

Tesis de Posgrado

El papel de los tioles en la oxidación enzimática del acetaldehído : Estudios de inhibición y cinética

Milstein, César

1957

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Milstein, César. (1957). El papel de los tioles en la oxidación enzimática del acetaldehído : Estudios de inhibición y cinética. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0913_Milstein.pdf

Cita tipo Chicago:

Milstein, César. "El papel de los tioles en la oxidación enzimática del acetaldehído : Estudios de inhibición y cinética". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1957. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0913_Milstein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

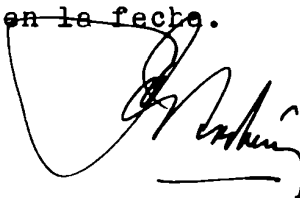


UBA

Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, febrero 12 de 1957.

Presentada en la fecha.

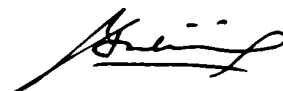


Com. Ex. Excm. ...

Buenos Aires, febrero 14 de 1957.

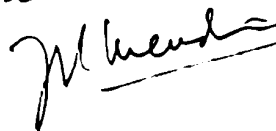
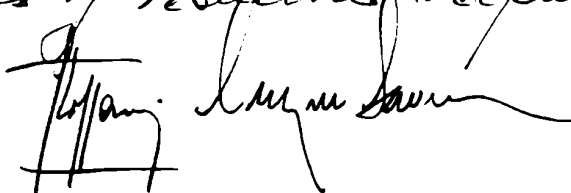
Pase a la Comisión Examinadora Grupo VII, para
que tenga a bien considerar la tesis presentada por el ex-
alumno de la carrera del Doctorado en Química, D.César -
Milstein.

nt.-



Buenos Aires, 12 de febrero de 1957

La Comisión Examinadora respectiva
procedió a considerar la presente
tesis y resolverla aceptarla.



TESIS: 913

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

— 0 —

EL PAPEL DE LOS TIPOLES EN LA OXIDACION ENZIMATICA DEL ACETALDEHIDO

Estudios de Inhibición y Cinética

Tesis para optar al título de Doctor en Química

por

CESAR MILSTEIN

TESIS: 913

- 1957 -

Genio 13

A mia madre

Este trabajo ha sido realizado en la cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Buenos Aires. El profesor titular de la Cátedra, Dr. A. C. H. Stoppani, propuso el tema y dirigió el trabajo con dedicación extrema. Por ello, y en especial por haberme introducido en las prácticas de la investigación biológica lo quedo profundamente agradecido.

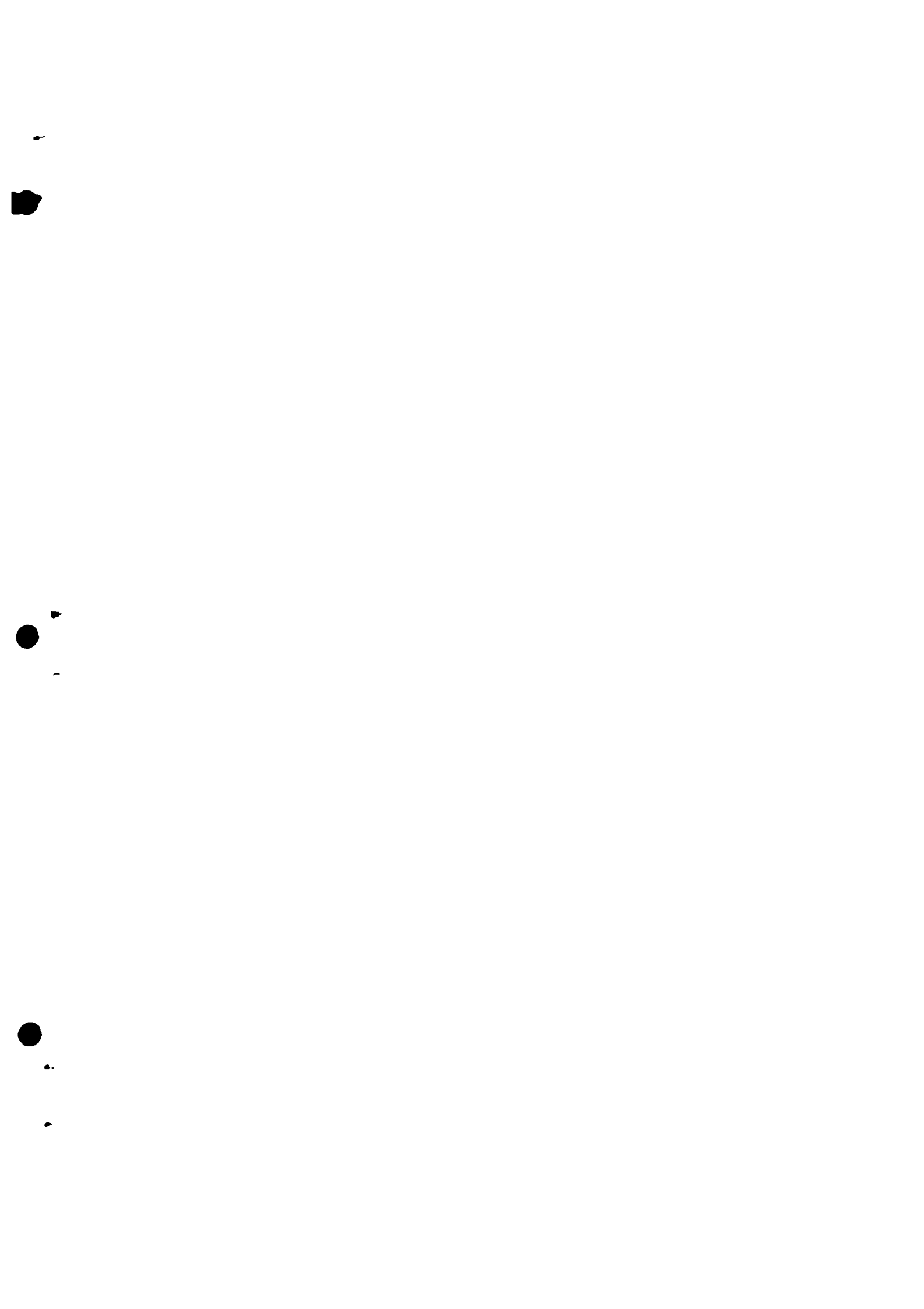
A la Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias por haberme otorgado la beca "Laboratorios Millet" con la que se realizó parte de este trabajo.

A R. Squibb and Sons o IVA (Industrias Vidrieras Argentinas) por su apoyo financiero.

Al Dr. A. S. Actis por haber realizado los dosajes de acetaldéhidido que figuran en las Tablas 2 y 3 del Capítulo 3 y 1 y 2 del Apéndice II.

A la Sta. Lilia Vifias, Sra. H. V. de Milstein y Lic. Celia P. de Milstein, por la inapreciable ayuda prestada en la preparación de los originales.

A todos ellos mi mas sincero agradecimiento.



Introducción

Capítulo I

LA OXIDACION BIOLÓGICA DE LOS ALDEHIDOS

Estas aldehido mutasas fueron identificadas por Wieland y otros con las aldehido oxidasa que Schardinger descubriera en la leche, en 1902, asumiendo la hipótesis de que el aldehido podía sustituir al azul de metileno en el papel de aceptor de hidrógeno del sistema aldehido oxidasa, en cuyo caso éste actuaría como "mutasa". Durante largo tiempo, esta hipótesis fué sostenida, lo que unido a las dificultades que ofrecía la investigación de las mutasas, llevó a que los estudios se dirigieran más hacia el sistema oxidasa que hacia el sistema "mutasa".

Kostytchew en 1914 descubrió la dismutación enzimática del acetaldehido en la levadura y Neuberg en cultivos bacterianos. Euler y Myrbäck, ya en 1927, demostraron la necesidad de la cozimasa para la actividad de la mutasa de levadura y al año siguiente Euler y Brunius hicieron igual comprobación en la de hígado. En 1935 Reichel estudió la cinética de la mutasa de hígado aunque sin separarla de la aldehido oxidasa, considerando aún ambas como una sola enzima la "aldehidasa de hígado".

Fué recién en 1937 cuando Dixon y Lutwak-Mann establecieron claramente la existencia de una aldehido-mutasa como sistema independiente a la oxidasa (7). Booth posteriormente corroboró esta observación (8). Para realizar estas comprobaciones realizaron diversas pruebas sobre aldehido mutasa de hígado de cobayo y perro y sobre aldehido oxidasa de leche, siendo de interés las que incluyeron el uso del iodoacetato, ya que fueron así los primeros indicios de la acción inhibitoria de este reactivo sobre la acetaldéhid deshidrogenasa e incluyeron un estudio sobre requerimiento de coenzimas (9). Propusieron para aclarar el mecanismo del proceso la existencia de dos centros activos, uno capaz de oxidar el aldehido en presencia de cozimasa (lo que la diferenciaría de la aldehido oxidasa) y otra capaz de reducirlo en igual condición, pero a su vez incapaz de oxidar al alcohol (lo que lo diferenciaría de la alcohol deshidrogenasa). Esos dos centros podrían estar en una sola enzima o en dos enzimas separadas, quedando el problema abierto a futuras investigaciones.

Posteriormente Dixon (1) sugirió la posible explicación de no haber

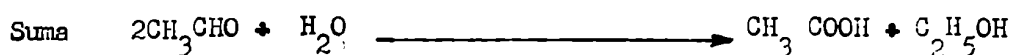
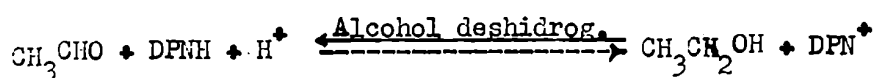
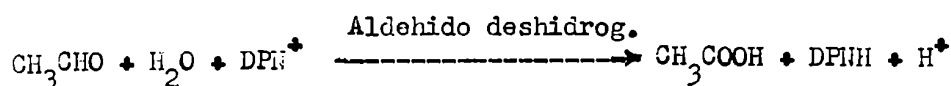
hallado alcohol deshidrogenasa en el sistema por la accidental remoción de diaforasa necesaria para la actividad del sistema que usaban. Planteó como posibilidad nueva la de que la alcohol deshidrogenasa pudiera asociarse a otra enzima para constituir la mutasa.

Paralelamente a esos estudios Green y col. (10) realizaron estudios sobre varias mutasas, en el que hallaron que la acción inhibitoria del iodoacetato se ejercía en realidad sobre la fracción de la mutasa que reduce a la cozimasa (es decir la que correspondería a la aldehído deshidrogenasa) señalando una posible competencia entre aldehído y iodoacetato por el centro activo correspondiente. Desarrollaron una teoría de las mutasas semejante a la esbozada por Dixon, por la que suponen que los dos centros activos que simultáneamente oxidan y reducen al sustrato estarían ligados por la coenzima en una sola enzima. Este tipo de mecanismo fué aceptado durante bastante tiempo e incluido en algunos textos como en el de Sumner y Sommers y en el de Myrbäck. En el año 1941 Miclin y Borodina publicaron un estudio sobre aldehído mutasa en plantas (11). A partir de porotos consiguieron aislar la mutasa, que actúa específicamente con cozimasa y que también resultó sensible al iodoacetato.

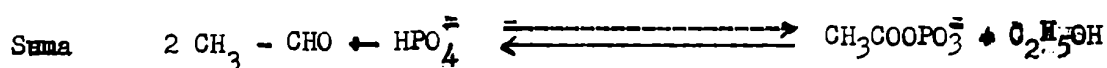
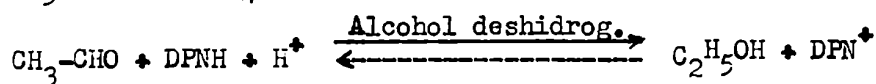
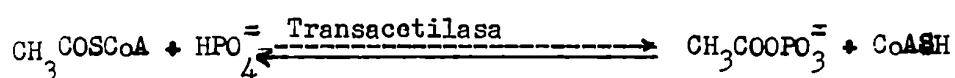
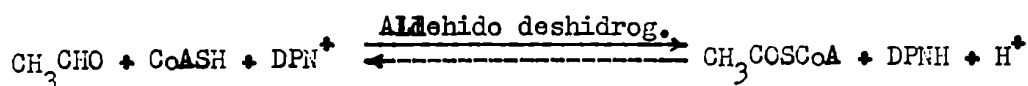
En 1947 en un estudio sobre los efectos del BAL sobre varios sistemas enzimáticos, Webb y Heyingen (12) incluyen los efectos sobre el aldehído mutasa de vacuno, encontrando una inhibición casi total con BAL 0,004. Sugieren la posible existencia de un metal en el grupo prostético.

Finalmente en 1949 E. Racker trabajando sobre hígado de vacuno (13) consigue separar del sistema, la aldehído deshidrogenasa, que requiere DPN como cofactor y que unida a la alcohol deshidrogenasa es capaz de reconstituir la "mutasa".

El sistema de Racker realizaría la dismutación de Cannizzaro de acuerdo al siguiente esquema:



Los trabajos de Stadtman y Barker (14) y de Burton y Stadtman (15) permitieron aclarar otro de dichos procesos de dismutación. Encontraron que en preparaciones parcialmente purificadas de *Cl. Kluveri* la dismutación del acetaldehído requería aldehído deshidrogenasa, ortofosfato, CoA y DPN y propusieron el siguiente esquema :



De esa forma se cierra el capítulo de las aldehído mutasas. La oxidación anaeróbica de los aldehídos correspondientes, aparece desde entonces ligada a las llamadas aldehído deshidrogenasas.

Las aldehído deshidrogenasas.— Con posterioridad al estudio sobre las mutasas han sido descritas varias aldehído deshidrogenasas. Sin embargo entre ellas han sido encontradas una serie de diferencias que han dificultado su ordenación. Aún cuando Raker (16) engloba a casi todas en un solo grupo como tiohemiacetal deshidrogenasas, aceptando el supuesto de que el aldehído forma ^{con} un sulfhidrilo del sistema un hemiacetal, y que es sobre este compuesto sobre el que se produce la reducción, los resultados obtenidos por nosotros nos indican como poco probable este proceso en alguno de esos casos.

En otros casos han sido obtenidas ciertas evidencias para ese mecanismo. Tal es el caso de las siguientes deshidrogenasas:

Aldehído deshidrogenasa del *Clostridium Kluveri*.— Requiere DPN, CoA, transacetilasa y fosfato, da como producto final acetilfosfato (14-15). En los extractos

iniciales de Cl. Kluveri el sistema era activo tanto con DPN como con TPN pero el hecho de que extractos purificados eran activos solo con DPN sugirió a los autores la posible presencia de dos enzimas simultáneas. El sistema tiene una actividad máxima con acetaldehído, butiraldehído y glicolaldehído.

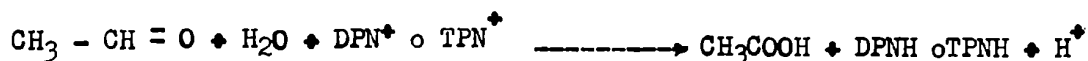
Formaldehído deshidrogenasa de hígado y levadura .- Activa con formol y DPN requiere cisteína o glutatión para su actividad (16) . Las enzima de hígado de vacuno y cerdo han sido estudiadas desde un punto de vista cinético (17). Los resultados corroboran la hipótesis de que la enzima actuaría sobre el hemimercaptal S-hidroximetilglutatión. Ha sido también sugerida la formación de un tiohemiacetal en el caso de la betaina aldehído deshidrogenasa de hígado (16-18) específica para ese aldehído y activa con DPN, requiere también glutatión o cisteína.

La triosafosfato deshidrogenasa no ha sido incluida por Racker con el grupo anterior; su mecanismo de acción no está aún aclarado habiéndose sugerido distintas posibilidades (del 19 al 26) . Requiere para su actividad glutatión que actuaría como cofactor firmemente unido a la proteína ,DPN y fosfato. Si bien es cierto que es el gliceraldehído - 3 - fosfato el sustrato que reduce más rápidamente , también puede actuar sobre gliceraldehído (27) e incluso con altas concentraciones de enzima el acetaldehído puede ser llevado a acetilfosfato, pudiendo también usar como sustratos propionaldehído y butiraldehído (23).

La benzaldehído deshidrogenasa . (16) de Ps fluorescens es considerada específica para benzaldehído habiéndose podido separar de los extractos originales una fracción activa con DPN y otra con TPN.

En otras enzimas el proceso parecería tener ciertas diferencias. En ellas no se requiere fosfato como en la de Cl. Kluveri y la ^{R/}triosafosfato deshidrogenasa y aparece como producto final ácido acético; por otra parte no se ha demostrado formación intermedia de un tiohemiacetal.

La oxidación se realizaría en forma directa según esta ecuación:



Tal sería el caso de la aldehído deshidrogenasa de hígado (13) que es DPN

especifica y que oxida el acetaldehído a velocidad máxima y en orden decreciente formaldehído, glicolaldehído, propionaldehído, butiraldehído, e isovalerilaldehído. También fueron encontradas acetaldehído deshidrogenasas en la levadura. La primera por Black (28) activa tanto con DPN como con TPN requiere K^+ y cisteína para su actividad. Oxida al acetaldehído y en menor grado al propionaldehído, butiraldehído, benzaldehído, semialdehído succínico, crotonaldehído, formaldehído y gliceraldehído. La segunda por Seegmiller (29) es específica con TPN y requiere para su actividad cationes divalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++}). Actúa sobre el acetaldehído, glicolaldehído, propionaldehído y formaldehído. Recientemente King y Chelding (30) han aislado una acetaldehído deshidrogenasa de Acetobacter suboxidans activa con DPN o TPN, que no requiere fosfato, CoA , Cl_2Mn ni Cl_2Mg . Es más específica que las anteriores ya que solo actúa sobre acetaldehído, propionaldehído y n-butiraldehído. Las pruebas realizadas hasta el presente sobre las aldehído deshidrogenasas de hígado y de levadura (13,28,29) tendientes a comprobar la formación de un complejo acetilado intermedio han dado resultados negativos. Por otra parte el intento de hidrólisis de un cierto número de tiolesteres con enzima de hígado parcialmente purificada, dió cuando lo hubo, un ataque muy lento (24). En experimentos con mitochondria de hígado y riñón de rata e hígado de paloma, Wallerstein y Winhouse (31) encontraron evidencias de que el acetaldehído se oxida sin formar acetil CoA . Sugieren como responsable de la oxidación a la enzima de Racker. Las experiencias con hígado de rata realizadas por Brady y Gurin (32) con C^{14} mostraron al acetaldehído como un mejor precursor de los ácidos grasos que el acetato, lo que resultaría difícil de explicar de acuerdo a los resultados anteriores a menos de admitir que el acetaldehído difunde más rápidamente que el acetato en la célula hepática. Podemos admitir pues como primera aproximación que ciertas aldehído deshidrogenasa podría actuar sin formación de hemiacetales intermedios. Observaciones realizadas en este trabajo refuerzan esta afirmación.

Para terminar con la serie de procesos de oxidación enzimática de alde-

hidos merece ser citado el propuesto por Yoshio Shimatzu (33) a través del sistema acetoina-acetilo por intermedio de una enzima a la que llama transcarbolicasa, según este mecanismo:



En este trabajo nos ocuparemos de problemas relativos a las acetaldehído. deshidrogenasas de hígado y levadura, que utilizando como cofactores DPN o TPN, son capaces de oxidar los aldehidos en forma aparentemente directa dando ácido acético como producto de oxidación : acción de reactivos de tioles sobre los extractos enzimáticos ; acción de reactivos de tioles sobre los extractos enzimáticos purificados de hígado y de levadura ; estudio del posible rol de los sulfidrilos en el mecanismo de la oxidación y finalmente estudio de algunos aspectos cinéticos de la DPN acetaldeído deshidrogenasa de levadura.

Bibliografía

- 1 Dixon, M., Enzymologia , 5 198 (1938-39)
- 2 Remy, C.R.N. Richert, D.A. Doisy, R.J. , Wells, I.C. y Westerfeld, W.W.,
J. Biol. Chem., 217 , 293 (1955)
- 3 Doisy, R.J., Richert, D.A. y Westerfeld, W.W., J. Biol. Chem. 217 , 307 (1955)
- 4 Carpentier, F.H., Acta Chem. Scand. , 5 , 406 (1951)
- 5 Mahler, H.R., Methods in Enzymology Colowick y Kaplan Academic Press
1955 p.523
- 6 Mahler, H.R., Mackler, B. y Green, D.E., J. Biol. Chem. , 210 , 465 (1954)
- 7 Dixon, M., Ergebnisse der enzymforschung - Nord und Weidenhagen Leipzig
VIII p.217 (1939)
- 8 Booth , V.H. , Biochem. J. , 32 , 503 (1938)
- 9 Dixon, M. y Lutwak Mann, Biochem. J. , 31 , 1347 (1937)
- 10 Green, D.E. , Nedham, D.M. y Dewan , J.G., Biochem. J. , 31 , 2327 (1937)
- 11 Miclin , D.M. y Borodina , O.S. , Enzymologia , 9 , 28 (1941)
- 12 Webb, E.C. y Heyningen , R. , Biochem. J., 41 , 74 (1947)
- 13 Racker , E. , J. Biol. Chem. , 177 , 883 (1949)
- 14 Stadtman , E.R. y Barker, H.A. , J. Biol. Chem. , 180 , 1095 (1949)
- 15 Burton , R.M. y Stadtman , E.R., J. Biol. Chem. , 202 , 873 (1953)
- 16 Racker , E. , Physiological Reviews , 35 1 (1955)
- 17 Strittmater , P. y Ball , E.G. , J. Biol. Chem., 213 , 448 (1955)
- 18 Rotchild, A.H. y Barron, E.S.G., J. Biol. Chem. , 209 , 511 (1954)
- 19 Krinsky , I. y Racker, E., J. Biol. Chem. , 198 , 721 (1952)
- 20 Racker, E. y Krinsky, I. , J. Biol. Chem. , 198 , 731 (1952)
- 21 Segal, H.L. y Boyer, P.D. , J. Biol. Chem. , 204 , 265 (1953)
- 22 Velick, S.F., J. Biol. Chem. , 203 , 563 (1953)
- 23 Harting , J. y Velick, S.F. , J. Biol. Chem. , 207 , 857 (1954)
- 24 Racker, E., Symposium on Mechanism of Enzyme Action , McElroy, Glass
Baltimore (1954) p. 475

- 25 Velick, S.F. , Symposium on Mechanism of Enzyme Action , Mc Elroy, Glass
Baltimore (1954) p.491
- 26 Boyer, P.D. y Segal, H.C. , Symposium on Mechanism of Action , Mc Elroy ,
Glass , Baltimore (1954) p.520
- 27 Warburg, O. y Christian, W. , Biochem. Z. , 303 , 40 (1939) cf Chem. Abs.
- 28 Black, S. , Arch. Biochem. Biophys 34 , 86 (1951)
- 29 Seegmiller, J.E. , J. Biol. Chem. , 201 , 629 (1953)
- 30 King, T.E. y Chelding, V.H. , J. Biol. Chem. , 220 , 177 (1956)
- 31 Walken stein, S.S. y Weinhouse, S. , J. Biol. Chem. , 200 515 (1953)
- 32 Brady , R.O. y Gurin, S. , J. Biol. Chem. , 189, 371 (1951)
- 33 Yoshio Shimatzu, J. Chem Soc. (Japan) 73 , 556 (1952) cf Chem. Abs.

Capítulo II

MINERAL DE COCOS

LEVADURA .- Se utilizó levadura de fermentación alta (Saccharomyces cerevisiae) pura, preparada industrialmente para uso en panadería . El contralor bacteriológico demostró que la especificidad y la pureza de las preparaciones eran satisfactorias.

LEVADURA AYUNADA.- Se utilizó en los experimentos de oxidación de acetaldehído por células vivas y se prepara de la manera siguiente : En un tubo ancho y estéril se homogenizan con agua destilada estéril, aproximadamente 30 gr. de levadura desmenuzada. La suspensión se centrifuga en tubos de ensayo estériles a 2.500 rpm. durante 30 min. y se separa la levadura de la capa de almidón sedimentada en el fondo del tubo. Se repite la operación una vez más, se suspende finalmente la levadura en agua destilada estéril, y se coloca en un frasco lavador alto y estrecho. Se hace burbujear aire filtrado por algodón a través de la suspensión durante 12 horas a 22-25° . La suspensión convenientemente diluida se colocó en los vasos de Warburg en las condiciones indicadas en cada caso.

PREPARACION DE POLVO ACETONICO DE LEVADURA

La obtención de extractos acelulares enzimáticamente activos (zimina) a partir de polvo de levadura secada con acetona y éter, fué ya descripta por Albert, Buchner y Rapp (1902) (1) . Un procedimiento fundado en ese principio se ha aplicado ahora para la preparación del polvo acetónico , si bien ciertos detalles críticos para la actividad de la enzima a obtener ulteriormente requieren una exposición detallada.

500 gr. de levadura se lavan 2 veces con 1 lt. de agua y se centrifugan descartándose la capa de almidón eventualmente presente. La levadura se suspende en 500 ml. de agua y se filtra por succión, quedando una torta de unos 280 gr. La torta enfriada a 4° se suspende en 700 ml de acetona a -18° , durante 1 minuto con la licuadora eléctrica . La suspensión se filtra por succión en un embudo de Buchner enfriado a -18° , repitiéndose la licuación y el filtrado 2 veces más. La torta obtenida se lava dos veces con 150-200 ml. de éter etílico li-

bre de peróxidos ,a -18° . Se desmenuza finalmente, se seca sobre papel de filtro bajo ventilador y se completa la desintegración con varilla gruesa de vidrio hasta convertirla en un polvo perfectamente seco, libre de olor a éter o acetona. Este polvo puede ser guardado indefinidamente en un desecador al vacío conteniendo vaselina líquida e hidróxido de sodio sólido.

PREPARACION DE LA DPN ALDEHIDO DESHIDROGENASA (Black)

80 gr. de polvo acetónico de levadura se suspenden con la licuadora eléctrica en 225 ml. de agua destilada y 100 ml de fosfato bipotásico 0.3 M. El pH de la suspensión a $0-4^{\circ}$, se ajusta a 8.6 con hidróxido de amonio concentrado (D.O.900). La suspensión se conserva en la heladera a $2^{\circ} - 4^{\circ}$ durante 5 días, con agitación ocasion al, manteniéndose el pH siempre superior a 6.6. Al término de esta extracción, la suspensión se centrifuga a 3.000 rpm., durante 30min. y 4° , descartándose el precipitado.

El sobrenadante se lleva a pH 6.3 con ácido cítrico 1 M. Se calienta a 55° en baño maria durante 15 minutos y se enfría inmediatamente en baño de agua helada. El precipitado formado se elimina por centrifugación a 3.500 rpm. y 4° y se suspende en 50 ml. de agua destilada helada, repitiéndose la centrifugación. El sobrenadante unido con el anterior se llevan a pH 4.7 con ácido cítrico 1 M. El precipitado que se forma , contiene la enzima y se suspende en 30 ml. de fosfato bipotásico 0, 025 M ajustándose el pH a 6.3 con amoníaco 3 M. Se centrifuga nuevamente y se junta el sobrenadante con el anterior. La solución contiene la enzima, y puede conservarse bien congelada a -16° , especialmente en presencia de cisteina 0,001 M , si bien después de un mes pierde parte de su actividad.

Precipitación de la enzima con acetona. Esta fracción se prepara inmediatamente antes de usarse de la siguiente manera : La preparación anterior se centrifuga y su pH se ajusta a 6.3.

Trabajando en baño de hielo y sal para impedir que la temperatura suba encima de 0° se agrega lentamente y con agitación constante 0.5 volúmenes de acetona helada. Se centrifuga entonces a 2.500 rpm. durante 5 minutos y a -8° y el precipitado se disuelve en Tris 0.015 M a pH 8.0 helado, restituyendo el volúmen original. Según las determinaciones a efectuar se agrega o no cisteína. La solución mantenida a $0-4^{\circ}$ es la que se utilizó en la mayoría de los experimentos realizados. La fracción acetónica es muy inestable. Con cisteína 0.001 M, congelada a -16° pierde totalmente la actividad en 4-5 días y sin cisteína en 24 horas. El cloruro de potasio 0.12 M tiene una acción protectora aún mayor que la cisteína. También se observa protección por el agregado de ácido nucleico. La enzima liofilizada pierde 57% de actividad a -18° durante 20 días.

Comentarios. - El método preparativo descripto difiere en varios aspectos del de Black (5). En primer lugar la enzima se extrajo de polvo de levadura secada con acetona y no de levadura congelada con aire líquido (Black). Este método tiene ventajas ciertas, primero porque es más fácil preparar y extraer polvo de levadura en cantidades ilimitadas lo que es más difícil con levadura congelada en aire líquido, y además, porque se obtienen extractos crudos libres de TPN aldehído deshidrogenasa, lo que no ocurre con el método de Black. En segundo lugar la substitución del último paso de Black (precipitación con ClNa saturado) por la precipitación con acetona, si bien no es tan eficaz en cuanto al aumento de la actividad específica de la enzima, resulta útil, por cuanto permite la eliminación de electrolitos, lo que es indispensable para muchos de los experimentos efectuados. En fraccionamientos típicos la precipitación con acetona aumentó 2.5 veces la actividad específica de la enzima.

PREPARACION DE LA TPN-ALDEHIDO DESHIDROGENASA (Seegmiller)

200 gr. de levadura sin fécula, lavada como se describió anteriormente y desmenuzada se mezclan gradualmente con 1 l. de nitrógeno líquido en un frasco termo. Una vez evaporado todo el nitrógeno, la levadura congelada se vierte lentamente y con agitación en 100 ml. de fosfato bipotásico 0.3 M.

Se ajusta el pH a 8.6 con NH_3 concentrado, manteniendo la temperatura debajo de 3° - 5° . La suspensión se agita vigorosamente durante 2 horas y luego se deja 24 horas a 4° con agitación ocasional, al cabo de las cuales se centrifuga a 0° .

A 140 ml del sobrenadante se agregan en frío y con agitación 45.5 gr. de sulfato de amonio y el pH se ajusta a 7.2; la suspensión se centrifuga y el precipitado se descarta. El sobrenadante se ajusta a pH 3.2 mediante adición lenta de SO_4H_2 2% y se centrifuga. El sedimento se extrae con fracciones sucesivas de 5 y 4 ml de fosfato bipotásico 0.3 M y el pH se ajusta a 6.3 con hidróxido de amonio 3 M. Esta preparación congelada a -17°C conserva bien su actividad.

Fraccionamiento con acetona.- Estas preparaciones se obtuvieron inmediatamente antes de su uso de la siguiente forma: A 1 ml de extracto activo se agrega 3 ml de buffer acetato 0.1 M pH 5.25 y luego, con agitación constante, 3 ml de acetona helada sin dejar subir la temperatura encima de 0° . El precipitado se centrifuga a -8° y se disuelve en Tris 0.015 M, pH 7.7. Esta preparación es muy inestable y de duración limitada, aún mantenida en baño de hielo. La misma contiene pequeñas cantidades de la enzima de Black que no interfiere las medidas porque ésta última requiere potasio y cisteína para su actividad.

Comentarios.- La preparación descrita difiere de la de Seegmiller (3) en el método de extracción y en que se suprime la adsorción con gel de alúmina. La destrucción de la estructura celular con aire líquido es mejor que la agitación mecánica con arena pues no introduce elementos extraños a la preparación, en particular los metales pesados que suelen contaminar la arena y que inhiben la enzima. La adsorción con gel de alúmina no se realizó porque la pureza obtenida sin esa etapa era suficiente para las necesidades de los experimentos a efectuar y en esas condiciones era posible mantener activos los preparados mucho más tiempo que el referido por Seegmiller.

PREPARACION DE ACETALDEHIDO DESHIDROGENASA DE HIGADO (Racker)

250 gr. de hígado picado se licúa con 750 ml de acetona a -18° y la suspensión se mezcla con 1 litro de acetona helada y se filtra en un Buchner

con succión repitiéndose la operación una vez más. La torta se lava dos veces con pequeñas cantidades de éter helado libre de peróxidos y se desmenuza y se seca sobre papel de filtro, bajo un ventilador. El polvo seco se suspende con agitación mecánica en 8 volúmenes de agua destilada, a temperatura ambiente, durante 45 minutos. La suspensión se centrifuga y a cada 100 ml de sobrenadante se agrega lentamente 70 ml de etanol helado; la temperatura se mantiene debajo de 8° . Se deja durante 20 minutos en reposo, se centrifuga y al sobrenadante se agrega lentamente 40 ml de alcohol frío por cada 100 ml de extracto original. Se deja durante 10 minutos a 0° y el precipitado se centrifuga, se disuelve en agua destilada y se dializa durante dos horas con agitación mecánica contra un gran volumen de agua destilada. La preparación se centrifuga y el precipitado se descarta.

Fraccionamiento con sulfato de amonio.— La solución límpida se lleva hasta 51 % de saturación con solución saturada de sulfato de amonio, a 0° . El precipitado que se obtiene se descarta por centrifugación y el sobrenadante se lleva a 60 % de saturación con sulfato de amonio obteniéndose un precipitado que se centrifuga y se disuelve en un volumen mínimo de agua destilada. Esta solución mantenida a -17° C fué utilizada en los experimentos que se describen mas adelante.

Comentarios. — Este método de preparación es semejante al propuesto por Racker (4) hasta la precipitación con sulfato de amonio salvo que se ha utilizado éter para acelerar la eliminación de acetona durante el secado del polvo de hígado. La precipitación de la enzima con ácido nucleico descrito por Racker no se pudo realizar por la mala calidad del nucleico disponible. En su lugar se ha introducido la purificación con sulfato de amonio que permite aumentar la pureza de la preparación unas 2 veces.

Determinación de las actividades enzimáticas.— La actividad de las deshidrogenasas se midió por la velocidad de reducción del DPN o TPN, medida con el espectrofotómetro Beckman DU a $340\text{ m}\mu$, en celdas de corex de 1 cm. de espesor óptico, a temperatura ambiente ($17^{\circ} - 25^{\circ}$), siendo el volumen final de la mezcla de reacción 3.0 ml. Después de tomar como cero la densidad óptica del blanco, se inició

la reacción añadiendo el acetaldehído y a partir de entonces, cada 10-30 segundos se midió el aumento de absorción. La medida de la DPN aldehído deshidrogenasa de levadura se realizó según Black (2) salvo cuando se indica lo contrario. La concentración final de los reactivos es la siguiente: tris (hidroximetil) metilamina 0.015 M, pH 8.0; CLK 0.05 M ; DPN 0.45 mM; cisteína 0.001 M y acetaldehído 17×10^{-5} M. Black utiliza 0.1M CLK. Según nuestras observaciones (v.i.) la concentración óptima de CLK es 0.05 M y no 0.2 M como indica Black.

La medida de la TPN aldehído deshidrogenasa de levadura se realizó según Seegmiller (3) si bien la glicil-glicina se substituyó por Tris. Las concentraciones finales usadas son tris (hidroximetil) metilamina 0.015 M, pH7.7, Cl_2 Mg 0.015 M, TPN 0.12 mM y acetaldehído 0.5 mM.

La medida de la DPN- aldehído deshidrogenasa de hígado, se efectuó según Racker (4) , con las siguientes concentraciones finales ; pirofosfato 0.01 M , pH 9.3, DPN 0.45 mM y acetaldehído 3.5 mM.

Consumo de oxígeno de la levadura .- Se midió con el método directo de Warburg (6) La levadura se suspendió en 2.0 ml PO_4H_2K 0.02 M con aire en la fase gaseosa del manómetro y un pequeño trozo de papel embebido en 0.15 ml de hidróxido de potasio al 15% en el compartimiento central del vaso. Después de equilibrar a 30° , se añadió el acetaldehído (concentración final, 0.013 M).

Determinación de la concentración proteica de las preparaciones de deshidrogenasas.

Se realizó según Stadtman , Novelli y Lipman (7) si bien se modificó la concentración de los reactivos de la manera siguiente : La solución que contenía entre 0.1 mg y 2 mg de proteína se llevó a 15 ml. Se agregó 3.5 ml de ácido tricloroacético al 3% y 30 segundos después se midió la densidad óptica respecto de un blanco de agua con el colorímetro Cromión (filtro verde) . La curva de calibración se realizó con proteínas de suero humano cuya concentración total se determinó según Parnas. La concentración de la DPN- aldehído deshidrogenasa de hígado se midió espectrofotométricamente a 280 m μ con corrección para ácidos nucleicos según Christian y Warburg (8) .

Concentración de las suspensiones de levadura viva.- Se midió nefelométricamente en el fotocolorímetro Cromoión, por comparación con una curva patrón obtenida con una suspensión de levadura de concentración determinada por el peso del residuo sólido secado a 100°. Las concentraciones se refieren al peso (en mg.) de levadura seca.

Métodos generales de inhibición y protección de las deshidrogenasas.- Excepto cuando se indica de otra manera los experimentos de inhibición y protección se realizaron como sigue: En un tubo de ensayo pequeño, se colocó Tris, la enzima en solución concentrada, el presunto protector, agua destilada hasta completar un volumen final de 0.5 ml, y por último, el reactivo de tioles. Al cabo del tiempo que se indica en cada caso, medido con cronómetro a partir de la adición del reactivo de tioles, se tomó una alícuota (0.05 - 0.2) que se diluyó en la mezcla de cuyos componentes faltaba sólo el acetaldehído, utilizada para medir la actividad enzimática. La absorción de la mezcla a 340 m μ se tomó como densidad óptica cero y se añadió el acetaldehído. En la misma forma se midió la actividad de la enzima tratada 1) sin reactivo de tioles, 2) sin protector, y 3) sin protector ni reactivo de tioles. La mayoría de los experimentos se efectuaron por duplicado.

Expresión de los resultados.- La actividad enzimática se expresa por $10^3 \cdot \Delta(\log I_0 / I)_{340} / \text{min}$, siendo $(\log I_0 / I)_{340}$ el aumento de la densidad óptica. Como la actividad decrece a través del tiempo (especialmente con la enzima de Black) se representó gráficamente la variación de absorción (ordenadas) en función del tiempo (abscisas) tomando el valor de la tangente de la curva en el origen de coordenadas como la velocidad inicial de la reacción. La inhibición (I) de las deshidrogenasas se calcula con la ecuación (1) donde v_i y v_t son las velocidades iniciales obtenidas con la enzima inhibida y con el respectivo testigo.

$$I (\%) = (1 - \frac{v_i}{v_t}) 100 \quad (1)$$

El error de I , e_I es el de $(\frac{v_i}{v_t}) 100$ sea

$$e_I = 100 / \frac{v_t}{v_i} \sqrt{e_{v_i}^2 + (\frac{v_i}{v_t})^2 \cdot e_{v_t}^2}$$

Puede verse que e_I disminuye al aumentar v_t y disminuir v_i . La velocidad del testigo está limitada por las concentraciones del sustrato y de la enzima, mientras que la velocidad de la enzima inhibida está limitada además por la concentración del inhibidor.

En los experimentos de protección la disminución de la inhibición enzimática debida al protector p se calcula con la ecuación (2)

$$P (\%) = 1 - \frac{I_p (\%)}{I (\%)} \quad (2)$$

donde I tiene el significado dado mas arriba y I_p es la disminución de actividad de la enzima tratada con protector y reactivo de tioles, respecto a la actividad de la enzima con protector solamente.

El error de p , e_p es el error de $\frac{I_p}{I} \cdot 100$ es decir

$$e_p = 100/I \sqrt{\frac{e_{I_p}^2 + (I_p \cdot e_I)^2}{I^2}}$$

Puede verse que e_p aumenta a medida que aumenta $\frac{I_p}{I}$ y disminuye I . Por lo tanto las protecciones observadas frente a reactivos de bajo poder inhibidor resultaron afectadas de un error tanto mayor cuanto menor fué la actividad inicial del testigo y la inhibición observada.

Reactivos.- Se utilizaron los siguientes:

DPN y $DPNH_2$ (96% puro) y TPN (90% puro) de Sigma Chemical Co. ; AMP de Schwartz Laboratories Inc.; tris (hidroximetil) metilamina de Sigma Chemical Co.; clorhidrato de cisteina 2:4-dinitrofenol y etilenediamina tetraacetato puro (sal disódica) de British Drug Houses Ltd. 2:5- y 2:6-dinitrofenol de E.Merck,Darmstadt; mafarsen , de Parkr Davies & Co.; N-etilmaleimide de Schwarz Laboratories Inc.; glicil-glicina de Hoffman-La Roche; BAL de Boot Pure Drug Co. Nottingham ; y glutation (sal sódica)de Schwarz Laboratories Inc. . Además se utilizaron los siguientes métodos preparativos :ácido p-cloromercuribenzoico, según Whitmore y Woodward (10), ácido o-iodosobenzoico, según Askenasy y Meyer (11); iodoacetato de etilo, según Tiemann (12) ; cloroacetofenona y bromuro de cianobencilo , según Rojahn y Giral (13).

Determinación del acetaldehído..- El acetaldehído fué valorado por el método de Clift y Cook modificado por Elliot, Benoy y Baker (9) y que se basa en la formación de un complejo bisulfítico, eliminación del exceso de bisulfito y titulación con bido del bisulfito por la hidrólisis con bicarbonato de sodio.

Abreviaturas.- Por razones de espacio la DPN acetaldehído deshidrogenasa de levadura, TPN-acetaldehído deshidrogenasa de levadura y DPN-acetaldehído deshidrogenasa de hígado se denominarán , respectivamente, enzima de Black, de Seegmiller y de Racker.

Otras abreviaturas usadas son las siguientes: DPN, difosfopiridina-adenina dinucleótido; DPNH₂ difosfopiridina-adenina dinucleótido reducido; TPN, trifosfopiridina-adenina dinucleótido ; AMP, ácido adenílico; EDTA etilenediamina tetraacetato (sal sódica) ; mafarsen , m-amino-p-hidroxifenil arsenóxido; Tris, tris (hidroximetil) metilamina y BAL 2:3-dimercaptopropanol.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Buchner E.; Buchner H. y Liahn M. Die Zimaregärung (1903)
- 2 Black S. Arch. BIOCHEM Biphys 34 86 (1951)
- 3 Seegmiller J.E. J. Biol. Chem. 201 629 (1953)
- 4 Racker E. J. Biol. Chem. 177 883 (1949)
- 5 Black S. en Methods in Enzymology Colowick y Kaplan Academic Press
(1955) I p 508
- 6 Umbreit W.W., Burris R.H. y Stauffer J.F. "Manometric Techniques"
(Burgess Publishing Co Minneapolis Minn) (1949)
- 7 Stadtman, Novelli y Lipman . J. Biol. Chem. 191 365 (1951)
- 8 Christian W. y Warburg O. Biochem. Z. 310 684 (1939)
- 9 Elliot, K.E.C., Benoy H.P. y Baker Z. Biochem. J. 29 1937 (1935)
- 10 Whitmore F.C. y Woodward G.E. Org. Synth. Coll. 1 159 (1941) New York:
J. WILEY and Sons.
- 11 Askenasy P. y Meyer V. Ber. dtsh. Chem. Ges. 26 1954 (1893)
- 12 Tieman F. Ber. dtsh. Chem. Ges. 31 825 (1898)
- 13 Kojahn C.A. y Giral F. Productos Químicos y Farmacéuticos a 2 1028 y
b 3, 1179 (1946)

folio III

INDICACION DE LA ORIGINACION BIOLOGICA DE LOS ALDEHIDOS

La oxidación biológica de los aldehidos es afectada por inhibidores onzimáticos específicos. Así el disulfuro de tetraetiltiouram (antabuse) inhibe la oxidación del acetaldehido por homogeneizado de hígado (1) (2) y por preparaciones de aldehido oxidasa (3) y aldehido deshidrogenasa (4) del mismo órgano. Esta acción inhibitoria podría atribuirse a la oxidación de grupos tioles. Un reactivo de tioles (iodoacetato) inhibe la aldehido mutasa de los extractos de levadura (5) . En la levadura se han descrito dos enzimas que oxidan el acetaldehido. La primera (enzima de Black) (6) depende de grupos tioles para su actividad mientras que la segunda (enzima de Seegmiller) (7) no dependeria de la presencia de tioles. El grado en que los reactivos de tioles pueden afectar la oxidación del acetaldehido por las células de levadura viva podría estar condicionada por la diferencia funcional de las dos aldehido deshidrogenasas mencionadas, y mostrar por lo tanto el papel de cada una de esas enzimas en la oxidación del acetaldehido por la levadura.

Con ese propósito se ha estudiado la acción de varios reactivos de tioles (iodoacetato, iodoacetato de etilo, bromuro de cianobencilo, cloroacetofenona y p-clomercuribenzoato) sobre la oxidación del acetaldehido por la levadura.

RESULTADOS

1°) Acción del iodoacetato. La oxidación del acetaldehido por la levadura es claramente disminuída por el iodoacetato (Tabla 1). El efecto se desarrolla lentamente, pues la inhibición alcanza su máximo después de 17 minutos de contacto de las células con el iodoacetato, y requiere concentración alta de iodoacetato (0.01 M) para ser total. Con concentraciones algo menores (5.0 y 2.5 m μ) se obtiene también inhibiciones grandes (93.7% y 65.7% respectivamente). La respiración residual de la levadura dificulta la apreciación exacta del efecto inhibitor del iodoacetato. Para evitar ese inconveniente se han calculado las inhibiciones a partir del momento en que la respiración residual se hace pequeña; a pesar de ello cuando se inhibe la respiración de células en presencia de acetaldehido es imposible establecer en qué medida se inhibe la oxidación del acetaldehido y la respiración residual. Sin embargo, como exis-

Tabla 1. Acción del iodoacetato sobre la oxidación del acetaldehído por S.cerevisiae

Cada vaso de Warburg lleva 9 mg. de levadura, 2.0 ml. PO_4H_2K 0.02 M y las adiciones indicadas. 0.2 ml. de KCN al 15% en el vaso central. 30°. 30 minutos de equilibración.

Adiciones	Consumo de oxígeno en 30 minutos (ml)	Inhibición (%)
Ninguna	44	-
Acetaldehído 0.03 M	216	-
Iodoacetato 0.01 M	26	-
Acetaldehído 0.03 M + iodoacetato 0.01 M	22	102
Acetaldehído 0.03 M + iodoacetato 0.005 M	47	90
Acetaldehído 0.03 M + iodoacetato 0.0025 M	60	85

te una diferencia notable en la magnitud de ambas es posible sacar conclusiones semicuantitativas respecto a la acción del inhibidor.

2°) Acción del iodoacetato de etilo, la cloroacetofenona y el bromuro de cianobencilo.

Estos tres lacrimógenos en concentración 1.7 ml, 2.7 ml y 1.5 ml respectivamente inhiben fuertemente la oxidación del acetaldehído como se evidencia tanto por la disminución del consumo de oxígeno como por la inhibición de la desaparición de acetaldehído (Tabla 2).

3°) Acción del p-cloromercuribenzoato. En concentración de 0.05 ml inhibe 40.0% la oxidación del acetaldehído. Llama la atención que aumentos significativos en la concentración del inhibidor (de 0.05 a 0.52 ml) no modifiquen significativamente la intensidad de la inhibición (Tabla 3).

DISCUSION

La oxidación del acetaldehído por la levadura depende de grupos tioles como lo demuestra su inhibición por el iodoacetato, los lacrimógenos y el mercurial. Las dos aldehído deshidrogenasas mencionadas transforman el acetaldehído en acetato que a través de la acetil Co A pasaría a ser oxidado por reacciones del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

La acción de los reactivos de tioles podría afectar 1°) las deshidrogenasas respectivas y 2°) la coenzima A. Los resultados experimentales reseñados demuestran que la etapa aldehído deshidrogenasa depende de tioles pues de otra manera, los reactivos inhibidores si bien disminuirían el consumo de oxígeno afectarían en grado notablemente menor la desaparición de acetaldehído, lo que no ocurre. Ello no excluye que además de las aldehído deshidrogenasas, la coenzima A sea bloqueada por los inhibidores de tioles.

Se demostrará en capítulos siguientes que las dos aldehído deshidrogenasas de levadura cuando están purificadas son sensibles a varios tipos de detectores de tioles, incluso los ensayados con células vivas. La actividad considerable de la on-

Tabla 3. Acción del p-cloromercuribenzoato sobre la oxidación del acetaldehído por S. cerevisiae.

Cada vaso de Warburg lleva 7.0 mg. de levadura, 2.0 ml. de $\text{PO}_4^{H_2} \text{K}$ 0.02 M y las adiciones indicadas. 0.2 ml. de KOH al 15% en el vaso central. 30° Aire. 10 minutos de equilibración, 60 minutos de oxidación del acetaldehído. Entre paréntesis, inhibición %.

Adiciones	Consumo de oxígeno (μl)	Consumo de acetaldehído. (μmoles)
Ninguna	17	0.0
Acetaldehído 0.03 M	436	38.7
Acetaldehído 0.03 M + p-cloromercuribenzoato 0.52 ml	236 (45.6)	19.2 (50.5)
Acetaldehído 0.03 M + p-cloromercuribenzoato 0.25 ml	218 (50.0)	18.0 (53.5)
Acetaldehído 0.03 M + p-cloromercuribenzoato 0.05 ml	259 (40.5)	22.3 (42.2)

zima de Seegmiller en ausencia de tioles, señalada por Seegmiller para distinguir esta enzima de la de Black, no excluye la presencia de tioles esenciales en la molécula de la enzima de Seegmiller. La enzima de Black es notablemente menos sensible al iodoacetato que la enzima de Seegmiller (capítulo IV Tabla 5) y el iodoacetato en concentración capaz de inhibir la oxidación de acetaldehído por las células de levadura apenas afecta la enzima de Black, si bien inhibe netamente la enzima de Seegmiller. Esto implicaría que es esta última la que tiene el papel preponderante en la levadura viva. Estos resultados deben ser interpretados sin embargo con cautela. Las condiciones de inhibición de la enzima aislada y de la célula son distintas pues en el último caso intervienen factores de estructura celular, permeabilidad iónica, etc. que podría modificar notablemente la sensibilidad de los tioles en las enzimas para los inhibidores específicos. En el mismo sentido pueden considerarse los experimentos con *p*-cloromercuribenzoato pues se verá que la enzima de Seegmiller es aparentemente la más sensible al mercurial.

CONCLUSIONES

- 1°) La oxidación del acetaldehído por células de Saccharomyces cerevisiae es inhibida por reactivos de tioles como el iodoacetato, iodoacetato de etilo, bromuro de cianobencilo, cloroacetofenona y *p*-cloromercuribenzoato. La inhibición se manifiesta en el consumo de oxígeno y de acetaldehído respectivamente.
- 2°) El efecto del iodoacetato sobre la enzima de Seegmiller explica preferentemente la inhibición de la oxidación de acetaldehído por levadura viva.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Graham, A., J.Pharm.Pharmacol. 2 , 160 (1951)
- 2 Kold, J., Jacobsen, B. y Larsen , V., Acta Pharmacol.et Toxicol. 2 , 298 (1949)
- 3 Njelgaard, H.O., Acta Pharmacol.et Toxicol. 2 , 397 (1949)
- 4 Racker, E., Methods in Enzymology Collovecchi y Kaplan Ac. Press (N.Y.) 1955 I 51
- 5 Dixon, M. y Lutwak Mann, C., Biochem.J. 31 , 1347 (1937)
- 6 Black, S., Arch.Biochem.Biophys. 34 , 86 (1951)
- 7 Seegmiller, J.D., J.Biol.Chem. 201 , 627 (1953)

o c t 1 0 I V

ACCION DE LOS REACTIVOS DE TIOLES SOBRE ALDEHIDO D.LS.INDOLEMASAS

Los grupos tioles han adquirido en los últimos tiempos una importancia capital en la explicación de los fenómenos enzimáticos. Desde que Rapkine (1) Hopkins y Morgan (2) demostraron el papel primordial de los tioles en enzimas de óxido reducción, son muchas las enzimas clasificadas como "enzimas tioles".

Los grupos tioles se detectan mediante una serie de reactivos más o menos específicos. La respuesta al detector depende, por una parte de su naturaleza química y por otra, de la posición que el SH ocupa en la proteína respecto a otros tioles, o a grupos funcionales diferentes. Así la posibilidad de oxidación intramolecular entre 2 SH para formar un disulfuro depende de la distancia entre los mismos, mientras que la presencia de grupos polares electronegativos próximos al SH disminuye su reactividad. De acuerdo con esto se han clasificado a los tioles en, tioles débilmente reactivos y tioles enmascarados (3). Los tioles libres se reconocen por la reacción del nitroprusiato (Hefter-Arnold).

Para el estudio sistemático de estos grupos se utilizan reactivos que pueden clasificarse de la siguiente manera (3).

a) Reactivos oxidantes.- Oxidan grupos SH libres y en ciertas condiciones los débilmente reactivos. Son muy importantes, pero deben tenerse en cuenta que existen casos en que no actúan sobre algunos tioles, pues para que ello sea posible se requieren 2 grupos -SH lo suficientemente cercanos, como para poder formar un puente S-S. Por otra parte algunos de estos agentes pueden también oxidar otros grupos funcionales. El glutatión oxidado y la cistina pueden considerarse como los más específicos si bien actúan muy lentamente. El *p*-iodosobenzoato introducido por Hellerman y col. y usado con éxito sobre la ureasa (4) y posteriormente sobre la succinoxidasa (5), la isocitricodeshidrogenasa (6), la carboxilasa, (7), etc. es por la velocidad y selectividad de su acción, uno de los más utilizados.

b) Reactivos que forman mercaptidas.- Son reactivos de acción muy selectiva y reversible. De ellos los más usados son el *p*-cloromercuribenzoato y los arse-

nicales trivalentes. El primero es el mas poderoso de los agentes inhibidores y también muy específico si su acción es completamente reversible. Ha sido usado en muchas oportunidades : en la ureasa (8), succinoxidasa (9)(10), alcohol deshidrogenasa (11), carboxilasa (12), DPN aldehido deshidrogenasa (13), etc.

En cuanto a los arsenicales trivalentes también se ha utilizado con ventaja, aunque su efecto no sea siempre tan neto como el del p-cloromercuribenzoato. Su acción fué observada sobre succinoxidasa (9) piruvato deshidrogenasa (14), carboxilasa (12)(5), etc. De ellos el mafarsen, derivado aromático, es uno de los mas activos, usándose también dicloroarsinas como la divinildicloroarsina (lewisita), arsenóxidos como el metilarsenóxido, etc.

c) Agentes alquilantes.- Son sustancias con un átomo de halógeno lábil en las que el grupo alquilo se une al -S del -SH dejando libre un H⁺. Han sido muy extensamente utilizados en particular el iodoacetato y la iodoacetamida a pesar de su poca especificidad, en especial frente a las aminas con las que pueden reaccionar en forma semejante a los SH. Este grupo es el menos satisfactorio para la detección de los tioles (3). Lo mismo puede decirse respecto de otros agentes alquilantes como los llamados lacrimógenos o vesicantes (cloropiricina, bromoacetofenona, cloroacetofenona, iodoacetato de etilo, etc.). Ejemplos de inhibición con este grupo de reactivos son la alcohol deshidrogenasa (15), succinoxidasa (5), isocítrico deshidrogenasa (6), carboxilasa (16), triosafosfato deshidrogenasa (17)(18), etc.

Recientemente se han comenzado a utilizar para la investigación de sulfhidrilos los derivados del ácido maleico, que en 1938 ya se había utilizado como inhibidor de la succinodeshidrogenasa. Entre esos derivados la N-etilmaleimida es la usada preferentemente, actúa adicionando el -SH a su doble ligadura. Esta sustancia ha sido propuesta como reactivo analítico de grupos SH, en sustitución de nitroprusiato, respecto al cual tendría la ventaja de su mayor sensibilidad. (19).

Actualmente existe evidencia de que los grupos tioles son esenciales para las aldehido deshidrogenasas. Según Dixon y Lutwak Mann (1937) (20) el iodoacetato M/100 inhibió fuertemente la dismutación del acetaldehído por la aldehido mutasa de hígado, siendo el efecto atribuido por Green, Dewan y col. (21) a la inhibición del componente de la mutasa que reduce a la coenzima, es decir al centro aldehido deshidrogenasa. Una vez aclarada la estructura de las mutasas, Racker (22) califica de enzima sulfhidrilo a la aldehido deshidrogenasa de hígado aunque no da detalles experimentales. Black (13) al describir la DPN aldehido deshidrogenasa de levadura, encuentra que el p-cloromercuribenzoato la inhibe y que la actividad puede recuperarse con glutatión. Recientemente King y Chelding (23) indican que la aldehido deshidrogenasa de Acetobacter suboxidasa, es sensible a varios reactivos de tioles sea que la enzima actúe con DPN o con TPN.

Por nuestra parte hemos creído conveniente ampliar las observaciones de Black y Racker por entender que los datos aportados hasta ahora no eran completos y además en nuestro estudio se ha incluido la TPN acetaldehído deshidrogenasa de levadura, no obstante que según Seegmiller no requiere tioles para su acción. Con ese objeto se ha ensayado la inhibición de las aldehido deshidrogenasas de hígado y levadura por una gama de reactivos tioles.

RESULTADOS

1º) Acción del mafarsen.- Las tres enzimas estudiadas son inhibidas por este detector de tioles (Tabla 1). La enzima de hígado es la menos sensible pues se requiere una concentración 10 veces mayor e incubación más prolongada para obtener efectos similares a los que se observan con las enzimas de levadura. Entre estas, la enzima de Black parece ser la más sensible al mafarsen pues al término de 30 seg. de incubación el mafarsen 0.032 mM inhibió 97.3 % la enzima de Black y 79.8 % la de Seegmiller, no obstante la menor cantidad de ésta última.

Tabla 1.- Inhibición de acetaldehído deshidrogenasas ^{por/} mafarsen

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0, se tratan según se indica.

Se mide la actividad en 0.2 ml. de solución excepto con la enzima de Black (0.05 ml)

Enzima	Cantidad (mg)	Duración de la incubación (min.)	Mafarsen (ml)	Inhibición (%)
Black	1.6	0.5	0.064	75.9
Black	1.6	1.0	0.064	91.0
Black	0.6	0.5	0.032	97.3
Black	1.9	0.5	0.064	79.2
Seegmiller	2.8	0.5	0.032	53.8
Seegmiller	0.3	0.5	0.032	79.8
Racker	1.8	0.5	0.032	53.0
Racker	1.8	3.0	0.032	85.9
Racker	1.8	3.0	0.016	72.0

2°) Acción del o-iodosobenzoato. Este oxidante inhibe las tres aldehído deshidrogenasas (Tabla 2). La enzima de Seegmiller parece ser la más intensamente afectada pues 1.4 mg. fueron inhibidos 94.4 % por o-iodosobenzoato 0.02 mM mientras que en iguales condiciones, 0.8 mg de la preparación de Black fué inhibida sólo 58.2 %. La deshidrogenasa de hígado requiere una concentración mucho mayor de oxidante e incubación más prolongada para sufrir una inhibición similar.

3°) Acción de la etilmaleimida. Este reactivo de tioles inhibe también las tres aldehído deshidrogenasa (Tabla 3). La sensibilidad de la enzima de Seegmiller es máxima y la de la enzima de Racker mínima. Con la enzima de Black la inactivación es de curso lento pues recién después de 5.6 min. la inhibición alcanza desarrollo completo.

4°) Acción del p-cloromercuribenzoato. La acción de este mercurial sobre la DPN aldehído deshidrogenasa de levadura fué demostrada por Black.

La enzima de Seegmiller es inhibida por concentraciones muy pequeñas de este reactivo al cual es notablemente muy sensible (Tabla 4). La inhibición es poco reversible pues la enzima inhibida por p-cloromercuribenzoato 0.06 mM fué reactivada sólo 26% por adición de cisteína 1.0 mM (Fig.1). En cambio la enzima de Racker requiere concentraciones notablemente mayores de p-cloromercuribenzoato para modificar su actividad (Tabla 4).

5°) Acción de reactivos alquiladores. Eliodoacetato inhibe las tres enzimas estudiadas (Tabla 5). La de Seegmiller parece la más sensible pues en iguales tiempos de incubación, sufrió la mayor inhibición. En cambio la enzima de Racker es la menos sensible (18 % de inhibición en 5 min. de incubación). Como ocurre habitualmente con el iodoacetato, la inhibición se desarrolla lentamente (Tabla 5). Así con la enzima de Black se obtuvo respectivamente, 31.0 y 85.7 % de inhibición después de 5.5 y 30 min. de incubación con el iodoacetato.

Otros reactivos alquiladores (bromuro de cianobencilo, cloroacetofenona y iodoacetato de etilo) inhiben más específicamente las dos enzimas de la

Tabla 2.- Inhibición de acetaldehído deshidrogenasa por o-iodobenzoato

Enzimas disueltas en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0, se tratan según se indica.

Se mide la actividad en 0.1 ml (exp. A y C) y 0.2 ml (exp B y D)

Expe- ri- mento	Enzima	Cantidad (mg)	Duración de la in- cubación (min)	o-iodoso- benzoato (mM)	Inhibi- ción (%)
A	Black	0.8	0.5	0.06	85.0
B	Black	0.8	0.5	0.02	58.2
B	Seegmiller	4.4	0.5	0.06	94.0
C	Seegmiller	1.4	0.5	0.02	94.4
D	Racker	4.4	1.0	0.20	74.4

Tabla 3 .- Inhibición de acetaldehído deshidrogenasa por otilmaloinida

Enzimas disueltas en 0.5 ml de Tris 0.015 M , pH 8.0, se tratan según se indica. Se mide la actividad en 0.2 ml de solución, excepto con la enzima de Black (0.05 ml).

Enzima	Cantidad (mg)	Duración de la incubación (min.)	Etilmaloinida (mM)	Inhibición (%)
Black	1.9	0.5	0.024	37.8
Black	1.9	1.0	0.024	50.0
Black	1.9	2.0	0.024	58.2
Black	1.9	5.6	0.024	62.8
Seegmiller	4.0	1.0	0.024	71.4
Seegmiller	1.0	1.0	0.024	88.1
Seegmiller	0.4	1.0	0.024	99.1
Racker	1.8	3.0	0.18	70.0

Tabla 4.- Acción del p-cloromercurobenzoato sobre acetaldehído deshidrogenasa.

Enzimas disueltas en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0, se trata según se indica.
Se mide la actividad en 0.2 ml de mezcla.

Enzima	Cantidad (mg)	Duración de la incubación (min)	p-cloro mercuri benzoato	Inhibición (%)
Soegmiller	0.24	0.5	6.0 μ M	61.0
Racker	1.0	0.5	60 μ M	6.2
Racker	1.0	2.0	80 μ M	24.2
Racker	1.0	3.0	0.6 mM	54.0

Figura 1

Acción inhibitoria del p-Cloromercuribenzoato sobre la enzima de Secguller y efecto reactivador de la cisteína.

Tris 0.015 M pH 7.7 ; ClMg 0.015 M , TPN 0.12 mM, enzima 0.28 mg. y acetaldehído 0.5 mM. Se agregó en A p-Cloromercuribenzoato hasta concentración 0.012 mM y en B cisteína hasta concentración 0.001 M.

Volumen final, 3.05 ml.

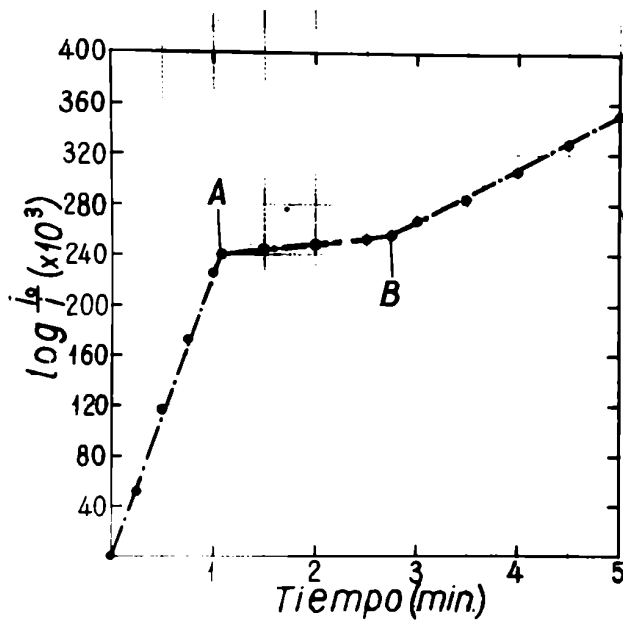


Tabla 5 .- Inhibición de acetaldohido deshidrogenasas por iodoacetato.

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0 , se tratan según se indica.

La actividad se mide en 0.2 ml de solución excepto con la enzima de Black (0.05 ml)

Enzima	Cantidad (mg)	Duración de la in- cubación (min)	Iodoacetato (M)	Inhibicion (%)
Seegmiller	4.4	5	0.01	83.5
Seegmiller	4.2	5	0.01	94.3
Seegmiller	4.2	5	0.004	63.5
Seegmiller	4.2	5	0.001	24.7
Racker	1.8	5	0.01	18.0
Racker	1.8	16	0.01	38.0
Black	-	1.0	0.01	-7.1
Black	-	5.5	0.01	31.0
Black	-	30.0	0.01	85.7

levadura (Tabla 6) . En las condiciones descriptas no puede establecerse una diferencia en la sensibilidad de estas enzimas a estos reactivos.

DISCUSION

De acuerdo a nuestras observaciones las tres aldehido deshidrogenasas estudiadas son tioles.

Black (13) habia ya comprobado que el p-cloromercuribenzoato disminuye la actividad de la DPN-aldehido deshidrogenasa de levadura en presencia de tioles libres necesarios para su actividad; pero este experimento no es suficiente para incluir la enzima entre las enzimas tioles, pues se puede objetar que el p-cloromercuribenzoato eliminó una parte de la cisteína esencial para la actividad de la enzima . Con respecto a las enzimas de Seegmiller y Racker , salvo una referencia ocasional de Racker, (22) al papel de los tioles de su enzima de hígado , no existia estudio sistemático que demostrara el papel esencial de esos grupos. Seegmiller ha utilizado la falta de requerimiento de tioles como criterio para diferenciar su enzima de la de Black. Las dos aldehido deshidrogenasas de levadura pueden diferenciarse netamente por un conjunto de propiedades fundamentales, entre ellas la necesidad de tioles libres, pero no es la presencia de grupos tioles esenciales en la proteina, lo que permite distinguir las. Más aún, la enzima de Seegmiller parece ser la mas sensible a los reactivos de tioles, si bien se debe exceptuar el mafarsén que inhibe en mayor grado a la enzima de Black . Ello excluye la protección de la enzima de Black por tioles no enzimáticos , propio de otras proteinas presente en la preparación como explicación de su mayor resistencia a los detectores de tioles pues en ese caso, todos los reactivos de tioles deberían ser menos eficaces sobre la enzima de Black, que sobre la de Seegmiller; la sensibilidad menor de la enzima de Racker debe ser interpretada con cautela pues las preparaciones empleadas son las mas impuras, a juzgar por su menor actividad específica.

Tabla 6 .- Acción del bromuro de cianobencilo, cloroacetofenona y iodoacetato de etilo sobre acetaldehido deshidrogenasa de levadura.

Enzimas disueltas en 0.5 ml de borato-succinato 0.01 M , pH 6.8 , se tratan según se indican durante 15 minutos. Se mide la actividad de 0.05 ml de mezcla (exp. con enzima de Black) o 0.2 ml (exp. con enzima de Seegmiller).

Enzimas	Cantidad (ng.)	Adiciones	Inhibición (%)
Black	0.26	Bromuro de cianobencilo 1.2 mM	98.0
Black	0.26	Cloroacetofenona 1.3 mM	93.0
Black	0.26	Iodoacetato de etilo 0.67 mM	100.0
Seegmiller	1.2	Bromuro de cianobencilo 1.2 mM	99.0
Seegmiller	1.2	Cloroacetofenona 1.3 mM	88.0
Seegmiller	1.2	Iodoacetato de etilo 0.67 mM	100.-

Si se compara la acción de los distintos reactivos de sulfhidrilos, el iodoacetato es el menos activo, lo que concuerda con la menor eficacia del mismo, como inhibidor de otras enzimas, ej.: la amino ácido oxidasa, ureasa, malato-deshidrogenasa (3), carboxidasa (16), etc. La poca acción del iodoacetato contrasta con el mayor efecto de los lacrimógenos, lo que puede explicarse por el efecto de la ionización del iodoacetato sobre la movilidad del halógeno lábil.

Se debe destacar que las tres enzimas estudiadas, así como la aldehído deshidrogenasa de Acetobacter suboxidans descrita por King y Chelding (23) dependen de grupos tioles para catalizar la oxidación de aldehído a ácido acético lo que sugiere que esos tioles intervienen en un mecanismo general común a las cuatro enzimas. En los capítulos siguientes se analiza con más detalle esta cuestión.

CONCLUSIONES

1°) La DPN (Black) y TPN (Seegmiller) aldehido deshidrogenasas de levadura y la aldehido deshidrogenasa de hígado (Racker) poseen grupos tioles esenciales para su acción como lo demuestra la inhibición por los reactivos respectivos.

2°) La TPN (Seegmiller) aldehido deshidrogenasa de levadura muestra la mayor sensibilidad para p-iodosobenzoato, etilmaleimida y iodoacetato, mientras que la DPN (Black) aldehido deshidrogenasa de levadura es la mas sensible a compuestos arsenicales trivalentes.

La TPN (Seegmiller) aldehido deshidrogenasa de levadura es extremadamente sensible a la acción del p-cloromercuribenzoato.

3°) La aldehido deshidrogenasa de hígado tiene la menor sensibilidad aparente para los reactivos de tioles.

4°) El iodoacetato es el detector de tioles menos efectivo sobre las enzimas estudiadas

BIBLIOGRAFIA

- 1 Rapkine ,L. Biochem. J. 32 1729 (1938)
- 2 Hopkins, F.G. y Morgan,E.J. Biochem.J. 32 611 (1938)
- 3 Barron, G. Adv. in enzymology 11 201 (1951)
- 4 Hellerman, L., Chinard,F.P, y Ramsdell,P.A. J.Am.Chem.Soc. 63 2551 (1941)
- 5 Barrón, E.S.G. y Singer,T.P. J.Biol.Chem. 157 221 (1945)
- 6 Lotespeich, W.D. y Peters,R.A. Biochem.J. 49 704 (1951)
- 7 Stoppani,A.O.M., Deferrari,J.O. y Gonzalez E.L. Anales Asoc. Quim.Argen.
41 49 (1953)
- 8 Hellerman, L., Chinard, F. y Deitz V.R. J.Biol.Chem. 147 443 (1943)
- 9 Slater,E.C. Biochem.J. 45 130 (1949)
- 10 Barrón, E.S.G. y Kalnitsky,G. Biochem.J. 41 346 (1947)
- 11 Theorell ,H. y Bonnichsen,R. Acta Chem.Scand. 5 1105 (1951)
- 12 Stoppani,A.O.M. y Aetis,A.S. Anales Asoc.Quim.Argen. 40 128 (1952)
- 13 Black ,S. Arch.Biochem.Biophys. 34 86 (1951)
- 14 Peters,R.A.,Sinclair,H.M. y Thompson,R.H.S. Biochem.J. 40 516 (1946)
- 15 Mackwarth,F.J. Biochem.J. 42 82 (1948)
- 16 Stoppani,A.O.M., Deferrari ,J.O. y González,B.L. Anales Asoc. Quim. Argen.
40 260 (1952)
- 17 Cori,G.T.,Slein,M.W.y Cori,C.F. J.Biol.Chem. 173 605 (1953)
- 18 Racker, E. y Krimsky, I. J.Biol.Chem. 198 731 (1952)
- 19 Benesch,R.,Benesch,R.E.,Gutcho,M. y Laufer,L. Science 123 981 (1956)
- 20 Dixon,M. y Lutwak Mann,C. Biochem. J. 31 1347 (1937)
- 21 Green ,E.D.,Nedham,D.M. y Dewan ,J.G. Biochem. J. 31 2327 (1937)
- 22 Racker,E. Methods in Enzymology Colowick y Kaplan Academic
Press N.Y. 1955 I 517
- 23 King,T.E., Chelding, V.H. J.Biol.Chem. 220 177 (1956)

Capítulo V

NECESIDAD DE TIQUES PARA LA ACTIVIDAD DE ALDEHIDO DESHIDROGENASAS

Los experimentos descriptos en el capítulo anterior, demuestran que ciertos tioles en la molécula de las aldehído deshidrogenasas, son esenciales para la actividad de las mismas. Ello concuerda con las observaciones de Black (1) referentes a la necesidad de un exceso de tioles libres en el medio (cisteína y glutatión) para que la DPN aldehído deshidrogenasa de levadura pueda actuar. Ello distinguiría la enzima de Black de las otras dos deshidrogenasas estudiadas, puesto que tanto la enzima de Seegmiller como la de Racker parecen actuar en medio sin tioles (2-3).

Según nuestras observaciones, la cisteína es necesaria para la actividad de la enzima de Black (de acuerdo con las observaciones de éste), pero además la cisteína exagera la acción de la enzima de Seegmiller. En cambio no modifica la acción de la enzima de hígado (Tabla 1). La activación discreta de la enzima de Seegmiller tal vez debida a la remoción de metales pesados debe ser distinguida del efecto observado sobre la enzima de Black, cuya actividad es escasa o nula en ausencia de activadores. Algunos experimentos se han efectuado para explicar la acción de la cisteína.

En primer lugar, el glutatión y el BAL tienen una acción similar a la de la cisteína, mientras que el tioglicolato fué ligeramente menos eficaz como activador (Tabla 2). En segundo lugar, el EDTA en concentración 0.06 m μ activó la enzima con igual eficacia que los compuestos tioles. Se debe hacer notar que el EDTA $1.5 \cdot 10^{-4}$ M tiene la misma acción que la cisteína y por otra parte que la adición de cisteína a una preparación totalmente activada con EDTA, no modifica la actividad; es decir que ambos activadores tendrían el mismo mecanismo de acción. La acción de la cisteína podría explicarse por remoción de metales pesados, y ello está de acuerdo con el efecto similar del EDTA, y el menor eficaz de la histidina (Tabla 2). La acción de la histidina es menos eficaz de lo que aparenta. Si la observación se prolonga, la activación por histidina disminuye no obstante que la enzima puede ser activada casi totalmente por la adición de exceso de cisteína. La preparación tratada por histidina,

Tabla 1.- Efecto de tioles y EDTA sobre las aldehido deshidrogenasas.

Enzimas disueltas en 3.0 ml de Tris 0.015 M , pH 8.0 (Exp. A y B) , glicil-glicina 0.05 M, pH 7.7 (Exp.C) o pirofosfato 0.1 M , pH 9.3 (Exp. D) con las adiciones que se indican . Acetaldehido, coenzimas y electrolitos según se indica en " Procedimientos generales" .

Ex- pe- ri- men- to	Enzima	Can- ti- dad (mg)	Adiciones	Activi- dad $(\frac{40340 \times 10^3}{\text{min.}})$	Activi- dad res- pecto al testigo con cistei- na 1.0mM (%)
A	Black	0.08	Cisteina 1.0 mM	540	100
A	Black	0.08	Glutación 1.0 mM	530	98
A	Black	0.08	EDTA 0.6 mM	630	116
A	Black	0.08	Tioglicolato 1.0 mM	480	89
A	Black	0.08	BAL 0.016 mM	620	115
A	Black	0.08	Ninguna	16	3
B	Seegmiller	0.44	Cisteina 1.0 mM	112	100
B	Seegmiller	0.44	Ninguna	52	46.5
C	Seegmiller	0.44	Cisteina 1.0 mM	57	100
C	Seegmiller	0.44	Ninguna	39	68.6
D	Racker	0.45	Cisteina 1.0 mM	57	100
D	Racker	0.45	Glutación 1.0 mM	70	123
D	Racker	0.45	EDTA 0.15 mM	68	120
D	Racker	0.45	Ninguna	66	114

Tabla 2.- Efecto de varios activadores sobre la DPH aldohido deshidrogenasa

(Black)

Enzima disuelta en Tris 0.015 M pH 7.6 (Exp A y B) o 0.6 (Exp C y D), en presencia de DPH 0.44 mM, GLK 0.05 M y acetaldehido $1.7 \cdot 10^{-4}$ M

Ex- pe- ri- men- to	Enzi- ma (mg.)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca $\left(\frac{\Delta D}{340} \times 10^3\right)$ min	Acti- vidad respecto al testi- go con dis- teina 1.0 ml (%)
A	0.024	Cisteina 1.0 mM	256	100
A	0.024	EDTA $1.5 \cdot 10^{-5}$ M	260	102
A	0.024	EDTA $2.0 \cdot 10^{-5}$ M	177	69
A	0.024	EDTA $0.6 \cdot 10^{-5}$ M	36	14
A	0.024	EDTA $0.2 \cdot 10^{-5}$ M	21	8
B	0.08	EDTA 0.6 mM	630	116
B	0.08	EDTA 0.06 mM	515	95
B	0.08	Cisteina $0.2 \cdot 10^{-2}$ mM	117	22
B	0.08	EDTA 0.6 mM + Cisteina $0.2 \cdot 10^{-2}$ mM	626	115
B	0.08	EDTA 0.06 mM + Cisteina $0.2 \cdot 10^{-2}$ mM	530	98
B	0.08	Ninguna	16	3
C	0.013	Cisteina 1.0 mM	222	100
C	0.013	Histidina 1.0 mM	100	45.0
C	0.013	Glicina 1.0 mM	3	1.3
C	0.013	Ninguna	0	-
D	0.024	Cisteina 1.0 mM	400	-
D	0.024	Ascorbato de Na 0.01 M	0	-

aumenta apenas su actividad por adición extra de histidina. La glicina en cambio no produce ninguna activación, si bien la enzima tratada con glicina puede ser activada por cisteína lo mismo que el testigo sin glicina (Fig.1) . La diferente acción de la cisteína, histidina y glicina concuerda con la capacidad decreciente de dichas sustancias para complejar metales pesados. (4,5)

Sin embargo existen hechos contrarios a la interpretación sugerida mas arriba. En primer lugar el efecto de la histidina decrece a través del tiempo y no recupera su actividad inicial por nueva adición de histidina. En segundo lugar llama la atención que siendo la enzima de Seegmiller tanto o mas sensible que la enzima de Black para los reactivos de tioles, no exija como la enzima de Black, tioles para su actividad.

El solo hecho de que el EDTA y la histidina, puedan reemplazar total o parcialmente a los tioles en la activación de la enzima de Black, no permite por otra parte postular un mecanismo de activación por la remoción de metales pesados. En efecto, el EDTA y la histidina activan la succinoxidasa (6), acción que no es atribuida a la remoción de metales pesados. Además el EDTA puede suprimir la acción inhibitoria del SH^- sobre la láctico deshidrogenasa efecto que no está relacionado con una unión a un metal pesado (7).

Con los datos experimentales presentados, no es posible aventurar una hipótesis explicativa del fenómeno.

Figura 1

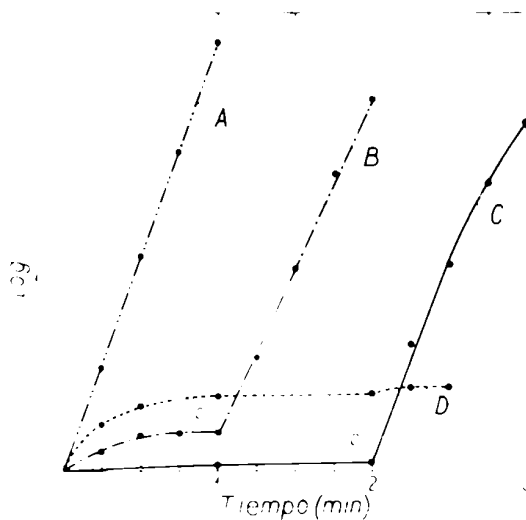
Activación de la enzima de Black por cisteína, histidina y glicina.

Tris 0.015 M, pH 8.9, GHI 0.05 M, DPH 0.001 M y acetaldehído 17×10^{-5} M. Cisteína, histidina y glicina según se indica. Volumen final, 3 ml.

Un testigo sin activador dió actividad nula.

Curva A: cisteína 10^{-3} M. Curva B: histidina 10^{-3} M. Curva C: glicina 10^{-3} M.

Curva D: histidina 10^{-3} M. En los puntos indicados (c) se agregó cisteína hasta concentración final 10^{-3} M, y en el indicado (h), histidina hasta concentración final 2×10^{-3} M.



BIBLIOGRAFIA

- 1 Black S. Arch. Biochem. Biophys. 34 86 (1951)
- 2 Racker E. J. Biol. Chem. 177 883 (1949)
- 3 Seegmiller J.E. J. Biol. Chem. 201 629 (1953)
- 4 Albert A. Biochem J. 47 531 (1950)
- 5 Albert A. Biochem J. 50 690 (1952)
- 6 Bonner W.D. jun., Biochem J. 56 274 (1954)
- 7 Terayama H. y Vestling C.S. Biochim et Biophys. Acta 20 587 (1956)

Capítulo VI

PROTECCION DE LOS TIEMPOS DE ALBENIDO DESMEDICIONADAS

En 1938 Hopkins y col. (1) observaron que el succinato disminuye la inhibición de la succinodeshidrogenasa por reactivos de tioles y poco después Rapkine y Rapkine (2) observaron protección de tioles de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa por difosforiridina-adenina dinucleótido (DPN). Estas observaciones se han interpretado asumiendo que el tiol está vinculado al área activa de la enzima que activa el sustrato o la coenzima respectivamente, y que por lo tanto tiene un papel esencial en dichos procesos de activación. Después de las observaciones iniciales citadas se han comprobado numerosos casos de protección enzimática por sustrato o coenzima frente a reactivos de sulfhidrilos. Así hay protección de la carboxilasa (3) por piruvato, de la alcohol deshidrogenasa (4) por etanol y DPN, de la aldehído flavina oxidasa (5) por acetaldehído, de la butiril-CoA deshidrogenasa (6) por flavina dinucleótido y butiril-CoA etc.

Por nuestra parte hemos realizado un estudio sistemático de los efectos que tienen el acetaldehído, la coenzima y algunos cationes (indispensables para la actividad de las dos aldehído deshidrogenasas de levadura) sobre la acción inhibitoria de los reactivos de tioles. En primer lugar se considera la protección por las coenzimas que es la más evidente; luego la acción de los iones y por último la del acetaldehído.

RESULTADOS

PROTECCION POR LA COENZIMA. Las aldehído deshidrogenasas de levadura e hígado requieren DPN y TPN para su actividad. La enzima de Black (7) reduce ambas coenzimas mientras que las de Seegmiller (8) y Racker (9) son específicas para el TPN y DPN respectivamente.

a) Experimentos con mafarsen. La acción inhibitoria del mafarse (Tabla 1) sobre las tres enzimas disminuye, en general, en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 1).

Con la enzima de Black el DPN oxidado y reducido tiene un efecto protector similar, bastante mayor que el TPN. En cambio la acción del ácido adenílico a pesar de su concentración netamente mayor, fué apenas significativa.

Tabla 1.- Acción de piridina-adenina dinucleótidos y ácido adenílico sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por mafarsén.

Enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0 se trata según se indica. Se determina la actividad en 0.2 ml. de solución excepto en el exp. C (0,05 ml)

Ex- pe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Dura- ción de la incuba- ción (min)	Adiciones	Activi- dad on- zimáti- ca $\frac{D_{240} \cdot 10^3}{\text{min}}$	Inhi- bición de la enzima (%)	Protoc- ción de la enzi- ma (%)
<u>Enzima de Black</u>						
A	0.87	0.5	Ninguna	181	-	-
A	0.87	0.5	<u>Mafarsén</u> 0.064 ml	50	72.4	-
A	0.87	0.5	DPN 4.0 ml	211	-	-
A	0.87	0.5	DPN 4.0 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	131	37.8	47.8
A	0.87	0.5	DPNH ₂ 4.0 ml	105	-	-
A	0.87	0.5	DPNH ₂ 4.0 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	65	38.1	47.4
A	0.87	0.5	DPN 1.08 ml	223	-	-
A	0.87	0.5	DPN 1.08 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	136	39.0	46.3
A	0.87	0.5	DPNH ₂ 1.08 ml	172	-	-
A	0.87	0.5	DPNH ₂ 1.08 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	121	29.7	59.0
B	1.3	0.5	Ninguna	87	-	-
B	1.3	0.5	<u>Mafarsén</u> 0.064 ml	23	73.5	-
B	1.3	0.5	DPN 0.4 ml	98	-	-
B	1.3	0.5	DPN 0.4 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	41	58.0	21.1
B	1.3	0.5	AMP 8.9 ml	83	-	-
B	1.3	0.5	AMP 8.9 ml + <u>mafarsén</u> 0.064 ml	25	67.7	5.2
C	0.62	0.5	Ninguna	330	-	-
C	0.62	0.5	<u>Mafarsén</u> 0.032 ml	9	97.3	-
C	0.62	0.5	TPN 1.5 ml	270	-	-
C	0.62	0.5	TPN 1.5 ml + <u>mafarsén</u> 0.032 ml	40	85.2	12.4
<u>Enzima de Secnmiller</u>						
D	0.35	0.5	Ninguna	148	-	-
D	0.35	0.5	<u>Mafarsén</u> 0.032 ml	30	79.8	-
D	0.35	0.5	TPN 1.5 ml	196	-	-
D	0.35	0.5	TPN 1.5 ml + <u>mafarsén</u> 0.032	148	24.5	69.5
<u>Enzima de Racker</u>						
E	1.8	3.0	Ninguna	67	-	-
E	1.8	3.0	<u>Mafarsén</u> 0.16 ml	19	72.0	-
E	1.8	3.0	DPN 2.7 ml	82	-	-
E	1.8	3.0	DPN 2.7 ml + <u>mafarsén</u> 0.16 ml	53	35.2	51.0
E	1.8	3.0	TPN 1.5 ml	60	-	-
E	1.8	3.0	TPN 1.5 ml + <u>mafarsén</u> 0.16 ml	21	65.0	9.7

La enzima de Racker fué protegida por el DPN. En cambio el TPN, en concentración próxima al DPN tuvo una acción protectora netamente menor.

b) Experimentos con etilmaleimida. La acción de la etilmaleimida sobre las aldehido deshidrogenasas disminuye en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 2).

Tanto el DPN oxidado y reducido como el TPN protegen a la enzima de Black. La acción protectora del segundo es algo mayor que la de los primeros. El TPN es un protector efectivo y específico de la enzima de Seegmiller, ya que el DPN no tiene ninguna acción. Por el contrario, con la enzima de Racker el efecto es inverso pues el DPN es protector aunque débil, mientras que la acción del TPN es insignificante.

c) Experimentos con o-iodosobenzoato. La acción del o-iodosobenzoato sobre las aldehido deshidrogenasas de levadura disminuye en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 3). La enzima de Black es protegida por DPN y TPN. La acción del primero se nota aún en la concentración 0.08 mM. En cambio el ácido adenílico 5.0 mM carece de acción. Por el contrario, la enzima de Seegmiller es protegida por el TPN pero no por el DPN.

Frente al o-iodosobenzoato la enzima de Racker tiene una conducta singular que merece descripción en detalle (Tabla 4). La incubación de la enzima con o-iodosobenzoato en presencia de DPN determina un aumento de la actividad enzimática sobre la actividad del testigo tratado con DPN solamente. Efecto análogo aunque menos intenso se obtiene con DPNH_2 . En cambio, el TPN o el ácido adenílico tienen una acción escasa o nula sobre la inhibición por o-iodosobenzoato.

d) Experimentos con p-cloromercuribenzoato. ^{La acción inhibidora} sobre las enzimas de Seegmiller y Racker disminuye en presencia de sus respectivas coenzimas específicas (Tabla 5). El TPN 1.5 mM disminuye en un 87 % el efecto inhibitor de este reactivo sobre la enzima de Seegmiller. En cambio el efecto protector del DPN 2.7 mM apenas llega al 7.5%. En cuanto a la enzima de Racker el DPN es un protector específico

La enzima de Racker fué protegida por el DPN. En cambio el TPN, en concentración próxima al DPN tuvo una acción protectora netamente menor.

b) Experimentos con etilmaleimida. La acción de la etilmaleimida sobre las aldehido deshidrogenasas disminuye en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 2).

Tanto el DPN oxidado y reducido como el TPN protegen a la enzima de Black. La acción protectora del segundo es algo mayor que la de los primeros. El TPN es un protector efectivo y específico de la enzima de Seegmiller, ya que el DPN no tiene ninguna acción. Por el contrario, con la enzima de Racker el efecto es inverso pues el DPN es protector aunque débil, mientras que la acción del TPN es insignificante.

c) Experimentos con o-iodosobenzoato. La acción del o-iodosobenzoato sobre las aldehido deshidrogenasas de levadura disminuye en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 3). La enzima de Black es protegida por DPN y TPN. La acción del primero se nota aún en la concentración 0.08 mM. En cambio el ácido adenílico 5.0 mM carece de acción. Por el contrario, la enzima de Seegmiller es protegida por el TPN pero no por el DPN.

Frente al o-iodosobenzoato la enzima de Racker tiene una conducta singular que merece descripción en detalle (Tabla 4). La incubación de la enzima con o-iodosobenzoato en presencia de DPN determina un aumento de la actividad enzimática sobre la actividad del testigo tratado con DPN solamente. Efecto análogo aunque menos intenso se obtiene con $DPNH_2$. En cambio, el TPN o el ácido adenílico tienen una acción escasa o nula sobre la inhibición por o-iodosobenzoato.

d) Experimentos con p-cloromercuribenzoato. ^{La acción inhibidora} sobre las enzimas de Seegmiller y Racker disminuye en presencia de sus respectivas coenzimas específicas (Tabla 5). El TPN 1.5 mM disminuye en un 87 % el efecto inhibitorio de este reactivo sobre la enzima de Seegmiller. En cambio el efecto protector del DPN 2.7 mM apenas llega al 7.5%. En cuanto a la enzima de Racker el DPN es un protector específico

Tabla 2.- Acción de piridina-adenina dinucleótidos sobre la inhibición de alcohol deshidrogenasas por etilmaleimida.

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M pH 8.0, se tratan según se indica. Se determina la actividad en 0.1 (exp.A) o 0.2 ml. (exp.B, C y D).

Experi- mento	Cantidad de enzima (mg)	Duración de la incubación (min)	Adiciones	Actividad de la enzima (D340.10 ³) ... min ...	Inhibición de la enzima (%)	Protección de la enzima (%)
<u>Enzima de Black</u>						
A	0.4	1.0	Ninguna	149	-	-
A	0.4	1.0	Etilmaleimida 0.048 mM	32	78.6	-
A	0.4	1.0	DPN 1.35 ml	179	-	-
A	0.4	1.0	DPN 1.35 ml + etilmaleimida 0.048 mM	100	44.3	43.6
A	0.4	1.0	DPNH 1.35 ml	108	-	-
A	0.4	1.0	DPNH 1.35 ml + etilmaleimida 0.048 mM	57	47.3	39.8
B	0.6	3.0	Ninguna	320	-	-
B	0.6	3.0	Etilmaleimida 0.024 mM	141	56.0	-
B	0.6	3.0	TPN 1.5 ml	320	-	-
B	0.6	3.0	TPN 1.5 ml + etilmaleimida 0.024 mM	252	21.3	62.0
<u>Enzima de Seegmiller</u>						
C	1.6	1.0	Ninguna	175	-	-
C	1.6	1.0	Etilmaleimida 0.02 mM	1.6	99.1	-
C	1.6	1.0	TPN 1.5 ml	231	-	-
C	1.6	1.0	TPN 1.5 ml + etilmaleimida 0.02 mM	180	22.3	77.5
C	1.6	1.0	TPN 0.75 ml	216	-	-
C	1.6	1.0	TPN 0.75 ml + etilmaleimida 0.02 mM	149	31.0	69.0
C	1.6	1.0	DPN 2.7 ml	160	-	-
C	1.6	1.0	DPN 2.7 ml + etil maleimida 0.02 mM	3	98.1	1.0
<u>Enzima de Racker</u>						
D	1.8	3.0	Ninguna	81	-	-
D	1.8	3.0	Etilmaleimida 0.18 mM	25	69.0	-
D	1.8	3.0	DPN 2.7 ml	93	-	-
D	1.8	3.0	DPN 2.7 ml + etilmaleimida 0.18 mM	38	59.2	14.1
D	1.8	3.0	TPN 1.5 ml	72	-	-
D	1.8	3.0	TPN 1.5 ml + etilmaleimida 0.18 mM	24	66.5	3.6

Tabla 3.- Acción de piridina-adenina dinucleotidos y ácido adenílico sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas de levadura por o - iodosobenzato.-

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M pH 8.0, se trata durante 30 segundos según se indica. Se determina la actividad en 0.5 ml. (exp.A), 0.1 ml. (exp.B) o 0.2 ml. (exp. C y D).

Ex- pe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Activi- dad enzi- matica $\left(\frac{\Delta D_{340} \cdot 10^3}{\text{min.}}\right)$	Inhibi- ción de la enzi- ma (%)	Protoc- ción de la enzi- ma (%)
<u>Enzima de Black</u>					
A	3.5	Ninguna	105	-	-
A	3.5	o-Iodosobenzato 0.06 ml	26	75.2	-
A	3.5	DPN 9.0 ml	120	-	-
A	3.5	DPN 9.0 ml + o-iodosobenzato 0.06 ml	77	35.8	52.3
A	3.5	DPN 0.8 ml	100	-	-
A	3.5	DPN 0.8 ml + o-iodosobenzato 0.06 ml	73	27.0	63.8
A	3.5	DPN 0.08 ml	95	-	-
A	3.5	DPN 0.08 ml + o-iodosobenzato 0.06 ml	35	63.2	16.0
B	1.3	Ninguna	71	-	-
B	1.3	o-Iodosobenzato 0.02 ml	32	55.0	-
B	1.3	AMP 5.0 ml	72	-	-
B	1.3	AMP 5.0 ml + o-iodosobenzato 0.02 ml	33	54.3	1.3
C	0.6	Ninguna	340	-	-
C	0.6	o-Iodosobenzato 0.02 ml	58	83.0	-
C	0.6	TPN 1.5 ml	320	-	-
C	0.6	TPN 1.5 ml + o-iodosobenzato 0.02 ml	205	36.0	56.7
<u>Enzima de Seegmiller</u>					
D	0.8	Ninguna	187	-	-
D	0.8	o-Iodosobenzato 0.055 ml	2	98.9	-
D	0.8	TPN 0.68 ml	185	-	-
D	0.8	TPN 0.68 ml + o-iodosobenzato 0.055 ml	73	60.5	38.8
D	0.8	DPN 2.5 ml	182	-	-
D	0.8	DPN 2.5 ml + o-iodosobenzato 0.055 ml	2	98.9	0.0

Tabla 4.- Acción de piridina-adenina dinucleótidos y ácido adonílico sobre la inhibición del aldehído deshidrogenasa de hígado por o-iodosobenzoato.

4.3 mg. de enzima disuelta en 0.5 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0, se trata según se indica durante 1 minuto. Se determina la actividad de 0.2 ml. de solución.

Expe- ri- men- to	Adiciones	Voloci- dad i- nicial ($\frac{\Delta D_{240} \cdot 10^3}{\text{min.}}$)	Inhibi- ción de la enzi- ma (%)	Protec- ción de la en- zima (%)
A	Ninguna	64.3	-	-
A	o-Iodosobenzoato 0.2 ml	18.0	72.0	-
A	DPN 2.7 ml	65.8	-	-
A	DPN 2.7 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	109.0	-66.1	192.0
A	DPN 1.8 ml	64.9	-	-
A	DPN 1.8 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	103.0	-58.6	181.0
A	DPN 0.27 ml	64.9	-	-
A	DPN 0.27 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	75.5	-16.7	123.0
A	TPN 1.5 ml	54.7	-	-
A	TPN 1.5 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	22.4	59.3	17.6
A	TPN 0.3 ml	64.0	-	-
A	TPN 0.3 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	20.4	68.1	5.4
A	AMP 2.9 ml	69.0	-	-
A	AMP 2.9 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	16.0	76.8	-6.7
B	Ninguna	65.0	-	-
B	o-Iodosobenzoato 0.2 ml	33.0	49.0	-
B	DPN 2.7 ml	87.0	-	-
B	DPN 2.7 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	225.0	-15.9	425.0
B	DPNH ₂ 2.7 ml	76.0	-	-
B	DPNH ₂ 2.7 ml + o-iodosobenzoato 0.2 ml	120.0	-58.0	218.0

Tabla 5.- Acción de piridina-adenina dinucleótido sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por p-cloromercuribenzoato.

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0, se tratan según se indica. Se mide la actividad en 0.2 ml. de solución.

Canti- dad de enzi- ma (mg)	Dura- ción de la incu- bación (min.)	Adiciones	Activi- dad enzí- ma $\left(\frac{\Delta D_{340} \cdot 10^3}{\text{min.}}\right)$	Inhi- bición de la enzi- ma (%)	Protec- ción de la en- zima (%)
<u>Enzima de Secgiller</u>					
0.6	0.5	Ninguna	202	-	-
0.6	0.5	p-Cloromercuribenzoato 8.0 μ M	78	61.3	-
0.6	0.5	TPN 1.5 ml	266	-	-
0.6	0.5	TPN 1.5 ml + p-cloromercuribenzoato 8.0 μ M	244	8.0	87.0
0.6	0.5	TPN 0.75 ml	272	-	-
0.6	0.5	TPN 0.75 ml + p-cloromercuribenzoato 8.0 μ M	233	14.4	76.4
0.6	0.5	DPN 2.7 ml	225	-	-
0.6	0.5	DPN 2.7 ml + p-cloromercuribenzoato 8.0 μ M	104	53.8	7.5
<u>Enzima de Racker</u>					
1.8	3.0	Ninguna	64.0	-	-
1.8	3.0	p-Cloromercuribenzoato 0.60 ml	8.5	84.8	-
1.8	3.0	DPN 2.7 ml	88.5	-	-
1.8	3.0	DPN 2.7 ml + p-cloromercuribenzoato 0.60 ml	31.5	64.2	24.3
1.8	3.0	TPN 1.5 ml	75.0	-	-
1.8	3.0	TPN 1.5 ml + p-cloromercuribenzoato 0.60 ml	11.0	85.3	-0.6

ya que la acción del TPN sobre la inhibición por el mercurial es nula.

e) Experimentos con iodoacetato. La acción inhibitoria del iodoacetato sobre las aldehido deshidrogenasas de levadura disminuye en presencia de las coenzimas específicas (Tabla 6). La protección de la enzima de Black con DPN es proporcional a la concentración de la coenzima. El ácido adenílico, en concentración superior carece de acción. Con la enzima de Seegmiller, la acción protectora del TPN es específica ya que no se observa con DPN. La escasa inhibición de la enzima de Racker por el iodoacetato hace inconveniente el uso de este reactivo para el estudio de la protección de la enzima pues el error experimental incide seriamente sobre la significación de los resultados.

PROTECCION POR CATIONES. Las aldehido deshidrogenasas de levadura requieren cationes para su actividad. La de Black (7) actúa con K^+ y Rb^+ y el NH_4^+ también la activa aunque en menor grado. La de Seegmiller (8) es activada por cationes bivalentes (Ca^{++} , Mg^{++} , etc.) y en menor grado por monovalentes (K^+ , Na^+). En los experimentos de protección que se describen a continuación los cationes empleados se agregan en forma de cloruros.

a) Experimentos con la enzima de Black. Los cationes monovalentes K^+ y Rb^+ disminuyen la inhibición de la enzima de Black por el mafarsen (Tabla 7). El ion potasio es el más efectivo y su acción es específica, ya que no se observa con Na^+ , NH_4^+ o Li^+ . La acción protectora del ion potasio se ha estudiado cuantitativamente (Tabla 8) siendo significativa aún con K^+ 0.006 M.

El ion potasio también disminuye la acción del ρ -iodosobenzato sobre la enzima de Black. En cambio el Na^+ , Rb^+ y Li^+ no solo no son protectores sino que exageran la acción del ρ -iodosobenzato, especialmente el Na^+ y Li^+ (Tabla 9). Si se estudia cuantitativamente la acción protectora de los iones potasio la máxima protección se consigue con concentración 0.06 M (Tabla 10); con concentración 0.0012 M aun puede observarse una protección significativa.

Resultados similares se obtienen con el iodoacetato como inhibidor. Los iones potasio disminuyen la inhibición mientras que el Na^+ la exagera (Tabla 11). El efecto del potasio es proporcional a su concentración.

Tabla 6.- Acción de piridina-adenina dinucleótidos y ácido adenílico sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas de levadura por iodoacetato.

Enzimas disueltas en 0.5 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0, se tratan durante 5 minutos según se indica. Se mide la actividad en 0.05 ml. (exp. con enzima de Black) o 0.2 ml (exp. con enzima de Seegmiller).

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca (10^3) min	Inhibi- ción de la enzima (%)	Protoc- ción de la onzi- ma (%)
<u>Enzima de Black</u>					
A	--	Ninguna	71	--	--
A	--	Iodoacetato 0.01 M	44	38.0	--
A	--	DPN 2.5 ml	68	--	--
A	--	DPN 2.5 ml + iodoacetato 0.01 M	66	3.3	91.2
A	--	DPN 0.5 ml	30	--	--
A	--	DPN 0.5 ml + iodoacetato 0.01 M	66	17.2	54.5
A	--	DPN 0.25 ml	77	--	--
A	--	DPN 0.25 ml + iodoacetato 0.01 M	57	25.7	32.4
B	1.6	Ninguna	107	--	--
B	1.6	Iodoacetato 0.01 M	93	13.5	--
B	1.6	AMP 5.8 ml	121	--	--
B	1.6	AMP 5.8 ml + iodoacetato 0.01 M	105	13.2	2.2
<u>Enzima de Seegmiller</u>					
C	0.7	Ninguna	160	--	--
C	0.7	Iodoacetato 0.004 M	76	52.5	--
C	0.7	TPN 0.75 ml	168	--	--
C	0.7	TPN 0.75 ml + iodoacetato 0.004 M	132	21.4	59.0
C	0.7	DPN 2.7 ml	162	--	--
C	0.7	DPN 2.7 ml + iodoacetato 0.004 M	74	54.4	-3.6

Tabla 7.- Acción de cationes sobre la inhibición de la DFM aldehído deshidrogenasa de levadura (Black) por mafarsen.-

La enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0 se trata con las adiciones que se indican durante 30 segundos. Se determina la actividad en 0.05 ml (exp. A y B) o 0.1 ml (exp. C y D) de solución.

Expe- ri- men - to	Contri- bución de enzima (ug)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca ($\frac{ADP}{O \cdot 10^2}$) min	Inhibi- ción de la en- zima (%)	Protec- ción de la en- zima (%)
A	1.3	Ninguna	87	--	--
A	1.3	<u>mafarsen</u> 0.06% mM	23	73.5	--
A	1.3	ClK 0.12 M	91	--	--
A	1.3	ClK 0.12 M + <u>mafarsen</u> 0.06% mM	64	29.7	59.7
A	1.3	ClLa 0.12 M	89	--	--
A	1.3	ClLa 0.12 M + <u>mafarsen</u> 0.06% mM	14	84.3	57.7
B	2.0	Ninguna	150	--	--
B	2.0	<u>mafarsen</u> 0.04 mM	36	76.0	--
B	2.0	ClRb 0.10 M	118	--	--
B	2.0	ClRb 0.10 M + <u>mafarsen</u> 0.06% mM	56	58.5	30.2
C	2.5	Ninguna	124	--	--
C	2.5	<u>mafarsen</u> 0.032 mM	26	78.0	--
C	2.5	CLM ₄ 0.10 M	115	--	--
C	2.5	CLM ₄ 0.10 M + <u>mafarsen</u> 0.032 mM	26	77.4	2.2
D	2.5	Ninguna	41	--	--
D	2.5	<u>mafarsen</u> 0.06% mM	14	65.8	--
D	2.5	CLLi 0.27 M	40	--	--
D	2.5	CLLi 0.27 M + <u>mafarsen</u> 0.06% mM	14	65.0	1.2

Tabla 8.- Influencia de la concentración de iones potasio sobre la inhibición de la DFL aldolido deshidrogenasa (Black) por mafarson.-

1.3 mg de enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0 se trata con las adiciones que se indican durante 30 segundos. Se determina la actividad en 0.05 ml de solución.

Adiciones	Actividad enzimática ($40340 \cdot 10^3$) min	Inhibición de la enzima (%)	Protección de la enzima (%)
Ninguna	87	--	--
<u>Mafarson</u> 0.064 mM	23	73.5	--
ClK 0.12 M	91	--	--
ClK 0.12 M + <u>mafarsen</u> 0.064 mM	64	29.7	59.7
ClK 0.06 M	92	--	--
ClK 0.06 + <u>mafarsen</u> 0.064 mM	58	37.0	59.8
ClK 0.012 M	93	--	--
ClK 0.012 M + <u>mafarsen</u> 0.064 mM	46	50.5	31.7
ClK 0.006 M	86	--	--
ClK 0.006 M + <u>mafarsen</u> 0.064 mM	38	55.8	24.1
ClK 0.0012 M	87	--	--
ClK 0.0012 M + <u>mafarsen</u> 0.064 mM	22	74.7	-1.1

Tabla 9.- Acción de cationes monovalentes sobre la inhibición de la DHI al-
dehído deshidrogenasa de levadura (Black) por o-iodosobenzoato.-

La enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0, se trata con las adicio-
nes que se indican durante 30 segundos. Se determina la actividad en 0.1 ml
(exp. A y C) o 0.05 ml (exp. B) de solución.

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Activi- dad en- zimática ($\frac{10^3 \text{ D340}}{\text{min.}}$)	Inhibi- ción de la enzi- ma (%)	Protoc- ción de la enzi- ma (%)
A	1.3	Ninguna	71	--	--
A	1.3	o-Iodosobenzoato 0.02 M	32	55.0	--
A	1.3	ClK 0.4 M	95	--	--
A	1.3	ClK 0.4 M + o-iodosobenzoato 0.02 ml	68	28.4	48.3
A	1.3	ClK 0.12 M	99	--	--
A	1.3	ClK 0.12 M + o-iodosobenzoato 0.02 ml	66	31.3	42.7
A	1.3	ClNa 0.2 M	58	--	--
A	1.3	ClNa 0.2 M + o-iodosobenzoato 0.02 ml	16	77.4	-31.6
B	0.86	Ninguna	60	--	--
B	0.86	o-Iodosobenzoato 0.02 ml	25	58.3	--
B	0.86	ClRb 0.12 M	63	--	--
B	0.86	ClRb 0.12 M + o-iodosobenzoato 0.12 ml	22	65.0	-11.5
C	2.4	Ninguna	48	--	--
C	2.4	o-iodosobenzoato 0.02 ml	15	68.7	--
C	2.4	CLi 0.27 M	50	--	--
C	2.4	CLi 0.27 M + o-iodosobenzoato 0.02 ml	4	92.0	-34.0

Tabla 10.- Influencia de las concentraciones de iones potasio sobre la inhibición de la DPN - aldehído deshidrogenasa (Black) por el o-iodosobenzato.-

La enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0 se trata con las adiciones que se indican durante 30 segundos. Se determina la actividad en 0.1 ml de solución.-

Ex- peri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca ($\frac{AD340 \cdot 10^3}{\text{min.}}$)	Inhi- bición de la enzima (%)	Protec- ción de la enzi- ma (%)
A	0.8	Ninguna	64	--	--
A	0.8	o-iodosobenzato 0.06 ml	10	34.5	--
A	0.8	ClK 0.4 M	56	--	--
A	0.8	ClK 0.4 M + o-iodosobenzato 0.06 ml	19	66.1	21.8
A	0.8	ClK 0.12 M	56	--	--
A	0.8	ClK 0.12 M + o-iodosobenzato 0.06 ml	22	60.9	26.9
A	0.8	ClK 0.06 M	46	--	--
A	0.8	ClK 0.06 M + o-iodosobenzato 0.06 ml	19	58.7	30.6
A	0.8	ClK 0.012 M	43	--	--
A	0.8	ClK 0.012 M + o-iodosobenzato 0.06 ml	10	76.8	9.1
B	1.3	Ninguna	71	--	--
B	1.3	o-Iodosobenzato 0.02 ml	32	55.0	--
B	1.3	ClK 0.12 M	99	--	--
B	1.3	ClK 0.12 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	66	31.3	42.7
B	1.3	ClK 0.06 M	88	--	--
B	1.3	ClK 0.06 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	75	14.8	73.2
B	1.3	ClK 0.012 M	81	--	--
B	1.3	ClK 0.012 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	62	23.5	57.2
B	1.3	ClK 0.006 M	79	--	--
B	1.3	ClK 0.006 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	53	32.8	40.3
B	1.3	ClK 0.0012 M	78	--	--
B	1.3	ClK 0.0012 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	44	43.6	20.8
B	1.3	ClK 0.0006 M	93	--	--
B	1.3	ClK 0.0006 M + o-iodosobenzato 0.02 ml	37	60.2	-9.5

La acción de los cationes monovalentes sobre la inhibición de la enzima de Black por etilmaleimida difiere notablemente de la que se observa con otros reactivos de tioles (Tabla 12). El catión rubidio es el que ejerce la acción protectora más evidente mientras que el potasio tiene una acción considerablemente menor que no es específica, pues se obtienen protecciones similares con Li^+ y NH_4^+ .

La acción protectora de los iones potasio frente a los reactivos de tioles, es extensiva a la inactivación aparentemente espontánea que sufre la enzima congelada. La estabilidad de la enzima aumenta notablemente en presencia de CLK 0.12 M cuyo efecto es superior al de la cisteína 0.002 M, próxima a la que Black aconseja para conservar la actividad de la enzima. Los efectos de la cisteína y el cloruro de potasio no son aditivos (Tabla 13).

b) Experimentos con las enzimas de Racker y Seegmiller. El ión potasio tuvo un efecto muy poco significativo cuando se intentó prevenir la inhibición de enzima de Racker por mafarsen (Tabla 14). Los iones potasio, magnesio y calcio tampoco afectaron significativamente la inhibición de la enzima de Seegmiller por el *p*-iodosobenzoato, etilmaleimida, iodoacetato, mafarsen y *p*-cloromercuribenzoato (Tabla 15).

PROTECCION POR EL ACETALDEHIDO

a) Experimentos con mafarsen. La acción del acetaldehído sobre la inhibición de las acetaldehído deshidrogenasas por mafarsen depende de la enzima (Tabla 16), pues el acetaldehído protege en forma neta la enzima de Racker, es un protector débil de la enzima de Black, mientras que exagera la acción del mafarsen sobre la enzima de Seegmiller (Tabla 16).

b) Experimentos con etilmaleimida y o-iodosobenzoato. El acetaldehído es un protector débil de las enzimas de Black y Racker frente a la etilmaleimida, siendo nula su acción con la enzima de Seegmiller (Tabla 17). Resultados similares se obtuvieron con el *p*-iodosobenzoato (Tabla 18).

c) Experimentos con p-cloromercuribenzoato. La acción del *p*-cloromercuriben-

Tabla 11.- Prevención por iones potasio de la inhibición de la DPN acetaldohido deshidrogenasa (Black) por iodoacetato.-

0.5 ml de enzima disuelta en 0.015 M Tris, pH 8.0 se trata con las adiciones que se indican durante 5.5 minutos. Se determina la actividad de 0.05 ml de mezcla.

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (ng)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca (<u>40340.10³</u>) min.....	Inchibi- ción de la enzima (%)	Protec- ción de la enzi- ma (%)
A	--	Ninguna	224	--	--
A	--	Iodoacetato 0.01 M	150	33.0	--
A	--	ClK 0.4 M	211	--	--
A	--	ClK 0.4 M + iodoacetato 0.01 M	200	5.2	64.2
A	--	ClK 0.04 M	240	--	--
A	--	ClK 0.04 M + iodoacetato 0.01 M	202	16.0	51.5
A	--	ClK 0.02 M	210	--	--
A	--	ClK 0.02 M + iodoacetato 0.01 M	175	16.9	48.7
A	--	ClK 0.004 M	198	--	--
A	--	ClK 0.004 M + iodoacetato 0.01 M	125	36.7	-11.2
A	--	ClNa 0.34 M	187	--	--
A	--	ClNa 0.34 M + iodoacetato 0.01 M	100	46.6	-41.3
B	0.86	Ninguna	68	--	--
B	0.86	Iodoacetato 0.01 M	58	14.7	--
B	0.86	ClK 0.2 M	72	--	--
B	0.86	ClK 0.2 M + iodoacetato 0.01 M	65	10.2	33.0
B	0.86	ClK 0.04 M	70	--	--
B	0.86	ClK 0.04 M + iodoacetato 0.01 M	61	12.9	12.3

Tabla 12.- Acción de varios cationes monovalentes sobre la inhibición de la DPN alcohol deshidrogenasa (Black) por etilmaleimida.

La enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 7.9 se trata con las adiciones que se indican, durante 1 minuto. Se determina la actividad sobre 0.05 ml (A) o 0.1 m. de mezcla (B).

Ex- pe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Activi- dad de la on- zima (Δ D ₃₄₀ .10 ³) min.	Inhi- bición de la enzima (%)	Protec- ción de la enzi- ma (%)
A	1.9	Ninguna	120	--	--
A	1.9	Etilmaleimida 0.024 mM	52	56.7	--
A	1.9	ClRb 0.4 M	33	--	--
A	1.9	ClRb 0.4 M + etilmaleimida 0.024 mM	79	4.7	91.1
A	1.9	Cl K 0.4 M	102	--	--
A	1.9	Cl K 0.4 M + etilmaleimida 0.024 mM	58	43.1	24.0
B	2.4	Ninguna	40	--	--
B	2.4	Etilmaleimida 0.024 mM	27	32.5	--
B	2.4	ClLi 0.27 M	37	--	--
B	2.4	ClLi 0.27 M + etilmaleimida 0.024 mM	28	24.4	24.8
B	2.5	Ninguna	116	--	--
B	2.5	Etilmaleimida 0.024 mM	72	38.0	--
B	2.5	ClLi 0.27 M	92	--	--
B	2.5	ClLi 0.27 M + etilmaleimida 0.024 mM	65	29.3	22.8
B	2.5	ClNH ₄ 0.1 M	96	--	--
B	2.5	ClNH ₄ 0.1 M + etilmaleimida 0.024 mM	63	34.3	9.7
B	2.5	Ninguna	94	--	--
B	2.5	Etilmaleimida 0.024 mM	56	40.4	--
B	2.5	ClNH ₄ 0.1 M	102	--	--
B	2.5	ClNH ₄ 0.1 M + etilmaleimida 0.024 mM	69	32.4	19.8

Tabla 13.- Acción preservadora del clorhidrato de cisteína y del CLK on la descomposición espontánea de DPL aldehído deshidrogenasa. (Black)

0.17 mg de enzima cuodan 2 días a -16° con las adiciones que se indican.

Se mida su actividad antes de congelar y al cabo de 48 horas. Volúmen final

0.25 ml.

Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca ini- cial (10^3) min....	Activi- dad en- zimáti- ca a las 48 horas (10^3) min....	Inacti- vación espón- tánea (%)	Protec- ción de la enzi- ma (%)
Ninguna	132	41	68	- -
CLK 0.12 M	118	64	46	32
Clorhidrato de cisteína 0.002 M	124	56	55	19
Clorhidrato de cisteína 0.002 M	124	56	55	19
Clorhidrato de cisteína 0.002 M + Cl K 0.12 M	140	30	43	37

Tabla 14.- Acción de iones potasio sobre la inhibición de la acetaldéhidó deshidrogenasa de levado por mofarsen.

1.0 mg de enzima disuelta en 0.5 ml de 0.015 N Tris, pH 8.0, se trata con las adiciones que se indican durante 3 minutos. Se determina la actividad de 0.2 ml de mezcla.

Adiciones	Actividad enzimática (Δ D ₂₄₀ .103) min.	Inhibición de la enzima (%)	Protección de la enzima (%)
Ninguna	67	--	--
<u>Mofarsen</u> 0.16 ml	19	72.0	--
ClK 0.3 M	51	--	--
ClK 0.3 + Mofarsen 0.16 ml	19	62.9	12.6

Tabla 15.- Acción de varios cationes sobre la inhibición de la enzima de Seegermiller por reactivos de tioles.

0.5 ml de enzima disuelta en Tris 0.015 M, pH 8.0. Se determina la actividad en 0.2 ml de mezcla.

Experi- mon- to	Canti- dad de enzima (mg)	Dura- ción de la incu- ción (min)	Adiciones	Activi- dad enzi- matica ($\frac{OD_{340}}{C \cdot 10^3}$) (%)	Inhibi- ción de la enzi- ma (%)	Protec- ción de la enzi- ma (%)
A	0.8	0.5	Ninguna	137	-	-
A	0.8	0.5	o-iodosobenzoato 0.055 ml	2	98.9	-
A	0.8	0.5	Cl ₂ Mg 0.07 M	188	-	-
A	0.8	0.5	Cl ₂ Mg 0.07 M + o-iodosobenzoato 0.055 ml	1	99.5	-0.5
A	0.8	0.5	ClK 0.2 M	188	-	-
A	0.8	0.5	ClK 0.2 M + o-iodosobenzoato 0.055 ml	1	99.5	-0.5
B	0.7	0.5	Ninguna	125	-	-
B	0.7	0.5	o-iodosobenzoato 0.055 ml	7	94.4	-
B	0.7	0.5	Cl ₂ Ca 0.07 M	100	-	-
B	0.7	0.5	Cl ₂ Ca 0.07 M + o-iodosobenzoato 0.055 ml	0	100.0	-5.8
C	0.4	1.0	Ninguna	175	-	-
C	0.4	1.0	Etilmaleimida 0.02 ml	1.6	99.1	-
C	0.4	1.0	Cl ₂ Mg 0.15 M	141	-	-
C	0.4	1.0	Cl ₂ Mg 0.15 M + etilmaleimida 0.02 ml	4.0	97.2	1.9
C	0.4	1.0	ClK 0.1 M	166	-	-
C	0.4	1.0	ClK 0.1 M + etilmaleimida 0.02 ml	4.0	97.6	1.5
D	0.7	5.0	Ninguna	160	-	-
D	0.7	5.0	Iodoacetato 0.004 M	76	52.5	-
D	0.7	5.0	Cl ₂ Mg 0.066 M	176	-	-
D	0.7	5.0	Cl ₂ Mg 0.066 M + iodoacetato 0.004 M	96	45.0	14.3
D	0.7	5.0	ClK 0.1 M	156	-	-
D	0.7	5.0	ClK 0.1 M + iodoacetato 0.004 M	85	45.5	13.3
E	2.8	0.5	Ninguna	106	-	-
E	2.8	0.5	Mafarson 0.032 ml	49	53.8	-
E	2.8	0.5	Cl ₂ Mg 0.076 M	77	-	-
E	2.8	0.5	Cl ₂ Mg 0.076 M + Mafarson 0.032 ml	30	61.0	-13.4
F	0.7	0.5	Ninguna	148	-	-
F	0.7	0.5	Mafarson 0.032 ml	30	79.8	-
F	0.7	0.5	Cl ₂ Ca 0.076 M	104	-	-
F	0.7	0.5	Cl ₂ Ca 0.076 M + Mafarson 0.032 ml	12	88.5	-10.9
G	0.6	0.5	Ninguna	202	-	-
G	0.6	0.5	p-Cloromercuribenzoato 8.0 μ M	78	61.3	-
G	0.6	0.5	Cl ₂ Mg 0.076 M	242	-	-
G	0.6	0.5	Cl ₂ Mg 0.076 M + p-cloromercuriben- zoato 8.0 μ M	81	66.6	-7.0
G	0.6	0.5	ClK 0.1 M	280	-	-
G	0.6	0.5	ClK 0.1 M + p-cloromercuribenzoato 8.0 μ M	129	54.0	11.9

La enzima usada en los experimentos con Cl₂Ca fue preparada especialmente, lavan-
do el precipitado del fraccionamiento acetónico dos veces, con 1 volumen de una
solución helada de acetato 0.5 M pH 5.3 y acetona en partes iguales.-

Tabla 16.- Acción del acetaldehído sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por mafarsen

Enzimas disueltas en 0.5 ml de Tris 0.015 M pH 8.0 se tratan según se indica. Se determina la actividad en 0.05 ml de solución (Exp. con enzima de Black) y en 0.2 ml de solución (Exp. con enzima de Seegmiller y Racker).

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzi- ma (mg)	Dura- ción de la incuba- ción (min)	Adiciones	Activi- dad on- zimáti- ca (Δ D340.10 ³) min.....	Inhi- ción de la enzi- ma (%)	Pro- tec- ción de la enzi- ma (%)
<u>Enzima de Black</u>						
A	1.6	0.5	Ninguna	132	--	--
A	1.6	0.5	<u>Mafarsen</u> 0.064 M	32	75.8	--
A	1.6	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M	108	--	--
A	1.6	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M + <u>mafarsen</u> 0.064 mM...	43	60.1	20.7
<u>Enzima de Seegmiller</u>						
B	2.8	0.5	Ninguna	106	--	--
B	2.8	0.5	<u>Mafarsen</u> 0.032 mM	49	53.8	--
B	2.8	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M	98	--	--
B	2.8	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M + <u>mafarsen</u> 0.032 mM...	33	66.3	-23.3
<u>Enzima de Racker</u>						
C	--	3.0	Ninguna	77	--	--
C	--	3.0	<u>Mafarsen</u> 0.13 mM	52	33.0	--
C	--	3.0	Acetaldehído 1.0 x 10 ⁻² M	89	--	--
C	--	3.0	Acetaldehído 1.0 x 10 ⁻² M + <u>mafarsen</u> 0.13 mM...	79	11.0	67.0

zoato sobre las enzimas de Seegmiller y Racker no es afectada por el acetaldehído (Tabla 19).

d) Experimentos con iodoacetato . El acetaldehído disminuye ligeramente la acción del iodoacetato sobre la enzima de Seegmiller pero no modifica la inhibición de la enzima de Black (Tabla 20).

DISCUSION

En un capítulo anterior se demostró la existencia en todas las aldehído deshidrogenasas de grupos tioles esenciales para la actividad enzimática .

Los resultados reseñados en este capítulo demuestran que esos tioles están estrechamente vinculados a las coenzimas respectivas pues la protección del tiol se obtiene solamente con la coenzima específica. En efecto:

- 1) La enzima de Black , que actúa con DPN o TPN indistintamente fué protegida frente a todos los detectores de tioles usados , por ambas coenzimas, y también por DPN reducido, mientras que el ácido adenílico careció totalmente de acción protectora .
- 2) La enzima de Seegmiller , que es específica para el TPN, fué protegida exclusivamente por esta coenzima, pues el DPN no previno su inhibición por el iodoacetato , la etilmaleimida, el *p*-iodosobenzoato, o el *p*-cloromercuribenzoato.
- 3) La enzima de hígado que es específica para el DPN, fué protegida por el DPN pero no por el TPN frente al *p*-cloromercuribenzoato y a la etilmaleimida si bien el TPN protegió débilmente frente al mafarsén .

La relación funcional entre el tiol y las coenzimas de las aldehído deshidrogenasas podría explicarse de varias maneras; 1) el tiol se encuentra próximo al área de la enzima que combina la coenzima sin tener relación funcional con ésta; 2) el tiol se encuentra en el área activa de la enzima y contribuye a la unión de enzima y coenzima y 3) en condiciones similares el tiol contribuye al transporte de electrones del sustrato a la coenzima.

Respecto a la hipótesis 1) Es poco probable que en tres sistemas dis-

Tabla 17.- Acción del acetaldehído sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por N-etilmaleimida.-

Enzimas disueltas en 0.5 ml de Tris 0.015 M, pH 8.0. Se tratan según se indica. Se determina la actividad en 0.05 ml (exp. con enzima de Black) y 0.2 ml (exp. con enzimas de Seegmiller y Racker)

Ex- pe- ri- men- to	Can- ti- dad de on- zi- na (mg)	Du- ra- ción de la incu- ba- ción (min)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca ($\frac{\Delta OD_{400}}{10^3}$) min	Inhi- bi- ción de la en- zima (%)	Protec- ción de la en- zima (%)
<u>Enzima de Black</u>						
A	1.9	1	Ninguna	104	--	--
A	1.9	1	N-etilmaleimida 0.024 ml	56	53.9	--
A	1.9	1	Acetaldehído $1.6 \times 10^{-3}M$	100	--	--
A	1.9	1	Acetaldehído $1.6 \times 10^{-3}M$ + N-etilmaleimida 0.024 ml	55	45.0	16.5
<u>Enzima de Seegmiller</u>						
B	1.6	1	Ninguna	175	--	--
B	1.6	1	N-etilmaleimida 0.024 ml	1.6	99.1	--
B	1.6	1	Acetaldehído $3.2 \times 10^{-3}M$	185	--	--
B	1.6	1	Acetaldehído $3.2 \times 10^{-3}M$ + N-etilmaleimida 0.024 ml	2.6	98.6	0.5
<u>Enzima de Racker</u>						
C	1.8	3	Ninguna	80	--	--
C	1.8	3	N-etilmaleimida 0.18 ml	24	70.0	--
C	1.8	3	Acetaldehído $1.0 \times 10^{-2}M$	81	--	--
C	1.8	3	Acetaldehído $1.0 \times 10^{-2}M$ + N-etilmaleimida 0.18 ml	37	54.3	22.4

Tabla 18.- Acción del acetaldehído sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por o-iodosobenzoato

Enzimas disueltas en 0.50 ml (exp. con enzimas de Black y Racker) y 0.55 ml (exp. con enzima de Seegmiller) de Tris 0.015 M, pH 8.0, se tratan según se indica. Se determina la actividad en 0.05 ml (exp. con enzima de Black) y en 0.2 ml (exp. con enzima de Seegmiller y Racker)

Ex- pe- ri- men- to	Can- ti- dad de en- zi- ma (ng)	Dura- ción de la incu- bación (min)	Adiciones	Activi- dad en- zimáti- ca (Δ D340.10 ³) min.	Inhi- ción de la en- zi- ma (%)	Protec- ción de la en- zima (%)
<u>Enzima de Black</u>						
A	3.5	0.5	Ninguna	105	--	--
A	3.5	0.5	o-Iodosobenzoato 0.06 mM	26	75.2	--
A	3.5	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M	79	--	--
A	3.5	0.5	Acetaldehído 1.6 x 10 ⁻³ M + o-iodosoben- zoato 0.06 mM	34	56.7	24.4
A	3.5	0.5	Acetaldehído 2.7 x 10 ⁻⁴ M	92	--	--
A	3.5	0.5	Acetaldehído 2.7 x 10 ⁻⁴ M + o-iodosoben- zoato 0.06 mM	29	68.5	8.9
<u>Enzima de Seegmiller</u>						
B	0.8	0.5	Ninguna	2	--	--
B	0.8	0.5	o-Iodosobenzoato 0.055 mM	187	98.9	--
B	0.8	0.5	Acetaldehído 1.5 x 10 ⁻³ M	166	--	--
B	0.8	0.5	Acetaldehído 1.5 x 10 ⁻³ M + o-iodosoben- zoato 0.055 mM	3	98.2	0.7
<u>Enzima de Racker</u>						
C	4.3	1.0	Ninguna	66.0	--	--
C	4.3	1.0	o-Iodosobenzoato 0.2 mM	17.2	73.9	--
C	4.3	1.0	Acetaldehído 1.3 x 10 ⁻² M	70.0	--	--
C	4.3	1.0	Acetaldehído 1.3 x 10 ⁻² M + o-iodosoben- zoato 0.2 mM	35.9	46.6	34.3

Tabla 19.- Acción del acetaldehído sobre la inhibición de aldehído deshidrogenasas por p-cloromercuribenzoato.

Enzima disuelta en 0.5 ml de Tris , pH 8.0, se tratan según se indica. Se mide la actividad en 0.2 de solución.

Cantidad de enzima (mg)	Duración de la incubación (min)	Añadiciones	Actividad enzimática (4.0340×10^3) min	Inhibición de la enzima (%)	Protocolo de la enzima (%)
<u>Enzima de Segmiller</u>					
0.6	0.5	Ninguna	202	--	--
0.6	0.5	p-cloromercuribenzoato 8 μ M	78	61.3	--
0.6	0.5	Acetaldehído 3.2×10^{-3} M	232	--	--
0.6	0.5	Acetaldehído 3.2×10^{-3} M + p-cloromercuribenzoato 8 μ M	85	63.4	-3.4
<u>Enzima de Racker</u>					
1.8	3.0	Ninguna	64.0	--	--
1.8	3.0	p-cloromercuribenzoato 0.6 mM	8.5	84.8	--
1.8	3.0	Acetaldehído 1.0×10^{-2} M	81.0	--	--
1.8	3.0	Acetaldehído 1.0×10^{-2} M + p-cloromercuribenzoato 0.6 mM	9.0	88.9	-3.6

tintos exista un tiol localizado precisamente en la zona de unión de la coenzima, sin poseer función específica. Esto hace más verosímiles las hipótesis 2) y 3). Casos análogos han sido considerados previamente por diferentes autores.

Rapkin y Rapkin explican el "fenómeno de protección" por coenzima en la ^{trio}triofosfato deshidrogenasa por la proximidad de la unión DPN-enzima al SH necesario para el proceso de catálisis.

Guzmán Barrón (10) propone una explicación similar para la alcohol deshidrogenasa donde los SH actuarían como transpotadores de electrones entre el sustrato y la coenzima, pues en la alcohol deshidrogenasa de levadura (4), sustrato y coenzima ejercen acción protectora frente a los reactivos de tioles.

Bonnichsen y Theorell (11) postulan en la alcohol deshidrogenasa cristalizada de hígado una unión directa del DPNH a la enzima, por intermedio de un SH, por lo que aparece un nuevo máximo de absorción que de 340 m μ pasa a 325 m μ , salto que puede ser prevenido por p-cloromercuribenzoato, si bien en la alcohol deshidrogenasa de levadura Barron y Levine (4) no encontraron un efecto semejante. Las observaciones de Kaplan y Ciotti (12) sobre la inhibición de la alcohol deshidrogenasa de hígado por hidroxilamina tienden sin embargo a confirmar la hipótesis de Bonnichsen y Theorell.

Racker y Krinsky (13) han propuesto también la unión del DPN a la triosafosfato deshidrogenasa, a través de un SH, para explicar el mecanismo de la reducción del DPN en base a la variación del espectro de absorción del complejo enzima-DPN por agregado de ácido iodoacético. Un examen exhaustivo del problema se encuentra en la monografía de B.Chance (14).

La acción del acetaldehído frente a los reactivos de tioles es mucho menos uniforme que la observada con las coenzimas. Con la enzima de hígado la acción protectora del acetaldehído es evidente (salvo con p-cloromercuribenzoato); con la enzima de Black, la protección es mucho más débil mientras que con la enzima de Seegmiller solo respecto al iodoacético se comprueba una muy

débil protección. En oposición a estos resultados, en algunos casos el acetaldehído aumenta el efecto de los reactivos tioles.

Esta disparidad en la acción del acetaldehído excluye algunas posibilidades e implica otras. En primer lugar la ausencia completa de protección por acetaldehído con la enzima de Seegmiller contradice el mecanismo general propuesto por Racker (15) para la oxidación enzimática de los aldehídos cuya etapa inicial sería la formación de un hemitioacetal, si bien este mecanismo podría ser válido en las enzimas de Black y Racker. Pero aún en estas enzimas no es seguro que se forme el hemitioacetal. La reactividad de los SH (10) depende en parte de los grupos que se encuentran en su vecindad y si el acetaldehído se uniese a la proteína en un lugar cercano al SH, la actividad del mismo cambiaría (con aumento o disminución), lo que explicaría tanto la exageración como la disminución de la inhibición que se observa en presencia de acetaldehído. Además el carbonilo aldehídico (15) que es altamente reactivo, podría formar complejos inactivos con tioles esenciales de la enzima, protegiéndolos, sin que estos tioles tuvieran papel alguno en la formación del complejo activo enzima-acetaldehído. Esta posibilidad ha sido ya sugerida por Racker (15) y en ese sentido es bien característica la acción inhibidora de altas concentraciones de acetaldehído (13, v. i.), cuya cinética como se verá más adelante, satisface la hipótesis de la unión de 2 moléculas de acetaldehído por área activa de enzima, la primera formando el complejo de Michaelis y la segunda inhibiéndolo. Todo ello hace poco evidente el papel de los tioles en la formación del complejo enzima-acetaldehído.

La protección de los tioles de la enzima de Black por cationes como el potasio y el rubidio, no parece estar ligada específicamente a la acción activadora de la enzima ni a la formación de un complejo tiol-ion. El poder activador de cada ión y su capacidad para proteger tioles no son paralelos en la misma enzima o comparativamente, en las dos aldehído deshidrogenasas activadas por iones es decir las enzimas de Black y Seegmiller. Así la enzi-

ma de Black fué protegida frente al mafarsen por sus activadores específicos, potasio y rubidio , mientras que el calcio y magnesio necesarios para la actividad de la enzima de Seegmiller no impidieron la inactivación de ésta última por los reactivos de tioles.

Si se analiza con más detalle la protección de la enzima de Black por los iones p otasio y rubidio se comprueba que su efecto no es general sino que depende del reactivo de tioles utilizado. En efecto, el rubidio es fuerte protector respecto a la etilmaleimida pero no frente al ρ -iodosobenzoato, mientras que el potasio impide más la acción de este último que la de la etilmaleimida.

La singular acción de los iones sobre la sensibilidad de los tioles de la enzima de Black para sus reactivos específicos , puede mas bien atribuirse a efectos (tal vez electrostáticos) sobre la disposición de las redes peptídicas de la molécula proteica , de manera que de acuerdo a la configuración espacial de éstas últimas los tioles serian más o menos accesibles a sus inhibidores . En algunos casos habria una relación inversa entre la variación de accesibilidad a un determinado reactivo tiólico y a las áreas activas de la enzima y entonces la acción activadora de la enzima y la protectora del tiol estarían parcialmente superpuestas . Esta explicación satisface por una parte, la coincidencia cuantitativa entre las concentraciones de potasio que activan la enzima y protegen los tioles, y por otra el hecho de que los iones inhibidores de la deshidrogenasa, como el sodio y el litio, exageren en algunos casos la sensibilidad de los tioles para sus reactivos específicos. Si la acción del sodio y litio consistiera en ocupar el tiol ocupado normalmente por el potasio (o el rubidio) , en lugar de mayor inhibición debería obtenerse protección.

La fijación de cationes alcalinos por proteínas (19) en forma de complejos similares a los que se postulan para la enzima de Black, ha sido demostrada recientemente por Carr (20) con la pepsina, β lacto globulina y β sero globulina , α sero globulina y el fibrógeno ; argumentos derivados de la ciné-

tica de la activación de la enzima de Black concuerdan con la hipótesis del complejo enzima-cación alcalino.

Los iones potasio, rubidio y amonio, tienen radios similares (18). Cuando los iones están hidratados, el radio de los del primer grupo es menor que el del sodio, y éste a la vez menor que el del litio, mientras que en los no hidratados la relación es justamente la inversa. Esto parecería indicar que la protección de los tioles y la activación de la enzima de Black están ligadas al radio del ión cualquiera sea la forma (hidratada o no) en que éste actúe. Una hipótesis similar ha sido expuesta por Kachmar y Boyer (17) para explicar la activación de la pirúvico fosfoferasa por los iones ahora en discusión. Debe hacerse notar, sin embargo, que el ión amonio, a pesar de su radio parecido al del potasio y el rubidio es un activador y protector de tioles menos eficaz que el potasio y el rubidio, lo que pone incertidumbre en la explicación propuesta.

El efecto activador del p -iodosobenzoato sobre la enzima de Racker en presencia de DPN (oxidado o reducido) es específico pues no se observa con TPN, pero por el momento no existen hechos que permitan explicarlo.

En resumen, la diferente intensidad de la protección por coenzima, sustrato y cación activador que varía según la enzima, lleva a la conclusión general de que existe una relación directa entre coenzima y grupos tioles de la proteína en las tres aldehído deshidrogenasas.

Estos grupos tioles podrían actuar como vínculo de coenzima y apoenzima (caso de la enzima de Seegmiller) o como transpotador de electrones entre sustrato y coenzima (enzima de Racker especialmente). En este último caso debería esperarse que el sustrato y la coenzima den protección aproximadamente igual, como ocurre en la alcohol deshidrogenasa (4). En nuestras observaciones, excepto con la enzima de Racker, donde frente a algunos inhibidores el acetaldehído protege en la misma extensión que la coenzima, la protección por ésta última fué mayor y más consistente que por el sustrato, lo que disminuye la probabilidad de que el tiol en las coenzimas de Black y Seegmiller actúe como

transportador de electrones y si bien ello puede ocurrir en la onzima de Racker, no se excluye que grupos tioles tengan allí un papel análogo al de los tioles de las otras dos deshidrogenasas, es decir facilitar la unión de la apoenzima con la coenzima.

CONCLUSIONES

- 1°.- La inhibición de las aldehido deshidrogenasas de levadura y de la aldehido deshidrogenasa de hígado es disminuida específicamente por las respectivas coenzimas. Por el contrario, la acetaldehido deshidrogenasa de hígado oxagera su actividad normal en presencia de DPN o DPNH y *o*-iodosobenzoato; dicho efecto es específico pues no se produce ~~con~~ TPN.
- 2°.- El acetaldehido previene en forma neta la inhibición de la enzima de Racker por reactivos de tioles (excepto el *p*-cloromercuribenzoato) y previene en forma débil la inhibición similar de la enzima de Black (excepto por iodoacetato). En cambio no protege los tioles de la enzima de Seegmiller salvo frente al iodoacetato.
- 3°.- El ión potasio protege la enzima de Black frente a todos los reactivos de tioles estudiados y el ión rubidio la protege frente al mafarsen y la etilmaleimida, pero no respecto al *o*-iodosobenzoato.

Los iones sodio, litio y amonio no tienen acción protectora y en algunos casos exageran la inhibición por reactivos tioles.

- 4°.- Los tioles de las enzimas de Seegmiller y Racker no son protegidos por los cationes monovalentes ni la enzima de Seegmiller por los cationes divalentes, calcio y magnesio, necesarios para su actividad.

- 5°.- En las tres deshidrogenasas estudiadas existen grupos tioles esenciales, funcionalmente vinculados a la coenzima específica. En las enzimas de Black y Racker es posible la existencia de otros tioles que intervienen en la activación del acetaldehido, especialmente en la última.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Hopkins ,F. Morgan,E.J. y Lutwak Mann C. Biochem J. 32 1829 (1938)
- 2 Rapkine L., Rapkine S.M. y Trpinac P., Compt.rend. 209 253 (1939)
- 3 Stoppani A.O.M. y Actis A.S. , Anales Asoc. Quim.Arg. 40 128 (1952)
- 4 Barron E.S.G. y Lovine S., Arch.Biochem.and Biophys. 41 175 (1952)
- 5 Mahler H.R., Mackler B. y Green D.E., J.Biol.Chem. , 210 465 (1954)
- 6 Mahler H.R., J.Biol. Chem. 206 16 (1954)
- 7 Black S., Arch. Biochem. Biophys. 34 86 (1951)
- 8 Seegmiller J.E. , J.Biol.Chem. 201 629 (1953)
- 9 Racker E., J.Biol Chem. 177 883 (1949)
- 10 Barron G., Adv. in Enzymology. , 11 201 (1951)
- 11 Theorell H. y Bonnichsen R., Acta Chem. Scand. 5 1105 (1951)
- 12 Kaplan N.O. y Ciotti M.M. , J.Biol.Chem. 211 431 (1954)
- 13 Racker E. y Krinsky I., J. Biol.Chem. 198 731 (1952)
- 14 Chance B., Mecanism of enzyme acción Mc Elroy-Glass 1954 (p.433)
- 15 Racker E., Physiological Reviews. 35 1 (1955)
- 16 Black S., Arch Biochem . Biophys. 34 86 (1951)
- 17 Kachmar J.F. y Boyer P.D., J.Biol.Chem. , 200 669 (1953)
- 18 Pauling L., The nature of chemical bond Ithaca, 346 (1939)
citado por Kachmar y Boyer, J.Biol.Chem. 200 680 (1953)
- 19 Klotz J.M., The proteins, Neurath y Baley Ac.press Vol. I part. B 793 (1953)
- 20 Carr Ch .W., Arch .of Biochem. ,Biophys, 62 476 (1956)

Capítulo VII

ESTUDIOS QUÍMICOS SOBRE LA DEXALDEHÍDO DEXIDROGENASA
DE LEVADURA (LEZINA DE BLACK)

1) ACTIVACION POR DATIQUES

Los resultados obtenidos hasta ahora demuestran que algunos componentes de la enzima de Black, en especial el ión potasio y el DPN, pueden hallarse vinculados en la superficie de la enzima en la proximidad de grupos tioles. Esta posibilidad se ha explorado ahora detalladamente mediante el análisis de la cinética de la enzima. Black (1) realizó algunas observaciones de tipo cinético sobre la acción antagónica de los iones potasio y litio, llegando a la conclusión de que la acción inhibidora de éste último no está ligada a un efecto salino. Por otra parte comprobó que la formación del complejo enzima-sustrato, no sigue la curva clásica de Michaelis-Menten pues por encima de una cierta concentración al acetaldehído actúa como inhibidor de la enzima.

En los experimentos que se detallan a continuación se ha analizado detalladamente la cinética de la enzima de Black, considerándose sucesivamente la influencia del ion activador, de la enzima y del acetaldehído sobre la actividad del sistema y así mismo, sobre los distintos complejos que regulan dicha actividad.

Resultados

- 1) Acción de varios cationes sobre la actividad de la enzima de Black.— Según Black los iones potasio rubidio y amonio, activan con intensidad en orden decreciente la DPN aldehído deshidrogenasa de levadura (1) mientras que los iones sodio y litio la inhiben. Hemos confirmado cualitativamente sus observaciones (Tabla 1) y además, que los cationes bivalentes calcio, magnesio y bario son inhibidores. Cuantitativamente el efecto activador máximo del potasio se obtiene con la concentración 0.05 M, en lugar de 0.3 M que refiere Black (Fig. 1). Con rubidio (Fig 2) la activación máxima corresponde a la concentración 0.02 M. En las secciones siguientes se analizará la influencia de los iones activadores sobre las propiedades de los complejos que la enzima forma con sus sustratos específicos, es decir el acetaldehído y el DPN.
- 2) Influencia del potasio y el rubidio sobre la constante K_s del complejo enzima-acetaldehído. La constante de Michaelis aparente (K_s) del complejo enzima-ace-

Tabla 1 .- Acción de varios cationes sobre la actividad de la DPHaldehído deshidrogenasa (Black).

Enzima disuelta en 3 ml de Tris 0.015 M pH 8.0 en presencia de cisteína 0.001 M, DPH 0.44 mM, las adiciones que se indican y acetaldehído 17×10^{-5} agregado al final. El ión bario se añadió como nitrato; los restantes iones como cloruros

Cantidad de enzima (mg)	Adiciones	Actividad enzimática (Δ D 340.10^3) min	Actividad respecto al testigo con CLK 0.05 M (%)
0.065	Ninguna	36	9
0.065	K ⁺ 0.05 M	400	100
0.065	Na ⁺ 0.05 M	0	0.0
0.065	Ca ⁺⁺ 0.05 M	2	0.5
0.065	Mg ⁺⁺ 0.05 M	5	1.2
0.065	Ba ⁺⁺ 0.05 M	1	0.2
0.021	Ninguna	4	4.8
0.021	K ⁺ 0.05 M	84	100
0.021	Rb ⁺ 0.05 M	59	70.3

Figura 1

Influencia del potasio en la actividad enzimática.

Tris 0.015 M pH 8.0 , cisteína 0.001 M , DFN 0.44 ml, acetaldehído 17×10^{-5} M.
CLK en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml. Velocidad inicial
($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$).

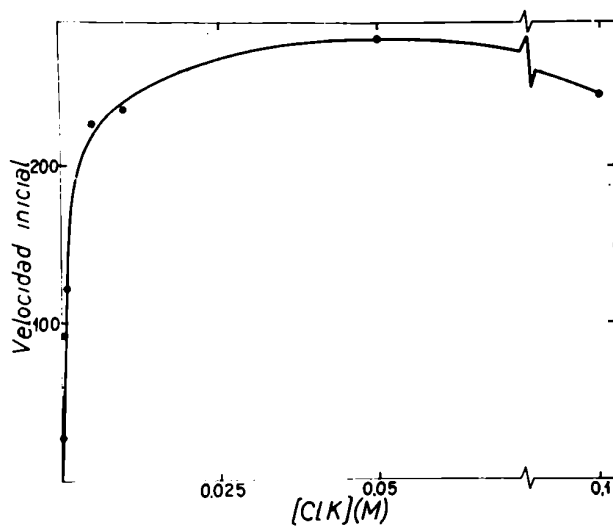
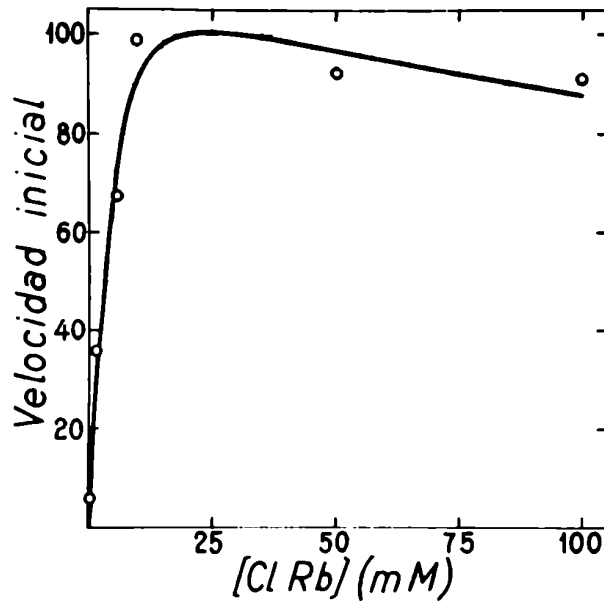


Figura 2

Influencia del rubidio sobre la actividad enzimática.

Tris: 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, DPH 0.44 mM, enzima 0.2 mg. ClRb on las concentraciones indicadas. Acetaldehído 17×10^{-5} M. Velocidad inicial ($\Delta D_{340} \times 10^3 \text{ min}^{-1}$)



taldehido se determina mediante la aplicación de las ecuaciones (1) y (2) ;

$$1/v = \frac{K_s}{V} \frac{[S]}{[S] + 1/V} \quad (1)$$

donde v es la actividad enzimática con la concentración de sustrato $[S]$ y V la velocidad máxima aparente del sistema.

$$\frac{[S]}{v} = \frac{[S]}{V} + \frac{K_s}{V} \quad (2)$$

Con la ecuación (1), si se representa $1/v$ en función de $1/[S]$, K_s se puede calcular dividiendo la pendiente de la recta por la ordenada en el origen de las abscisas y con la ecuación (2) representando $[S]/v$ en función de $[S]$, K_s se puede calcular dividiendo el valor de la ordenada para el origen de abscisas por la pendiente de la recta (2). En uno de los dos métodos de análisis cinético se incluye el cálculo de las constantes por cuadros mínimos y se indican los valores correspondientes a los errores probables. La comparación de los resultados obtenidos con ambos métodos se consigna en un capítulo aparte.

Estas determinaciones están afectadas por la forma de la curva de actividad en función de la concentración de acetaldehido y por la escasa disociación del complejo enzima-sustrato. Los valores de las constantes se han calculado con las velocidades correspondientes a acetaldehido en concentraciones entre 0.9 y $9.0 \times 10^{-5} M$. Con concentraciones menores no se pudo determinar exactamente la velocidad inicial aún haciendo lecturas cada 10 segundos, pues la pequeña cantidad de acetaldehido presente afecta rápidamente la forma de la curva.

En las figuras 3,4 y 5 se representa la influencia de la concentración del sustrato sobre la actividad inicial de la enzima, a varias concentraciones de iones potasio. La constante de Michaelis (Tabla 2) calculada de esas observaciones casi se duplica cuando el CLK pasa de 0.5 a 50 mM, pero la variación no es estadísticamente significativa pues la relación entre la diferencia máxima de los términos medios (D) y el error medio cuadrático $R = \sqrt{\frac{r_1^2 + r_2^2}{2}}$ fué en el experimento A 2.5 y en el B 2.3, es decir inferior al valor 4 que habitualmente se toma (3) como criterio de significación.

Figura 3

Influencia de la concentración de acetaldehído sobre la actividad enzimática a tres concentraciones de potasio.

Velocidad inicial : ($\Delta D_{240} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.0 ; DPN 0.44 mM , cistina 0.001 l., enzima 0.20 mg. CLK y acetaldehído en las concentraciones indicadas.

Volumen final, 3 ml.

Curva A: [CLK] 0.05 M ; curva B: [CLK] 0.003 M y curva C: [CLK] 0.0005 M.

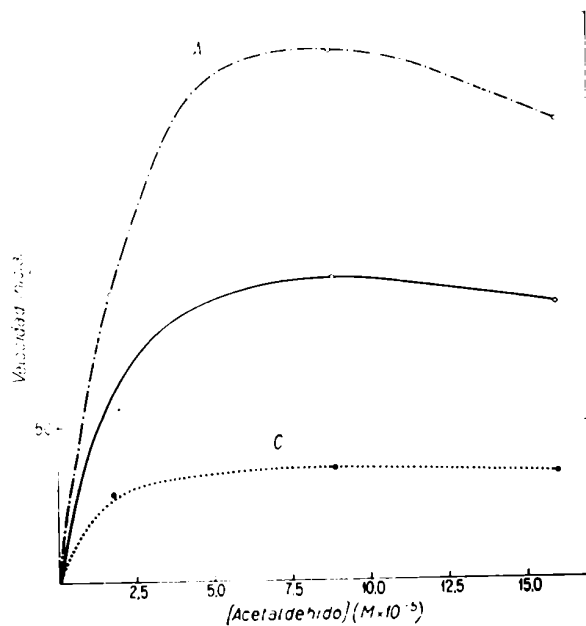


Figura 4

Influencia del acetaldehído sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de potasio (valores recíprocos).

v (Velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M pH 7.9, DPN 0.44 ml, cisteína 0.001 M, enzima 0.14 mg.; acetaldehído y GK en las concentraciones que se indican. Volumen final, 3 ml.

Línea A: $[K^+]$ 0.0005 M ; Línea B: $[K^+]$ 0.002 M y Línea C: $[K^+]$ 0.05 M.

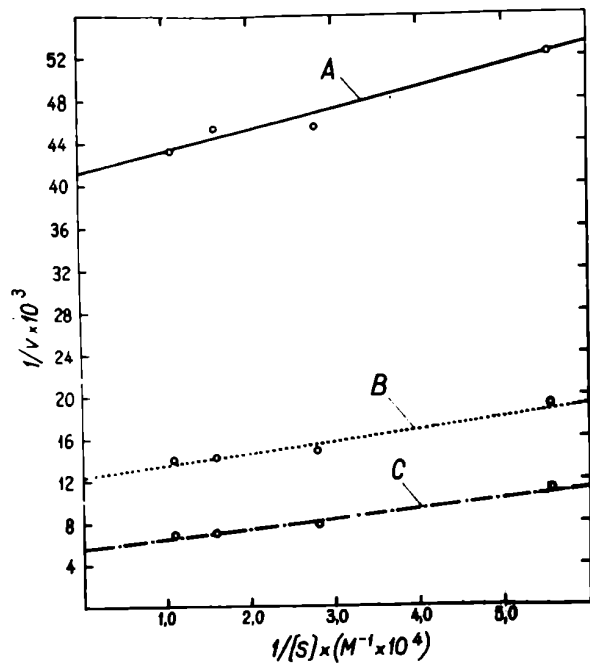


Figura 5

Influencia del acetaldehído sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de potasio.

v (Velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M, pH 7.9, DPN 0.44 ml, cisteína 0.001 M, enzima 0.20 mg. CLK y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A: $[K^+]$ 0.0005 M ; línea B: $[K^+]$ 0.003 M ; línea C: $[K^+]$ 0.05 M.

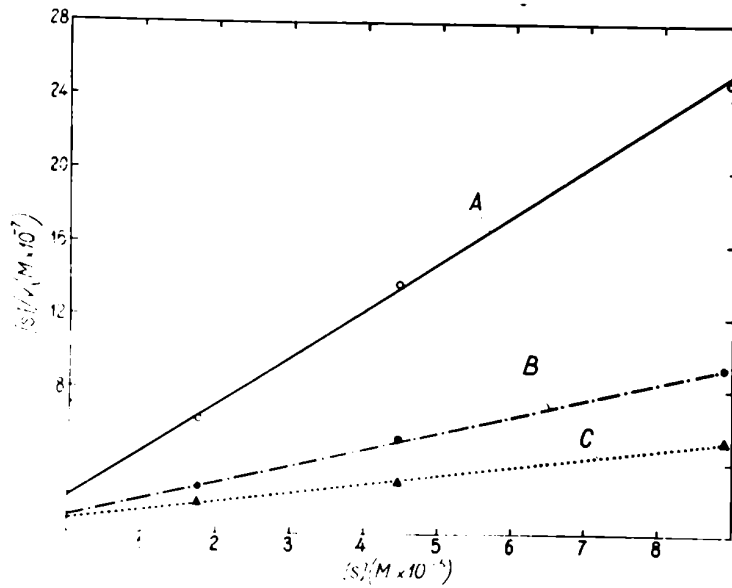


Tabla 2 .- Influencia de iones potasio sobre la constante Ks del complejo acetaldohido deshidrogenase - acetaldohido.-

Enzima disuelta en 0.5 ml de Tris 0,015 M, pH 7,9 en presencia de cisteina 0.001 M, DPN 0,44 ml y GKH. El acetaldohido fue agregado al final segun se indica.

Expe- rimen- to	Canti- dad de cincina (mg)	Concen- tración de K ⁺ (mM)	Concentra- ciones de acetaldohi- do usadas (μ M \cdot 10 ⁻⁵)	Actividad enzimati- ca ($\frac{\Delta D_{340} \cdot 10^3}{\text{min}}$)	Ks ($\times 10^{-5}$)		
					1/v=f(1/s) (Método grafico)	S.v=f(S) (Meto- do gra- fico)	(Cuadra- dos ni- mos)
A	0.28	0.5	1.8	28	0.65	0.76	0.96 \pm 0.16
			4.5	32			
			8.9	36			
A	0.28	3.0	1.8	72	1.0	0.98	0.96 \pm 0.15
			4.5	84			
			8.9	98			
A	0.28	50.0	1.8	93	2.6	2.0	1.83 \pm 0.30
			4.5	156			
			8.9	170			
B	0.14	0.5	1.8	19	0.48	0.48	0.55 \pm 0.12
			3.6	22			
			6.3	22			
			8.9	23			
B	0.14	2.0	1.8	52	1.0	0.71	0.71 \pm 0.16
			3.6	68			
			6.3	70			
			8.9	71			
B	0.14	50.0	1.8	89	1.82	1.55	1.06 \pm 0.18
			3.6	124			
			6.3	137			
			8.9	143			

Resultados similares se obtienen con el ión rubidio como activador. En la Fig. 6,7 y 8 se representa la variación de la actividad inicial en función de la concentración de acetaldehído, a varias concentraciones de rubidio. Las constantes K_s (Tabla 3) que se calculan de esas curvas, muestran un ligero aumento (de $1.7 \cdot 10^{-5} M$ a $2,3 \cdot 10^{-5} M$) cuando la concentración de ClRb pasa de 1.0 a 10 mM (experimento A) pero la diferencia no es significativa pues la relación D/R es 0.54. Resultados similares se obtuvieron en los experimentos B y C.

3) Influencia de los iones potasio y rubidio sobre la constante K_{DPN} del complejo enzima - DPN. La influencia de los iones activadores sobre el complejo enzima-DPN, se estudió en forma similar a la efectuada respecto al acetaldehído. En la Fig.9 se representa la influencia de la concentración de DPN sobre la actividad enzimática, a varias concentraciones de iones potasio. Tomando las recíprocas de los valores hallados (Fig.10), por la ecuación (1) se obtiene los valores que figuran en la tabla 4, donde además se incluyen los errores probables de cada valor calculado por el método de los cuadros mínimos. Las variaciones de la constante K_{DPN} fueron como sigue: en el exp. A, aumenta 2,5 veces cuando la concentración de potasio pasa de 0.5 a 50 mM; en el experimento B, K_{DPN} aumenta 10 veces cuando la concentración de potasio pasa de 0.5 a 20 mM; en el experimento C, K_{DPN} disminuye cuando la concentración del potasio pasa de 0.5 a 200 mM. Estas diferencias no son significativas para los experimentos A y C ($D/R = 3.6$ y 1.0 respectivamente); pero en el experimento B, $D/R = 8.2$, o sea que debería considerarse que el aumento de K_{DPN} excede el error experimental. Sin embargo en este último experimento el error de la última determinación es excepcionalmente alto, lo que disminuye la significación del resultado.

La influencia del ión rubidio sobre la actividad de la enzima a diferentes concentraciones de DPN se representa en las Fig. 11 y 12. Los valores de las constantes K_{DPN} obtenidas con el método (1) figuran en la Tabla 5 conjuntamente con los obtenidos por el método de los mínimos cuadrados. Las variaciones de K_{DPN} imputables al rubidio no son significativas pues el valor máximo observado de la relación D/R fué 1.2.

Figura 6

Influencia de la concentración de acetaldehído sobre la actividad enzimática, a tres
concentraciones de rubidio.

Velocidad inicial; ($\Delta D_{340} \times 10^3/\text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0; DPN 0.44 mM, cisteína 0.001 M, enzima .024 mg. ClRb y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Curva A Rb^+ 0.001 M; curva B Rb^+ 0.0033 M; curva C Rb^+ 0.01 M.

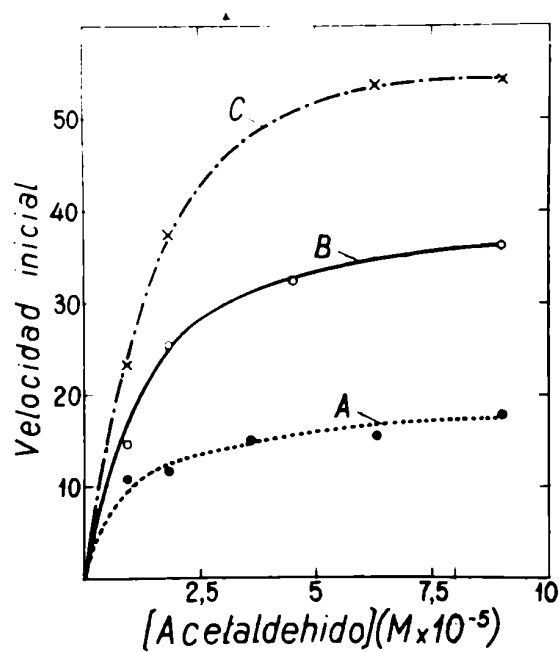


Figura 7

Influencia del acetaldehído sobre la velocidad inicial a cuatro concentraciones de rubidio (valores recíprocos).

v (velocidad inicial) ($\Delta D_{340} \times 10^3/\text{min.}$); Tris 0.015 M pH 8.0; DFN 0.14 mM, cisteína 0.001 M, enzima 0.39 mg. ClRb y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A Rb⁺ 0.001 M; línea B Rb⁺ 0.0033 M;
línea C Rb⁺ 0.01 M; línea D Rb⁺ 0.1 M.

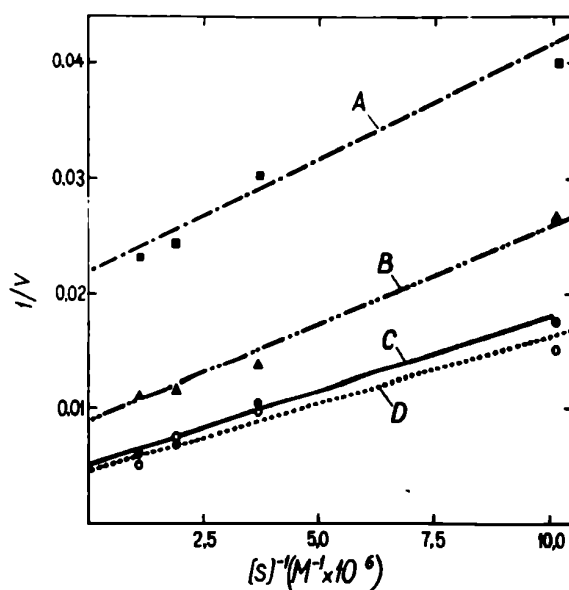


Figura 8

Influencia de la concentración de acetaldehído sobre la velocidad inicial a cuatro concentraciones de rubidio.

v (velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M pH 8.0, DPN 0.44 ml, cisteína 0.001 M, enzima 0.39 mg. ; ClRb y acetaldehído en las concentraciones indicadas.

Volumen final, 3 ml.

línea A : Rb⁺ 0.001 M ;

línea B : Rb⁺ 0.0033 M ;

línea C : Rb⁺ 0.01 M ;

línea D : Rb⁺ 0.1 M.

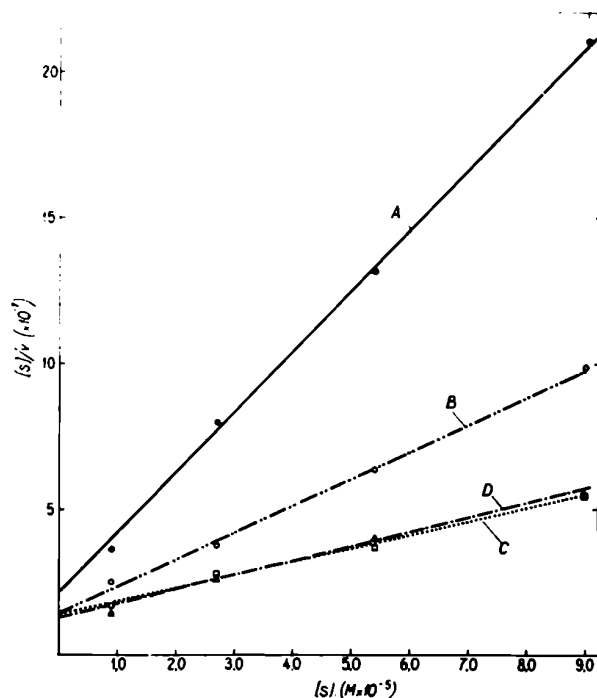


Tabla 3.- Influencia de la concentración de iones rubidio sobre la constante K_m del complejo enzima acetaldéhid

Enzima disuelta en Tris 0.015 M pH 8.0 en presencia de cisteína 0.001 M, DPN 0.001 M, concentración de ClRb variable. El acetaldéhido fué agregado al final según se indica.

Ex- pe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (ng)	Con- cen- tra- ción de Rb ⁺ (M)	Concen- tra- ciones de acetaldéhid usadas (10 ⁻⁵)	Actividad enzimática ($\frac{\Delta D_{340} \times 10^3}{\text{min}}$)	--- K_m ($\times 10^{-5}$) ---		
					$1/v = f(1/S)$ (Método gráfico)	(S)/ $v = f(S)$ (Método gráfico)	(S) (Cuadra- dos mí- nimos)
A	0.23	0.001	0.9	10	1.3	1.4	2.3 ± 0.77
			1.8	12			
			3.6	15			
			9.0	23			
A	0.23	0.0023	0.9	11	1.8	1.6	1.5 ± 1.1
			1.8	17			
			3.6	22			
			9.0	27			
A	0.23	0.01	0.9	25	1.9	1.6	1.7 ± 0.4
			1.8	32			
			3.6	48			
			9.0	57			
B	0.39	0.001	0.9	25	0.83	0.95	0.9 ± 0.15
			2.7	34			
			5.4	41			
			9.0	43			
B	0.39	0.0033	0.9	37	1.8	1.5	0.9 ± 0.36
			2.7	72			
			5.4	86			
			9.0	92			
B	0.39	0.01	0.9	56	2.4	3.6	3.1 ± 0.62
			2.7	97			
			5.4	150			
			9.0	168			
B	0.39	0.1	0.9	66	2.2	2.2	2.5 ± 1.5
			2.7	104			
			5.4	133			
			9.0	174			
C	0.24	0.001	0.9	11	0.8	0.8	1.0 ± 0.24
			1.8	12			
			3.6	16			
			9.0	18			
C	0.24	0.0033	0.9	15	1.5	1.4	1.4 ± 0.14
			1.8	26			
			4.5	33			
			9.0	36.5			
C	0.24	0.01	0.9	23.5	1.1	1.7	1.2 ± 0.25
			1.8	38			
			3.6	48			
			9.0	54			
C	0.24	0.1	0.9	24	1.1	1.65	1.7 ± 0.82
			1.8	26			
			3.6	32			
			9.0	44			

Figura 9

Influencia del DPN sobre la actividad enzimática a tres concentraciones de potasio

Velocidad inicial: ($D_{340} \times 10^3/\text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0; enzima 0.26 ng.,
cisteína 0.001 M, acetaldehído 9.0×10^{-5} M. DPN y ClK en las concentraciones in-
dicadas.

Volumen final, 3 ml.

Línea A: K^+ 0.0005 M ; línea B: K^+ 0.05 M ; línea C: K^+ 0.2 M.

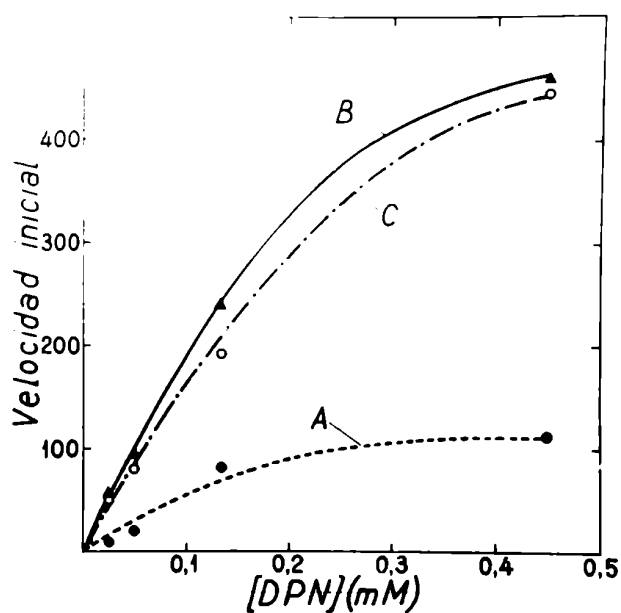


Figura 10

Influencia del DPN sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de potasio.

v (Velocidad inicial): ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M, pH 8.0 ; cisteína 0.001 M , enzima 0.26 mg. , acetaldehído 9×10^{-5} M. DPN y ALK en concentraciones que se indican.

Volumen final, 3 ml.

Línea A : K^+ 0.0005 M ; línea B : K^+ 0.05 M ; línea C : K^+ 0.2 M.

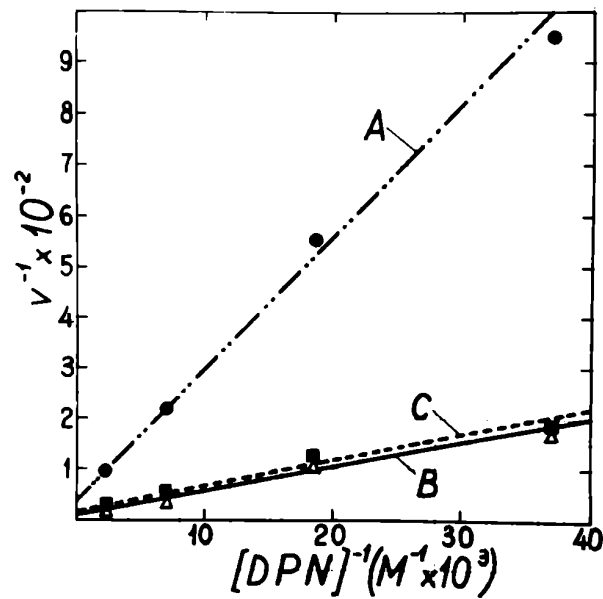


Tabla 4.- Influencia de iones potasio sobre la constante K_{DPN} del complejo acetaldéhidico deshidrogenasa - DPN.-

Enzima disuelta en 3.0 ml de Tris 0.015 M, pH 7,9 (Exp. A) y 8,0 (Exp. B y C) en presencia de cisteína 0.001 M, DPN según se indica y CLK en varias concentraciones. El acetaldéhidó fué agregado al final en concentración $2.0 \times 10^{-5}M$.

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Concen- tración de K^+ (mM)	Concentra- ciones de DPN usadas (mM)	Activi- dad en- zimática ($\Delta D_{340} \cdot 10^3 \cdot \text{min}$)	$K_{DPN} (\times 10^{-4})$ $1/v = f(1/DPN)$ (metodo gráfico)	(Cuadrados mínimos)
A	0.14	0.5	0.027	8	0.95	0.79 ± 0.24
			0.044	9		
			0.135	19		
			0.44	28		
A	0.14	1.0	0.027	8	1.0	1.3 ± 0.28
			0.044	10		
			0.135	22		
			0.44	35		
A	0.14	5.0	0.027	14	1.7	1.5 ± 0.03
			0.044	44		
			0.135	68		
			0.44	68		
A	0.14	50.0	0.027	18	2.1	2.1 ± 0.27
			0.044	59		
			0.135	115		
			0.44	115		
B	0.24	0.5	0.027	2.75	0.6	0.68 ± 0.30
			0.044	3.75		
			0.135	5.25		
			0.44	9.50		
B	0.24	2.0	0.027	3.25	2.86	2.2 ± 0.73
			0.044	4.50		
			0.135	11.25		
			0.44	21.5		
B	0.24	5.0	0.027	4.5	4.8	4.8 ± 0.40
			0.044	7.0		
			0.135	18.0		
			0.44	40.25		
B	0.24	20.0	0.027	6.25	5.2	8.4 ± 5.0
			0.044	13.50		
			0.135	23.50		
			0.44	54.50		
C	0.26	0.5	0.027	10.5	6.75	5.1 ± 2.2
			0.054	16.0		
			0.135	44.0		
			0.44	112.0		
C	0.26	50.0	0.027	55.0	5.54	4.2 ± 1.9
			0.054	95.0		
			0.135	238.0		
			0.44	462.0		
C	2.26	200.0	0.027	54.0	3.42	2.5 ± 1.3
			0.054	80.0		
			0.135	190.0		
			0.44	446.0		

Figura 11

Influencia del DPN sobre la actividad enzimática a tres concentraciones de rubidio.

v (Velocidad inicial): ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0 ; cisteína 0.001 M, enzima 0.24 ng. , acetaldehído 9×10^{-5} M. ClRb y DPN en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Curva A: $[\text{Rb}^+]$ 0.001 M ; curva B: $[\text{Rb}^+]$ 0.0033 M ; curva C: $[\text{Rb}^+]$ 0.01 M.

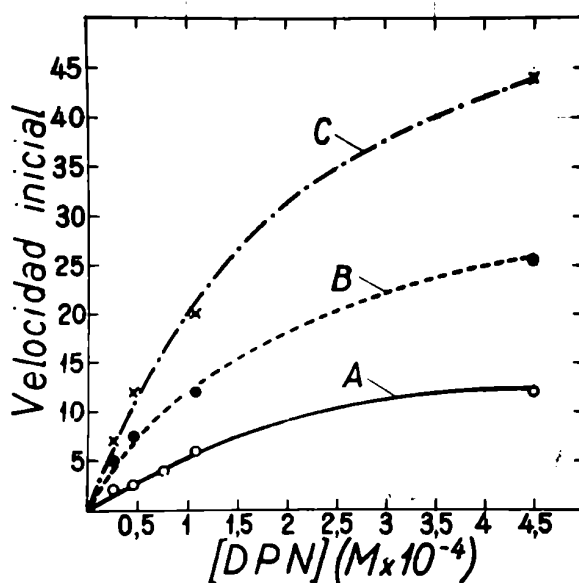


Figura 12

Influencia del DPN sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de rubidio.

v (velocidad inicial); ($D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.24 mg., acetaldehído 9×10^{-5} M. ClRb y DPN en las concentraciones que se indican. Volumen final, 3 ml.

Línea A: Rb^+ 0.001 M; línea B: Rb^+ 0.0033 M; línea C: Rb^+ 0.01 M.

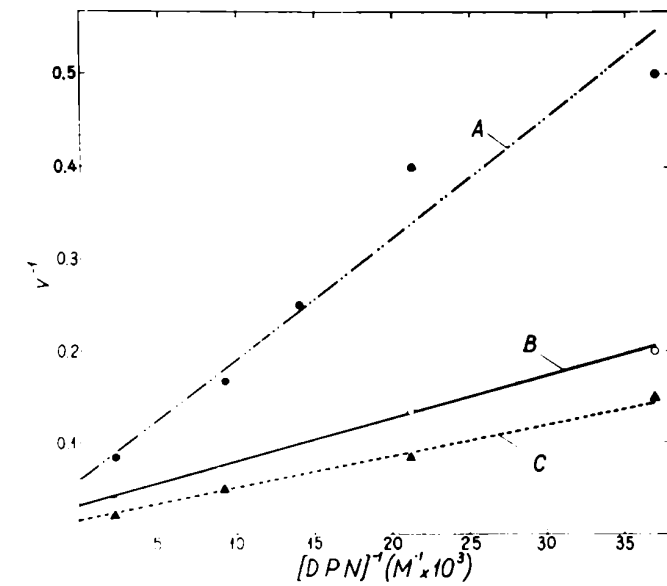


Tabla 5.- Influencia del ión rubidio sobre la constante K_{DPN} del complejo enzima-DPN

Enzima disuelta en 3 ml de Tris 0.015 M pH 8.0 en presencia de cisteína 0.001 M, varias concentraciones de Rb^+ y DPN según se indica. El acetaldehído fue agregado al final en concentración $2 \cdot 10^{-5}$ M.

Experi- mento	Canti- dad de enzima (ng)	Concen- tración de Rb^+ (M)	Concentra- ciones de DPN usadas (ml)	Actividad enzimati- ca ($\Delta D_{340} \cdot 10^3$) min	K_{DPN} (Método gráfico)	(x 10^{-4}) (Cuadrados mínimos)
A	0.39	0.0033	0.027	14.0	2.8	2.8 ± 0.88
			0.044	24.0		
			0.108	47.0		
			0.44	92.0		
A	0.39	0.01	0.027	27.0	1.7	1.5 ± 0.53
			0.044	39.0		
			0.108	67.0		
			0.44	162.0		
B	0.24	0.01	0.027	2.0	2.2	2.0 ± 0.90
			0.044	2.5		
			0.072	4.0		
			0.108	6.0		
B	0.24	0.0033	0.44	12.0	1.6	1.3 ± 0.32
			0.027	5.0		
			0.044	7.5		
			0.108	12.0		
B	0.24	0.01	0.44	26.0	1.7	2.6 ± 1.1
			0.027	6.7		
			0.044	12.0		
			0.108	20.0		
			0.44	44.0		

El DPNH_2 disminuye la velocidad de oxidación del acetaldehído (Tabla 11). Si se tiene en cuenta que protege los tioles de la enzima en forma similar al DPN, debe concluirse que se unen a la proteína por el mismo punto. Ello lleva a presumir que la acción inhibitoria del DPNH_2 puede explicarse por la baja velocidad de descomposiciones del complejo enzima- DPNH_2 . Una explicación similar ha sido propuesta por Theorell y Bonnichsen para la inhibición de la alcohol deshidrogenasa por el DPNH_2 (4).

4) Influencia del potasio y el rubidio sobre la velocidad máxima aparente de oxidación del acetaldehído. La velocidad máxima aparenta (V) de la oxidación del acetaldehído, puede observarse mediante la ecuación (1) por la recíproca del valor de la ordenada cuando $1/[S] = 0$, o bien de la ecuación (2) por la recíproca de la pendiente de la recta, sea que se tome como sustrato variable el acetaldehído o el DPN. En la Fig. 13 se representa $1/V$ (promedio de los valores obtenidos por ambos métodos) en función de la recíproca de la concentración de ión activador, en experimentos en los que el sustrato variable es el acetaldehído. En la Fig. 14 figuran resultados obtenidos en forma similar, de experimentos donde el sustrato variable es el DPN. En ambos casos $1/V$ es una función lineal de la inversa de la concentración de activador. La relación entre la pendiente de la recta y el valor de la ordenada en el origen, da el valor de la constante de disociación del complejo enzima-activador. Los valores hallados ($K_{K^+} = 2.2$ y 3.8×10^{-3} ; $K_{Rb^+} = 3.9$ y 4.1×10^{-3} con acetaldehído variable, y $K_{K^+} = 2.5$ y 6.0×10^{-3} ; $K_{Rb^+} = 3.0 \times 10^{-3}$ con DPN variable) concuerdan satisfactoriamente con los obtenidos directamente, como se comprueba más adelante.

5) Influencia del acetaldehído sobre la constante K_{DPN} del complejo enzima-DPN
En la Fig. 15 se representa la actividad inicial en función de la concentración de DPN, para varias concentraciones de acetaldehído y en la Fig. 16 la inversa de la velocidad inicial en función de la inversa de la concentración de DPN. Las constantes de Michaelis calculadas en base a esas curvas se consignan en la Tabla 6. En el experimento A, realizado con acetaldehído entre 1.8 y $53.0 \times 10^{-5}M$ no se

Figura 13

Influencia de la concentración de potasio (línea A y B) y rubidio (línea C y D) sobre las velocidades máximas aparentes obtenidas para el acetaldehído (valores recíprocos).

Valores calculados con los datos de las tablas 2 y 3.

Líneas A y C, escala de la izquierda; líneas B y D, escala de la derecha.

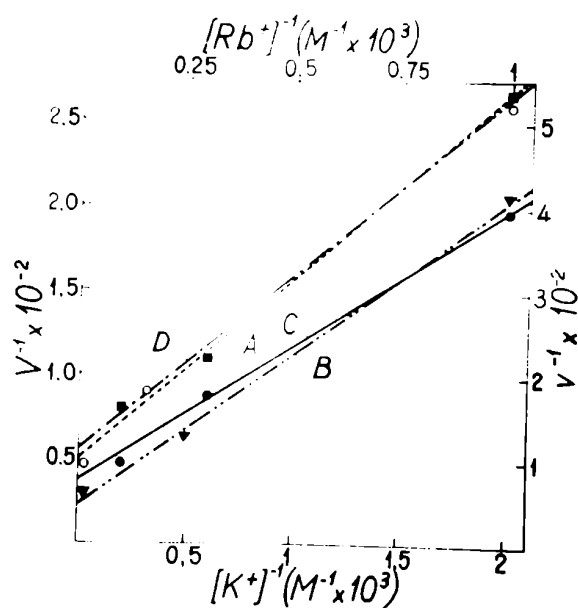


Figura 14

Influencia de la concentración de potasio (líneas A y B) y rubidío (línea C)
sobre las velocidades máximas aparentes obtenidas para el DFI (valores recíprocos).

Valores calculados con los datos de las tablas 4 y 5.

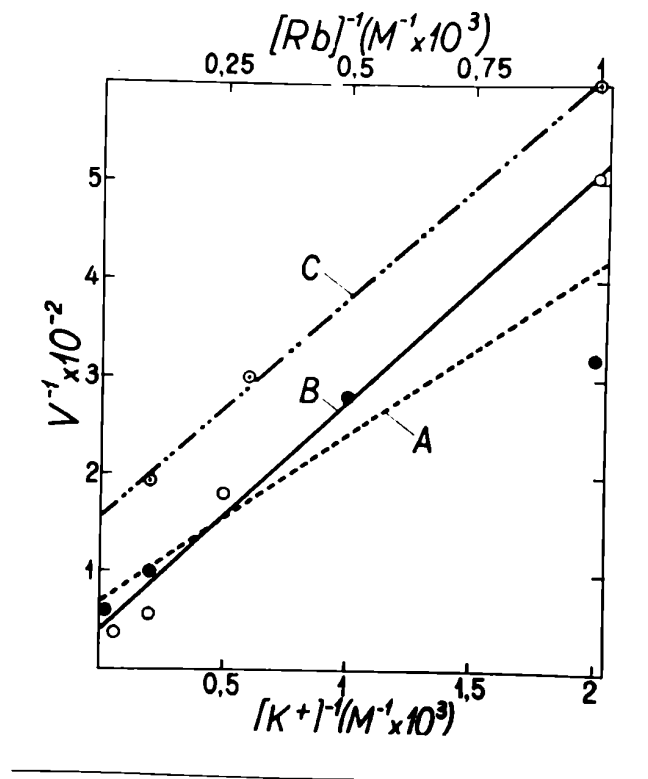


Figura 15

Influencia del DPN sobre la actividad enzimática a cuatro concentraciones de acetaldehído.

Velocidad inicial; ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.9, cisteína 0.001 M, CLK 0.05 M enzima 0.086 ng.- DPN y acetaldehído en las concentraciones indicadas.

Volumen final, 3 ml.

Línea A acetaldehído 1.8×10^{-5} M ; línea B acetaldehído 4.45×10^{-5} M ;

línea C acetaldehído 16×10^{-5} M ; línea D acetaldehído 53×10^{-5} M.

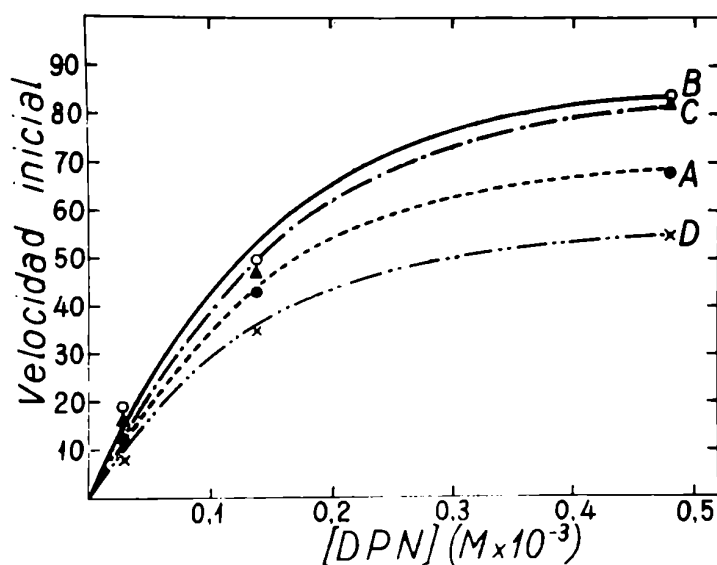


Figura 16

Influencia del DPN sobre la velocidad inicial a cinco concentraciones de acetaldehído (valores recíprocos).

v (velocidad inicial) : ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.9, cisteína 0.001 M, CLK 0.05 M enzima 0.086 mg.- DPN y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final 3 ml.

Línea A acetaldehído 1.8×10^{-5} M ; línea B acetaldehído 4.5×10^{-5} M ;
línea C acetaldehído 9×10^{-5} M ; línea D acetaldehído 16×10^{-5} M ;
línea E acetaldehído 53×10^{-5} M.

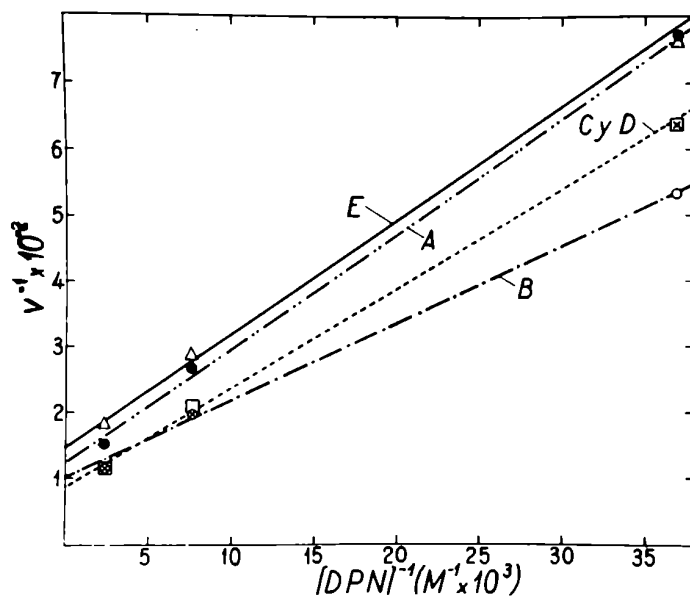


Tabla 6 .- Influencia del acetaldehído sobre la constante K_{DPI} del complejo acetaldehído deshidrogenasa -DPI

Enzima disuelta en 3 ml. de Tris 0.015 M, pH 7.9 (exp.A) y pH 8.0 (Exp.B) en presencia de cisteína 0.001 M y CLK 0.05 M, concentraciones de DPI variables. El acetaldehído fué agregado al final según se indica.

Experi- men- to.	Canti- dad de enzima (mg)	Concentra- ción de a- cetaldehído ($\mu\text{M} \times 10^{-5}$)	Concentra- ciones de DPI usadas (nM)	Actividad enzimática ($\frac{\Delta D_{340} \cdot 10^3}{\text{min.}}$)	K_{DPI} ($\times 10^{-4}$) $1/v = f(1/DPI)$ Método gráfico	Cuadrados mínimos
A	0.03	1.5	0.027 0.132 0.44	13 43 67	1.45	1.44 \pm 0.18
A	0.03	4.5	0.027 0.132 0.44	19 50 84	1.45	1.12 \pm 0.10
A	0.03	9.0	0.027 0.132 0.44	17 47 84	1.40	1.44 \pm 0.10
A	0.03	16.0	0.027 0.132 0.44	17 47 84	1.40	1.36 \pm 0.20
A	0.03	53.0	0.027 0.132 0.44	13 35 55	1.15	1.11 \pm 0.14
B	0.20	0.9	0.027 0.132 0.44	16 43 63	1.30	1.25 \pm 0.10
B	0.20	1.8	0.027 0.132 0.44	24 69 125	1.70	2.60 \pm 1.45
B	0.20	3.6	0.027 0.132 0.44	21 80 134	2.20	2.74 \pm 0.25
B	0.20	9.0	0.027 0.132 0.44	22 76 160	2.90	2.70 \pm 0.20

obtuvieron variaciones significativas de la constante de Michaelis. Solo en el experimento se anota un salto de la constante significativa entre los valores $0.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ de acetaldehído y $3.6 \times 10^{-5} \text{ M}$ desdiciendo el valor $1.8 \times 10^{-5} \text{ M}$ por estar afectado de un grosero error. La concentración $9.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ repite aproximadamente el valor anterior de la constante. La diferencia anotada entre la concentración $0.9 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $9.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ es cinco veces mayor que el error de la diferencia lo cual puede ser considerado estadísticamente significativo. Sin embargo ese único valor no es suficiente como para que se pueda atribuir significado a la variación, si se tiene en cuenta las dificultades técnicas así como la magnitud del error en la medida de la actividad enzimática cuando se trabaja con concentraciones muy pequeñas de acetaldehído. Los resultados indican claramente que la constante de Michaelis del DPN, no varía significativamente por encima de una concentración aproximadamente de $2.0 \times 10^{-5} \text{ M}$; es posible sin embargo que exista una disminución de la constante K_{DPN} por debajo de dicha concentración a medida que disminuye la concentración de acetal dehído.

6) Influencia del DPN sobre la constante de Michaelis del complejo enzima-acetaldehído. Las actividades iniciales han sido representadas en función de la concentración de aldehído, correspondiendo a cada curva una concentración determinada de DPN (Fig.17). Como ya fué indicado el acetaldehído aumenta la actividad de la enzima hasta un máximo y luego comienza a tener un efecto inhibitor. Mas adelante se discute mas a fondo este efecto comparándolo también al obtenido por Black.

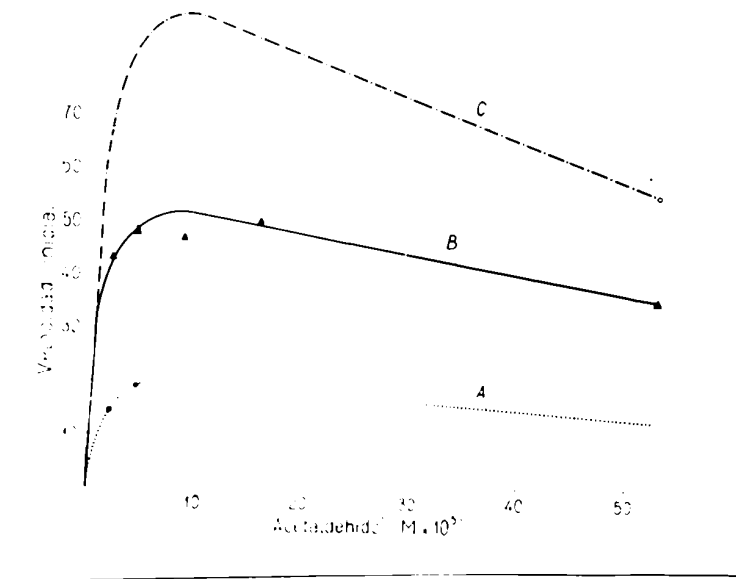
Por el momento consideraremos solamente las variaciones del máximo de actividad enzimática según la concentración de DPN. Puede observarse que a medida que aumenta la concentración de DPN el máximo de actividad se desplaza hacia las mayores concentraciones de acetaldehído; así, para DPN 0.027 mM la actividad máxima se obtuvo con acetaldehído $5 \times 10^{-5} \text{ M}$; para DPN 0.132 mM el máximo cayó alrededor de $8 \times 10^{-5} \text{ M}$ y para DPN 0.44 mM el máximo estuvo entre 9.0 y $10 \times 10^{-5} \text{ M}$ de acetaldehído. En otro experimento las diferencias fueron mas notables obteniéndose actividades máximas con acetaldehído 2.0×10^{-5} , $3.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y $7.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ respec-

Figura 17

Influencia de la concentración de acetilaldehído sobre la actividad enzimática a tres concentraciones de DPH.

Velocidad inicial; ($\Delta D_{340} = 10^3/\text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.0, DMI 0.05 M, cisteína 0.001 M, enzima 0.00 mg. Acetilaldehído; DPH en las concentraciones que se indica. Volumen final, 3 ml.

Línea A: DPH 0.007 M; Línea B: DPH 0.192 M; Línea C: DPH 0.77 M.



tivamente con concentraciones de DPN iguales a las usadas en el experimento anterior. Este efecto es mucho mas visible en la Fig. 18 ($1/v$ en función de $1/[S]$). Las rectas tienden a deformarse debido al efecto inhibitor de las concentraciones mayores de sustrato. La deformación se produce en puntos netamente distintos, según la concentración de DPN, lo que confirma el corrimiento del máximo. El efecto es tanto mas evidente si se compara estas figuras con las Fig. 3 y 4 donde se representa las velocidades en función de la concentración de sustrato y sus inversas respectivas a distintas concentraciones de activador (catión potasio). Hasta la concentración de acetaldehído $9.0 \times 10^{-5} M$ y para cualquier concentración de CLK el efecto de la deformación del máximo no se comprobó, resultado que es semejante al obtenido con la máxima concentración de DPN. El corrimiento del máximo de actividad en función de la concentración de acetaldehído se produce con concentraciones de acetaldehído tan pequeñas que imposibilitan la obtención directa de rectas, sin necesidad de extrapolación, de manera que las constantes de Michaelis K_s del complejo enzima-sustrato, solo pueden calcularse por el método gráfico (Tabla 7). Dentro de los errores presumibles se ve que la constante K_s no varía cuando el DPN pasa de 0.027 mM a 0.44 mM.

7) Influencia del DPN y del acetaldehído sobre la velocidad máxima aparente de oxidación del acetaldehído. Este valor (V) puede obtenerse de las rectas utilizadas para calcular K_s y K_{DPN} en la sección anterior y de los valores reseñados en las Tablas 6 y 7. Aplicando la ecuación (1), $1/V$ está dado por el valor de la ordenada en el origen. Si las recíprocas de las velocidades máximas aparentes obtenidas en el experimento en que varía la concentración de aldehído, se representa en función de la recíproca de la concentración de DPN, se obtiene una recta. La relación entre la pendiente y la ordenada en el origen permite recalcular (Fig. 19) K_{DPN} y los valores hallados (1.5×10^{-4} y 7.9×10^{-4}) concuerdan satisfactoriamente con los obtenidos directamente (sección 6). Resultados similares se obtienen recalculando K_s en función de la recíproca de las velocidades máximas tomadas del experimento en que se calcula K_{DPN} de la recíproca

Figura 10

Influencia del acetaldehído sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de DFI. (valores recíprocos).

v (velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M pH 8.0, $[K^+]$ 0.05 M, citreína 0.001 M y enzima 0.02 ng.; acetaldehído y DFI en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 mL.

Línea A: DFI 0.027 mM; Línea B: DFI 0.132 mM y línea C: DFI 0.44 mM.

Las prolongaciones de los trazos rectos fueron usadas para la determinación de las respectivas constantes de Michaelis.

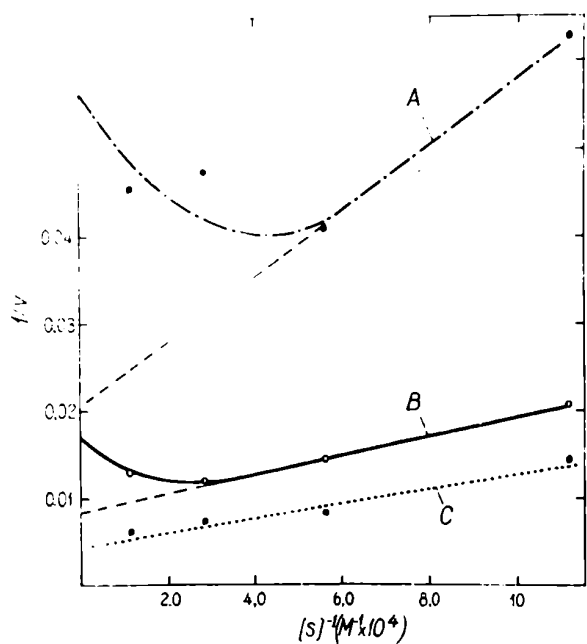


Tabla 7.- Influencia de difosforiridina dinucleótido sobre la constante K_s del complejo acetaldehído deshidrogenasa-acetaldehído.

Enzima disuelta en 3 ml. de Tris 0.015 M, pH 7.9 (exp.A) y 8.0 (exp.B) en presencia de cisteína 0.001 M CLK 0.05 M; concentraciones de DPN variables. El acetaldehído fué agregado al final según se indica.

Expe- ri- mento	Cantidad de enzi- ma (mg)	Concen- traciones de acetalde- hído usadas ($\times 10^{-2}$)	Concentra- ción de DPN (ml)	Actividad enzimática ($\frac{AD340 \cdot 10^3}{\dots \text{min}}$)	K_s ($\times 10^{-5}$)	
					$1/v = f(1/S)$ (Método gráfico)	$S/v = f(S)$ (Método gráfico)
A	0.08	1.8	0.027	13	1.34	1.60
		4.5		19		
		9.0		17		
A	0.08	1.8	0.132	43	1.48	0.50
		4.5		50		
		9.0		47		
A	0.08	1.8	0.44	67	0.96	0.67
		4.5		84		
		9.0		84		
B	0.20	0.9	0.027	16	1.60	1.15
		1.8		24		
		3.6		21		
		9.0		22		
B	0.20	0.9	0.132	48	1.36	1.05
		1.8		69		
		3.6		80		
		9.0		76		
B	0.20	0.9	0.44	68	1.72	1.15
		1.8		125		
		3.6		134		
		9.0		160		

Figura 19

Influencia de la concentración de DPN sobre las velocidades máximas aparentes obtenidas para el acetaldehído (valores recíprocos).

Valores promedio calculados con los datos de los métodos gráficos de la tabla 7.

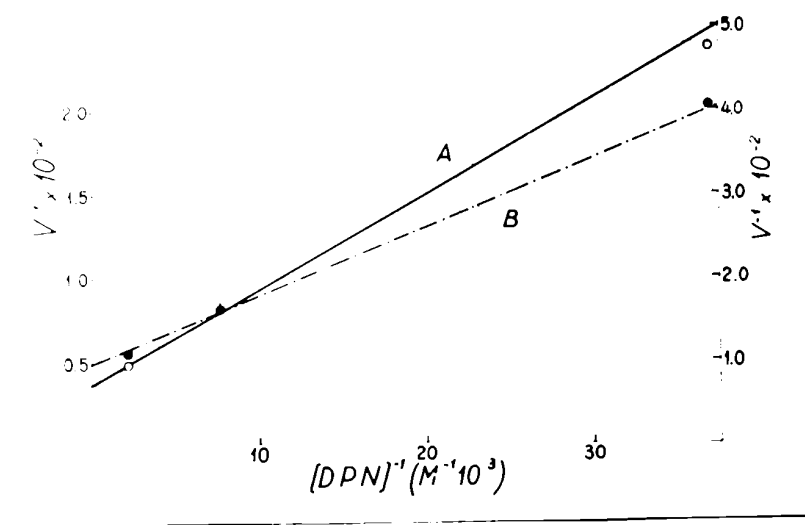
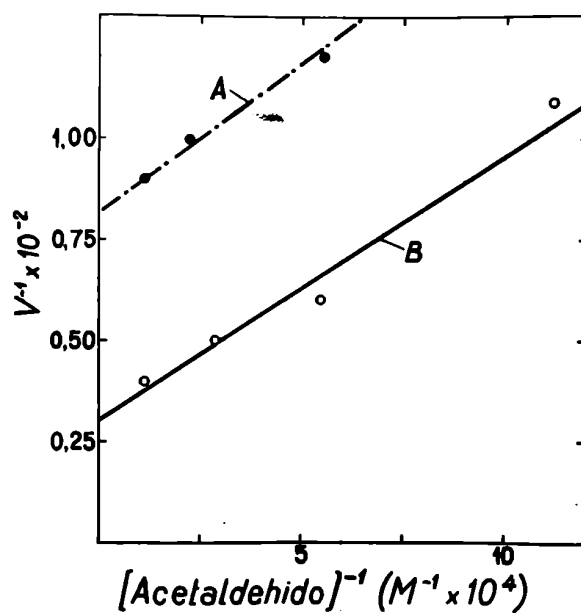


Figura 20

Influencia de la concentración de acetaldehído sobre las velocidades máximas aparentes obtenidas para el DPN. (valores recíprocos).

Valores calculados con los datos de la tabla 6.



de la concentración de acetaldehído (Fig. 20). ($K_s = 0.9 \times 10^{-5}$ y 2.1×10^{-5}).

8) Influencia del acetaldehído sobre la disociación aparente del complejo enzima-potasio y enzima-rubidio. La acción activadora del potasio y el rubidio puede atribuirse a la formación de un complejo reversible activo, con la proteína. Un estudio cuantitativo del complejo se efectúa mediante la variación de la actividad enzimática, en función de la concentración de activador a diferentes concentraciones de sustrato. En las Fig. 21 y 22 se representan los resultados obtenidos con potasio y rubidio respectivamente. Si los valores obtenidos se transforman en los recíprocos y se representan en forma similar se obtienen rectas con ambos cationes activadores (Fig. 23 y 24) .

Aplicando las ecuaciones correspondientes a los complejos , se demuestra que el cociente de la pendiente de cada recta, sobre el valor de la ordenada en el origen, da el valor de la constante de disociación aparente (K_{K^+} y K_{Rb^+}) del complejo hipotético. Los valores obtenidos (Tabla 8) indican que K_{K^+} no varió significativamente cuando la concentración de acetaldehído pasó de 1.8 a 16.0×10^{-5} M. En los experimentos con rubidio K_{Rb^+} aumenta ligeramente , pero la variación no es significativa, si se tiene en cuenta el error en el trazado de las rectas (Tabla 9) pues el punto correspondiente al ClRb 0.1 M está en las curvas C y D por debajo de la concentración óptima, que es menor. Ello aumenta el error probable de la constante calculada por el método de los cuadrados mínimos.

9) Influencia del DPN sobre la disociación aparente del complejo enzima-potasio y enzima-rubidio. La influencia del DPN sobre el complejo enzima activador se ha estudiado en forma similar a la efectuada con el acetaldehído . En las Figuras 25 y 26 se representan las velocidades iniciales de oxidación del acetaldehído, en función de la concentración de potasio y rubidio para varias concentraciones de DPN. Si se toman los valores recíprocos , en el experimento con potasio, con las concentraciones menores de DPN se obtienen curvas con un máximo, mientras que con las concentraciones mayores las funciones tienden a ser rectilíneas. Considerando estos resultados para los que no se dispone explicación, las constantes no se calcularon.

Figura 21

Influencia de la concentración de potasio sobre la actividad enzimática a tres concentraciones de acetaldehído.

Velocidad inicial: ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.9 ; DPN 0.44 mM ; cisteína 0.001 M y enzima 0.20 mg. Acetaldehído y K^+ en las concentraciones indicadas.

Volumen final, 3 ml.

Curva A: acetaldehído 9.0×10^{-5} M ; curva B: acetaldehído 4.45×10^{-5} M y curva C: acetaldehído 1.8×10^{-5} M.

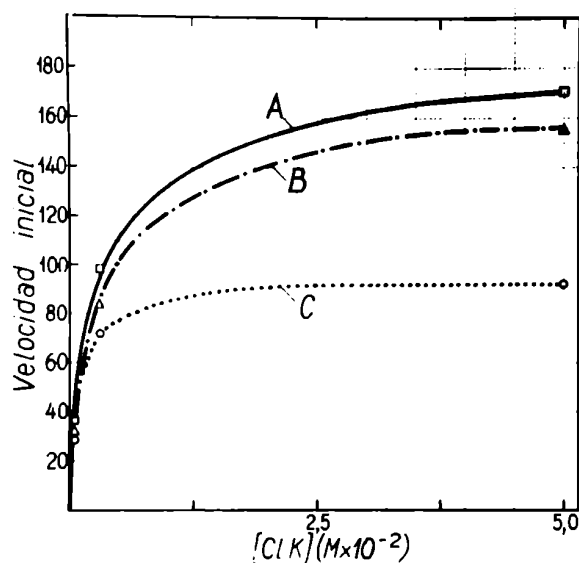


Figura 22

Influencia del rubidio sobre la actividad enzimática a cuatro concentraciones de acetaldehído.

Velocidad inicial: ($A_{D_{340}} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.39 mg., DFM 0.44 mM; Rb^+ y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Curva A: acetaldehído 0.9×10^{-5} M; curva B: acetaldehído 2.7×10^{-5} M; curva C: acetaldehído 5.4×10^{-5} M y curva D: acetaldehído 9.0×10^{-5} M.

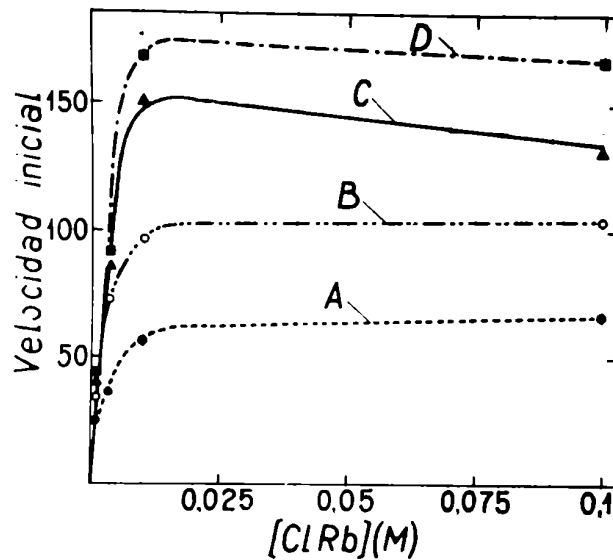


Figura 23

Influencia del potasio sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de acetaldehído. (valores recíprocos)

v (velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M pH 7.9 ; DPN 0.44 ml ,
cisteína 0.001 M , enzima 0.26 mg. Acetaldehído y K^+ en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A: acetaldehído 1.6×10^{-5} M ; línea B: acetaldehído 4.4×10^{-5} M ; línea C: acetaldehído 9.9×10^{-5} M y línea D: acetaldehído 16.0×10^{-5} M.

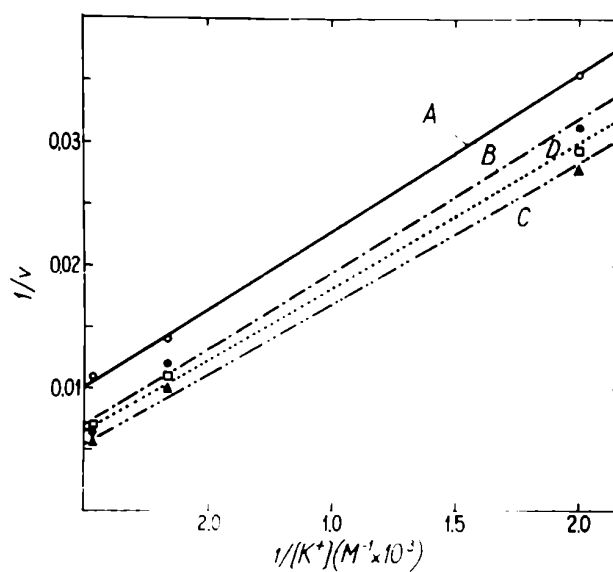


Figura 24

Influencia de la concentración de rubidio sobre la velocidad inicial a cuatro concentraciones de acetaldehído. (valores recíprocos)

v (velocidad inicial): ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.39 mg., DFM 0.44 mM; ClRb y acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A: acetaldehído 0.9×10^{-5} M; línea B: acetaldehído 2.7×10^{-5} M; línea C: acetaldehído 5.4×10^{-5} M y línea D: acetaldehído 9.0×10^{-5} M.

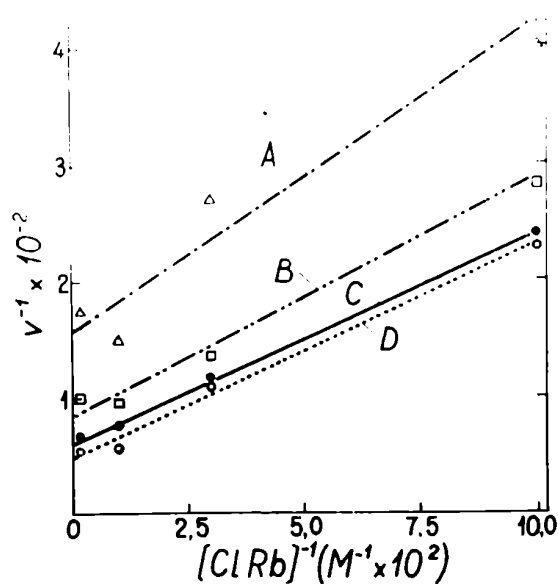


Tabla 3.- Influencia del acetaldehído sobre la constante K_M del complejo acetaldehído deshidrogenasa - K^+ .

Enzima disuelta en 3 ml. de Tris 0.015 M. pH 7.9 en presencia de cisteína 0.001 M y DPN 0.44 ml; concentraciones de CLK variables. El acetaldehído fué agregado al final según se indica.

Expe- ri- men- to	Canti- dad de enzima (mg)	Concentra- ción de ac- taldenido ($1 \cdot 10^{-5}$)	Concentra- ciones de K^+ usadas (ml)	Actividad enzimática ($\frac{AD340 \cdot 10^3}{\text{min}}$)	K_M ($\times 10^{-3}$) $\frac{1}{v} = f (\frac{1}{K^+})$ (Método gráfico) (Cuadrados mínimos)	
A	0.28	1.8	0.5	28	1.6	1.2 ± 0.13
			3.0	72		
			50.0	93		
A	0.28	4.45	0.5	32	1.8	2.0 ± 0.48
			3.0	84		
			50.0	156		
A	0.28	9.0	0.5	35	2.1	1.9 ± 0.27
			3.0	98		
			50.0	170		
A	0.28	16.0	0.5	34	1.9	1.7 ± 0.27
			3.0	89		
			50.0	147		
A	0.14	1.8	0.5	19	2.0	2.0 ± 0.48
			2.0	52		
			50.0	89		
B	0.14	3.6	0.5	22	2.9	2.5 ± 0.51
			2.0	68		
			50.0	124		
B	0.14	6.3	0.5	22	3.4	2.8 ± 0.59
			2.0	70		
			50.0	137		
B	0.14	9.0	0.5	23	3.8	2.6 ± 0.61
			2.0	71		
			50.0	143		

Tabla 9.- Influencia del acetaldehído sobre la constante $K_{1/2}$ del complejo enzima - rubidio.

Enzima disuelta en 3 ml de 0.015 N Tris, pH 8.0 en presencia de cisteína 0.001 M y DPN 0.44 mM, en concentraciones de URB variables. El acetaldehído fue agregado al final según se indica.

Cantidad de enzi - ma. (mg)	Concentra - ción de a - cetaldehído (μM)	Concentra - ciones de Rb^+ usadas (μM)	Actividad enzimática ($\frac{\text{ADP}}{\text{O}_2 \cdot 10^3}$) / min	$K_{1/2}$ ($\times 10^{-3}$) (método gráfico)
0.39	0.9	0.0010	25	1.7
		0.0033	37	
		0.01	56	
		0.1	66	
0.39	2.7	0.0010	34	2.2
		0.0033	72	
		0.01	97	
		0.1	104	
0.39	5.4	0.0010	41	3.1
		0.0033	86	
		0.01	150	
		0.1	133	
0.39	9.0	0.0010	43	3.7
		0.0033	92	
		0.01	168	
		0.1	167	

Figura 25

Influencia del potasio sobre la actividad enzimática a cuatro concentraciones de DPN.

Velocidad inicial: ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.14 mg. y acetaldehído 9×10^{-5} M. (K^+) y DPN en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Curva A: (K^+) 0.0005 M; curva B: (K^+) 0.001 M; curva C: (K^+) 0.005 M y curva D: (K^+) 0.05 M.

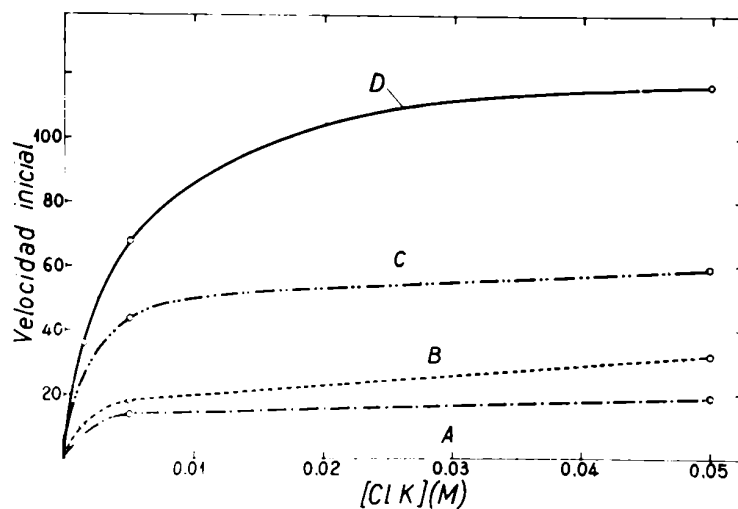


Figura 26

Influencia de la concentración de rubidio sobre la actividad enzimática a cuatro concentraciones de DFI.

Velocidad inicial: ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.24 mg. y acetaldehído 9×10^{-5} M. (Rb^+) y DFI en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Curva A: DFI 0.027 mM ; curva B: DFI 0.044 mM ; curva C: DFI 0.108 mM ; y curva D: DFI 0.44 mM.

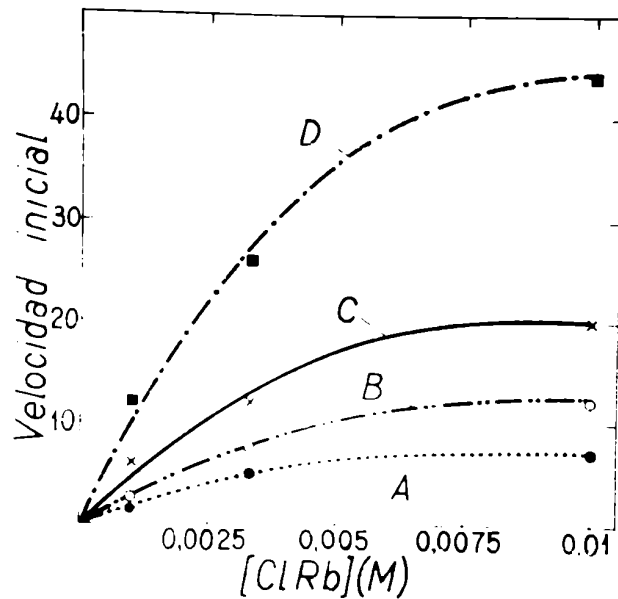
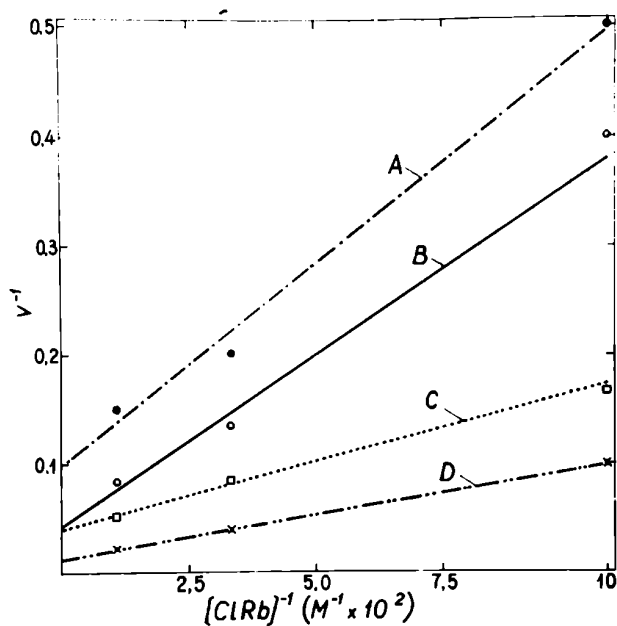


Figura 27

Influencia del rubidio sobre la velocidad inicial a cuatro concentraciones de DPE
(valores recíprocos).

v (velocidad inicial): $(\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.})$. Tris 0.015 M pH 8.0, cisteína 0.001 M, enzima 0.24 mg. y acetaldéhid 9 $\times 10^{-5}$ M. Rb^+ y DPE en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A: DPE 0.027 mM; línea B: DPE 0.044 mM; línea C: DPE 0.100 mM y línea D: DPE 0.44 mM.



En cambio , con el rubidio se obtienen rectas (Fig.27) que permiten el cálculo de la constante K_{Rb} de disociación del complejo enzima-rubidio, por la relación entre la pendiente y el valor de la ordenada en el origen . K_{Rb} no varió significativamente dentro de los límites estudiados (Tabla 10).

Si se representa las recíprocas de las velocidades máximas aparentes obtenidas en los experimentos anteriores, en función de la recíproca de la concentración de acetaldehído y DPN respectivamente se obtienen (Fig. 28) rectas. La relación entre la pendiente y la ordenada en el origen permiten calcular K_S y K_{DPN} y los valores hallados coinciden con los obtenidos directamente en los experimentos anteriores (activador K^+ : $K_S = 2.3 \times 10^{-5}$ y 2.0×10^{-5} ; activador : Rb^+ : $K_S = 2.8 \times 10^{-5}$ y $K_{DPN} = 3.1 \times 10^{-4}$).

DISCUSIÓN

Los experimentos de protección de los SH de la enzima de: Black por potasio y rubidio llevaron a la hipótesis de la existencia de un complejo -(cación activador-enzima). Esos complejos explicarían la acción activadora del potasio y el rubidio. Segal, Kachmaz y Boyer (5), y Alberty (6), han descrito , en base a una hipótesis semejante , la cinética de la activación enzimática por cationes, habiendo analizado los primeros con detalle, la activación de la pirúvico fosfoferasa por los iones potasio, rubidio y amonio.

Como lo demuestran las observaciones de Black, confirmadas en general por los resultados experimentales reseñados, el potasio y el rubidio y en menor grado el amonio ,son esenciales para la actividad de la aldehído deshidrogenasa de levadura. Las mínimas actividades observadas cuando no se añaden cationes, pueden atribuirse a la presencia de pequeñas cantidades de cationes, en particular amonio, restantes de la preparación de la enzima. La acción del potasio y el rubidio debe describirse entonces como la activación esencial de Segal y col. (5).

Varios mecanismos pueden proponerse para la acción de los activadores. Dos de ellos ,poco probables, serán analizados brevemente a continuación, para luego tratar el que coincide con nuestros resultados experimentales.

En primer lugar, la formación previa de un complejo acetaldehído-metal

Tabla 10.- Influencia del DPH sobre la constante K_{Rb^+} del complejo enzima - rubidio.

Enzima disuelta en 3 ml. de Tris 0.015 M, pH 8.0 en presencia de cisteína 0.001 M; DPH según se indica y concentraciones de GLB variables. El acetaldehído fue agregado al final en concentración 9.0×10^{-5} M.

Santidad de enzima. (mg)	Concentración de DPH (ml)	Concentraciones de Rb^+ usadas (M)	Actividad enzimática $(\frac{\Delta D_{340} \cdot 10^3}{\text{min}})$	$K_{Rb^+} (\times 10^{-3})$ (método gráfico)
		0.001	2.0	
0.024	0.027	0.0033	5.0	3.8
		0.01	6.3	
		0.001	2.5	
0.024	0.045	0.0033	7.5	3.2
		0.01	12.0	
		0.001	6.0	
0.024	0.108	0.0033	12.0	3.9
		0.01	20.0	
		0.001	12.0	
0.024	0.45	0.0033	26.0	7.5
		0.01	44.0	

Tabla 1.1.- Accion inhibidora del DPMI sobre la enzima de Black.

Enzima incubada con buffer de Tris, pH 8.0 con las adiciones indicadas durante 30 segundos. Se mide la actividad de 0.05 ml. del incubado*

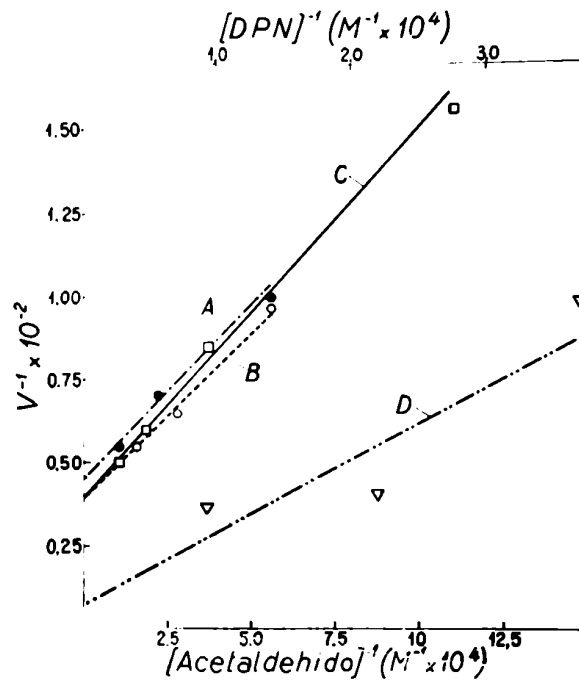
Canti- dad de enzima (μ g)	Adiciones	Relacion DPMI/DPI durante la medida	Actividad enzimatica (Δ D ₃₄₀ .10 ³ /min)	Inhibicion (%)
0.07	Ninguna	0	184	-
0.07	DPMI 0.06 ml	0.13	105	42.9
0.07	DPMI 0.018 ml	0.04	178	6.5
0.4	Ninguna	0	174	-
0.4	DPMI 0.045 ml	0.10	112	36.2
0.4	Ninguna	0	190	-
0.4	DPMI 0.036 ml	0.30	120	36.7

*) Al equilibrio se llego rápidamente.

Figura 20

Influencia de la concentración de acetaldehído (líneas A, B y C) y de DPN (línea D) sobre las velocidades máximas aparentes obtenidas para el potasio (líneas A y B) y para el rubidio (líneas C y D). (valores más cercanos).

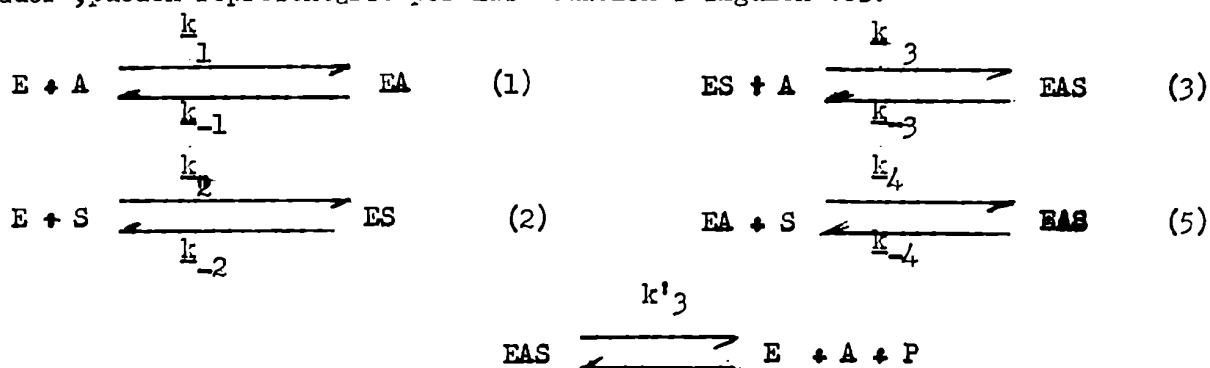
Valores calculados con los datos de las tablas 8, 9 y 10.



o DPN-metal, puede ser inmediatamente excluida. En efecto ella exige que la curva de velocidad en función de concentración de sustrato sea coincidente, para una concentración subóptima de activador, con la curva velocidad versus concentración del activador, para igual concentración del sustrato (5-7). Los resultados obtenidos no coinciden con ello.

En segundo lugar, y admitiendo condiciones de equilibrio, puede también excluirse la formación previa de un complejo binario enzima-metal o enzima-sustrato (acetaldehído o DPN) que pasa a complejo ternario por adición de sustrato o activador respectivamente. El hecho de que las ordenadas al origen y las pendientes de las familias de curvas correspondientes no sean las mismas, está en contra de ese mecanismo.

El mecanismo que mejor satisface nuestras observaciones, corresponde al descrito por Laidler y Socquet (8) para un sistema constituido por la enzima y dos sustratos que se adsorben en diferentes puntos de la superficie enzimática, sin competir entre sí, y donde la relación entre las concentraciones de los sustratos por una parte, y enzima por otra se supone grande. En el presente caso se considera que el activador se comporta como uno de los sustratos de acuerdo a la teoría desarrollada en casos análogos, por Segal, Kachmar y Boyer y Alberty. En condiciones de equilibrio los complejos de la enzima con el sustrato (coenzima o acetaldehído) y con el activador, pueden representarse por las ecuaciones siguientes:



en los que $K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}$ y $K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}}$ simbolizan el hecho de que la formación de uno de los complejos no afecta la formación del otro. En las ecuaciones descritas, k_1 , k_2 , k_3 y k_4 son constantes de velocidad de formación de los complejos respec-

tivos ; $k_{-1}, k_{-2}, k_{-3}, k_{-4}$ las correspondientes constantes de velocidad de descomposición y K_1, K_2, K_3, K_4 las constantes de disociación de los complejos.

La hipótesis lleva a la siguiente expresión de la velocidad inicial :

$$v = \frac{k'_3 [E]_0 [A] [S]}{K_A K_S + K_A [S] + K_S [A] + [A] [S]} \quad (1)$$

$$\frac{1}{v} = \left(\frac{K_A (K_S + [S])}{k'_3 [E]_0 [S]} \right) \frac{1}{[A]} + \frac{(K_S + [S])}{k'_3 [E]_0 [S]} \quad (2)$$

Donde v es la velocidad de la reacción enzimática ; k'_3 la velocidad de descomposición del complejo activo que condiciona la velocidad de la reacción ; $[E]_0$, la concentración de centros activos de enzima; K_A y K_S las constantes de disociación de los complejos enzima - activador y enzima-sustrato respectivamente y $[A]$ y $[S]$ las concentraciones de activador y sustrato respectivamente. Cuando $[S]$ es constante, esta expresión corresponde a una recta donde $1/v$ es función de $1/[A]$. La relación de la tangente sobre la ordenada al origen es K_A , independiente del valor de $[S]$, lo que coincide con nuestros resultados. La ordenada al origen que representa la inversa de la velocidad máxima aparente (V) resulta una función lineal de $1/[S]$ (ecuación 3)

$$\frac{1}{V} = \frac{K_S}{k'_3 [E]_0} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{k'_3 [E]_0} \quad (3)$$

La ordenada al origen de esta nueva recta representa la inversa de la velocidad máxima real de la reacción. La relación de la tangente sobre la ordenada al origen da K_S , como fuera observado en nuestros experimentos.

La ecuación (1) puede transformarse en la (4), que también representa una recta donde manteniendo $[A]$ constante, $1/v$ es una función lineal de $1/[S]$. La relación de la pendiente sobre la ordenada al origen da K_S , que es independiente de la concentración del activador.

$$1/v = \frac{K_S (K_A + [A])}{k'_3 [E]_0 [A]} \frac{1}{[S]} + \frac{K_A + [A]}{k'_3 [E]_0 [A]} \quad (4)$$

diente de la concentración del activador.

Los resultados obtenidos, satisfacen en general la ecuación (4). Las pe-

pequeñas variaciones observadas (estadísticamente no significativas) pueden atribuirse a acciones secundarias del potasio, tales como su efecto relativamente inhibitor por encima de la concentración 0.05 M. La velocidad máxima aparente obtenida de la ecuación (4) está dada por la ecuación (5) :

$$1/V = \frac{1}{[A]} + \frac{K_A}{k_3 [E]_0} + \frac{1}{k_3 [E]_0} \quad (5)$$

Y la recta que expresa $1/V$ en función de $1/[A]$ permite calcular K_A cuyos valores deben ser igual es a los obtenidos por el otro método, tal como ocurre en nuestras observaciones .

Los resultados obtenidos permiten calcular la relación entre ión activador y "centro activo" de la enzima. Cuando se representan recíprocas de actividad enzimática, en función de recíprocas de concentración de activador, se obtienen en general rectas, o sea que el exponente de la concentración del activador es 1. Ello indica que un equivalente de activador se une a cada centro activo de enzima.

Las ecuaciones deducidas, valen cualquiera sea la naturaleza de la sustancia que se tome como sustrato, es decir el acetaldehído o el DPN. En general, los resultados experimentales, satisfacen también esta premisa, si bien en los experimentos, donde las variables fueron el DPN y el potasio, la función tuvo desviaciones respecto a la recta, para pequeñas concentraciones de DPN. La importancia de este hecho está, sin embargo disminuida por la concordancia encontrada con rubidio en lugar de potasio. Considerando la protección de los tioles de la enzima por el potasio, la conducta anómala del mismo podría explicarse de la siguiente manera.

En la deducción cinética se supuso que la concentración de DPN era muy alta respecto a la de la enzima. Ello podría no ser cierto trabajando con bajas concentraciones de DPN. Si el DPN se uniese además a un sulfhidrilo inespecífico, la concentración eficaz podría ser aún menor. En estas condiciones el potasio al desplazar al DPN combinado a la proteína, pondría en libertad una cantidad suficiente del mismo para modificar la velocidad de la reacción e introducir una perturbación en la cinética del sistema.

Todos los resultados consignados, pueden también explicarse con otro mecanismo, admitiendo condiciones de flujo estacionario ("steady state ") (5).

En ese caso, la necesidad de formación del complejo enzima-metal activador previa a la adición del sustrato, daría una ecuación de la velocidad inicial que podría reproducir los resultados siempre que $k'_3 \approx k_{-1}$. Esta posibilidad puede excluirse en vista de los experimentos de protección con metales (v,s), en efecto, el hecho de que el K^+ fuera capaz de proteger los tioles indica que el ión activador puede unirse a la enzima en ausencia de acetaldehído o coenzima.

La necesidad de formación del complejo enzima-sustrato previa a la adición del metal, daría también una ecuación de la velocidad inicial congruente con los resultados siempre que $k'_3 \approx k_{-2}$. Esta situación es menos probable, y ninguna condición a priori permite suponer esa relación. Sin embargo no debe ser desdeñada como posibilidad, ya que como se vió en el capítulo anterior, la protección débil observada con acetaldehído frente a reactivos tiólicos podría no estar relacionada a la formación del complejo activo enzima-sustrato.

La necesidad de formación del complejo enzima-coenzima, previa a la adición del metal, puede excluirse vista la protección ejercida por el DPN en ausencia del metal activador.

CONCLUSIONES

- 1) Los iones potasio y rubidio aumentan la velocidad máxima aparente de oxidación del acetaldehído por la enzima de Black, sin afectar significativamente las constantes de Michaelis de los complejos enzima-acetaldehído y enzima-DPN. La recíproca de la velocidad máxima aparente es función lineal de la recíproca de la concentración de ión activador.
- 2) La velocidad máxima aparente de oxidación del acetaldehído por la enzima de Black aumenta con la concentración de acetaldehído, sin que varíe significativamente las constantes de Michaelis del DPN o de los iones activadores potasio o rubidio. La recíproca de la **velocidad máxima aparente de oxidación** es función lineal de la recíproca de la concentración de acetaldehído.
- 3) El DPN aumenta la velocidad máxima de oxidación del acetaldehído por la enzima

de Black sin afectar la constante de Michaelis del acetaldehído o del rubidio. La recíproca de la velocidad máxima aparente es función lineal de la recíproca de la concentración de DPK (excepto con potasio y baja concentración de DPK).

BIBLIOGRAFIA

- 1 Black S. Arch. Biochem. Biophys. , 34 36 (1951)
- 2 Lineweaver, H. y Burk, D.S. , Am. Chem. Soc., 56 658 (1934)
- 3 Crumpler T.D. y Yoe J.H. Chemical Computation and errors John Wiley
and Sons N.Y. (1940)
- 4 Theorell H. y Bonnichsen R. Acta Chem. Scand. 5 1105 (1951)
- 5 Segal H. , Kachmar J.F. y Boyer P. D. Enzimologia 15 187 (1952)
- 6 Alberty R.A. Adv. in Enzimology XVII , 2 (1956)
- 7 Kachmar J.F. y Boyer P.D. J. Biol. Chem. , 200 , 669 (1953)
- 8 Laidler K. J. y Socquet , I.M. J. Phys. and Colloid Chem. 54 530 (1950)

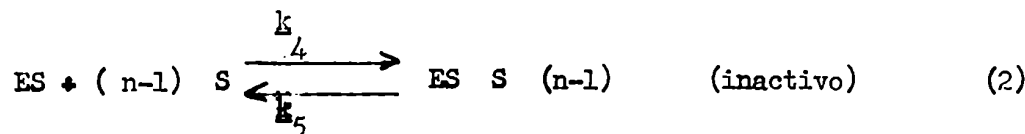
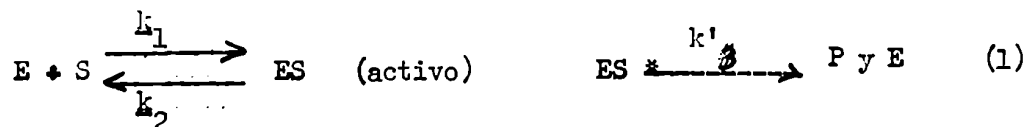
Capítulo VIII

REGIMEN DE BARRIOS COMO LA DEL ALDEHEDO DON PEDRO GONZALEZ

DE ENZENA (ENZENA DE BARRIO)

II) FORMACION DEL BARRIO ENZENA-SUCUMARO

El acetaldehído, por encima de una determinada concentración, inhibe la acetaldéhidó deshidrogenasa. Se admite desde el estudio clásico de Lineweaver y Burk (1) que es posible la formación de un segundo complejo enzima-sustrato catalíticamente inactivo, de donde, el exceso de acetaldehído se comporta como inhibidor de la enzima. Esto puede representarse por las ecuaciones siguientes:



La constante de disociación de este segundo complejo será por lo tanto:

$$K_{s_2} = \frac{(ES) (S)^{n-1}}{ES_n} \quad (3)$$

La ecuación (3) desarrollada en función de los valores correspondientes, lleva a la ecuación (4), donde \underline{n} es el número de moléculas de sustrato que se combinan con cada centro activo de la enzima y los demás símbolos tienen el significado establecido. Si se representa el término de la derecha en función de $\log (S)$, debe

$$\underline{n} \log S - \log \frac{K_{s_2} V}{V} = \log \left[\left(\frac{S}{V} \right) - \left(\frac{S}{V} \right) - \left(\frac{K_{s_2}}{V} \right) \right] \quad (4)$$

obtenerse una recta de pendiente \underline{n} y ordenada en el origen igual a $-\log \frac{K_{s_2} V}{V}$, de manera que conociendo \underline{V} , se puede calcular K_{s_2} . En las Fig. 1 y 2 se reseñan experimentos de oxidación de acetaldehído, con potasio y rubidio como activadores, cuyos resultados satisfacen la ecuación (4). En la tabla 1 se encuentran los valores hallados para \underline{n} y K_{s_2} que son aproximadamente 2.0 y 0.94×10^{-3} M. La temperatura, si bien constante para un mismo experimento, varía ligeramente en experimentos realizados en diferentes días. Apesar de ello los resultados obtenidos concuerdan satisfactoriamente con la teoría postulada.

De acuerdo con los valores obtenidos experimentalmente, para una concentración de DPN 0.44mM, el máximo de actividad está ubicado aproximadamente en 9.0×10^{-5} M de acetaldehído, desplazándose progresivamente hacia menores concen-

Figura 1

Representación gráfica de $-\log \left(\frac{[S]}{v} - \frac{K_s}{V} - \frac{[S]}{V} \right)$ en función de $-\log [S]$

Determinación de Lineweaver y Burk de n , número de moléculas de sustrato que forman con la enzima el complejo inactivo y K_{s2} constante de disociación del complejo inactivo. Activador potasio; K_s constante de Michaelis; V velocidad máxima y v velocidad inicial ($\Delta D_{340} \times 10^3 / \text{min.}$). Tris 0.015 M pH 7.9; cisteína 0.001 M y $[K^+]$ 0.05 M. Acetaldehído, DPN y enzima en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml. Línea A: DPN 0.027 mM y enzima 0.086 mg.; línea B: DPN 0.132 mM y enzima 0.086 mg; línea C: DPN 0.44 mM y enzima 0.086 mg. y línea D: DPN 0.44 mM y enzima 0.14 mg.

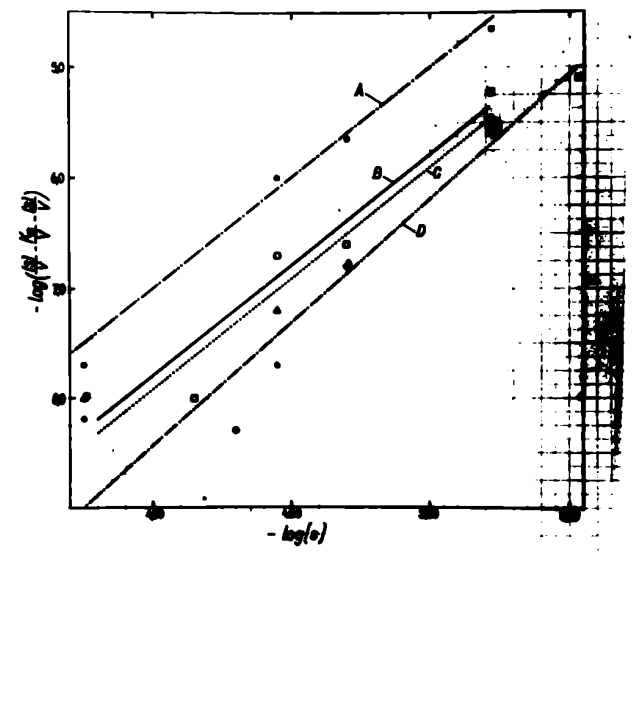


Figura 2

Representación gráfica de $-\log \left(\frac{[S]}{v} - \frac{K_s}{V} - \frac{[S]}{V} \right)$ en función de $-\log [S]$.

Determinación según Lineweaver y Burk de n, número de moléculas del sustrato que forman con la enzima el complejo inactivo y K_{s2} constante de disociación del complejo inactivo. Activador rubidio; K_s constante de Michaelis; V velocidad máxima; v velocidad inicial ($\Delta D_{340} \times 10^3/\text{min.}$). Tris 0.015 M pH 8.0 ; cisteína 0.001 M, [Cl₂O] 0.01 M, DEN 0.44 ml y enzima 0.39 mg. Acetaldehído en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3ml.

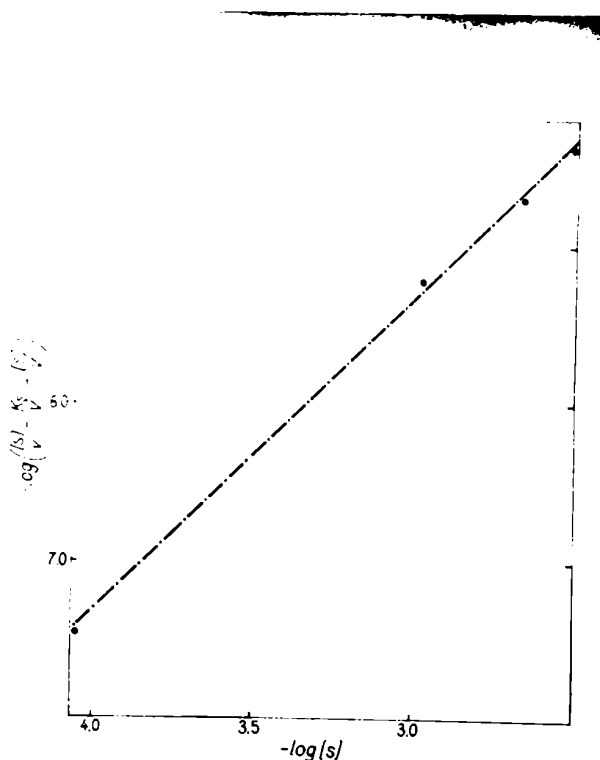


Tabla 1.- Número de moléculas de acetaldehído y valores de la constante K_{s2} del complejo inactivo acetaldehído deshidrogenasa-acetaldehído n.

Enzima en 3 ml de agua 0.015 M, pH 7,9 en presencia de cisteína 0.001 M con DPH según se indica y 0.05 M de (K^+) (exp. A, B, C, D y E) y (Rb^+) 0.01 M (exp G). El acetaldehído se agregó al final según se indica.

Expe- ri- mento	Canti- dad de enzima (mg)	Concentra- ción de DPH (ml)	Concentracio- nes de acetal- dehído usadas ($M \cdot 10^{-5}$)	Actividad enzimática ($\frac{10^{10} \cdot 10^3}{\text{min}}$)	Nº de molo- culas de acetaldehído (n)	K_{s2} ($\cdot 10^{-3}$)
A	0.036	0.027	1.8	13	2.0	0.4
			9.0	17		
			16.0	17		
			53.0	13		
B	0.036	0.132	1.8	43	2.0	1.1
			4.5	50		
			9.0	47		
			16.0	49		
C	0.036	0.44	1.8	67	2.0	0.94
			9.0	34		
			16.0	34		
			53.0	55		
D	0.14	0.44	1.8	39	2.2	0.4
			6.3	137		
			9.0	143		
			16.0	136		
E	0.28	0.44	1.8	93	1.9	0.8
			9.0	170		
			16.0	147		
			53.0	98		
G	0.39	0.44	9.0	160	2.0	0.8
			106.0	100		
			213.0	75		
			319.0	45		

traciones al disminuir el DPN.

La divergencia con el valor observado por Black (2) que para una concentración semejante de DPN, obtiene el máximo de actividad con acetaldehído $17 \times 10^{-5} M$, puede atribuirse a que nosotros hacíamos lecturas cada 15 segundos en lugar de cada 30, de manera que nuestras observaciones reflejan más exactamente la velocidad inicial cuando la concentración de acetaldehído es $9.0 \times 10^{-5} M$ o menor, pues entonces la curva de actividad tiende a la parábola muy rápidamente, dificultando la precisión de la medida de la velocidad inicial.

Si la ecuación de Michaelis se corrige respecto a la segunda molécula de acetaldehído se obtiene (1) la ecuación (5);

$$(S)/y = \frac{K_s}{V} + \left[(S) + (S)^n / K_{s_2} \right] / V \quad (5)$$

Representando $(S) / y$ en función de $\left[(S) + (S)^n / K_{s_2} \right]$ se tiene una recta de pendiente $1/V$ y ordenada al origen K_s / V que permite recalculer K_s . Esto se ha hecho en la Fig. 3, para el experimento anterior, obteniendo un $K_s = 6.95 \times 10^{-5} M$ para DPN 0.027 ml y 0.132 ml y $K_{s_2} = 1.68 \times 10^{-5} M$ para DPN 0.44 ml.

Tomando el valor medio de estas determinaciones para K_s y el valor correspondiente a DPN 0.44 ml de $K_{s_2} = 0.94 \times 10^{-3} M$, se calcularon las cantidades relativas de cada uno de los complejos enzima acetaldehído de acuerdo al siguiente desarrollo: $K_s = [S][E] / [ES]$, de donde,

$$K_s / [S] = [E] / [ES] \text{ y } [ES] / ([E] + [ES]) = [S] / (K_s + [S]) \quad (6)$$

Es posible hacer así una curva en la que se representa la proporción de complejo enzima sustrato activo en función de la concentración de sustrato supuesta la no formación del segundo complejo. (Fig. 4 curva A). La cantidad relativa de enzima presente en el segundo complejo se calcula teniendo en cuenta que:

$$K_{s_2} = [ES][S] / [ES_2]; \quad K_{s_3} = K_{s_2} \cdot K_s = [E][S]^2 / [ES_2]$$

$$([ES_2] + [E]) / [ES_2] = (K_{s_3} + [S]^2) / [S]^2$$

y sumando m.a.m.

Figura 3

Influencia de la concentración de acetaldehído (corregida por la formación del complejo inactivo) sobre la velocidad inicial a tres concentraciones de DFI.
 v , velocidad inicial ($\Delta D_{340} \cdot 10^3 / \text{min}$); n , número de moléculas que forman el complejo inactivado. K_{S_2} , constante del complejo inactivo. Tris 0.015 M pH 7.9; cisteína 0.001M; (K^+), 0.05 M y enzima 0,036 ng. Acetaldehído y DFI en las concentraciones indicadas. Volumen final, 3 ml.

Línea A: DFI 0.027 mM ; Línea B: DFI 0.132 mM y línea C: DFI 0,44 mM.

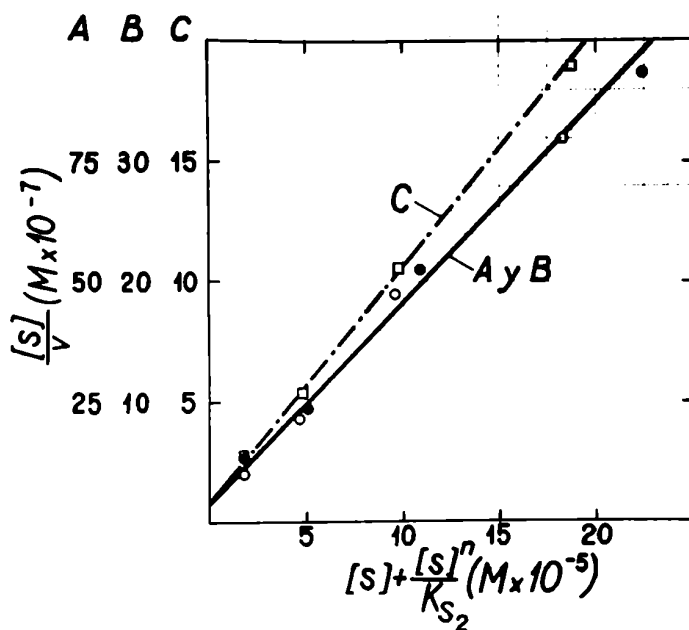
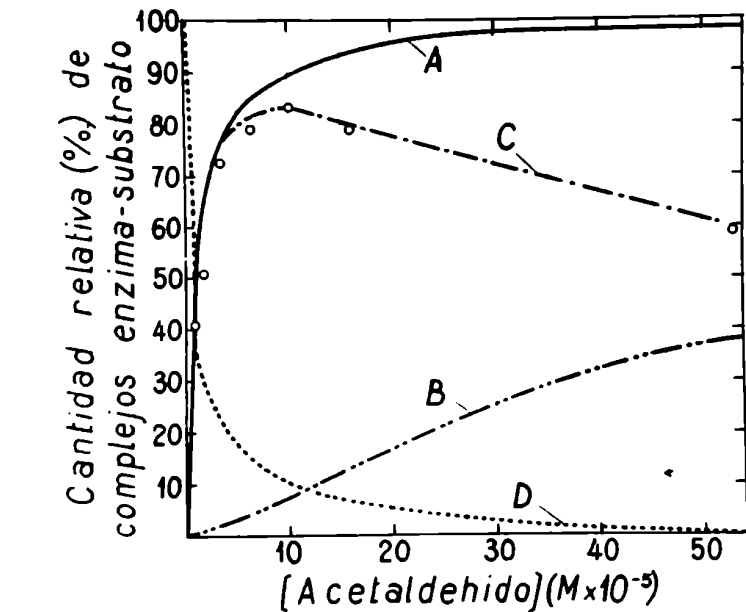


Figura 4

Influencia del acetaldehído sobre la cantidad relativa calculada de complejos enzima-sustrato.

Curva A: cantidad relativa del compuesto enzima-sustrato sin formación del complejo inactivo. Curva B: cantidad relativa del complejo inactivo. Curva C: (curva A - curva B) cantidad real del compuesto activo. Curva D: cantidad relativa de enzima libre. Los puntos marcados indican la actividad relativa en función de la concentración de sustrato, resultado de uno de los experimentos realizados.



$$\frac{K_{s_2}}{[S]} = [S] / [ES_2]$$

se obtiene

$$(K_{s_3} + [S]^2) / [S]^2 + K_{s_2} / [S] = ([ES_2] + [E] + [ES]) / [ES_2]$$

y finalmente :

$$[ES_2] / ([E] + [ES] + [ES_2]) = [S]^2 / (K_{s_3} + K_{s_2} [S] + [S]^2) \quad (7)$$

Con lo que la cantidad relativa de enzima presente en la forma del segundo complejo puede representarse gráficamente en función de la concentración de sustrato (Fig.4 , curva B).

La cantidad de enzima presente en forma de complejo activo es la resultante de la diferencia de las curvas A y B (Fig. 4, curva C), cuya ecuación puede obtenerse en forma semejante a la anterior.

$$([S] + \frac{K_{s_2}}{[S]}) \frac{K_{s_2}}{[S]} + \frac{K_{s_3}}{[S]} / [S] = ([ES_2] + [ES] + [E]) / [ES] \quad (8)$$

$$[ES] / ([E] + [ES] + [ES_2]) = [S] \frac{K_{s_2}}{[S]} / ([S]^2 + K_{s_2} [S] + \frac{K_{s_3}}{[S]})$$

Puede verse que cuando el sustrato se hace mínimo $[S]^2$ tiende a cero y dividiendo el numerador y denominador del segundo miembro por K_{s_2} y considerando que $[ES]_2$ se hace despreciable respecto de $[E]$ y $[ES]$ resulta:

$$[ES] / ([E] + [ES]) = [S] / ([S] + \frac{K_{s_2}}{[S]}) \text{ que coincide con la ecuación (6).}$$

Por otra parte el segundo miembro de la ecuación (3) puede escribirse así :

$\frac{K_{s_2}}{[S]} / ([S] + \frac{K_{s_2}}{[S]} + \frac{K_{s_3}}{[S]})$ cociente que tiende a 0 cuando $[S]$ tiende a infinito, formándose solo el segundo complejo. Podemos escribir en forma general que siendo la velocidad de formación de los productos

$$V = k'_2 (ES)$$

será reemplazado (ES) por un valor hallado en (8)

$$V = k'_2 [E]_0 \cdot [S] \frac{K_{s_2}}{[S]} / ([S]^2 + K_{s_2} [S] + \frac{K_{s_3}}{[S]})$$

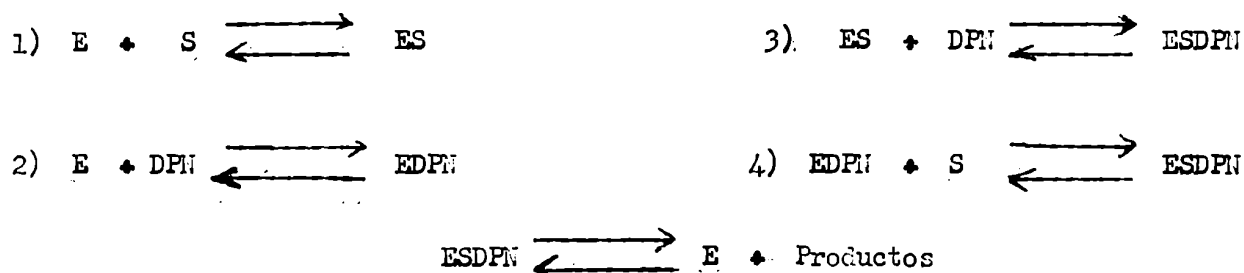
en que $[E]_0$ es la concentración de enzima agregada . Haciendo $k'_2 [E]_0 = V$ y reor-

Finalmente puede obtenerse la cantidad relativa de enzima libre. (Fig. 4. curva D) restando a 100 % (enzima total) las cantidades correspondientes a la enzima unida a sustrato en el primer complejo (curva C) y en el segundo complejo (curva B). El máximo de la curva C corresponde a un entorno $8.0 - 9.0 \times 10^{-5} M$ de acetaldehído aproximadamente, coincidiendo con los resultados obtenidos experimentalmente.

DISCUSION

Los resultados experimentales reseñados completan la cinética de la activación del acetaldehído por la acetaldehído deshidrogenasa de levadura. Es conveniente ahora efectuar un análisis general de este proceso, en forma similar al análisis de la activación por metales realizados en el capítulo anterior. En el análisis cinético de la activación del acetaldehído se tomaron datos experimentales de este capítulo y del precedente.

La cinética de la oxidación del acetaldehído en función de la concentración de coenzima puede desarrollarse de la siguiente manera (ver Alberty (3), Segal Kachmar y Boyer (4) y Ingraham y Markower (5)). Si se considera el sistema en condiciones de equilibrio el mecanismo más plausible consiste en suponer la formación de un complejo ternario por adición de sustrato y coenzima en forma independiente.



Si se supone que la presencia de DPN, no influye en la unión del sustrato y viceversa, este mecanismo lleva a una ecuación de la velocidad inicial semejante a la propuesta por Laidler y Soquet (6) para dos sustratos adsorbidos en dos sitios enzimáticos y que no compiten entre sí

$$v = \frac{V}{(1 + K_s[S]) (1 + K_{DPN}[DPN])}$$

La constante aparente de Michaelis en este caso coincide con la constante de Michaelis verdadera para sustrato y para coenzima y es por lo tanto independiente de las concentraciones de coenzima o sustrato respectivamente.

La inversa de la velocidad máxima aparente es una función lineal de la inversa de la concentración de DPN o sustrato.

$$1/V_{\text{DPN}} = \frac{1}{V} + \frac{K_{\text{DPN}}}{V} \frac{1}{(\text{DPN})} \quad 1/V_{\text{S}} = \frac{1}{V} + \frac{K_{\text{S}}}{V} \frac{1}{(\text{S})}$$

Los valores de la pendiente sobre el valor de la ordenada en el origen reproducen las respectivas constantes de Michaelis.

b) Si se supone el sistema en estado de flujo estacionario ("steady state")

La formación previa de un complejo enzima sustrato o enzima coenzima, con formación o no de un complejo ternario previo a la descomposición en productos, el tratamiento cinético lleva a la fórmula de la velocidad inicial:

$$v = \frac{V}{1 + K'/(\text{S}) + K''/(\text{DPN}) + K'''/(\text{S})(\text{DPN})}$$

en la que K' , K'' y K''' son constantes que toman distintos valores según se forma el complejo enzima sustrato o enzima DPN primero y según sea el posterior proceso de formación eventual del complejo ternario y la forma de descomposición del mismo (3-4).

Las constantes respectivas de Michaelis serán pues:

$$K_{\text{S}} = \frac{K' + K'''/(\text{DPN})}{1 + K''/(\text{DPN})} \quad K_{\text{DPN}} = \frac{K'' + K'''/(\text{S})}{1 + K'/(\text{S})}$$

K''' podría tomar un valor numérico tal, que fuera $K''' = K' \times K''$ en cuyo caso K_{S} y K_{DPN} serían otra vez constantes de Michaelis verdaderas e independientes de la concentración de sustrato o de DPN respectivamente. Aún no siendo cierta la igualdad anterior, la diferencia podría no ser suficientemente significativa, como para que puedan observarse variaciones de las respectivas constantes aparentes de Michaelis. En cuanto a las velocidades máximas, también se obtendría una función lineal de sus inversas, respecto a la inversa de la concentración de sustrato o DPN.

En resumen , si se admiten las condiciones de equilibrio , los resultados experimentales referidos en el capítulo anterior y en el presente, satisfacen la teoría de formación desordenada del complejo ternario. Si se considera el sistema en estado de flujo estacionario también pueden explicarse los resultados obtenidos por la formación obligada de un complejo enzima-sustrato (acetaldehído o DPN), ulteriormente transformable en el respectivo complejo ternario, siempre que algunas constantes de velocidad se igualen , dentro de ciertos límites.

El hecho de que la coenzima ($V - S$) protege al SH en ausencia de acetaldehído nos permite afirmar que la formación del compuesto enzima-acetaldehído no es condición previa a la unión de la coenzima y excluir esta posibilidad cinética. Sobre la formación del compuesto enzima coenzima previa a la adición del acetaldehído en cambio nada podemos afirmar, dado que el acetaldehído podría actuar como protector independientemente de su acción como sustrato (ver capítulo V).

La forma de la curva de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato con su máximo característico puede explicarse por la formación de dos compuestos enzima-sustrato. El primero, activo, está constituido por una molécula de acetaldehído por cada centro activo de enzima , el segundo inactivo , por dos moléculas de acetaldehído por centro activo de enzima . La inactividad del segundo complejo es difícil de explicar; por el momento, considerando la alta reactividad del acetaldehído, es posible que la segunda molécula se una a la enzima en el centro activo o en sus mediaciones e interfiera el transporte de electrones a la coenzima. Ello podría estar en relación con la protección de los tioles de la enzima , estrechamente vinculados a la coenzima.

En el capítulo anterior se comprobó que según la concentración de DPN varía la concentración de acetaldehído que da la actividad enzimática máxima. Varias explicaciones pueden proponerse para el efecto del DPN . El DPN podría a) aumentar el valor de K_s de manera que cuando aumenta el DPN debe aumentar la concentración de acetaldehído para mantener igual actividad; b) aumentar K_{s_2} disminuyendo así la concentración del complejo inhibidor ES_2 . El máximo de actividad se corre hacia las mayores concentraciones de acetaldehído; c) modificar la concentración efectiva

de acetaldehído. Dos condiciones deben cumplirse en este último caso, a saber: 1) que la cantidad de sustrato no sea muy grande respecto a la enzima, y 2) que la formación del complejo enzima-acetaldehído se realice a través del DPN. En esas condiciones, con bajas concentraciones de acetaldehído, si crece la concentración de DPN, parte del acetaldehído se une con éste y la enzima para formar el complejo activo; disminuye entonces el acetaldehído utilizable en la formación del complejo ES_2 que inhibe la actividad enzimática.

Por el momento no hay argumentos positivos en favor de cualquiera de los mecanismos propuestos. Los resultados obtenidos en el capítulo anterior no demuestran (dentro del error experimental) variación de K_s en función de la concentración de DPN, lo que permitiría excluir el mecanismo a); las variaciones K_{s2} en función de la concentración de DPN, descritas en este capítulo, no son sistemáticas y dado el error alto introducido en su evaluación por la suma de los errores parciales de la medida, lo más probable es que esas variaciones no sean significativas. No existe ningún argumento en favor de la hipótesis c) si bien conviene señalar que la unión de enzima y sustrato a través de la coenzima ha sido sugerida por Kaplan y Ciotti (7) y Burton y Kaplan (8) para la alcohol deshidrogenasa y por Terayama y Vestling (9) para la láctico deshidrogenasa. Todo ello hacen necesarios nuevos estudios con preparaciones más purificadas y con medidas más precisas de las constantes.

CONCLUSIONES

- 1) La DPN aldehído deshidrogenasa de levadura forma dos complejos con el acetaldehído. Una y dos moléculas de acetaldehído se combinan con cada centro activo de enzima, en el primero y segundo complejo, respectivamente.
- 2) El complejo que contiene una molécula de acetaldehído por centro activo es catalíticamente activo, mientras que el que tiene dos es inactivo e inhibe a la enzima. La existencia del segundo complejo explica el máximo que presenta la curva de actividad en función de la concentración de sustrato.
- 3) Se discute la influencia de la concentración de DPN sobre la concentración óptima de acetaldehído para la actividad de la enzima.

BIBLIOGRAFIA

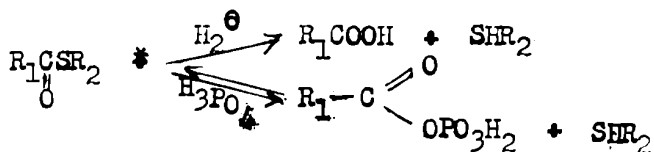
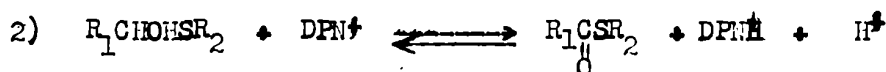
- 1 Lineweaver H., y Burk, D. J. Am. Chem. Soc. 56 658 (1934)
- 2 Black S., Arch. Biochem. Biophys. 34 36 (1951)
- 3 Alberty R.A., Adv. in Enzymology XVII, 2 (1956)
- 4 Segal, H. Kachmar J.F. y Boyer, P.D. Enzymologia, 15 137 (1952)
- 5 Ingraham L.L. y Markower B.J. J. Phys. Chem. 58, 266 (1954)
- 6 Laidler, K.S. y Socquet I.M., J. Phys. and Colloid Chem., 54 530 (1950)
- 7 Kaplan N.O. y Ciotti M.M. J. Biol. Chem. 211 431 (1954)
- 8 Burton R.M. y Kaplan N.O. J. Biol. Chem. 211 447 (1954)
- 9 Terayama H. y Vestling C.S. Biochem. Biophys. Acta. 20 587 (1953)

Capítulo

MECANISMO DE OXIDACION DEL ACETALDEHIDO A ACIDO ACETICO

DISCUSION GENERAL

La oxidación del acetaldehído, puede ser realizada por diversas vías y a través de distintos sistemas enzimáticos; en la introducción hemos realizado una reseña detallada de los estudiados hasta el presente. Entre esos sistemas enzimáticos hay un grupo que utiliza DPN y TPN como coenzima y como resultado de la oxidación, produce ácido acético. En ellos no pudo demostrarse hasta el presente la formación intermedia de acil derivados (1, 2, 3, 4,). Racker, sin embargo (4) los agrupa como "tiohemiacetal deshidrogenasas" junto a sistemas como la aldohído deshidrogenasa del Cl. Kluyveri y E. Coli. (5,6). El mecanismo general de acción sería el siguiente:



Puntualiza que "cuando el SH de la enzima participa en la reacción y no se necesitan compuestos tiólicos libres, la evidencia de la participación de un tiohemiacetal es difícil de obtener".

Creemos que los resultados obtenidos por nosotros, son suficientes para desechar esa argumentación. Si la hipótesis de Racker fuera cierta, el sustrato tendría que ser capaz de preservar a la enzima en forma efectiva de la acción inhibitoria de los reactivos tiólicos.

En las tres enzimas ensayadas, dos de levadura y la tercera de hígado de vacuna, se ha demostrado la presencia de sulfhidrilos esenciales; en ningún caso el acetaldehído fué capaz de una protección general frente a todos los reactivos de tioles. Sólo frente a algunos la acción protectora del sustrato sobre la enzima de hígado fué suficientemente significativa. En cambio los resultados obtenidos con DPN y TPN acetaldehído deshidrogenasas de levadura, son bien concluyentes, especialmente si se toma en cuenta los valores de la constante de Michaelis del complejo enzima-sustrato. En efecto, $K_s \approx (k_2 + k_3) / k_1$; Para que K_s sea pequeño (1×10^{-5} en

la DPN acetaldehído deshidrogenasa (v.i.) y 3.5×10^{-5} en la TPN acetaldehído deshidrogenasa (3)), debe ser $k_2 + k'_3 \ll k_1$. Aún cuando k'_3 fuera despreciable respecto de k_2 , tendría que ser $k_2 \ll k_1$ y por lo tanto el equilibrio de la ecuación de formación del hemiacetal, estar netamente desplazado hacia el complejo. Las concentraciones de reactivos de tioles, fueron usadas en cantidades tales que dieran inhibición por debajo del 100 % (en general del orden del 70 %) y por lo tanto es evidente que la presencia de relativamente altas concentraciones de acetaldehído debieron tener un efecto visible. El hecho de que las coenzimas, cuyos K_{DPN} y K_{TPN} son de un orden igual o mayor (10^{-4} para DPN acetaldehído deshidrogenasa (v.i.) y 10^{-5} para TPN acetaldehído deshidrogenasa (3)) dieron siempre protección frente a todos los reactivos, refuerza esta argumentación indicando que la relación de un SH de la proteína y el sustrato, difícilmente pueden tener el mismo significado que el atribuido a la relación entre SH y la coenzima. Respecto a la DPN acetaldehído deshidrogenasa, debemos agregar que hemos podido reemplazar los tioles imprescindibles por *veroseno*, sin pérdida de actividad y por histidina, aunque en este caso a costa de gran parte de la actividad lo cual no condice con la hipótesis de formación de un tiohemiacetal intermedio.

Los resultados obtenidos hasta ahora en lo referente a la oxidación de aldehídos no parecen ser muy decisivos como para poder generalizar su proceso.

Quizá sea la unión de la coenzima a la enzima la única generalización acorde con todos los resultados. Efectivamente, los distintos requerimientos de cada una de las deshidrogenasas, tanto en lo referente a tioles agregados, como a metales activadores, el distinto comportamiento del acetaldehído en la protección de los sulfhidrilos, y el distinto comportamiento de los metales activadores en la acción protectora, tienden a mostrar diferencias antes que semejanzas. Sin embargo esas diferencias es posible que se refieran a ciertos detalles del mecanismo, que no obstaculizarían a una formulación de tipo general. El primer indicio de ello lo daría la formación de un compuesto enzima - coenzima, que hemos ya supuesto se realizaría a través de un sulfhidril o.

Los experimentos cinéticos realizados con la enzima de Black nos llevarían a dos posibilidades respecto a la acción del acetaldehído. La primer posibilidad (Laidler) sería que los compuestos binarios enzima acetaldehído y enzima coenzima se formaran independientemente, prevaleciendo para el sistema condiciones de equilibrio (descomposición muy lenta o nula de complejos binario o ternario en enzima y productos), o con el complejo ternario en equilibrio y los otros en estado de flujo estacionario ("steady state"), requiriéndose en tal caso coincidencia en algunas constantes. Estos compuestos binarios formarían a su vez el complejo ternario, uniéndose al sustrato o la coenzima a igual velocidad que la enzima libre. Este segundo paso, sin embargo, podría diferir, quedando bloqueada la unión de uno de ellos por la del otro. En tal caso prevalecerían condiciones de equilibrio parcial por parte de uno de los complejos binarios y del complejo ternario(15).

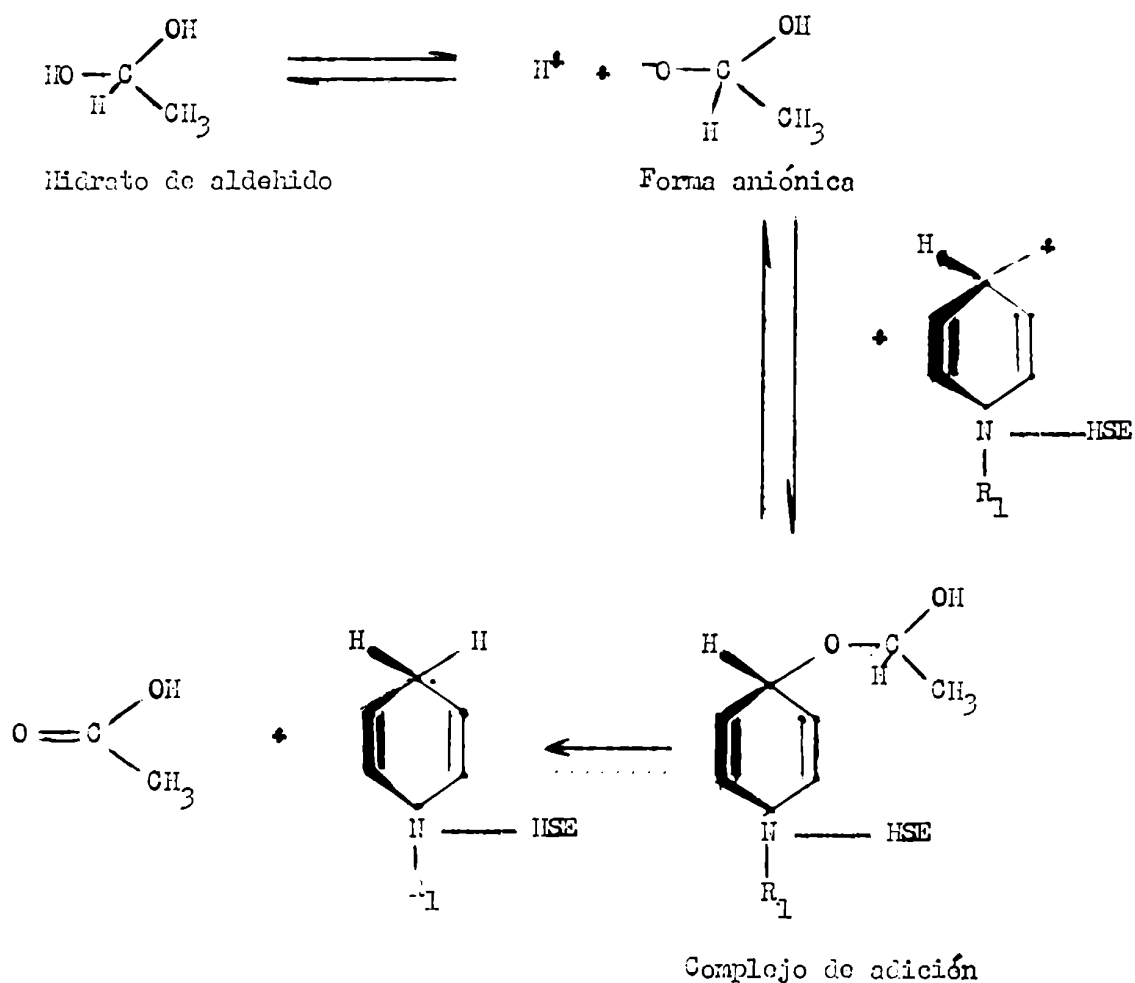
La formación del complejo ternario podría involucrar condiciones favorables para el traspaso del hidrógeno o del acetaldehído a la coenzima, como lo proponen Vennesland, Westheimer y col. (7, 8, 9).

La segunda posibilidad, que requiere condiciones de flujo estacionario y coincidencia en algunas constantes, sería que el acetaldehído se uniese al compuesto enzima DPN, por ejemplo a través del DPN, en forma semejante al que proponen Kaplan y col. (10,11) para explicar la oxidación del alcohol por la alcohol deshidrogenasa. Terayama y Westling (12), sugieren un mecanismo semejante para la láctico deshidrogenasa.

En la figura 1 hemos esquematizado el proceso. En un primer paso la forma aniónica del hidrato de aldehído se uniría al compuesto enzima - DPN a través de este último. Al respecto cabe señalar que Bell y col. (14) encontraron que el acetaldehído en agua a temperatura ambiente está hidratado en un 60 % aproximadamente; los autores sugieren la posibilidad de que dicho hidrato esté en equilibrio con su forma aniónica en soluciones de pH alto, como es nuestro caso.

Figura 1

Mecanismo hipotético de oxidación del acetaldehído. Los detalles se describen en el texto. De acuerdo a las investigaciones de Pullman y col. (13) con D, la reducción del anillo piridinico se indica en posición para. El dibujo se hizo en forma espacial, en vista de los resultados obtenidos en estudios con D (7, 8, 9).-



BIBLIOGRAFIA

- 1 Racker, E., J. Biol. Chem. 177 , 883 (1949)
- 2 Black, S., Arch. Biochem. Biophys. 34 , , 86 (1951)
- 3 Seegmiller, J.E., J. Biol. Chem. 201 , 629 (1953)
- 4 Racker, E. , Physiological Reviews 35 , 1 (1955)
- 5 Burton, R.M. y Stadtman, R.E., J. Biol. Chem. 202 , 873 (1953)
- 6 Pinchott, G. B. y Racker, E. en Phosphorus Metabolism Vol. I (Mc.Elroy and Glass) 1951
p 366
- 7 Fischer, H.F.; Conn, E.E.; Vennesland, B. y Westheimer, F.H., J. Biol. Chem. 202
687 (1953)
- 8 Loewus, F.A., Ofnor, P., Fischer, H.F., Westheimer, F.H. y Vennesland, B., J. Biol. Chem.
202 699 (1953)
- 9 Vennesland, B. y Westheimer, F.H. en The Mechanism of Enzyme Action (Mc.Elroy and
Glass) Balt. 1954
- 10 Kaplan, H.O. y Ciotti, M.M., J. Biol. Chem. 211 , 427 (1954)
- 11 Burton, R.M. y Kaplan, H.O., J. Biol. Chem. 211 , 147 (1954)
- 12 Torayama, H y Vestling, C.S., Biochim. et Biophys. Acta 20 , 587 (1956)
- 13 Pullman, M.E., San Pietro, A. y Collowick, S.P., J. Biol. Chem. 206 , 129 (1954)
- 14 Bell, R.P., Rand, M.H. y Wynne Jones, K.M.A., Trans. Faraday Soc. 52 , 1093
(1956)
- 15 Laidlor, K.J., Trans. Faraday Soc. 52 , 1374 (1956)

A p é n d i c e I

CONSTANTES CINETICAS DE LA DPL ALDHEDO DES. IDROGENASA

DE LLEVADURA (ENZIMA DE BLACK)

Los experimentos cinéticos realizados con la DPH acetaldéhidó deshidrogenasa de levadura (Black), fueron realizados con el principal propósito de determinar las variaciones de la constante de Michaelis para distintas condiciones experimentales. Las mismas fueron realizadas a temperatura ambiente; por ello y por las dificultades particulares que presenta y a las que oportunamente nos hemos referido, los valores determinados están afectados de errores bastante groseros. A pesar de ello, dado que no hay antecedentes de estos datos, creemos de interés agruparlos.

Se ordenan a continuación, las constantes de los complejos que la enzima de Black forma con el sustrato, la coenzima y los cationes activadores, determinadas en condiciones de óptima actividad. Mayores detalles se encontrarán en el capítulo VIII

Tabla N°	Acti- va- dor	$K_s (\times 10^{-5})$	Tab- la N°	Acti- va- dor	$K_{DPH} (\times 10^{-4})$	Tab- la N°	$K_K (\times 10^{-3})$	Tab- la N°	$K_{Rb} (\times 10^{-3})$
2	K ⁺	1.83 ± 0.3	4	K ⁺	2.1 ± 0.3	8	1.7 ± 0.27	9	3.7
2	K ⁺	1.06 ± 0.16	4	K ⁺	4.2 ± 1.9		2.6 ± 0.6	9	7.5
*	K ⁺	1.06	6	K ⁺	1.4 ± 0.1				
			6	K ⁺	2.7 ± 0.2				
3	Rb ⁺	1.7 ± 0.4							
3	Rb ⁺	3.1 ± 0.6	5	Rb ⁺	1.5 ± 0.5				
3	Rb ⁺	1.2 ± 0.25	5	Rb ⁺	2.6 ± 1.1				

* Obt enido según se detalla en el capítulo VIII Fig. 3.

La constante de Michaelis para el acetaldéhidó usando DPH como coenzima, es pues aproximadamente igual o quizá algo menor a la hallada por Seegmiller (1) para la TPI acetaldéhidó deshidrogenasa (3.5×10^{-5}) y algo menor a la determinada por King y Cholding (2) para la acetaldéhidó deshidrogenasa de Acetobacter suboxidans con TPI como coenzima (9.8×10^{-5}) o con DPH (12.8×10^{-5}). A pesar de cierta diferencia, los resultados en los tres casos son del mismo orden aproximadamente.

El K_{DPH} resultó muy parecido al K_{TPI} determinado por King y Cholding para

la enzima de Acetobacter suboxidans (1×10^{-4}) y algo menor que el K_{DFH} (3.6×10^{-3}) (2). Fué en cambio sensiblemente mayor que el K_{TPH} determinado por Seegriller para la TPH acetaldéhidado deshidrogenasa ($1,4 \times 10^{-5}$) (1).

Las determinaciones fueron hechas aplicando cuadrados mínimos a la recta $[S]/v$ en función de $[S]$, $1/v$ en función de $1/[DFH]$ y $1/v$ en función de $1/[K^*]$ excepto el tercer valor de K_s que se calculó del gráfico S/v en función de $[S] + [S]^2/K_{s2}$. Finalmente los valores de K_{nb} fueron calculados gráficamente como ya aclaramos oportunamente.

En las tab las correspondientes hemos anotado los valores de las constantes calculadas por varios métodos. Creemos oportuno señalar algunas consideraciones que pueden deducirse de la comparación de dichos resultados ya que por lo general los autores eligen el método a usar sin que pueda compararse resultados obtenidos por distintos métodos de cálculo. La importancia de las diferencias puede verse claramente demostrada por el hecho de que con iguales datos hemos obtenido resultados que difirieron entre sí comúnmente en un 30-40% llegando raramente a diferencias mayores. No hemos hallado por otra parte diferencias de tipo sistemático en el método gráfico usando la representación $[S]/v$ en función de $[S]$ o $1/v$ en función de $1/[S]$; las diferencias fueron indistintamente en uno u otro sentido. En cuanto al método de cuadrados mínimos, mucho más laborioso, sólo estuvo justificado por que el orden de las diferencias observadas fué pequeño.

BIBLIOGRAFIA

- 1 Seegriller, J.E., J. Biol. Chem. 201, 629 (1953)
- 2 King, T.E. y Cholding, V.H., J. Biol. Chem. 220, 177 (1956)

Apéndice II

ACCION DE LOS DIMETILAMINOS SOBRE LA OXIDACION

DEL ACETALDEHIDO POR S. CEREVISIAE

En los capítulos anteriores se ha estudiado detalladamente la sensibilidad de las aldehído deshidrogenasas del S. cerevisiae para los reactivos de tioles y en base a la diferente respuesta a dichos reactivos se ha tratado de establecer el papel fisiológico de esas enzimas, por comparación con la inhibición de la oxidación del acetaldehído por las células enteras.

Entre las sustancias capaces de inhibir la oxidación del acetaldehído por la levadura se encuentran los dinitrofenoles (DNF) (1). La oportunidad de disponer de las dos aldehído deshidrogenasas en forma purificada ha posibilitado el estudio de la acción de los dinitrofenoles sobre las mismas, en un intento de aclarar el mecanismo de la acción inhibitoria de los dinitrofenoles sobre las células enteras.

RESULTADOS

1) Acción de los dinitrofenoles sobre la oxidación del acetaldehído por la levadura. En concentraciones relativamente pequeñas, alrededor de $10^{-4}M$ los dinitrofenoles inhiben la oxidación del acetaldehído. La acción es particularmente notable con los isómeros 2:4 y 2:5 y se evidencia tanto en el consumo de oxígeno como en la desaparición de acetaldehído. En presencia de DNF y acetaldehído el consumo disminuye por debajo del nivel del testigo tratado con DNF solamente (Tabla 1) lo que indica que el acetaldehído actúa en este caso como un inhibidor de la respiración residual de la levadura. El efecto es más notable con ciertas preparaciones de levadura donde el DNF exagera la respiración residual (Tabla 1, exp. A) También disminuye el consumo de acetaldehído en presencia de DNF. El efecto es difícil de valorar exactamente pues el acetaldehído no solo desaparece por su metabolismo en la levadura sino por fijación en el alcali del compartimento central del vaso manométrico. Esto ha sido comprobado en experimentos realizados en condiciones iguales a las descritas, excepto la levadura, que reemplazó por igual volumen de agua. La desaparición concuerda con la formación de color amarillo sobre el papel usado para la absorción de anhídrido carbónico, posiblemente debido a formación de sustancias de tipo aldol. A pesar de estos inconvenientes es evidente que en presencia de DNF la levadura deja de consumir acetaldehído y la diferencia entre la inhibición del consumo de oxígeno y de acetaldehído, respectivamente, bien puede atribuirse a la fijación en

Tabla 1 . Acción de los dinitrofenoles sobre la oxidación del acetaldehido por S.cerevisiac.

Levadura suspendida en 2.0 ml de $\text{PQ.H}_2\text{K}$ (exp. A); succinato (exp. B) o ftalato (exp.C) 0.05 M a pH 4.5 - 30° aire. KOH en vaso central . Duración de la oxidación : 60 min.(exp. A y B) y 45 min. (exp.C) .

Ex- pe- ri- men- to	Leva- dura (mg)	Adiciones	Consu- mo de oxi- geno (μl)	Consu- mo de acc- talde- hido (μl)	Forma- ción de a- cetalde- hido (μl)
A	5.5	Acetaldehido 0.030 M	348	52.6	--
A	5.5	Acetaldehido 0.030 M + 2:4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	66	4.3	--
A	5.5	Ninguna	59	-1.2	--
A	5.5	2 : 4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	105	-1.2	--
B	3.3	Acetaldehido 0.030 M	515	52.8	+1.0
B	3.3	Acetaldehido 0.030 M + 2:4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	57	7.8	+1.0
B	3.3	Ninguna	80	0.0	+3.0
B	3.3	2 : 4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	53	0.0	+2.0
C	5.6	Acetaldehido 0.030 M	250	32.5	--
C	5.6	Acetaldehido 0.030 M + 2 : 4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	25	9.0	--
C	5.6	Acetaldehido 0.030 M + 2 : 5 DNF $6.5 \cdot 10^{-4}$ M	37	9.0	--
C	5.6	Acetaldehido 0.030 M + 2 : 6 DNF $3.8 \cdot 10^{-4}$ M	53	11.0	--
C	5.6	Ninguna	87	--	--
C	5.6	2 : 4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	47	--	--
C	5.6	2 : 5 DNF $6.5 \cdot 10^{-4}$ M	96	--	--
C	5.6	2 : 6 DNF $3.8 \cdot 10^{-4}$ M	64	--	--

el alcali del compartimento central o bien a condensaciones intracelulares de acetaldehído, que no consumen oxígeno tales como la condensación aldólica de Neuberg (8), la transcarbolicación de Shimatzu (9) etc. La importancia de estas últimas reacciones sería sin embargo, mínima. La inhibición de la oxidación del acetaldehído por los DNF no se acompaña con aparición de acidez volátil imputable a la formación de ácido acético, lo que llama la atención por cuanto los DNF son inhibidores de la oxidación del acetato por la levadura (2). Ello demuestra que el efecto es sobre la etapa inicial del proceso oxidativo.

La oxidación de acetaldehído por la levadura se acompaña por esterificación de ortofosfato (Tabla 2) lo mismo que la de los ácidos acético y pirúvico (2 y 3). La acción inhibidora de los DNF es extensiva a la esterificación de ortofosfato que no se produce en presencia de los mismos.

La acción inhibidora de los DNFs, se produce solamente a pH ácido (2-3) lo mismo que la inhibición de la oxidación de los ácidos acético y pirúvico; a pH 6.8 no se registra acción inhibidora.

2) Acción de los dinitrofenoles sobre las aldehido deshidrogenasas de levadura. En la Tabla 3 se reseñan experimentos que demuestran una cierta acción inhibidora de los dinitrofenoles sobre la enzima de Black, especialmente con el 2:4 DNF (42%). La enzima de Seegmiller es mucho menos sensible, siendo inhibida en mayor grado también por el 2:4 DNF. Estas substancias no son capaces de reemplazar al DPN o TPN como agentes oxidantes a pesar de que en los tejidos animales algunos grupos nitro pueden transformarse en amino.

DISCUSIÓN

Ninguna de las aldehido deshidrogenasas de la levadura sufre aparentemente una inhibición por los dinitrofenoles capaz de explicar la inhibición de la oxidación del acetaldehído por célula viva. Es cierto que las condiciones en que actúa el DNF sobre las células y las enzimas, son respectivamente distintas pues en el primer caso la acción es a pH 4.5 mientras que en el segundo es a pH 7.7 -

Tabla 2.- Acción de los dinitrofenolos sobre la esterificación de ortofosfato asociada a la oxidación de acetaldehido. 68.0 mg de levadura suspendida en 20.0 ml de ftalato 0.05 M, pH 4.5 a 30° Aire. 40 minutos de equilibrio, ortofosfato inicial, 4.5 μ P/20 ml.

Expe- ri- men- to	Adiciones	Desa- pari- ción de ace- talde- hido (μ moles)	Orto- fos- fato (μ P)	Δ P
A	Ninguna	0	-0.4	-
A	2 :4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	0	-2.7	-
A	2 :6 DNF $2.6 \cdot 10^{-4}$ M	0	-1.8	-
A	2 :5 DNF $6.4 \cdot 10^{-4}$ M	0	-1.8	-
A	Acetaldehido 0.030 M	30.2	2.6	3.0
A	Acetaldehido 0.030 M + 2:4 DNF $0.96 \cdot 10^{-4}$ M	2.9	-2.3	0.4
A	Acetaldehido 0.030 M + 2.6 DNF $2.6 \cdot 10^{-4}$ M	8.1	-2.1	-0.3
A	Acetal dehido 0.030 M + 2.5 DNF $6.4 \cdot 10^{-4}$ M	4.7	-2.3	-0.5

Tabla 3 . Acción del 2-4 , 2-5 , y 2-6 dinitrofenol sobre la oxidación del acetaldehído por las enzimas de Black y Seegmiller. Enzima en buffer de Tris 0.015 M, pH 8.0 (Exp. A) y 7.7 (Exp. B) en presencia de cisteína 0.001 M, CLK 0.1 M, DPN 0.44 mM y acetaldehído 0.17×10^{-5} M (exp.A) o Cl_2 Mg 0.015 M , TPN 0.12 mM y acetaldehído 0.5 mM (exp.B) , con las adiciones que se indican. Volumen final 3 ml .

Expe- ri- men- to	Can - ti- dad de enzima (mg)	Adiciones	Acti- vidad enzi- máti- ca ($\Delta D_{340} 10^3$) min	In- hi- bi- ción (%)
<u>Enzima de Black</u>				
A	-	Ninguna	130	--
A	-	2,4 Dinitrofenol 0.11 ml	75	42.5
A	-	2.5 Dinitrofenol 0.08 ml	96	26.2
A	-	2.6 Dinitrofenol 0.26 ml	105	19.3
<u>Enzima de Seegmiller</u>				
B	0.42	Ninguna	180	--
B	0.42	2,4 Dinitrofenol 0.11 ml	126	29.7
B	0.42	2.5 Dinitrofenol 0.08 ml	136	-3.0
B	0.42	2.6 Dinitrofenol 0.26 ml	188	-4.5
B	0.42	2.4 Dinitrofenol 0.11 ml *	0	100.-
B	0.42	DPN 0.44 ml	0	100.-

* Se omitió el DPN.

8.0 . Ello es una composición que resulta 1) , de la permeabilidad de las células al DNF, significativa solamente a pH ácido y 2) del pH óptimo para la actividad de las deshidrogenasas a pH netamente alcalino . Complica aún más la explicación el hecho de que el pH en el interior de las células sea de 6,5 - 6.7 lo que introduce la cuestión del papel fisiológico de enzimas que "in vivo" actuarían a un pH en el que aisladas carecen prácticamente de actividad . Si se argumenta, con rigor máximo , que las condiciones en los DNF ^{que} actúan sobre las enzimas por una parte y sobre las células por otra, son totalmente distintas y que lo observado con las enzimas no tiene valor alguno para explicar la inhibición de las células, debe también concluirse que las aldehído deshidrogenasas de la levadura no tienen ningún papel fisiológico y que la enzima que oxida el acetaldehído está aún por ser hallada .

Más probable que esta posición extrema parece suponer que las enzimas no se hallan aisladas sino constituyendo unidades multienzimáticas en que la mayor eficacia catalítica se obtiene a expensas de modificaciones de ciertas propiedades de las enzimas constituyentes. La "cicloforasa" descrita por Green (4), constituye un ejemplo de organización multienzimática y las mitocondrias estarían constituidas por este tipo de unidades.

Estas estructuras implican por su tamaño la presencia de superficies e interfases de las cuales depende la mutua accesibilidad de las enzimas constituyentes . Alteraciones en las mismas podrían significar la abolición de la actividad catalítica total sin que las enzimas constituyentes pudieran desplegar las suyas propias.

La acción más conocida de los DNF es prevenir la esterificación de fosfato acoplada a las oxidaciones o sea la fosforilación oxidativa (5,10). En la levadura , los DNF inhiben la oxidación del acetaldehído y simultáneamente la esterificación de ortofosfato ; resultados similares se obtienen empleando piruvato o acetato como sustratos . Esto indica la inhibición de un mecanismo oxidativo con acción general . En los tejidos animales la acción de los DNF tiene caracteres

análogos. Drysdale y Lardy (6) observaron que los DNF inhiben la oxidación de ácidos grasos por mitocondrias de hígado de rata pero no por las enzimas solubles aisladas de dicha preparación. Ello confirma que los DNF actúan solamente sobre organizaciones enzimáticas complejas, afectando propiedades estructurales de las mismas y en apoyo de esa interpretación está la observación de Dianzani y Scuro (7) según la cual los DNF modifican la estructura fisicoquímica de las mitocondrias como revela su cambio de forma.

Conclusiones

- 1º) Los dinitrofenoles 2:4 ; 2:5 y 2:6 inhiben intensamente la oxidación de acetaldehído por la levadura y la esterificación de ortofosfato asociada.
- 2º) Las aldehído deshidrogenasas de levadura en las condiciones de actividad óptima son ligeramente inhibidas por los dinitrofenoles, especialmente el isómero 2:4 - DNF. La inhibición no explica el efecto de los dinitrofenoles sobre la oxidación del acetaldehído por las células de levadura.

FOFNA

BIBLIOGRAFIA

- 1 Stoppani A.O.M. Actas del V Congreso internacional de microbiologia
Rio de Janeiro (1950)
- 2 Stoppani A.O.M. Nature Lond. 164 1096 (1949)
Anales Asoc. Quimica Argentina 37 180 (1949)
- 3 Stoppani A.O.M. Anales Asoc. Quimica Argentina 38 313 (1950)
- 4 Cross R.J.; Taggart J.V.; Covo G.A. y Green D.E. J. Biol. Chem. 177 655 (1949)
- 5 Loomis W.F. y Lipman F. J. Biol. Chem. 173 807 (1948)
- 6 Drysdale G.R. y Lardy H. A. J. Biol. Chem. 202 119 (1953)
- 7 Dianzani M.V. y Scure S. Biochem. J. 62 212 (1956)
- 8 Summer J.B. y Somers F.G. Chemistry and methods of enzymes N.Y. 1943 p.290
- 9 Yoshio Shimatzu J. Chem. Soc. Japan 73 556 (1952) cf. C.A.
- 10 Lehninger A.L. J. Biol. Chem. 178 643 (1949)

Christi