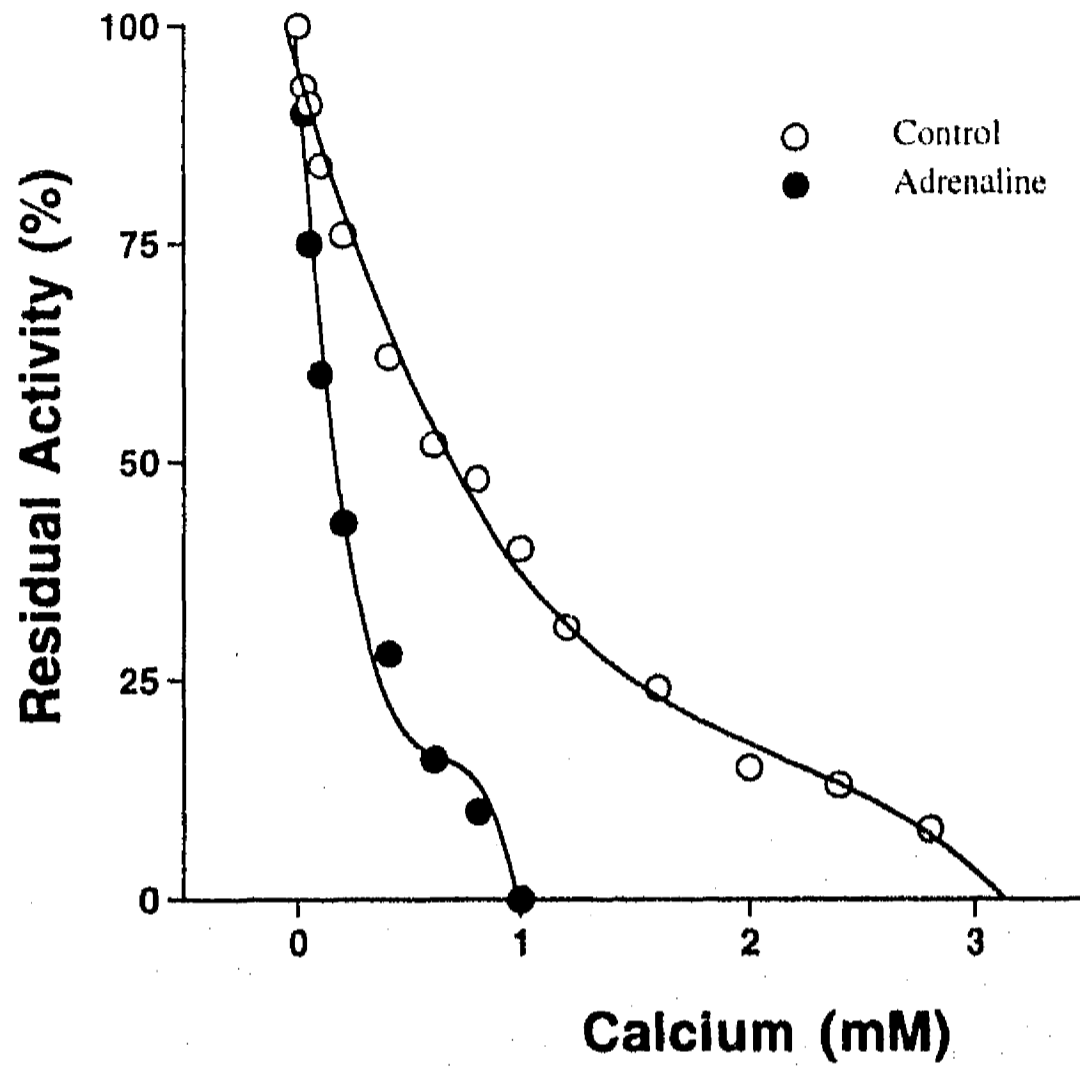
**FIGURA 8.** Influencia de efectores de calcio en la actividad de la AdoHcy hidrolasa en músculos papilares. Los músculos papilares se perfundieron con adrenalina ( $1\mu\text{M}$ ), verapamil ( $10\mu\text{M}$ ), adrenalina + verapamil ( $1$  y  $10\mu\text{M}$  respectivamente) o calcio ( $27\text{mM}$ ). \* $p \leq 0.01$  vs control, n.s. = no significativo. Los valores son el promedio  $\pm$  el error estandar,  $n=6$  (reproducida del manuscrito, fig. 4).

que el  $\text{Ca}^{2+}$  es el mediador involucrado en la inhibición de la adrenalina sobre la enzima.

**Experimentos in vitro con la enzima semipurificada.** Se exploró la posibilidad de que el  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiera directamente a la enzima. Se utilizó la fracción semipurificada con sulfato de amonio. La enzima se ensayó a diferentes concentraciones de calcio (los detalles se describen en el manuscrito). La enzima obtenida de músculo papilar control, muestra una cinética de inhibición dependiente de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$ . La enzima obtenida de músculo papilar tratado con adrenalina es mucho más sensible a la inhibición por  $\text{Ca}^{2+}$  en el rango micromolar fisiológico (fig. 9). Se utilizó  $1\mu\text{M}$  de adrenalina porque pensamos que si existía alguna diferencia en la enzima provocada por la adrenalina, podríamos hacerla más evidente con una concentración más alta ya que con las manipulaciones podrían perderse cambios pequeños.

**Papel fisiológico de la AdoHcy hidrolasa en el aparato cardiovascular en el animal íntegro.** Por los resultados anteriores hemos visto que la AdoHcy hidrolasa puede ser inhibida *in vivo* por agonistas adrenérgicos como la adrenalina e isoproterenol así como por aumento en la concentración de calcio extracelular. Esta inhibición pudiera estar relacionada con la función contráctil ya que existe una correlación inversa entre la actividad de la enzima y la contracción cuando se estimula con adrenalina. Otra posibilidad es que estos eventos fueran paralelos pero independientes uno del otro.

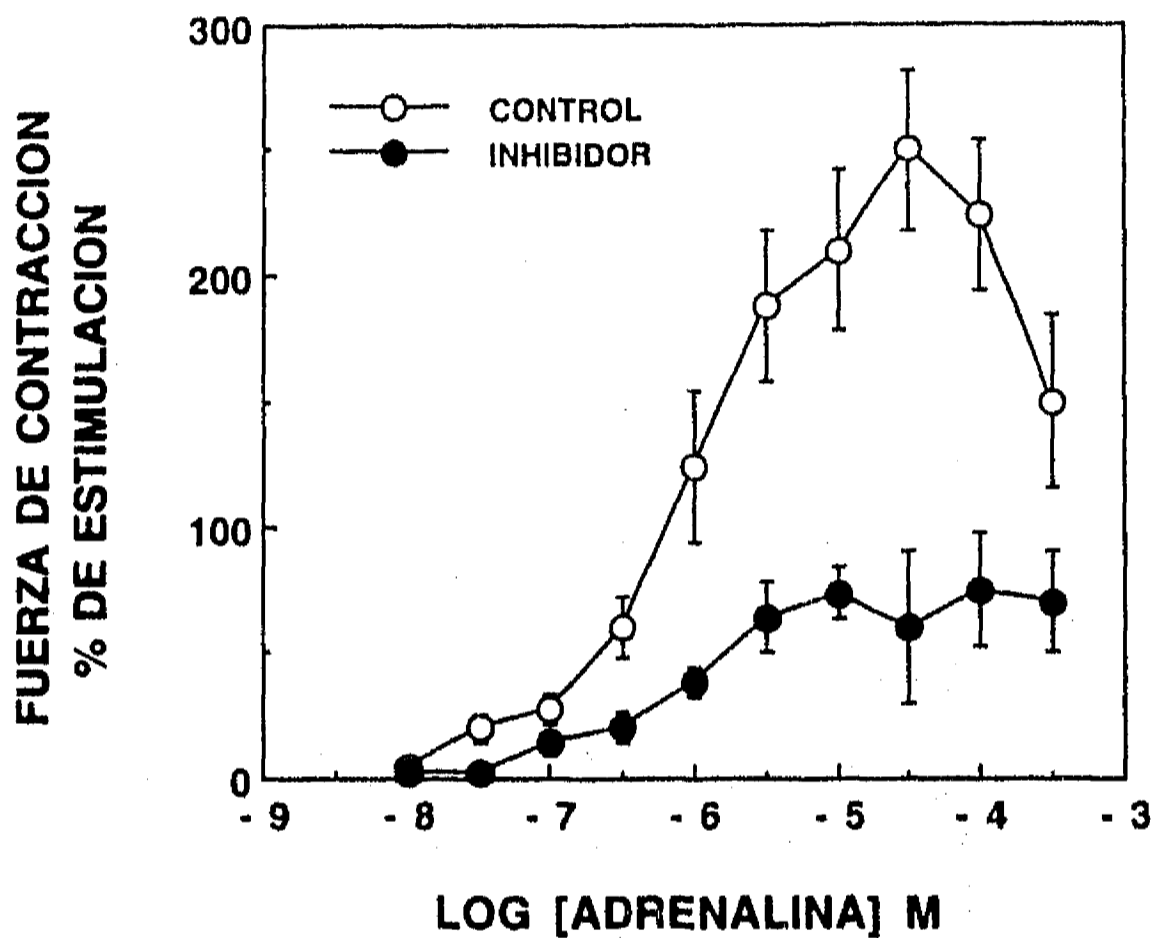
En un intento para investigar el posible papel fisiológico de la enzima en el animal íntegro se utilizó el inhibidor de la AdoHcy



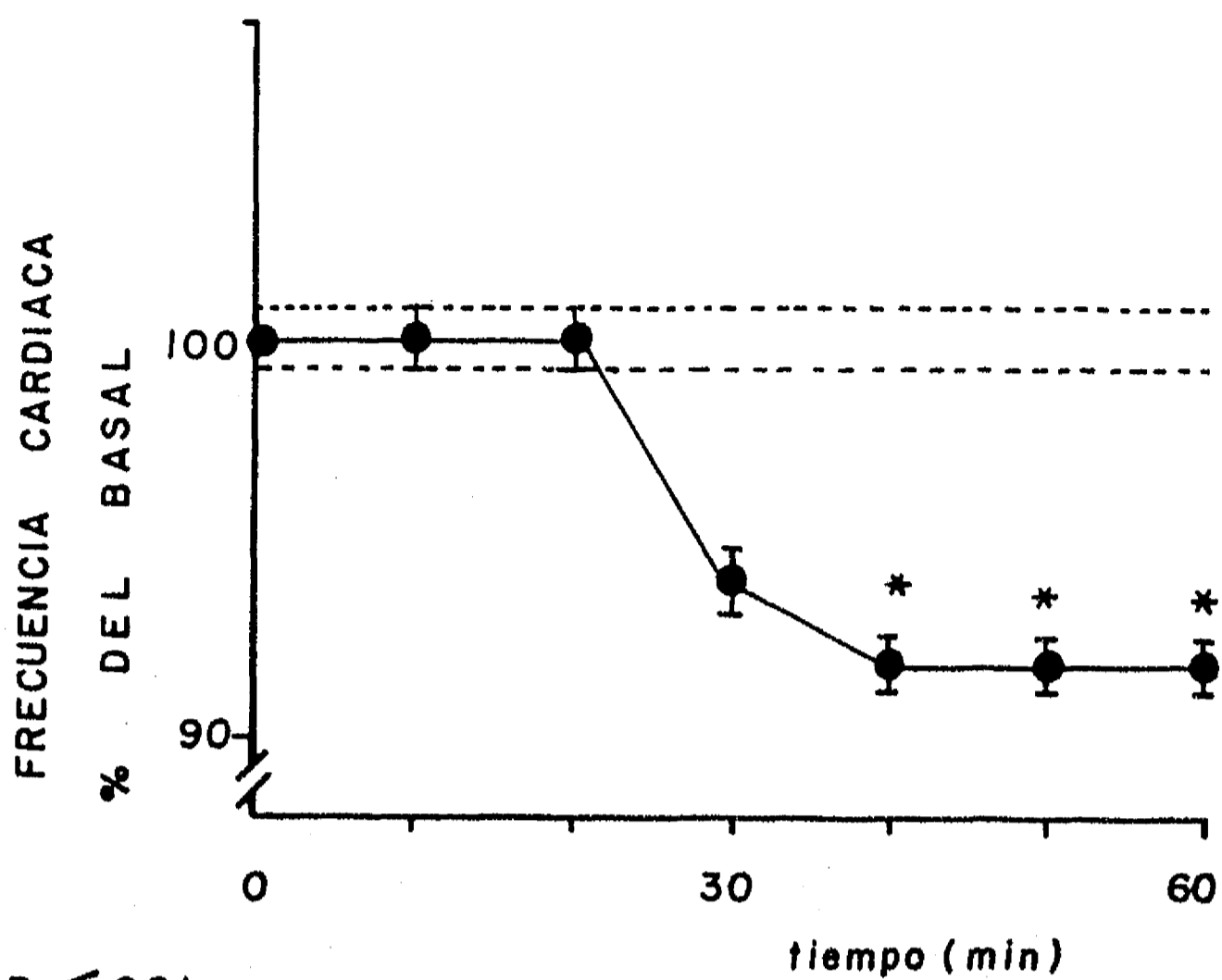
**FIGURA 9. Efecto del calcio en el ensayo de la AduHcy hidrolasa.** La actividad de la enzima parcialmente purificada de músculos controles o tratados con adrenalina ( $1\mu\text{M}$ ) se midió en diferentes concentraciones de calcio libre como se describe en metodología (reproducida del manuscrito anexo, fig. 5).

hidrolasa; el análogo de adenosina dialdehído de adenosina. Inhibiendo a la enzima podrían provocarse alteraciones que nos indicaran los procesos en los que tiene un papel fisiológico. Una de las funciones que exploramos fue la contracción del músculo cardíaco por la relación que parece tener con la enzima. Al inyectar este inhibidor a cobayos durante 1 h, no se pudo detectar actividad de la enzima, por nuestro método, en un extracto crudo del corazón (control;  $263 \pm 21$  pmoles/min/mg de prot,  $n=4$ ). Cuando se probó la actividad contráctil de las aurículas aisladas, se encontró que los animales tratados con el inhibidor de la enzima presentan una respuesta menor a la adrenalina que los controles (Fig. 10). Esto indicaría que la enzima tiene un papel importante en la transducción de esta señal.

Dado que la aurícula aislada presenta una respuesta anómala nos preguntamos que pasaba en el organismo completo. En el cobayo íntegro anestesiado y pretratado con el inhibidor se observa al minuto 30, una caída discreta pero significativa de 10% en la frecuencia cardíaca (frecuencia cardíaca basal =  $242 \pm 18$ , 40 min después del tratamiento =  $221 \pm 17$ ). Las diferencias son significativas cuando se toma cada animal como su propio control en una prueba de *t* pareada.  $p < .001$ ,  $n=15$ , Fig. 11). Esta disminución en la frecuencia cardíaca se mantiene a lo largo de 3 horas en que se ha monitoreado al animal. Para determinar los efectos de la inhibición de la AdoHcy hidrolasa en la respuesta del animal íntegro se valoró la respuesta vagal. Una de las maneras para desencadenar esta respuesta es provocando una estimulación  $\alpha$ -adrenérgica. Esto se logra administrando adrenalina en presencia de un bloqueador beta y



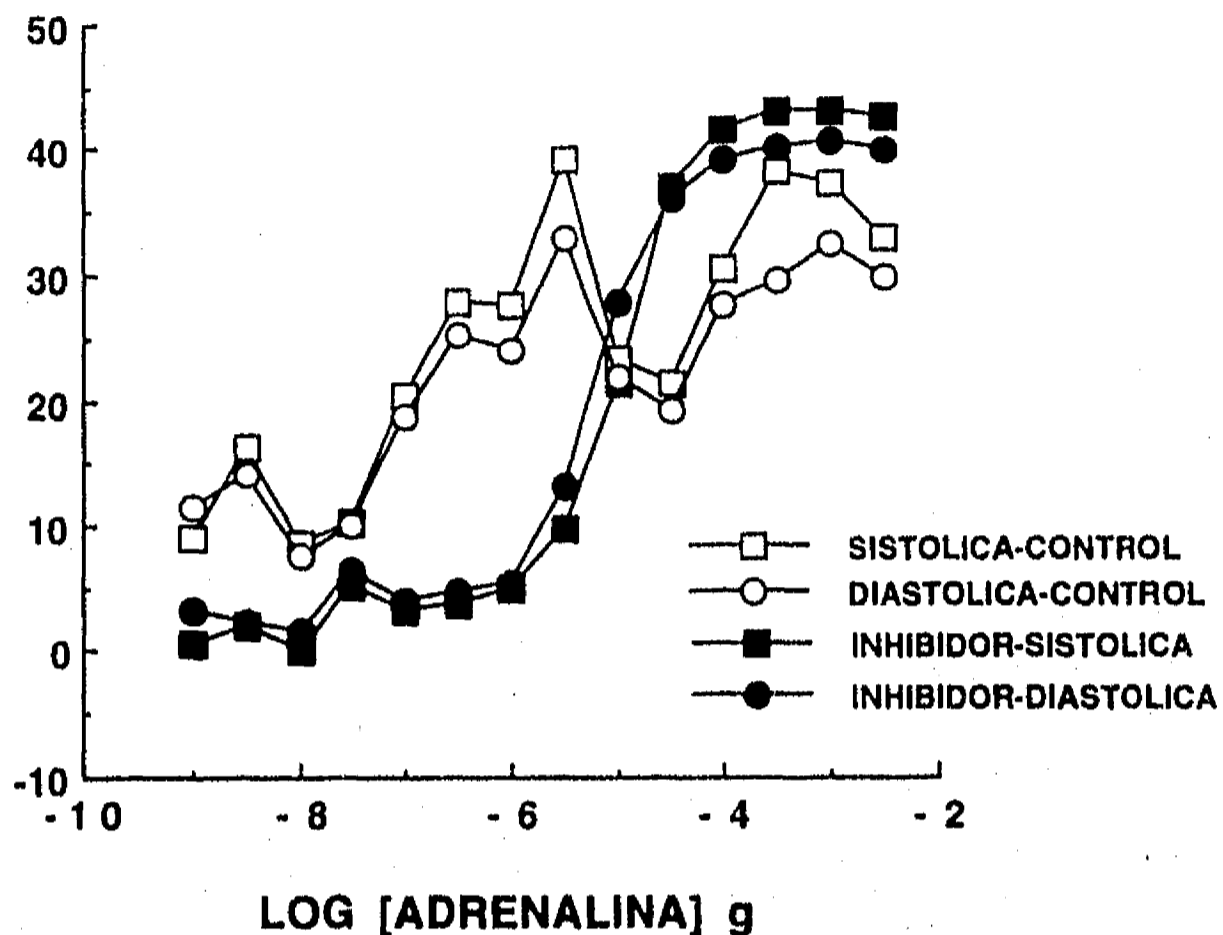
**FIGURA 10.** Influencia de la inhibición *in vivo* de la AdoHcy hidrolasa en la respuesta contractil para adrenalina de las aurículas aisladas. Los animales recibieron una dosis de dialdehído de adenosina de 200mg/kg de peso corporal y después de una hora se sacrificaron obteniéndose la aurícula izquierda en la cual se valoró el efecto de la concentración de adrenalina en la contracción.



**FIGURA 11. Efecto del inhibidor de la AdoHcy hidrolasa en la frecuencia cardíaca del cobayo. Los animales fueron anestesiados como se describe en metodología y se les monitoreó la frecuencia cardíaca basal ( $242 \pm 18$  latidos/min) que fue considerada como 100%. El cambio en donde se indica es significativo tomando a cada animal como su propio control, n=15.**

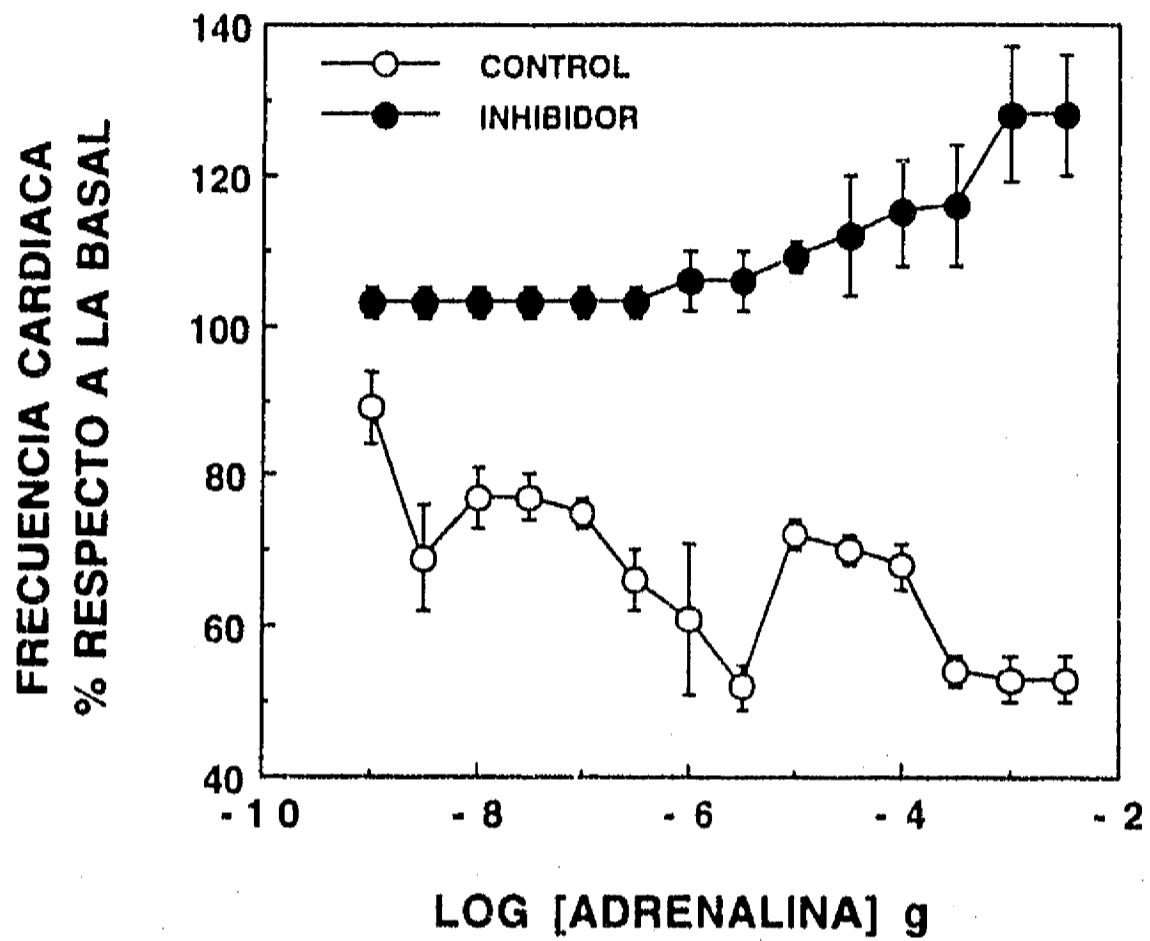
obtenemos información del estado de una respuesta alfa y además de la respuesta a acetilcolina por la estimulación del nervio vago. Se inyectaron bolos de la catecolamina a dosis crecientes, en presencia del bloqueador  $\beta$ -adrenérgico propranolol (1mg/kg de peso corporal). En estas condiciones la adrenalina provoca inicialmente un efecto hipertensor dependiente de la dosis como se observa en el control (fig. 12) y posteriormente una respuesta de estimulación vagal que se manifiesta como una caída en la frecuencia cardíaca de hasta un 50% (Fig. 13). Los animales que recibieron el análogo de adenosina una hora antes, presentan una respuesta anómala al efecto hipertensor de la adrenalina (Fig. 12 y 13). El aumento de la presión arterial se evidenció hasta la dosis de  $10^{-6}$  g de adrenalina, sin embargo, la frecuencia cardíaca no disminuyó como se observó en los controles indicando que existe una respuesta vagal alterada. La figura 14 nos muestra claramente la pérdida de la correlación inversa entre frecuencia cardíaca y presión arterial que mantienen los controles al compararlos con los animales tratados con el inhibidor de la enzima. La respuesta vagal depende de la estimulación de los barorreceptores carotídeos, que al ser estimulados activan al vago el cual libera acetilcolina directamente al corazón, causando una disminución de la frecuencia cardíaca. Tratando de dilucidar el mecanismo por el cual el inhibidor altera la respuesta vagal, estudiamos la respuesta del nervio vago a estimulación eléctrica en cobayos tratados con el inhibidor monitoreando el efecto sobre la frecuencia cardíaca. Los resultados de este experimento mostraron que los cobayos tratados con el

INCREMENTO DE LA PRESION ARTERIAL  
% SOBRE LA BASAL

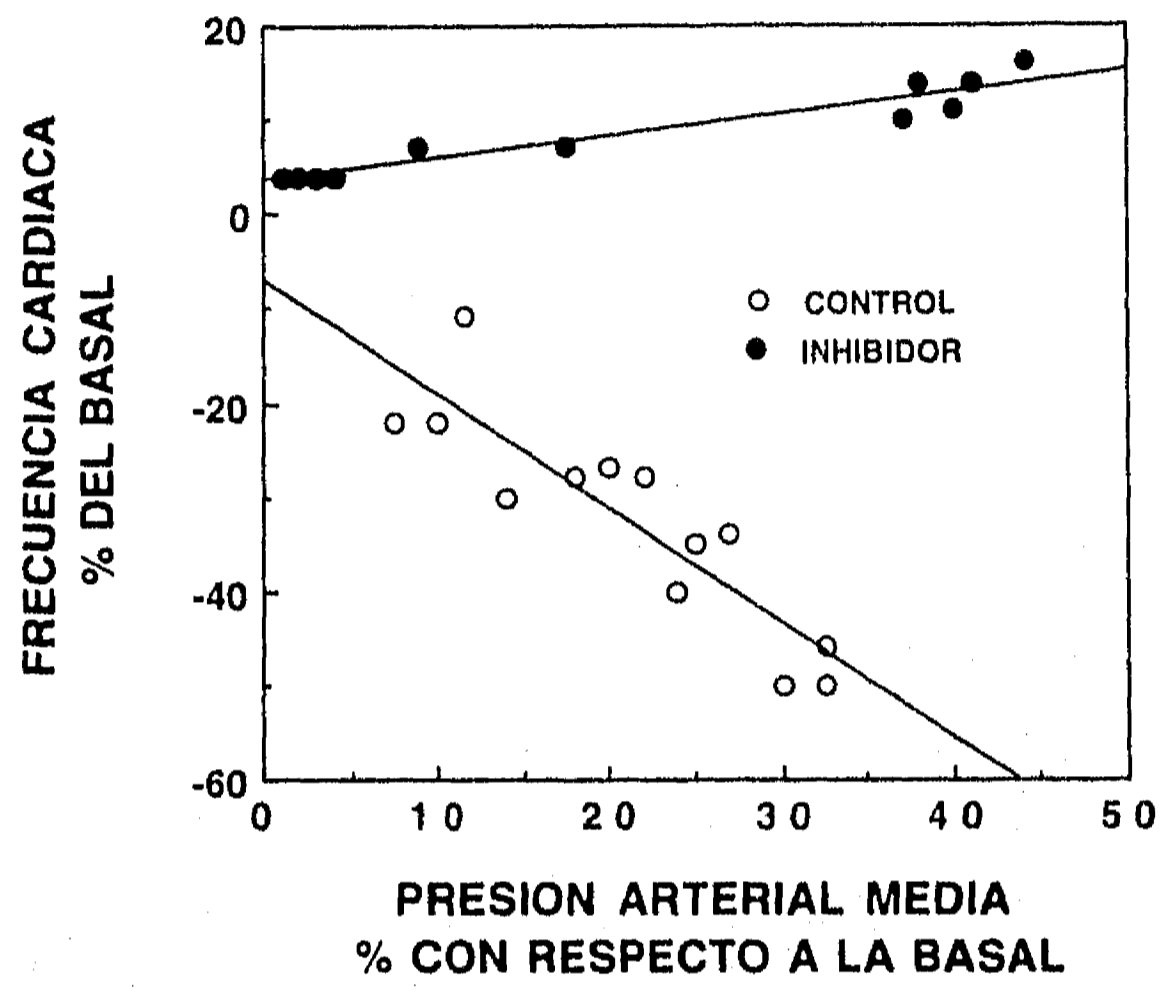


**FIGURA 12.** Efecto de la adrenalina sobre la presión arterial en cobayos tratados con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa. Los animales fueron instrumentados como se describe en la metodología. Se compara el efecto de la concentración de adrenalina sobre la presión areterial en animales control y tratados con el dialdehido de adenosina (200 mg/kg). Todos los animales recibieron propranolol IV (1mg/kg de peso) 10 min antes de iniciar la curva. Las curvas son el promedio de los incrementos con respecto a el basal antes de administrar el bolo de adrenalina. Los valores de los promedios de presión arterial basales fueron:  $108 \pm 1/88 \pm 0.7$  mmHg.



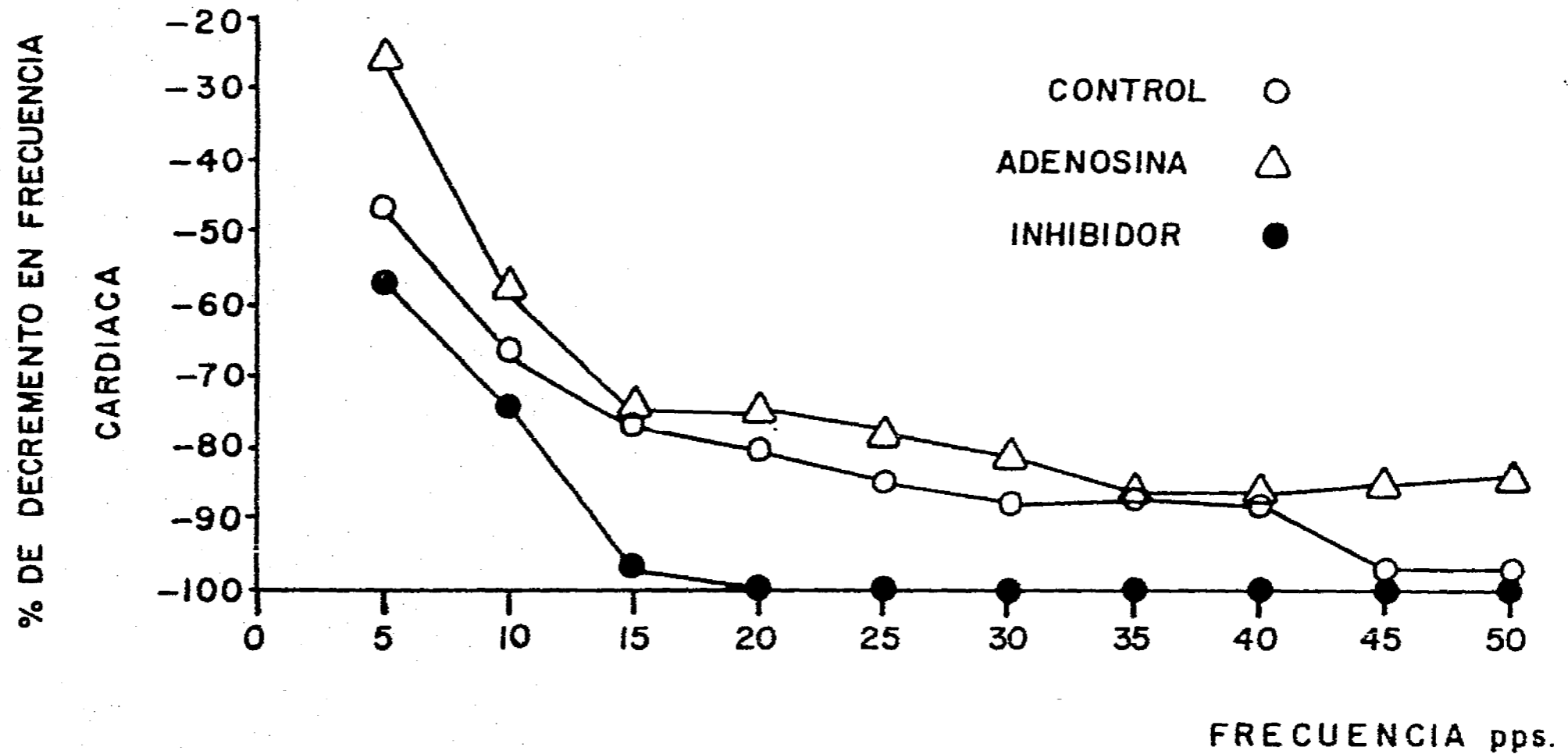


**FIGURA 13.** Efecto de la adrenalina sobre la frecuencia cardiaca en cobayos tratados con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa. Los animales fueron tratados como se describió en la figura 12.



**FIGURA 14.** Correlación entre la frecuencia cardíaca y la presión arterial media en cobayos control y cobayos tratados con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa. Esta gráfica se construyó con los valores de la figura 12 y 13.

### ESTIMULACION VAGAL



**FIGURA 15.** Influencia de la inhibición de la AdoHcy hidrolasa en la bradicardia producida por estimulación vagal. Se disecó y estimuló eléctricamente el nervio vago derecho a grupos de animales control o tratados con el inhibidor de la AdoHcy hidrolasa o con adenosina (200 mg/Kg de peso corporal). Los valores están dados en porcentaje de cambio con respecto a la frecuencia cardiaca basal sin estimulación. pps = pulsos por segundo.

inhibidor, tienen mayor sensibilidad a la estimulación vagal con respecto a los controles (Fig. 15).

## DISCUSION

Al hablar de la importancia que tiene la enzima AdoHcy hidrolasa en los organismos, por el papel que juega regulando las reacciones de metilación, se puede caer en la ambigüedad, porque todavía no tenemos claro el papel fisiológico que juegan estos procesos, ya que además de diversos son muy numerosos, pudiendo tener repercusiones a muchos niveles de la fisiología celular.

En esta tesis quisimos explorar algunos aspectos de la fisiología de la AdoHcy hidrolasa en el sistema cardiovascular, investigando si existen situaciones fisiológicas capaces de alterar la actividad de la enzima *in vivo* y analizando las alteraciones producidas al inhibirla en el animal íntegro.

Los resultados mostraron, en primer lugar, que los músculos papilares del cobayo perfundidos con adrenalina presentan una actividad de AdoHcy hidrolasa disminuida, posiblemente por un mecanismo modulado por calcio. En segundo término, la inhibición de la enzima en el animal íntegro causa a) disminución en la respuesta a adrenalina de las aurículas aisladas y b) alteración de la respuesta bradicardizante de origen vagal posiblemente por una alteración de los barorreceptores.

La AdoHcy hidrolasa es una proteína que une adenosina y AMPc con alta afinidad; la implicación de este pegado no está clara. Se ha demostrado que la incubación de la enzima purificada de *Dictyostelium discoideum* y de eritrocitos de conejo con AMPc produce inhibición de la actividad por promover la disociación del grupo prostético  $\text{NAD}^+$  (30,31). Se investigó si al aumentar las

concentraciones citoplásmicas de AMPc *in vivo*, pudiera afectarse también la actividad de la AdoHcy hidrolasa. La adrenalina es un agonista adrenérgico que actúa tanto en receptores alfa y beta. Sin embargo, los cambios en la contracción mediados por la adrenalina en el ventrículo de cobayo son mediados primordialmente por receptores beta (24). Los efectos finales de esta catecolamina endógena son mediados por un incremento en AMPc, el cual a su vez incrementa los niveles de calcio citosólico por la fosforilación de canales de calcio por medio de una proteína cinasa dependiente de AMPc (39a,49a). En el presente trabajo, la perfusión de músculos papilares con adrenalina resultó en una inhibición de la actividad de la AdoHcy hidrolasa dependiente de la concentración, sugiriendo la inactivación de la enzima *in vivo*. Solamente se afectó la Vmax (control; 222±13 vs. adrenalina 1µM; 42±6 pmol/min/mg de proteína) ya que la Km no cambió (control; 3.28±0.12 vs. adrenalina; 3.30±0.13 µM, no se muestra la curva). Esta inhibición *in vivo* es apoyada por los datos de concentración tisular de los metabolitos involucrados en la vía. El sustrato aumenta (AdoHcy) y uno de los productos disminuye (adenosina). Además, el índice de metilación, estimado por la relación AdoMet/AdoHcy, disminuye considerablemente en los músculos tratados con adrenalina, indicando una inhibición de las reacciones de metilación (27). El aumento de adenosina puede parecer pequeño, sin embargo se debe recordar que las concentraciones tisulares de este compuesto están finamente reguladas por otras rutas metabólicas. Así, la 5' nucleotidasa podría mantener la concentración en ausencia del aporte de la AdoHcy

hidrolasa. El parámetro que realmente apunta a la inhibición de la enzima es el índice de metilación (27).

El antagonista de receptores beta adrenérgicos, propranolol, bloqueó el efecto inhibitorio de la adrenalina mientras que el agonista beta, isoproterenol, tuvo efectos similares a la adrenalina, indicando un efecto mediado por receptores beta. La captación de calcio en el músculo cardíaco estimulado eléctricamente se incrementa bajo la influencia de la adrenalina (46,47,64). Este efecto se ejerce a través del incremento de la corriente de calcio mediada por receptores beta (46,47,64), el cual resulta de un acortamiento en el tiempo promedio de apertura de los canales de calcio activados en el sarcolema (48). Esta corriente de calcio puede ser inhibida por medio de varios bloqueadores de canales de calcio tales como el verapamil (15). Los datos presentados en este trabajo sugieren que el calcio citosólico participa en la inhibición de la AdoHcy hidrolasa inducida por adrenalina. El verapamil, el cual inhibe la corriente de calcio extracelular, evitó el efecto de la adrenalina. Por otra parte, el aumento en las concentraciones de calcio en el medio de perfusión produjo la inhibición de la enzima. La posibilidad de un efecto directo del calcio en la actividad del AdoHcy hidrolasa fue apoyado por el hecho de que al incubar con diferentes concentraciones de calcio libre, una fracción semipurificada de la enzima, se observó un efecto inhibitorio dependiente de la concentración del ion, tanto en la enzima obtenida del control como la obtenida de músculos papilares perfundidos con adrenalina. Un hallazgo interesante fue que la enzima obtenida de los músculos tratados con adrenalina se inhibe a concentraciones micromolares

mientras la enzima de los músculos control se inhibe a concentraciones milimolares. Este dato indica que existe una sensibilidad distinta para las dos fuentes de enzima, lo que pudiera sugerir dos tipos de conformaciones de la AdoHcy hidrolasa. Se requieren más estudios para determinar el mecanismo por el cual el calcio inhibe a la enzima, sin embargo podríamos especular que pudiera ser actuando sobre el grupo  $\text{NAD}^+$  que parece ser el blanco en la regulación de la enzima.

La inhibición de la AdoHcy hidrolasa se ha convertido en el blanco para el diseño de drogas anticancerígenas y antivirales (11,12,36). Uno de los problemas que se contemplan es que no se sabe qué implicaciones tiene la inhibición de la enzima en el organismo. En este trabajo utilizamos un inhibidor potente de la enzima. El dialdehído de adenosina es un análogo semejante a uno de los intermediarios de la reacción fijados a la enzima: el 3'-cetoadenosina con el cual compite durante la síntesis de s-adenosil-homocisteína *in vivo* con una  $K_i$  de 3.3 nM comparado con la  $K_m$  para adenosina de 1.4  $\mu\text{M}$  (26). El dialdehído de adenosina no produce efectos similares a los de adenosina como bradicardia severa, que puede llegar al paro cardíaco por bloqueo A-V, o hipotensión marcada. Por esta razón consideramos que los efectos observados con el dialdehído de adenosina pueden deberse a la inhibición de la AdoHcy hidrolasa aunque no podemos descartar en nuestros experimentos alguna actividad biológica propia de este compuesto.

Encontramos que la inhibición de la AdoHcy hidrolasa en el cobayo provoca alteraciones en todas las funciones exploradas. Las



aurículas aisladas de los animales tratados con el inhibidor, presentaron una respuesta disminuida a la adrenalina. Este efecto podría estar determinado por una alteración en la transducción de la señal ya que se ha postulado que las reacciones de metilación pueden modular la respuesta adrenérgica (25,40). En el caso de la respuesta anormal del animal íntegro al efecto presor de la adrenalina en presencia de propranolol, se puede determinar que la alteración causada por la inhibición de la AdoHcy hidrolasa se encuentra a nivel de los barorreceptores ya que al estimular eléctricamente al nervio vago en los animales tratados con el inhibidor, se presentó la respuesta bradicardizante. Esto nos indica que el sistema de liberación de acetilcolina y la respuesta cardíaca son normales, de hecho están aumentadas, por lo que la parte del sistema que puede estar alterada es la recepción del estímulo por los barorreceptores o a nivel del sistema nervioso central.

No es la intención de esta tesis esclarecer los mecanismos por los que se alteran estas respuestas porque resultan muy complejos ya que al inhibir a la enzima provocamos la inhibición de las reacciones de metilación y alteramos la homeostasis de la adenosina y no sabemos por este trabajo la relación de estos eventos con los efectos observados. Sin embargo, creo que se abren infinitas de caminos de estudio que se pueden seguir para dilucidar el papel de la enzima en la fisiología integral.

## CONCLUSIONES

Por los resultados presentados en este trabajo se puede concluir que la actividad de la enzima AdoHcy hidrolasa es regulada por sustancias como la adrenalina, probablemente a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos. La regulación de la actividad parece estar mediada por inhibición directa causada por  $Ca^{2+}$ . La inhibición causada por adrenalina parece estar relacionada a su efecto contráctil indicando un posible papel de esta enzima en esta función.

El papel fisiológico de la AdoHcy hidrolasa está relacionado con el funcionamiento cardiaco y la respuesta vagal. En este trabajo exploramos solamente estos parámetros pero como esta enzima se encuentra en todos los tejidos del organismo, pudiera tener un papel importante en la regulación de otros procesos fisiológicos relacionados con las reacciones de metilación dependientes de AdoMet o con la concentración de adenosina. Se tiene que seguir investigando para aclarar los procesos de regulación de la fisiología en los que participa esta enzima y se debe tener precaución si se piensa utilizar como un blanco de inhibición para tratar el cáncer o enfermedades vírales.

## REFERENCIAS

1. Borchardt, R.T.: S-Adenosyl-L-methionine-dependent macromolecule methyltransferases: potential targets for the design of chemotherapeutic agents. *J. Med. Chem.* 23: 347-356, 1980.
2. Borsook, H. and Dubnoff, J. W.: On the role of oxidation in methylation of guanidoacetic acid. *J. Biol. Chem.* 171:363-375, 1947.
3. Cantoni, G.L.: Methylation of nicotinamide with a soluble enzyme system from rat liver. *J.Biol. Chem.* 189:203-216, 1951.
4. Cantoni, G.L.: The nature of the active methyl donor formed enzymatically from L-methionine and adenosinetriphosphate. *J.Am. Chem. Soc.* 74: 2942-2943, 1952.
- 4a. Cantoni, G.L., Richards, H.H., and Chiang, P.K.: Inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase and their role in the regulation of biological methylation. In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Borchardt, and C. R. Creveling, pp. 155-164, Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
5. Cantoni, G.L., and Chiang, P.K.: The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methylations. In *Natural Sulfur Compounds. Novel Biochemical and Structural Aspects*, ed by D. Cavallini, G.E. Gaull and V. Zappia, pp 67-80, Plenum Press New York and London, 1980.
- 5a. Chagoya de S. V., Hernández-Muñoz R., Díaz-Muñoz M., Villalobos R., Glender, Vidrio S., Suárez J., and Yañez L. Circadian Variations of Adenosine Level in Blood and Liver and its Possible Physiological Significance. *Life Sci.*, 33; 1057-1064, 1983.
- 5b. Chagoya de S. V., Hernández-Muñoz R., Suárez J., Vidrio S., Yañez L., Aguilar-Roblero R., Oksemberg A., Vega A., Villalobos L., Rosenthal L., Fernández-Cancino F., Drucker-Colín R., Díaz-Muñoz M. Temporal Variations of Adenosine Metabolism in Human Blood. *Cronobiol. Int.* (en prensa), 1996.
6. Cantoni, G.L., and Scarano, E.: The formation of S-adenosylhomocysteine in enzymatic transmethylation reactions. *J.Am. Chem. Soc.* 76: 4744, 1954.
- 6a. Chagoya de Sánchez, V., Hernández-Muñoz, R., Sánchez, L., Vidrio, S., Yañez, L., and Suárez, J.: Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, adenosine and their metabolising enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int. J. Biochem.* 23, 1439-1443, 1991.
7. Chiang, P.K., Guranowski, A., and Seagall, J.E.: Irreversible inhibition of S-adenosylhomocysteine hydrolase by nucleoside analogs. *Arch. Biochem. Biophys.* 207:175-184, 1981.
8. Cohen, S.: The synthesis of creatine by preparations of liver from embryos and adults of various species. *J.Biol. Chem.* 193: 851-858, 1951.
9. Coward, J.K., Slisz, E.P., and Wu, F.Y.-H.: Kinetic Studies on catechol O-methyltransferase. Product inhibition and nature of catechol binding site. *Biochemistry* 12: 2291-2297, 1973.
10. Cox, R., Prescott, C., and Irving, C.C.: The effect of S-adenosylhomocysteine on DNA Methylation in isolated rat liver nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* 474: 493-499, 1977.
11. Driscoll, J.S., Márquez, V.E.: The design and synthesis of a new anticancer drug based on natural product lead compound: from neplanocin A to cyclopentenyl cytosine (CPE-C). *Stem Cells Dayt.* 12(1),7-12, 1994.
12. Durre, J.A., Buttz, H.R., Ackerman, J.J. Effect of methylation inhibitors on gene expression in HL-60 cells. *Biochem Cell Biol* 1992, 70:703-11.
13. Eloranta, T.O.: Tissue distribution of S-adenosylmethionine and adenosylhomocysteine in the rat. Effect of the age, sex and methionine administration on the metabolism of S-

- adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem. J.* 166:521-529, 1977.
14. Finkelstein, J.D. and Harris, B.: Methionine Metabolism in mammals: Synthesis of S-adenosylhomocysteine in rat tissues. *Arch. Biochem. Biophys.* 159: 160-165, 1973.
  15. Fleckenstein A.: Calcium antagonism in heart and smooth muscle. In *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, pp 34-108. John Wiley & Sons, New York, 1983.
  16. Fredholm, B.B., and Solevi, A.: The release of adenosine and inosine from canine subcutaneous adipose tissue by nerve stimulation and noradrenaline. *J. Physiol*, (London), 1981.
  17. Fujioka, M., and Takata, Y.: S-adenosylhomocysteine hydrolase from rat liver. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256: 1631-1635, 1981.
  18. Gibson, K.D., Wilson, J.D., and Udenfriend, S.: The enzymatic conversion of phospholipid ethanolamine to phospholipid choline in rat liver. *J. Biol. Chem.* 236: 673-679, 1961.
  19. de la Haba, G., and Cantoni, G.L., The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 234: 603-608, 1959.
  20. Glick, J.M., Ross, S., and Levoy, P.S.: S-Adenosylhomocysteine inhibition of three purified tRNA methyltransferases from rat liver. *Nucleic Acids Res.* 2: 1639-1651, 1975.
  21. Hershfield, M.S.: Human cytoplasmic adenosine binding protein: Identification of S-adenosylhomocysteinase. *Fed. Proc.* 37: 1466, 1978.
  22. Hershfield, M.S., and Francke, U.: The human genes for S-adenosylhomocysteine hydrolase and adenosine deaminase are syntenic on chromosome 20. *Science* 216: 739-742, 1982.
  23. Hershfield, M.S., Kredich, M.N., Small, W.C., and Fredericksen, M.L.: Suicide-like inactivation of human S-adenosylhomocysteine hydrolase by analogues of adenosine. In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 173-180, Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
  24. Hescheler J., Nawrath H., Tang M. and Trautwein W. Adrenoceptor-Mediated Changes of Excitation and Contraction in Ventricular Heart Muscle from Guinea-Pigs and Rabbits. *J. Physiol.* (London) 397, 657-670, 1988.
  25. Hirata, F., and Axelrod, J.: Phospholipid methylation and biological signal transmission. *Science* 209: 1082-1090, 1980.
  - 25a. Hirata, F., and Axelrod, J., and Strittmatter, W.J.: Methylation of membrane phospholipids. In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 233-240, Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
  26. Hoffman, J.L.: In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 181-186, Elsevier/North-Holland, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
  27. Hoffman, J.L.: The rate of transmethylation in mouse liver as measured by trapping S-adenosylhomocysteine. *Arch. Biochem. Biophys.* 205: 132-135, 1980.
  28. Hoffman, D.R., Haning, J.A., and Cortnatzner, W.E.: Microsomal Phosphatidylethanolamine methyltransferase: Inhibition by S-adenosylhomocysteine. *Lipids* 16:561-567, 1981.
  29. Hoffman, D.R., Cortnatzner, W.E. and Durre, J.A.: Relationship between tissue levels of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, and transmethylation reactions. *Can. J. Biochem.* 57: 56-65, 1979.
  30. Hohman R. J., and Veron M.: S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum* is inactivated by cAMP and reactivated by NAD<sup>+</sup>. *FEBS* 165, 265-268, 1984.
  31. Hohman R. J., Guitton M. C. and Veron M.: Purification of S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum*: reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 785-795, 1984.

32. Hurwitsj., Gold, M., and Anders, M.: The enzymatic methylation of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid. IV. The properties of the soluble ribonucleic acid-methylating enzyme. *J. Biol. Chem.* 239: 3474-3482, 1964.
33. Im, Y.S., Chiang, P.K., and Cantoni, G.L.: Guanidoacetato methyltransferase. Purification and molecular properties. *J. Biol. Chem.* 254:11047-11050, 1979.
34. Kajander, E.O., and Raina, A.M.: Affinity-chromatographic purification of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. Some properties of the enzyme from rat liver. *Biochem. J.* 193:503-512, 1981.
35. Kerr, S.J.: Competing methyltransferase systems. *J. Biol. Chem.* 247: 4248-4252, 1972.
36. Kitade, y., Monguchi, Y., Hirota, K., Maki, Y.: Acyclic analogues of naplanocin A as a potential inhibitor of s-adenosyl-homocysteine hydrolase. *Nucleic Acids Symp Ser.* (29):49-50, 1993.
37. Lexmond, T.M., deHaan, F.A.M., and Frissel, M.J.: On the methylation of inorganic mercury and the decomposition of organo-mercury compounds-a review. *Neth. J. Agric. Sci.* 24: 79-97, 1976.
38. Mann, J.D., and Mudd, S.H.: Alkaloids and plant metabolism. IV The tyramine methylpherase of barley roots. *J. Biol. Chem.* 238: 381-385, 1963.
39. Miller, C.H., and Durre, J.A.: S-Ribosylhomocysteine cleavage enzyme from *Echerichia coli*. *J. Biol. Chem.* 243: 92-97, 1968.
- 39a. Murielle, L. R., Capony, J.P., and Demaille, G.: The cyclic AMP-dependent modulation of cardiac sarcolemmal slow calcium channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 14, 279-289, 1982.
40. Okumura, K., Ogawa, K., Satake, T.: Phospholipid methylation in canine cardiac membranes. Relation to b-adrenergic receptors and digitalis receptors. *Jpn. Heart J.*, 24:215-225, 1983.
41. O'Dea, R.F., Viveros, O.H., and Dilverto, E.J., Jr.: Protein carboximethylation: Role in the regulation of cell functions. *Biochem Pharmacol.* 30: 1163-1168, 1981.
42. Paik, W.K., and Kim, S.: Protein methylation. In *Biochemistry: A Series of Monographs*, ed. by A. Meister, John Wiley & Sons, New York, hichester, Brisbane, and Toronto, 1980.
43. Palmer, J.L., and Abeles, R.H.: The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 254: 1217-1226, 1979.
44. Pegg, A.E.: Studies on inhibition of mammalina tRNA methylases. *FEBS Lett.* 16:13-16, 1971.
45. Pugh, C.S.G., Borchardt, R.T., and Stone, H. O.: Inhibition of newcastle disease virion messenger RNA (guanine-7-)methyltransferase by analogues of S-adenosylhomocysteine. *Biochemistry* 16: 3928-3932, 1977.
46. Reuter H.: The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium-concentrations. *J. Physiol. (London)* 192, 479-492. 1967.
47. Reuter H.: Localization of beta adrenergic receptors and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents, and tension in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol. (London)* 242, 429-451, 1974.
48. Reuter H., Stevens C.F., Tsien R.W. and Yellen G.: Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature (London)* 297, 501-504, 1982.
49. Richards, H.H., Chiang, P.K., and Cantoni, G.L.: Adenosylhomocysteine Hydrolase. Crystallization of the purified enzyme and its rproperties. *J. Biol. Chem.* 253: 4476-4480, 1978.
- 49a. Rosen, O.M., Rangel-Aldao, R & Erlichman, J.: Soluble cyclic AMP-dependent protein-kinases: Review of the enzyme isolated from bovine cardiac muscle. *Current Topics in Cellular Regulation*, 12:39-74, 1977.
50. Salvatore, F., Izzo, P., Colonna, A., Traboni, C., and Cimino, F.: Transfer RNA methyltransferases: Properties and role in maturation of tRNA. In *Transmethylation*,

- ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 449-456, Elsevier/North-Holand, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
51. Schatz, R.A., Vunnam, C.R., and Sellinger, O.Z.: Species and tissue differences in the catabolism of S-adenosyl-L-homocysteine: A quantitative, chromatographic study. *Life Sci.* 20: 375-384, 1977.
  52. Schatz, R.A., Vunnam, C.R., and Sellinger, O.Z.: S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase from rat brain: Purification and some properties. In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 143-154, Elsevier/North-Holand, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
  53. Schatz, R.A., Wilwms, T.E., and Sellinger, O.Z.: Decreased in vivo protein and phospholipid methylation after in vivo elevation of brain S-adenosyl-homocysteine. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 98: 1097-1107, 1981.
  54. Schatz, R.A., Wilwms, T.E., and Sellinger, O.Z.: Decreased transmethylation of biogenic amines methylation after in vivo elevation of brain S-adenosyl-homocysteine. *J. Neurochem.* 36: 1739-1748, 1981.
  55. Schneider, W.J., and Vance, D.E.: Conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat liver. Partial purification and characterization of the enzymatic activities. *J. Biol. Chem.* 254: 3886-3891, 1979.
  56. Schrader, J., Schutz, W., and Bardenheuer, H.: Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem. J.* 196: 65-79, 1981.
  57. Schutz, W., Schrader, J., and Gerlach, E.: Different sites of adenosine formation in the heart. *Am. J. Physiol.* 240: H963-H970, 1981.
  58. Shatkin, A. J., Furuichi, Y., and Sonenberg, N.: 5-Terminal modification and translation of eukaryotic mRNAs. In *Transmethylation*, ed. by E. Usdin, R.T. Bordchart, and C. R. Creveling, pp. 341-350, Elsevier/North-Holand, New York, Amsterdam, Oxford, 1979.
  59. Sæbø, J., and Ueland, P.M.: A study on the sequestration of adenosine and its conversion to adenine by the cyclic AMP-adenosine binding protein/S-adenosylhomocysteinase from mouse liver. *Biochem. Biophys. Acta* 587: 333-340, 1979.
  60. Taylor, R.T., and Weissbach, H.: N5-Methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferases. In *The enzymes*, ed by P.D. Boyer, vol. 9. pp. 121-165, Academic Press, New York and London, 1973.
  61. Ueland, P.M., and Doskeland, S.O.: An adenosine 3'5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. Purification and partial characterization. *J. Biol. Chem.* 252: 677-686, 1977.
  62. Ueland, P.M., and Doskeland, S.O.: An adenosine 3'5'-monophosphate-adenosine binding protein from mouse liver. A study on its interactions with adenosine 3'5'-monophosphate and adenosine. *J. Biol. Chem.* 253: 1667-1676, 1978.
  63. Ueland, P.M., and Sæbø, J.: S-Adenosylhomocysteinase from mouse liver. Effect of adenine and adenine nucleotides on the enzyme catalysis. *Biochemistry* 18:4130-4135, 1979.
  64. Vassort G., Rougier, O., Garnier, D., Sauviat, M.P., Coraboeuf, E., and Gargouil, Y.M.: Effects of adrenaline on membrane inward current during the cardiac action potential. *Pflügers Arch.* 309: 70-81, 1969.
  65. Walker, R.D., and Durre, J.A.: S-Adenosylhomocysteine metabolism in various species. *Can J. Biochem.* 53: 312-319, 1975.
  66. Walsh, C.: Recent developments in suicide substrates and other active site-directed inactivating agents of specific target enzymes. In *Horizons in Biochemistry and Biophysics*, ed. by E. Quagliariello, pp. 36-81, Addison-Wesley Publishing Co., Reading, MA, 1977.
  67. Zappia, V., Salvatore, F., Porcelli, M., and Cacciapuoti, G.: Novel aspects in the biochemistry of adenosylmethinine and related sulfur compounds. In *Biochemical and*

- Pharmacological Roles of Adenosylmethionine and Central Nervous System, ed. by V. Zappia, E. Usdin, and F. Salvatore, pp. 1-16, Pergamon Press, Oxford, 1979.
68. Zappia, V., Zydek-Cwik, C.R. and Schelenk, F.: The specificity of S-adenosylmethionine derivatives in methyl transfer reactions. *J. Biol. Chem.* 244: 4499-4509, 1969.

# The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

*Editor-in-Chief:*  
Professor Geoffrey J Laurent

June 27, 1996

Dr. Jorge Suárez  
Departamento de Farmacología  
Instituto Nacional de Cardiología  
"Ignacio Chávez"  
Juan Badiano N. 1, Col. Sección XVI  
México D.F., 14080  
México

Dr. Robert Mecham, Editor  
Department of Cell Biology  
Washington University  
School of Medicine, Box 8228  
660 South Euclid Ave  
St. Louis, MO 63110 U.S.A.  
Tel: 314-362-2254  
FAX: 314-362-2254  
Email: rmecham@cellbio.wustl.edu

Re: **Manuscript #96/10M**

**THE INHIBITION OF 5-ADENOSINE-3',5'-CYCLIC PHOSPHATE HYDROLASE BY ADRENALINE IN ISOLATED Guinea Pig Papillary Muscles. Role of Calcium.**  
Authors: J. Suárez and V. Chugoya de Sánchez

Dear Dr. Suárez:

Your manuscript has been reviewed and considered for publication in the *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Comments from referees are enclosed. As you can see, certain issues require further attention before a final decision can be made concerning publication. Please consider these points and make appropriate changes in the manuscript.

Please submit four copies of your revised manuscript and include in your cover letter a point-by-point response to the referees' comments. We also ask that you submit an electronic copy of your revised manuscript on disk. The attached sheet describes the disk and software configurations preferred by Elsevier Science.

Please direct all inquiries regarding your paper to my office. We appreciate the opportunity to review your work and look forward to receiving the revised manuscript.

Sincerely,

*Robert P. Mecham*

Robert P. Mecham, Ph.D.  
Editor

RPM:trh

enclosure



Published by Elsevier Science Limited



INHIBITION OF S-ADENOSYL-L-HOMOCYSTEINE HYDROLASE BY  
ADRENALINE IN ISOLATED GUINEA PIG PAPILLARY MUSCLES. ROLE OF  
CALCIUM

by

Jorge Suárez <sup>1</sup> and Victoria Chagoya de Sánchez <sup>2</sup>

1) Departamento de Farmacología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", México D.F. 14080, México 2) Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México D.F. 04510, México.

RUNNING HEAD: Adrenaline inhibits AdoHcyase.

KEY WORDS: S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, adrenaline-induced inhibition, calcium-modulation.

Please send correspondence to:

Dr. Jorge Suárez  
Departamento de Farmacología  
Instituto Nacional de Cardiología  
"Ignacio Chávez"  
Juan Badiano No. 1, Col. Sección XVI.  
México D.F., 14080  
México.  
Phone: (525) 573-2911 ext. 317  
FAX: (525) 573-0926  
email: psuarez@cenids.ssa.gob.mx

## ABSTRACT

Purified S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum* or rabbit erythrocytes is inactivated when incubated with cAMP. The aim of this study was to investigate whether adrenaline, which increases cytosolic cAMP and calcium concentrations, is able to modify *in vivo* the activity of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in the heart.

The enzyme was assayed in a crude extract obtained from perfused guinea pig papillary muscles with the different tested substances.

Adrenaline was found to inhibit S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase in papillary muscles in a concentration-dependent fashion. This inhibition was associated with an increase in the concentration of S-adenosyl-L-homocysteine (326%), decrease of adenosine (40%), and a lower transmethylation rate (17.6 control vs. 6.3 adrenaline).  $\beta$ -adrenoceptors are involved in the effect of adrenaline, since isoproterenol, a  $\beta$ -adrenergic agonist, inhibited the enzyme whereas the  $\beta$ -adrenergic blocker, propranolol, prevented this inhibition. Participation of calcium in the inhibitory effect of adrenaline was suggested because the calcium channel blocker, verapamil, suppressed this inhibition and high calcium in the perfusion medium inhibited the enzyme. *In vitro* experiments with calcium were performed in a semi-purified fraction of the enzyme, resulted in a concentration-dependent inhibition of the enzyme. Calcium concentration that inhibited the enzyme in 50% was in the mM range for control and in the  $\mu$ M range for the enzyme obtained from adrenaline-treated

muscles, indicating a different sensitivity to calcium. We conclude that adrenaline inhibits S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase *in vivo*, probably by a calcium-modulated mechanism. (230 words)

## INTRODUCTION

S-Adenosylhomocysteine hydrolase (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, EC 3.3.1.1 AdoHcyase) catalyzes the reversible, thermodynamically unfavorable cleavage of the thioether bond of S-adenosylhomocysteine (AdoHcy) to adenosine (Ado) and homocysteine (Hcy) (de la Haba and Cantoni, 1959). This reaction is essential for normal operation of S-adenosylmethionine-dependent transmethylation reactions, all of which produce and are inhibited by AdoHcy. Purified AdoHcyase from diverse mammalian tissues has a molecular weight of 180 to 190 KDa and is composed by four subunits. Each subunit contains one molecule of tightly bound  $\text{NAD}^+$  cofactor, which is required for the hydrolytic reaction (Palmer and Abeles, 1976; Palmer and Abeles, 1979). In addition, AdoHcyase binds adenosine and cAMP with high affinity (Aiyar and Hershfield, 1985; Hershfield and Kredich, 1978). A previous work evidenced the existence of 24-h changes in this enzyme's activity, the metabolites involved in the reaction, and the relationship with phospholipid methylation in rat liver (Chagoya de Sánchez *et al.*, 1991). Furthermore, AdoHcyase has been proposed as an important source of adenosine during hypoxia in guinea pig heart. (Schrader *et al.*, 1981). Purified enzyme from *Dictyostelium discoideum* or from rabbit erythrocytes are inactivated when incubated with cAMP due to a dissociation of the  $\text{NAD}^+$  cofactor (Hohman and Veron, 1984; Hohman *et al.*, 1984). In spite of the

physiological importance of AdoHcyase in mammalian cells, the mechanisms that regulate this enzyme are not well understood.

In the guinea pig ventricular heart muscle, the effects of adrenaline are mediated mainly through stimulation of  $\beta$ -adrenoceptors by increasing cytosolic cAMP and calcium concentrations (Hescheler *et al.*, 1988). The aim of this study was to explore whether adrenaline is able to modify the activity of AdoHcyase in the perfused papillary muscle isolated from guinea pig heart. The results show that adrenaline had an inhibitory action on AdoHcyase activity by a calcium-modulated mechanism.

### MATERIALS AND METHODS

Papillary muscles, approximately 1 mm in diameter, were quickly dissected from the right ventricles of guinea pigs (400-500 g of body weight) stunned and killed by cervical dislocation. Muscles were positioned horizontally in Lucite baths. One end of the muscle was held by a Lucite clip attached to a force transducer (Statham) and the tendinous end was tied by a silk thread to the wall of a Lucite bath (20 ml vol) and perfused with Krebs solution (pH 7.4) at 37° C, bubbled continuously with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Calcium concentration was 2.7 mM. All substances tested were diluted in the perfusion medium and the muscles were perfused during 10 min. The muscles were contracted isometrically at 12 times/min with transverse field stimulation provided by a Grass stimulator and two platinum electrodes situated parallel to the muscle.

The stimulus voltage was maintained at 2 V above threshold (usually 9-15 V) for 5 ms. To verify viability and response to pharmacological manipulation of the papillary muscles, peak isometric forces were continuously monitored in a polygraph (Grass Instruments, Quincy, MA., U.S.A.) (not shown).

**Source of enzyme.** Crude extract. Following the incubation protocols, each papillary muscle was homogenized with 3 vol of cold 250 mM sucrose, 0.1 mM EDTA in a glass homogenizer. The homogenate was centrifuged for 10 min at 10,000 g and the supernatant fraction was used for enzyme assay. Ammonium sulfate fractionation. The method described by Hohman *et al.* (1984) was followed. Briefly, the soluble crude extract was adjusted to 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , mixed on ice for 15 min, centrifuged at 12,000g for 20 min, and the pellet was discarded. The supernatant was further adjusted to 60%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and stirred at 0°C for 15 min. After centrifugation, the pellet (containing the AdoHcyase) was suspended in 20 ml buffer and centrifuged to remove insoluble debris. This procedure yields a 6-fold purification.

**AdoHcyase assay.** AdoHcyase activity was assayed at 25° C in the hydrolysis direction following AdoHcy decrease at 260 nm in a double-beam spectrophotometer (SLM-Aminco, Urbana, IL U.S.A.) (Chagoya de Sánchez *et al.*, 1991). The assay mixture consisted in a buffer (25 mM HEPES, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  at pH 7.4), 62.5  $\mu\text{M}$  of AdoHcy, and 0.1U of adenosine deaminase in a final volume of 2.5 ml. The reaction was started by adding 100-

300  $\mu\text{g}$  of crude extract containing the enzyme activity. The assay was linear with respect to time (1 h) and enzyme concentration (600  $\mu\text{g}$ ). Protein was measured by the biuret method (Gornall et al., 1949).

**Effect of Calcium in the AdoHcyase Activity.** The enzyme was assayed in calcium-EGTA buffers, in which free calcium concentration was calculated using the program described by Schoenmakers *et al.* (1992). Buffer composition was the same as described above with a final EGTA concentration of 2 mM and the pH of the fresh medium was carefully adjusted to 7.4.

**Quantification of AdoMet, AdoHcy and Ado.** Papillary muscles were homogenized in 2 vol of ice-cold 0.4 M  $\text{HClO}_4$ , and centrifuged at 9000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was adjusted at pH 7 with 4 M KOH. After 15 min, the  $\text{KClO}_4$  precipitate was eliminated by centrifugation and the supernatant was frozen for further determination by reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC), using a (33.0 cm x 3.9 mm i.d.) C18  $\mu\text{Bondapak}$  column. Ado, AdoMet, and AdoHcy were quantified following the method described by Gharib et al. (13). Statistics. Values are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was determined between groups by using the Student's *t* test. A P value  $\leq 0.05$  was accepted as a statistically significant difference.

## RESULTS

Perfusion of papillary muscles with adrenaline resulted in a concentration-dependent inhibition of AdoHcyase activity with an IC<sub>50</sub> (concentration of drug that inhibited the hydrolysis of AdoHcy in 50%) of 0.1 μM when measured in the crude enzyme extract (Fig. 1). Only V<sub>max</sub> was affected (control; 222±13 vs. 1 μM adrenaline 42±6 pmol/min/mg of protein) and K<sub>m</sub> was unchanged (control; 3.28±0.12 vs. adrenaline; 3.30±0.13 μM, not shown), suggesting inactivation of the enzyme. We investigated if this inhibition was reflected in tissular concentration of the metabolites involved in the reaction. Fig. 2 shows tissue concentration of AdoMet, AdoHcy and Ado. Adrenaline (1 μM) increased AdoHcy concentration by 326% as compared with the control papillary muscle (control; 1.5±0.07 vs. adrenaline; 4.9±0.18 nmol/g w.t.) No significant change was observed in the tissue concentration of AdoMet (adrenaline; 26.4±1.2 vs. control; 31.3±1.0 nmol/g w.t.), however, adenosine concentration decreased in the muscle treated with adrenaline by 40% (58.1±5 vs. 35.4±3 nmol/g w.t.) as expected if the enzyme were inhibited. The effect of adrenaline is basically mediated by β-adrenoceptors in the guinea pig heart (Hescheler *et al.*, 1988). To explore the participation of β-adrenoceptors in the adrenaline-induced inhibition of AdoHcyase, we tested the effect of two β-adrenoceptor effectors. The inhibition of AdoHcyase by adrenaline (0.1 μM) was almost totally blocked by the β-adrenergic antagonist propranolol (10 μM) Fig. 3. The β-adrenergic agonist isoproterenol (0.01 μM) had similar effects to adrenaline. These data agree with a β-adrenergic-mediated effect. Increase in cytosolic calcium is



responsible for the  $\beta$ -adrenergic effects of adrenaline (Reuter, 1967; Reuter, 1974; Vassort *et al.*, 1969). We investigated the participation of calcium in the adrenaline-inhibition of AdoHcyase by perfusing muscles with calcium effectors (Fig. 4). Verapamil, a calcium channel blocker, had no effect in the enzyme activity but abolished totally the effect of adrenaline. Increase in calcium concentration of the perfusion medium from 2.7 mM to 27.0 mM inhibited almost completely the AdoHcyase activity. The possibility of a direct effect of calcium on AdoHcyase was explored. Assay of AdoHcyase activity of the ammonium sulfate purified fraction in presence of different free calcium concentrations is shown in Fig. 5. Calcium inhibited AdoHcyase activity obtained from control muscles or adrenaline ( $1\mu\text{M}$ ) perfused, however, the enzyme obtained from muscles treated with adrenaline is inhibited at lower calcium concentrations ( $\mu\text{molar}$  range) than the control enzyme ( $\text{mmolar}$  range).

## DISCUSSION

The results show that guinea pig papillary muscles treated with adrenaline presented an inhibited AdoHcyase activity possibly by a calcium-modulated mechanism. AdoHcyase is a high affinity adenosine and cAMP binding-protein; the implication of this binding is unclear. It has been demonstrated that cAMP inhibits AdoHcyase *in vitro* by promoting dissociation of the  $\text{NAD}^+$  cofactor in *Dictyostelium discoideum* and in rabbit erythrocytes (Hohman and Veron, 1984; Hohman *et al.*, 1984). We searched whether *in vivo*, enhanced cAMP could also affect the mammalian AdoHcyase activity. Adrenaline is an agonist

acting in both,  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenergic receptors. However, adrenaline-mediated changes in the contraction force are mainly due to  $\beta$ -adrenoceptor stimulation in the guinea pig ventricle (Hescheler et al., 1988). Final effects of this endogenous catecholamine are mediated by an increase of cAMP which, in turn, increases cytosolic calcium by phosphorylating the calcium channels by a cAMP-dependent protein kinase. In the present work, perfusion of papillary muscles with adrenaline resulted in a concentration-dependent inhibition of AdoHcyase activity (Fig. 1), suggesting *in vivo* inactivation of the enzyme. *In vivo* adrenaline-induced inhibition of AdoHcyase is supported by an increase in tissue concentration of AdoHcy (substrate), and a decrease of Ado (one of the products). In addition, a reduced rate of transmethylation (estimated by the relation between AdoMet and AdoHcy) was observed in muscles treated with adrenaline (17.6 control vs. 6.3 adrenaline), which indicates an inhibition of the transmethylation reactions (Hoffman, 1980). Propranolol, a  $\beta$ -adrenergic antagonist, blocked the inhibitory effect of adrenaline, and isoproterenol had similar effects to adrenaline, indicating a  $\beta$ -adrenergic mediated effect. Calcium uptake in electrically stimulated heart muscle is increased under the influence of adrenaline (Reuter, 1974). This effect is exerted through a  $\beta$ -adrenoceptor-induced increase in calcium current (Reuter, 1967; Reuter, 1974; Vassort *et al.*, 1969), which results from a lengthening of the mean open time of activated (L-type) calcium channels in the sarcolemma (Reuter *et al.*, 1982). Calcium current can be inhibited by various calcium channel blockers such as verapamil (Fleckenstein, 1983). Data presented in this paper suggest that cytosolic

calcium participates in adrenaline-induced inhibition of AdoHcyase. Verapamil, which inhibits extra cellular calcium current, prevented the effect of adrenaline. On the other hand, high calcium concentration in the perfusion medium caused inhibition of the enzyme. Possibility of a direct effect of calcium in the activity of the enzyme is sustained since the assay of a partially purified enzyme fraction, in presence of different free calcium concentrations, resulted in a concentration-dependent inhibition in both, the enzyme obtained from papillary muscles treated with adrenaline and controls (Fig. 5). It is interesting that the IC50 for the control enzyme is in the mM range and the IC50 for the enzyme obtained from adrenaline-treated muscles is in the  $\mu$ M range, indicating a different sensitivity for calcium and suggesting the existence of two conformations of the enzyme. Further studies are necessary to understand the mechanism through which calcium affects AdoHcyase activity; however, it could be acting on the NAD<sup>+</sup> prosthetic group, which seems to be the regulator target of the enzyme.

In summary, this report demonstrates that adrenaline inhibits AdoHcyase activity by a calcium-modulated mechanism. The physiological relevance of these findings has to be determined in further studies as well as the mechanism involved in this calcium effect.

**Acknowledgments-**This research was partially supported by CONACyT-0716-M9109. We express our appreciation to Ms. L. Yañez and Ms. S. Vidrio for expert technical assistance. We thank to Ms. Ingrid Mascher for her revision of the manuscript. We are pleased to acknowledge helpful discussions with Drs.

Rolando Hernández-Muñoz and Mauricio Díaz-Muñoz during the course of this work.

## REFERENCES

- Aiyar V.N. and Hershfield M.S. (1985) Covalent labelling of ligand binding sites of human placental S-adenosylhomocysteine hydrolase with 8-azido derivatives of adenosine and cyclic AMP. *Biochem. J.* 232, 643-650.
- Chagoya de Sánchez V., Hernández-Muñoz R., Sánchez L., Vidrio S., Yañez L. and Suárez J. (1991) Twenty-four-hour changes of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine, adenosine and their metabolising enzymes in rat liver; possible physiological significance in phospholipid methylation. *Int. J. Biochem.* 23, 1439-1443.
- Fleckenstein A. (1983) Calcium antagonism in heart and smooth muscle. In *Experimental Facts and Therapeutic Prospects*, pp 34-108. John Wiley & Sons, New York.
- Gharib A., Sarda N., Chabannes B., Cronenberger L. And Pacheco H. (1982) The regional concentrations of S-adenosyl-L-methionine, S-adenosyl-L-homocysteine, and adenosine in rat brain. *J. Neurochem.* 38, 810-815.
- Gornall A.G., Bardawill C.J. and David M. M. (1949) Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 715-766.
- de la Haba G. and Cantoni G.L. (1959) The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J. Biol. Chem.* 234, 603-608.
- Hershfield M.S. and Kredich N.M. (1978) S-adenosylhomocysteine hydrolase is an adenosine-binding protein: a target for adenosine toxicity. *Science* 202, 757-760.
- Hescheler J., Nawrath H., Tang M. and Trautwein W. (1988) Adrenoceptor-Mediated Changes of Excitation and Contraction in Ventricular Heart Muscle from Guinea-Pigs and Rabbits. *J. Physiol. (London)* 397, 657-670.
- Hoffman J.L. (1980) The rate of transmethylaton in mouse liver as measured by trapping S-adenosylhomocysteine. *Arch Biochem Biophys.* 205, 132-135.
- Hohman R. J. and Veron M. (1984) S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum* is inactivated by cAMP and reactivated by NAD<sup>+</sup>. *FEBS* 165, 265-268.
- Hohman R. J., Guitton M. C. and Veron M. (1984) Purification of S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase from *Dictyostelium discoideum*: reversible inactivation by cAMP and 2'-deoxyadenosine. *Arch. Biochem. Biophys.* 233, 785-795.

Palmer J. L. and Abeles R. H. (1976) Mechanism for enzymatic thioether formation. Mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 215, 5817-5819.

Palmer J. L. and Abeles R. H. (1979) The mechanism of action of S-adenosylhomocysteinase. *J. Biol. Chem.* 254, 1217-1226.

Reuter H. (1967) The dependence of slow inward current in Purkinje fibers on the extracellular calcium-concentrations. *J. Physiol. (London)* 192, 479-492.

Reuter H. (1974) Localization of beta adrenergic receptors and effects of noradrenaline and cyclic nucleotides on action potentials, ionic currents, and tension in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol. (London)* 242, 429-451.

Reuter H., Stevens C.F., Tsien R.W. and Yellen G. (1982) Properties of single calcium channels in cardiac cell culture. *Nature (London)* 297, 501-504.

Schoenmakers T.J.M., Visser G.J., Flink G. and Theuvenet A.P.R. (1992) Chelator: an improved method for computing metal ion concentrations in physiological solutions. *Biotechniques* 12, 870-879.

Schrader J., Schutz W. and Bardenheuer H. (1981) Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem. J.* 196, 65-79.

Vassort G., Rougier O., Garnier D., Sauviat M.P., Coraboeuf E. and Gargouil Y.M. (1969) Effects of adrenaline on membrane inward current during the cardiac action potential. *Pflügers Arch.* 309: 70-81.

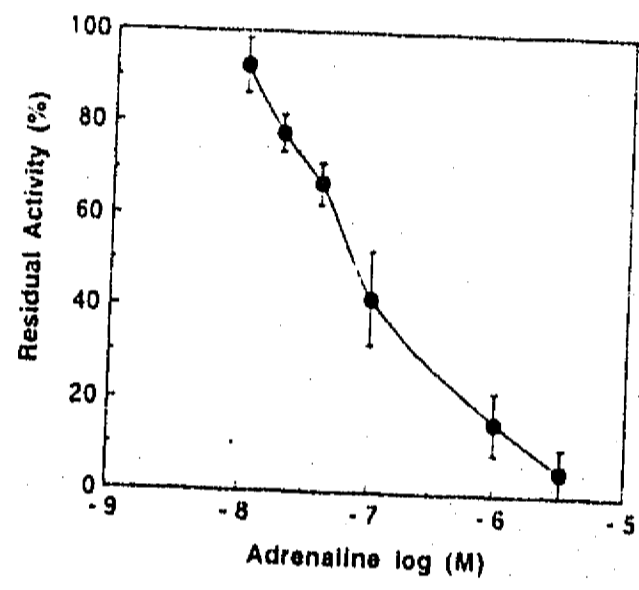


Fig. 1

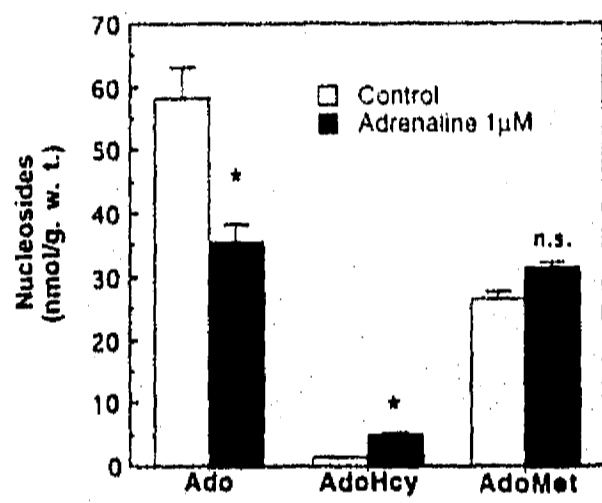


Fig. 2



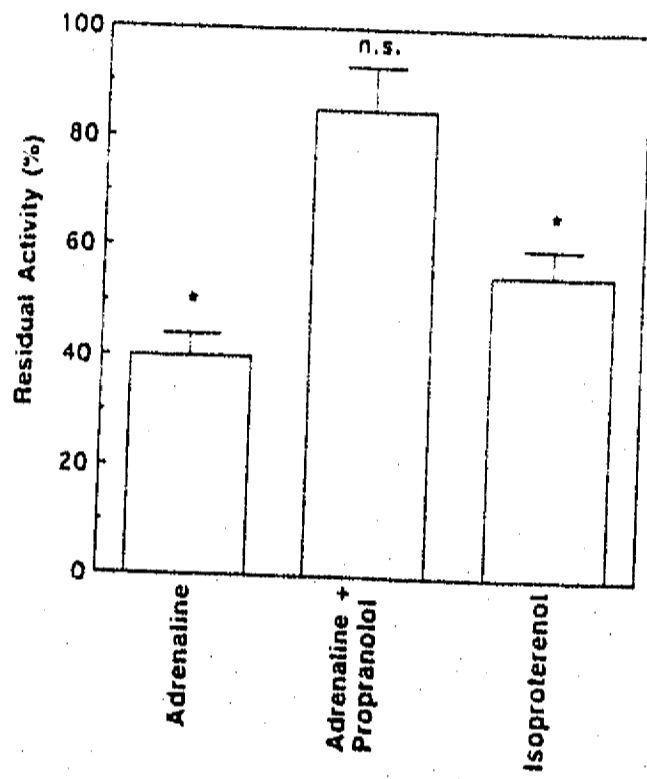


Fig. 5

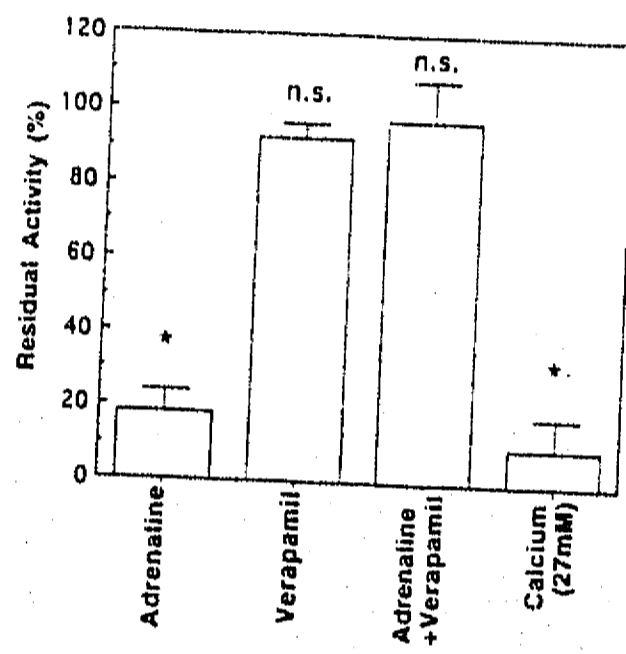


Fig. 4

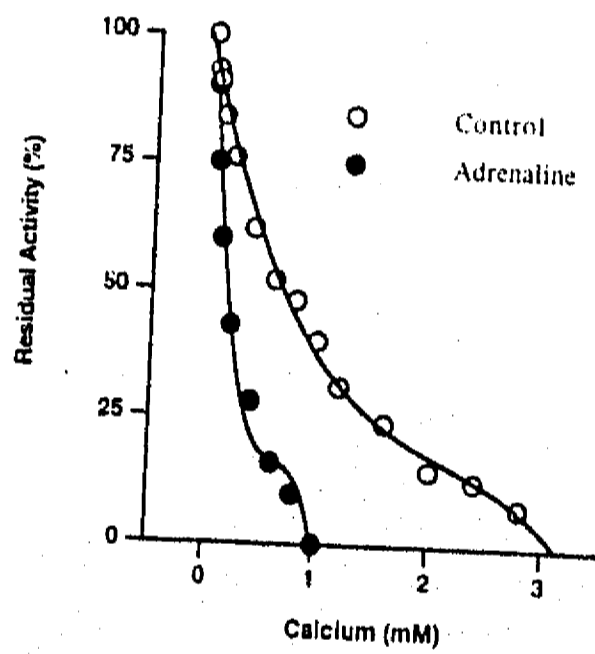


Fig. 5