

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la transformación enzimática del ácido delta-amino levúlico en porfobilinógeno : Aislamiento, purificación y propiedades de la enzima delta-amino levúlico dehidrasa de hígado bovino

Ferramola, Ana María

1972

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:

Ferramola, Ana María. (1972). Estudios sobre la transformación enzimática del ácido delta-amino levúlico en porfobilinógeno : Aislamiento, purificación y propiedades de la enzima delta-amino levúlico dehidrasa de hígado bovino. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1403_Ferramola.pdf

Cita tipo Chicago:

Ferramola, Ana María. "Estudios sobre la transformación enzimática del ácido delta-amino levúlico en porfobilinógeno : Aislamiento, purificación y propiedades de la enzima delta-amino levúlico dehidrasa de hígado bovino". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1972. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1403_Ferramola.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*ESTUDIOS SOBRE LA TRANSFORMACION ENZIMATICA DEL ACIDO
δ - AMINO LEVULICO EN PORFOBILINOGENO*

*Aislamiento, purificación y propiedades de la enzima
δ - amino levúlico dehidrasa de hígado bovino*

ANA MARIA FERRAMOLA

'1 4 0 3 = - :

**Tesis presentada para optar al título de
"DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES"**

-1972-

Padrino de Tesis

Dr. MOISES GRINSTEIN

Profesor Titular de Química Biológica
de la Facultad de Ciencias Exactas
y Naturales
de la Universidad Nacional de Buenos Aires

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. Moisés Grinstein, director de este trabajo por su constante interés durante la realización del mismo.

A la Dra. Alcira María del Carmen Batlle de Albertoni, por su dedicación e importantes sugerencias.

Al Dr. Aldo E. A. Mitta, bajo cuya dirección se hizo la primera parte de este trabajo y con quien me inicié en la investigación y en el campo de la Radioquímica.

Al Dr. Horacio A. Tigier, y a los Licenciados Ana María Stella de Rosellini y Luis O. Gorriño, con quienes se efectuaron determinaciones de algunas de las propiedades de la enzima.

A la Srta. Hilda Gasparoli y a la Sra. Carmen A. Aldonatti de Olivar por su asistencia técnica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que mediante becas y subsidios concedidos permitió en parte la realización de este trabajo

A todos aquéllos que de alguna manera han contribuído a la presentación de este trabajo.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A	Absorbancia
ADP	Acido adenosin difosfato
ALA	Acido 5-amino levúlico
ALA-D	Acido 5-amino levúlico dehidrasa
ALA-S	Acido 5-amino levúlico sintetasa
AMP	Acido adenosin monofosfato
ATP	Acido adenosin trifosfato
CPG-asa	Coprogenasa
CoA	Coenzima A
Copro	Coproporfirina
Coprogeno	Coproporfirinógeno
DEAE	Dietil amino etil
D-I	Porfobilinógeno Deaminasa-Uroporfirinógeno III Cosintetasa
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTE	Ditioeritrol
DTT	Ditiotreitrol
DTNB	Acido 5,5'-ditio bis (2-nitro benzoico)
EDTA	Acido etilén diamino tetra acético
"I"	Uroporfirinógeno III Cosintetasa
Km	Constante de Michaelis
NEMI	N etil maleimida
PBG	Porfobilinógeno
PBG-asa	Porfobilinogenasa
PBB -D	Porfobilinógeno-Deaminasa
POMB	p-Cloro mercuribenzoato
PDAB	p-Dimetilamino benzaldehido
PI	Punto isoeléctrico
PPO	2-5 difeniloxazol
POPOP	1-4-Bis- (5-feniloxazol 2-il) benceno

P.M.	Peso molecular
Proto IX	Protoporfirina IX
Protógeno	Protoporfirinógeno
m-RNA	Acido ribonucleico mensajero
$\left[\frac{S}{0.5} \right]$	Concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima de actividad enzimática
Tris	Tri (hidroximetil) amino metano
Uro	Uroporfirina
Urógeno	Uroporfirinógeno
U.V.	Ultravioleta
▼	Velocidad de transformación enzimática
V_{\max}	Velocidad máxima de transformación enzimática

INTRODUCCION:

PORFIRINAS EN LA NATURALEZA :

Entre los compuestos pigmentados que existen en la naturaleza, las porfirinas constituyen un grupo de sustancias de fundamental importancia biológica, cuya estructura química se caracteriza por tener un anillo tetrapirrólico. De estos compuestos el Hemo y la Clorofila son los ejemplos más representativos de la célula animal y vegetal respectivamente. (Fig. 1 y 2).

El Hemo, pigmento rojo de la hemoglobina, es un complejo metálico de la protoporfirina IX con hierro, al estado ferroso y la clorofila por su parte también deriva de este compuesto, pero tiene magnesio en su estructura.

Junto con la hemoglobina, existen una serie de proteínas importantes, como la mioglobina, los citocromos, las catalasas y peroxidases, cuyo núcleo prostético es precisamente el Hemo.

Todos estos derivados tetrapirrólicos, llevan a cabo funciones biológicas esenciales, como el transporte de gases, transporte de electrones, oxidación intracelulares y fotosíntesis, razón por la cual, una de las obligaciones principales de la célula viva es precisamente la de proveerse de estos compuestos. Todas las células aeróbicas tienen capacidad de biosintetizarlos y se ha comprobado que lo hacen por un camino común.

Química de las porfirinas. Propiedades

Los trabajos iniciales de Hoppe-Seyler (1880) y Nenki y colaboradores (1920), permitieron hace 100 años dar la primera noción clara acerca de la constitución de la parte coloreada de la molécula de hemoglobina y de la clorofila. Sin embargo, gran parte de los conocimientos actuales se deben a bioquímicos orgánicos como Willstätter y Fischer, quienes entre 1912 y 1945 estudiaron el Hemo, la clorofila y derivados de las porfirinas.

La mayor parte del trabajo de estos investigadores ha sido recopilado por Fischer y Orth (1937). Más recientemente, los trabajos de Lemberg y Legge (1949) y los de Mac Donald (1953, 1954, 1955, 1956) establecieron fehacientemente la naturaleza química de estos compuestos.

Para llegar a estos resultados, fueron necesarios muchos años y el trabajo de químicos y bioquímicos muy adiestrados en este campo.

Químicamente estas sustancias se caracterizan por tener una estructura macrocíclica básica formada por la unión de cuatro núcleos, unidos entre sí por puentes metálicos, denominada porfina (Fig. 3).

Las porfirinas son los derivados que resultan de reemplazar el hidrógeno de las posiciones β de los pirroles, por distintos sustituyentes.

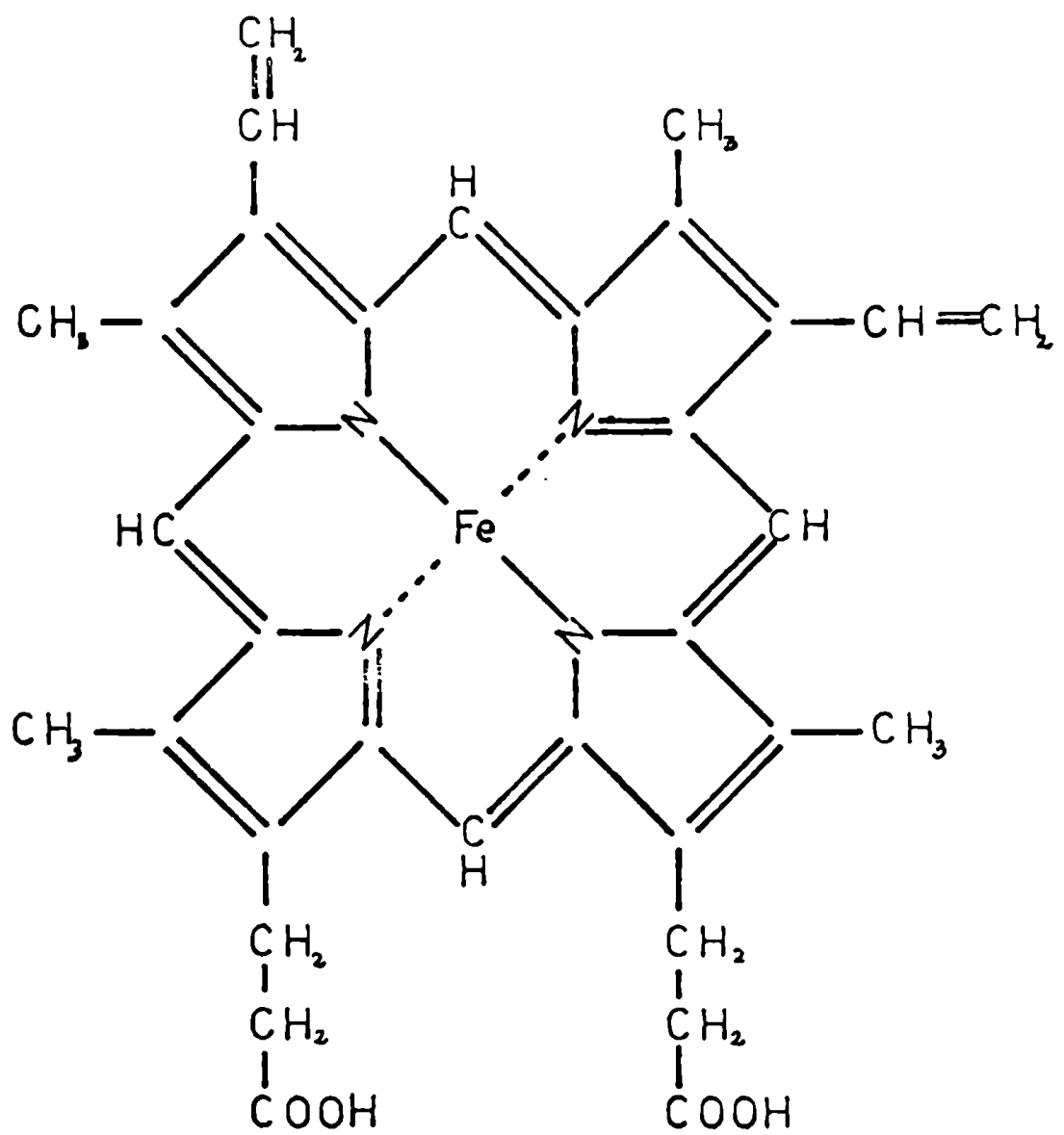
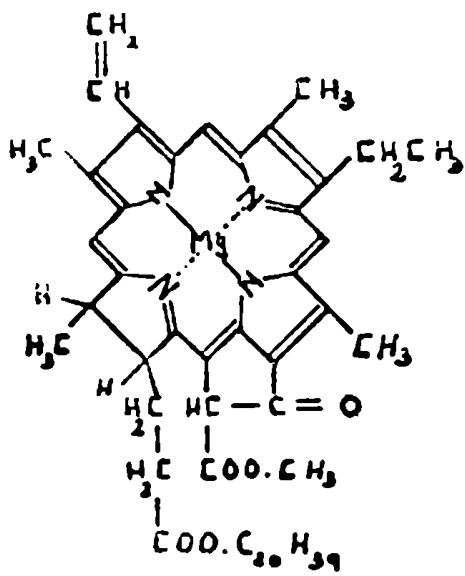
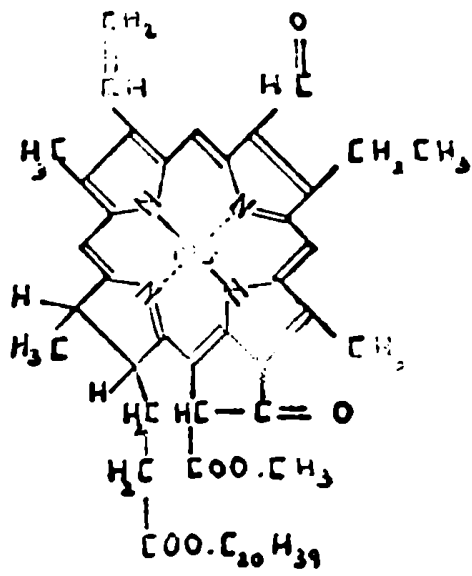


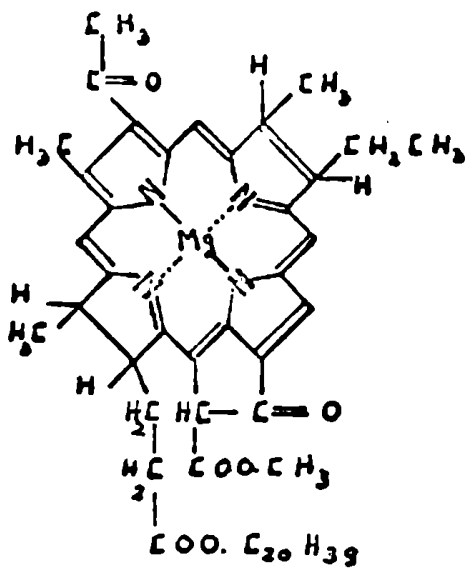
Fig.1 Estructura del Hemo



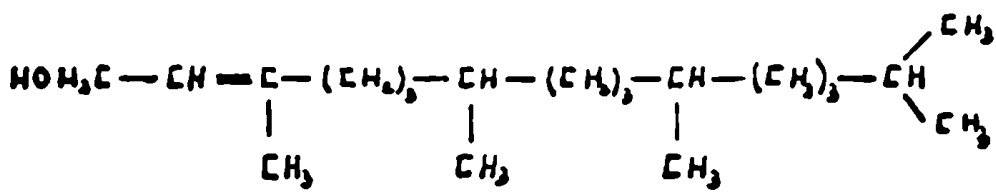
CLOROFILA a



CLOROFILA b



BACTERIOCLOROFILO



FITOL

estructuras de algunas Clorofilas

Cuando los ocho hidrógenos son reemplazados se pueden obtener diferentes isómeros. Así por ejemplo las etioporfirinas, sintetizadas por Fischer, que resultan de sustituir las posiciones por cuatro cadenas etilos y cuatro metilos, tienen cuatro isómeros de posición (Fig. 4).

Todas las porfirinas pueden considerarse derivadas de las etioporfirinas para poder determinar el tipo isomérico al que pertenecen.

Las uroporfirinas encontradas en la naturaleza tienen como sustituyentes cuatro grupos propiónicos y cuatro acéticos (Fig. 5). Estas porfirinas octacarboxílicas de igual número de isómeros que las etioporfirinas, dan lugar por descarboxilación a las coproporfirinas, con cuatro restos metilos y cuatro propiónicos. De los cuatro isómeros posibles de obtener, sólo aquellos pertenecientes a la serie I y III son los encontrados en la naturaleza.

La protoporfirina obtenida por descarboxilación oxidativa de dos de los restos propiónicos a vinilo, tiene tres sustituyentes distintos por lo que es posible obtener quince isómeros de posición; pero el isómero biológicamente importante es el denominado protoporfirina IX que también pertenece a la serie isomérica III (Fig. 9).

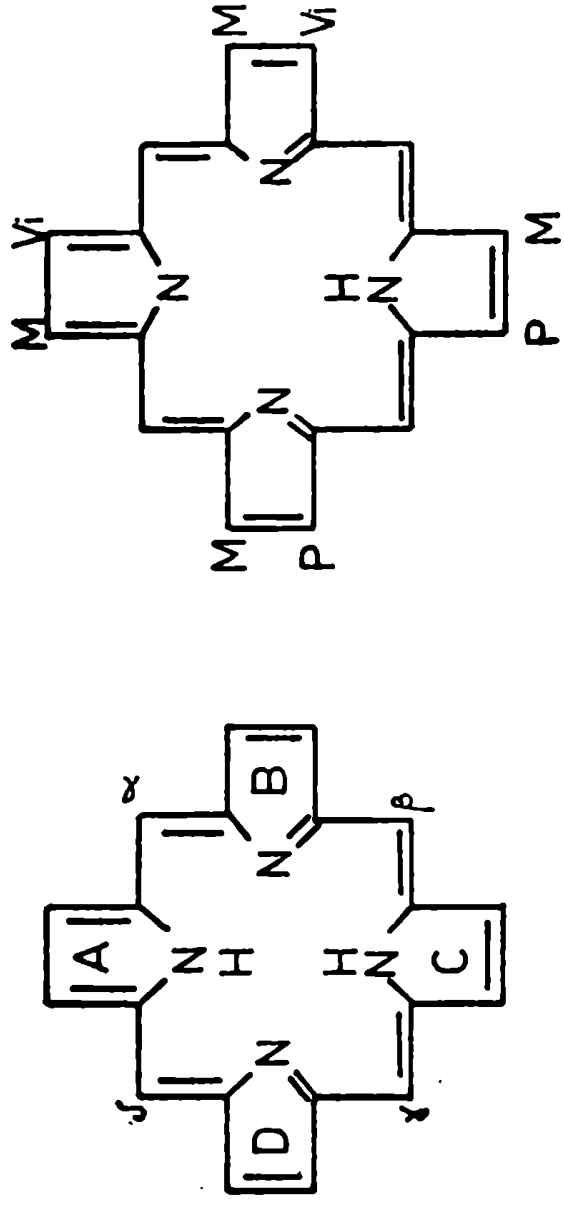
En la biosíntesis del Hemo, los verdaderos intermediarios no son las porfirinas, sino sus productos de reducción, los porfirinógenos. Estas hexahidroporfirinas se pueden obtener por reducción química de las porfirinas, ya que resultan de agregar seis átomos de hidrógeno al núcleo de porfina. Son tetrapirrimetanos en los que los cuatro pirroles están unidos por puentes metilénicos. Estos compuestos, no tienen conjugación, son incoloros, no presentan fluorescencia y son muy inestables.

En la naturaleza las porfirinas pueden existir libres, pero generalmente se las encuentra unidas a metales con los que forman complejos de gran importancia biológica, como en el caso del Hemo y de la vitamina B₁₂ en los animales, que contienen hierro y cobalto respectivamente y la clorofila en los vegetales que contiene magnesio.

Biosíntesis del Hemo:

La introducción del uso de radioisótopos en la bioquímica dió resultados de considerable importancia en estudios sobre la biosíntesis de constituyentes orgánicos o de sus productos metabólicos.

Según Lascelles (1964), el trabajo que condujo al esclarecimiento de la formación biológica de la Proto, se puede dividir en tres etapas. En primer lugar, con el empleo de compuestos isotópicamente marcados se pudo dilucidar la fuente de cada átomo de la molécula de Proto. Luego el reconocimiento de los distintos intermediarios y finalmente el estudio de cada una de las etapas enzimáticas involucradas en la biosíntesis del Hemo.



Porphina

Protoporphina

Fig 3 Estructura química de la Porphina y Protoporphina
 M_metilo P_ác. propiónico Vi_vinilo

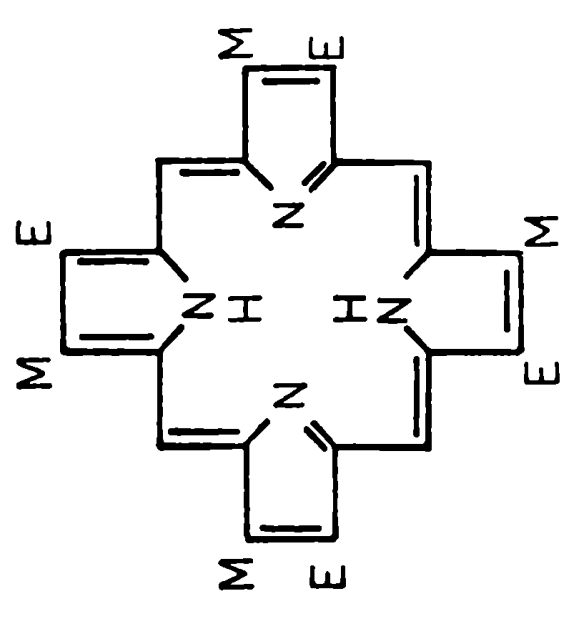
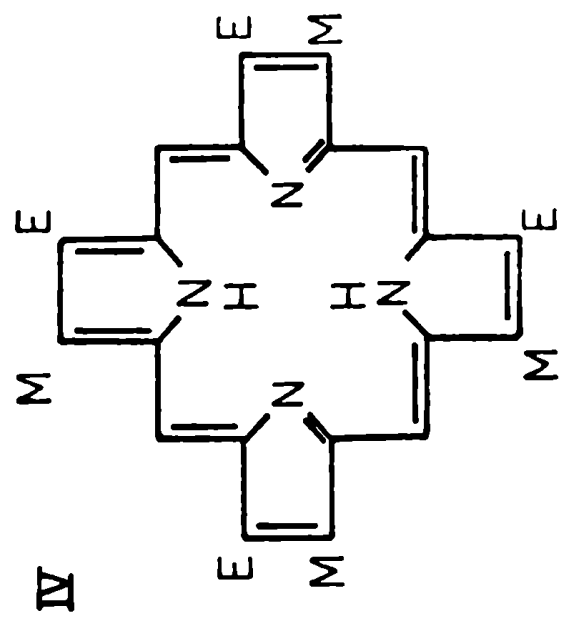
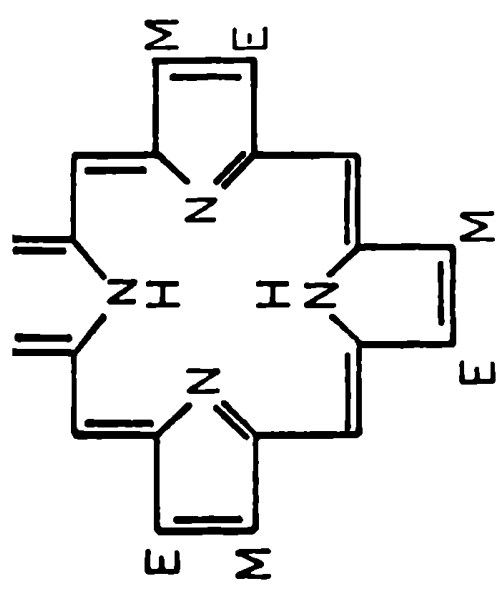
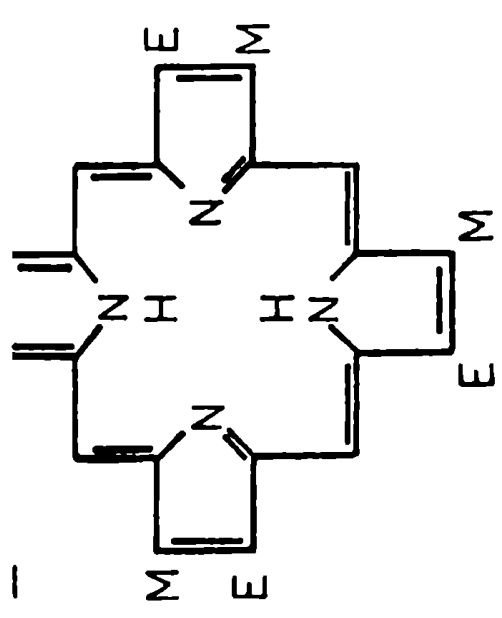


Fig.4 Estructura química de los cuatro isómeros de la Etióporfirina
M_ metilo E_ etilo

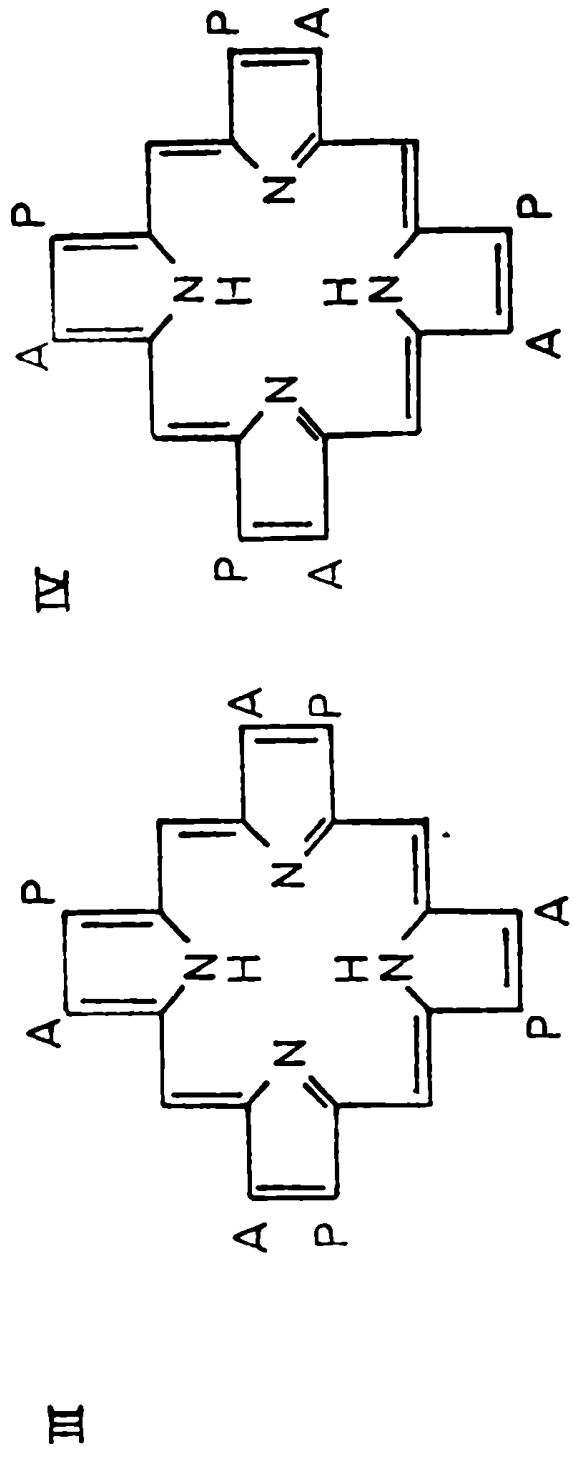
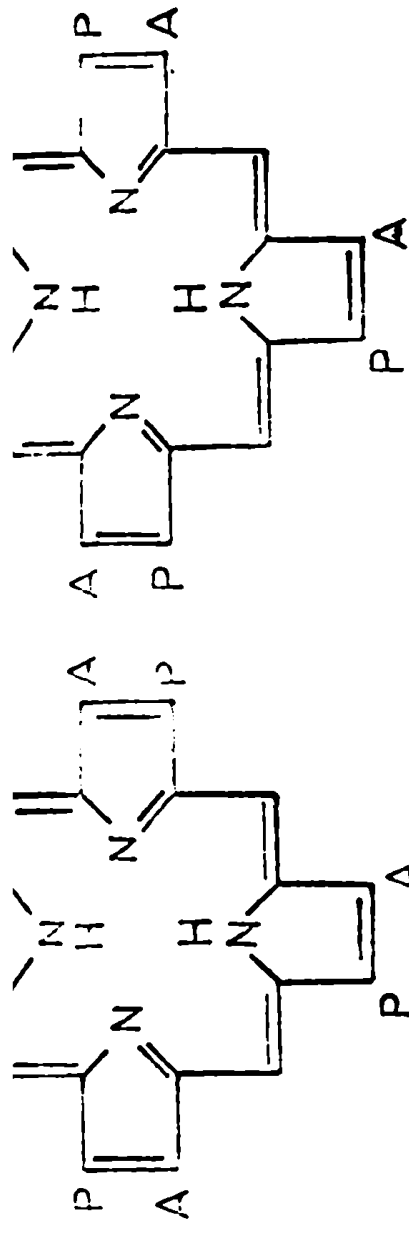


Fig. 5 Estructura química de los cuatro isómeros de la Uroporfirina
 A_ác. acético P_ác. propiónico

La biosíntesis de estos compuestos fué ampliamente estudiada en distintos tejidos animales, como así también en plantas y microorganismos.

El camino metabólico del Hemo, comprende una serie de etapas, cada una de las cuales se produce con la intervención de distintas enzimas, la mayoría de ellas hoy aisladas y purificadas por lo menos parcialmente.

La secuencia comienza con la condensación de una molécula de glicina con una de succinil coenzima A, en presencia de la enzima ALA-sintetasa. Esto dá origen al ALA (Fig. 6), primer precursor directo en la biosíntesis de las porfirinas. Luego, se produce una aromatización de esta aminocetona y se sintetiza el monopirrol porfobilinógeno, PBG (Fig. 6), por acción de la enzima ALA-dehidrasa sobre dos moléculas de ALA. Luego cuatro moléculas de PBG, con la intervención de la Porfobilinogenasa, se unen formando el Urógeno III, compuesto octacarboxílico. Por descarboxilación de éste en presencia de la Porfirinógeno decarboxilasa se obtiene el Coprógeno III de cuatro carboxilos pasando por los intermediarios de siete, seis y cinco grupos carboxilos.

En la etapa siguiente, una nueva descarboxilación y oxidación llevada a cabo por la Coprogenasa conduce a la Proto IX. Finalmente, la Ferroquelatasa adiciona un átomo de hierro ferroso a esta molécula y se obtiene el Hemo.

El esquema de esta biosíntesis, así como la compartimentalización de las enzimas involucradas en él, puede verse en la (Fig. 7).

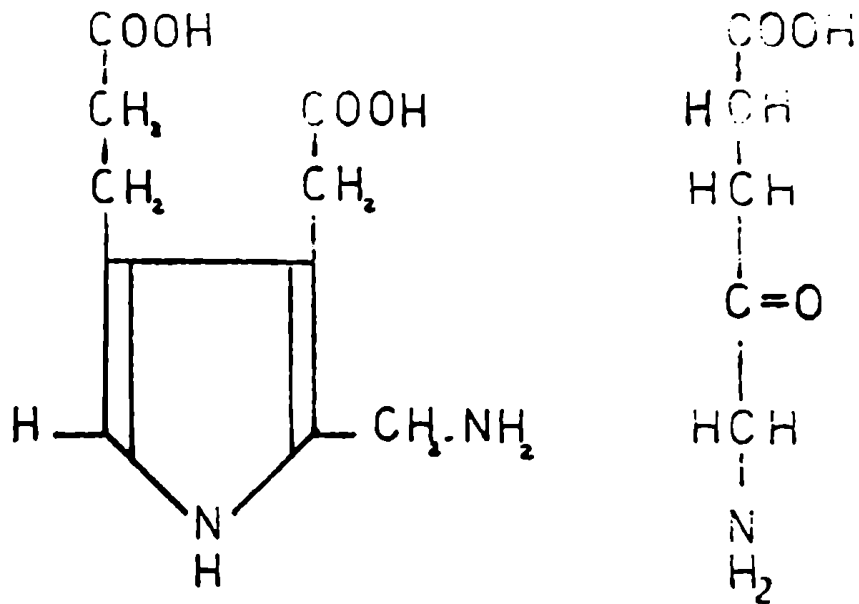
En los últimos años la literatura concerniente a la biosíntesis de porfirinas y derivados, ha sido recopilada por varios investigadores (Granick 1950; Rimington, 1955, 1957, 1959; Bogorad, 1960; Margolish, 1961; Granick y Mauzerall, 1961; Marks, 1962; Tait, 1968; Burnham, 1969).

Precursores del Hemo y enzimas involucradas en su biosíntesis:

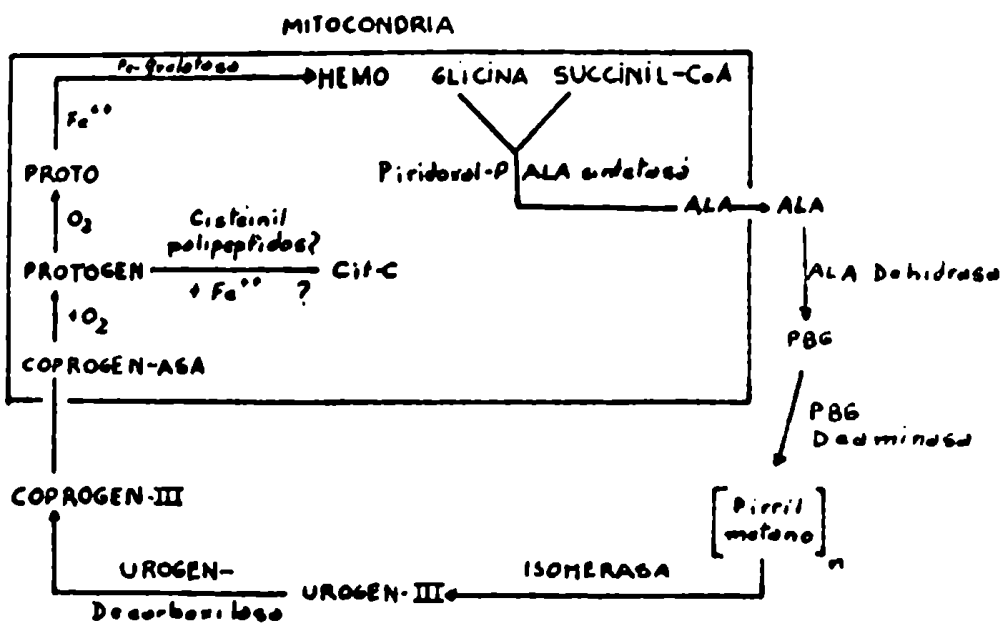
Glicocola y Succinil CoA como precursores:

En 1945, Shemin y Rittenberg (1945, 1946a, 1946b), obtuvieron pruebas directas de la utilización de la glicina en la formación de los anillos pirrólicos de la Proto. Suministrando glicocola ^{15}N , a seres humanos y animales, observaron que ésta se incorporaba al Hemo de la hemoglobina proveyéndole los átomos de nitrógeno. Esto fué confirmado por Shemin y col. (1948, 1950) y por London y col. (1950), quienes al trabajar con glóbulos rojos de pato y eritrocitos inmaduros de mamíferos, en presencia de Glicocola ^{15}N , lograron sintetizar hemoglobina "in vitro".

Las técnicas de degradación de la Proto marcada permitieron conocer el origen de cada átomo de la molécula. Estudios realizados por Wittenberg y col. (1948, 1950), Muir y col. (1950), y Shemin y col. (1951), con ^{14}C , demostraron que la glicocola no sólo provee los cuatro átomos de nitrógeno, sino también los átomos de carbono de los puentes metínicos y un átomo de carbono de cada pirrol, el de la posición α correspondiente a las cadenas vinilo y propiónico. Se vió además, que sólo el carbono 2 de la glicocola y no el del carboxilo, es incorporado al Hemo (Altman y col., 1948, 1949; Grinstein



6 Estructura química del Porfobilinógeno y Delta amino levúlico



Esquema de la biosíntesis de la Protoporfirina IX

y col., 1948, 1949; Muir y col. 1949, 1950; Wittenberg y col. 1950; Radin y col. 1950).

En la síntesis de una molécula de Hemo, se utilizan ocho de glicocola, las que deben sufrir un proceso de descarboxilación y sólo cuatro de ellas deben desaminarse en alguna etapa. De los treinta y cuatro átomos de carbono de la molécula de Proto, sólo ocho son suministrados por la glicocola.

Estudios realizados con acetato marcado con deuterio (Bloch y col. 1945), llevados a cabo prácticamente al mismo tiempo que los de Shemin con glicocola ^{15}N , indicaron la participación del acetato en la biosíntesis, al encontrar el isótopo en el Hemo.

Trabajos similares con acetato ^{14}C marcado en el metilo o en el carboxilo, (Radin y col. 1950; Wittenberg y col. 1950; Shemin y col. 1951), señalaron que el resto de los átomos de carbono de la molécula de Proto derivan de este compuesto. En efecto, por degradación de la molécula formada (Wittenberg y col. 1950), se demostró que los veintiséis átomos de carbono restantes son suministrados por el acetato.

Luego de estos hallazgos, Shemin y Wittenberg (1951) sugirieron que en la biosíntesis de las porfirinas los precursores del pirrol serían una molécula de glicocola y dos unidades de cuatro átomos de carbono provenientes del acetato a través del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, tratándose posiblemente de un derivado del ácido succínico. Esta teoría fué confirmada por Shemin y Kamin (1952a, 1952b), quienes incubando glóbulos rojos de pato con succinato marcado con ^{14}C en el carboxilo o en el metileno, obtuvieron hemina radiactiva. Ellos encontraron que los dos succinatos utilizados daban hemina ^{14}C , pero cuando ponían en el medio malonato, éste inhibía la marcación de la hemina proveniente del succinato con ^{14}C en el metileno. Además, como la adición de coenzima A incrementó la utilización del succinato en la formación de Proto, los autores sugirieron que el derivado del succínico que se condensa con la glicocola podría ser la succinil coenzima A, la cual puede venir directamente del succinato o del 2-cetoglutarato por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

Schulman y Richert (1955, 1957), trabajando con glóbulos rojos de patos alimentados con dietas deficientes en ácido pantoténico, encontraron una disminución en la síntesis del Hemo a partir de glicocola y succinato, lo que sugería la participación de la coenzima A en esta biosíntesis. Lascelles (1957), estudiando la síntesis de porfirinas en Tetrahymena vorax, obtuvo resultados similares.

La biosíntesis de la Proto se relaciona así, con el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la confirmación de esto fué hecha por los trabajos de Rubinstein y Densted (1953), así como con los de Wriston (1953, 1955) quienes usando como sustratos 2-cetoglutarato y citrato ^{14}C , llegaron a observar la marcación prevista para tales sustratos, considerando a la succinil CoA como intermediario. Quedó confirmado entonces, que este producto era un precursor del Hemo, proveniente del 2-cetoglutarato por descarboxilación oxidativa

(Gunsalus, 1954), o bien directamente del succinato por acción de la succinil CoA sintetasa, aunque también podía provenir de otros metabolitos (Kauffman y col., 1953; Dixon y Webb, 1958; Stadtman y col. 1960 y Rimington, 1966).

Se ha demostrado (Labbe y col. 1965; Steer y Gibbs, 1969; Wider y Tigier 1970), que la succinil CoA sintetasa, que cataliza la formación de succinil CoA a partir de succinato, ATP y un nucleósido trifosfato, se encuentra involucrada en la síntesis de porfirinas, en distintos tejidos. Esta enzima fosforilante, fué descubierta por Kauffman en 1951 y aislada y purificada por primera vez en 1953 (Kauffman y col. 1953; Hift y col. 1953).

Se la ha purificado de una gran variedad de fuentes: de riñón (Kauffman y Alivisatos, 1955), de espinaca (Sanodi y col. 1956), de Rhodospseudomonas spheroides (Burnham, 1963; Burnham y Lascelles, 1963), de hojas de trigo (Nandi y Wargool, 1965), de Topinambur (Palmer y Wedding, 1966), y de callos de semillas de soya (Wider y Tigier, 1970). Sobre las propiedades de esta enzima recientemente se han hecho interesantes estudios que tratan de establecer el mecanismo de la reacción así como también el papel que tiene en el control de la biosíntesis del Hemo (Labbe y col. 1965; Higuchi y col. 1968; Steer y col. 1969; Benson y col. 1969 y Wider y col. 1970).

Porfobilinógeno y Acido δ -aminolevúlico como precursores:

Como ya se indicó, el estudio de la estructura de las porfirinas estaba encaminado, cuando Westall (1952), aisló de orinas de un paciente con porfiria aguda una sustancia, que ya había sido observada por Sachs (1931), trabajando con el mismo material, a la que denominó Porfobilinógeno.

Más tarde, Cookson y Rimington (1953), señalaron que se trataba de un ~~monopirrol~~ pirrol con cadenas de ácido acético y ácido propiónico en las posiciones β y un grupo aminometil en una de las posiciones α , lo que fué confirmado por los estudios de difracción con rayos X efectuados por Kennard en 1953 (Fig. 6). La estructura de esta sustancia, resultó ser muy similar a la propuesta por Shemin y Kumin (1952) para su "precursor pirrólico".

Inmediatamente después de su descubrimiento, se comprobó que el PBG intervenía como precursor en la biosíntesis de las porfirinas. Esto fue demostrado por Falk y col. (1953), quienes agregaron PBG a hemolizados de glóbulos rojos de pollo como sustrato para la producción de Proto.

Simultáneamente, Bogorad y Granick (1953), demostraron la formación de porfirinas a partir de PBG en células de *Chlorella* sometidas previamente a un proceso de congelación y descongelación.

La existencia del PBG como intermediario normal en la síntesis del Hemo, fué ampliamente confirmada en varias fuentes, por investigaciones posteriores (Granick, 1954a; Dresel y Falk, 1956; Booiij y Rimington, 1957; Bogorad, 1958; Hoare y Heath, 1958; Lockwood y Benson, 1960; Batlle y Grinstein, 1962).

Oasi simultáneamente con el reconocimiento del PBG como precursor de las porfirinas, comenzaron las especulaciones sobre los posibles intermediarios existentes entre la glicina y el succinato y el mismo PBG. Este tipo de estudio, estaba en consideración por Neuberger y Scott (1953), cuando Shemin y Russell (1953) demostraron por experiencias realizadas con ^{15}N y ^{14}C que el ALA (Fig. 6) podía reemplazar al succinato "activo" y a la glicina, en la síntesis de las porfirinas, trabajando con sangre de patos. Según ellos, dos moléculas de ALA, podrían luego condensarse para formar PBG.

El primer producto de condensación de la glicina con el succinato podría ser el ácido 2-amino, 3-cetoadípico, el cual siendo un β cetoácido se descarboxila rápidamente para dar ALA; primer intermediario en este camino metabólico (Laver y col. 1959 a, 1959 b).

Shemin y col. (1954), comprobaron que este ácido aminocetónico era la fuente de todos los átomos de carbono de la Proto, pues al incubar sobrenadante de células de pato *lizadas* con ALA $4\text{-}^{14}\text{C}$, encontraron la distribución de la radioactividad esperada, al degradar la molécula de Hemo sintetizada.

La intervención del ALA en la formación de Hemo y porfirinas, fué confirmada por Neuberger y col. (1953), y Berlin y col. (1956); mientras que Dresel y Palk (1953), observaron su conversión en PBG, en un sistema de hemolizados de glóbulos rojos de pollo. Esto también fué demostrado en microorganismos (Lascelles, 1956, 1957, 1959; Pawelkiewicz 1956) y en una serie de sistemas "in vitro" (Granick, 1954a; Gibson y col. 1955; Schmid y col. 1955) por métodos basados principalmente en técnicas de dilución isotópica y en la observación de que el ALA es un precursor más activo para el Hemo, PBG y porfirinas, que la glicina.

Formación del ácido delta amino levúlico. ALA -sintetasa:

Estudios tendientes a demostrar la existencia del ALA como intermediario en la biosíntesis del Hemo, llevaron a la comprobación de que la condensación de la glicina y la succinil CoA, requería la presencia de fosfato de piridoxal (Lascelles, 1957; Schulman y col. 1957). Se vió luego, que éste sería necesario, posiblemente para activar la glicina (Brown 1958a; Gibson 1958; Kikuchi, Kumar, Talmage, Shemin, 1958).

Sobre las bases de sus evidencias experimentales, Kikuchi y col. sugirieron la formación de un carbanión estable entre la glicina y el fosfato de piridoxal, el cual reacciona luego con el átomo de carbono electrofílico, del carbonilo de la succinil CoA para dar el ácido 2-amino3cetoadípico. Este compuesto, luego pierde anhídrido carbónico y dá ALA. Como el ácido 2-amino 3-cetoadípico, se descarboxila inmediatamente en solución neutra a temperatura ambiente, (Laver y col. 1959 a y 1959b), no ha podido aislarse de medios biológicos, quedando aún sin saber si actúa como intermediario unido a una enzima o libre en solución, o si realmente llega a actuar como intermediario ya que es posible que la condensación y descarboxilación tenga lugar en una única reacción.

Un esquema similar a éste, ha sido propuesto por Neuberger en 1961 y más tarde por Aktar y col. en 1968. (Fig. 8)

Esta reacción es llevada a cabo con intervención de la enzima ALA-S, la cual ha sido encontrada en relativamente pocas células, considerando su supuesta distribución universal, ya que debe estar presente en todas aquéllas capaces de biosintetizar hemoproteínas, clorofilas y corrinas (Burnham y col. 1963; Clark-Walter y col. 1967).

Sobre la distribución de la ALA-S hay poca información. Se la ha encontrado en bacterias fotosintéticas relacionadas con las R. spheroides, pero no se pudo detectar su existencia en extractos de muchas otras bacterias. Se ha estudiado su presencia en extractos libres de células de R. spheroides (Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin, 1958; Kikuchi, Shemin, Bachman, 1958; Gibson, 1958; Sawyer y Smith, 1958) en extractos de Rhodospirillum rubrum (Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin, 1958) y en otras bacterias fotosintéticas (Burnham y Lascelles, 1963; Gibson y col. 1958; Narisava y col. 1965; Clark-Walter y col. 1967; Lascelles, 1960).

Recientemente, Lascelles ha podido estudiar la ALA-S en Spirillum litorsonii, único microorganismo fuera del género de las Athiorhodaceae, en el que la enzima ha sido encontrada.

En células animales, se la ha encontrado en preparaciones particuladas de eritrocitos de aves anémicas (Gibson y col. 1958; Laver y col. 1958), de aves normales (Brown, 1958a, Vogel y col. 1966), en mitocondrias de hígado de cobayos (Granick y Urata, 1963), en homogenato de hígado de ratas porfíricas y normales (Harver y col. 1966), en mitocondrias de glándula de Harder de ratas normales (Tomio y col. 1968), en hígado de ratones neonatos porfíricos (Hutton y Gross, 1970), en reticulocitos humanos (Feldman y col. 1967).

Se la ha encontrado también, en extractos libres de células de levadura Torulopsis utilis (Porra y col. 1970), en mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae (Barreiro, 1967), y en extractos de callos de semillas de soya (Wider y col. 1971).

En espinaca, la enzima está asociada con estructuras subcelulares, pero aún no se ha determinado si está en mitocondrias o en cloroplastos. En realidad, parece que en la célula la enzima está íntimamente relacionada con estructuras subcelulares.

La inestabilidad de esta enzima hace difícil su estudio. Se han realizado muchos intentos para purificarla, pero sólo se ha logrado una purificación parcial. Trabajando con R. spheroides, Kikuchi y col. (Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin, 1958), obtuvieron una purificación de 40 a 80 veces, y de la misma fuente Burnham y Lascelles (1963), purificaron la enzima unas 10 veces, mediante un método reproducible, que incluye una estabilización parcial de la misma por agregado de glicina y fosfato de piridoxal o mercaptoetanol y agentes quelantes. Recientemente se la ha purificado de reticulocitos de conejo (Aoki y col. 1971).

Trabajando con sus preparaciones enzimáticas, Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin (1958), y Gibson y col. (1958), observaron que no tenía especificidad absoluta por la succinil CoA. En efecto, ellos encontraron que la ALA-S catalizaba también la condensación de la glicina con propionil-CoA, glutamil-CoA y acetyl-CoA, aunque a una velocidad menor.

En experimentos posteriores, realizados en mitocondrias de hígado normales, Franick y Urata (1962, 1963) encontraron en cambio, utilizando distintos acil-CoA como sustratos, que esas reacciones estarían catalizadas por sintetetasas diferentes y específicas, presentes en esas preparaciones.

Si bien en la literatura, hay datos contradictorios acerca de la necesidad de hierro en esta reacción (Tait, 1968), hay evidencias de que éste participaría en la acción de la ALA-S en algunos tejidos. La enzima de preparaciones provenientes de glóbulos rojos de aves es estimulada por hierro (Brown, 1958 b; Vogel, 1960), Stain y col. (1970), han señalado que este metal aumenta la velocidad de síntesis de la enzima durante la inducción de la ALA-S hepática. En la enzima proveniente de bacterias, en cambio, se requiere hierro ya que cultivos de R. spheroides deficientes en este metal, conducen a un exceso de producción de porfirinas, resultando aumentada la excreción de Copro (Lascelles, 1964).

La síntesis de ALA es inhibida por el amino malonato, y estudios cinéticos han demostrado que esta inhibición es competitiva respecto a succinato (Gibson y col., 1961).

Se ha observado, además, que ciertos productos naturales existentes en la célula, producen inhibición de la ALA-S, como han señalado Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin (1958), en extractos de R. spheroides. Este hallazgo coincide con los encontrados últimamente por varios grupos de investigadores (Irving y col. 1969; Tuboi y col. 1969; Marriot y col. 1969, 1970; Wider y col. 1971), quienes trabajando sobre ALA-S proveniente de distintas fuentes, observaron la presencia de un compuesto cuya naturaleza química, aún no se ha identificado y modifica la actividad de la enzima.

Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin (1958), han sugerido que el inhibidor encontrado en R. spheroides podría tener un rol importante en el control de la biosíntesis de porfirinas.

Se sabe que los procesos metabólicos están catalizados por una variedad de factores. En la biosíntesis de metabolitos esenciales existen una serie de mecanismos regulatorios cuya función es evitar la sobreproducción de intermediarios de la síntesis de enzimas no necesarias. Los estudios, que han llevado a estos conocimientos, han sido realizados en su mayoría en bacterias (Moyed y Umbarger, 1962), y se han establecido claramente dos mecanismos: 1) control por "feed-back" sobre la acción de una enzima y 2) control por "feed-back" sobre la formación de la enzima (represión).

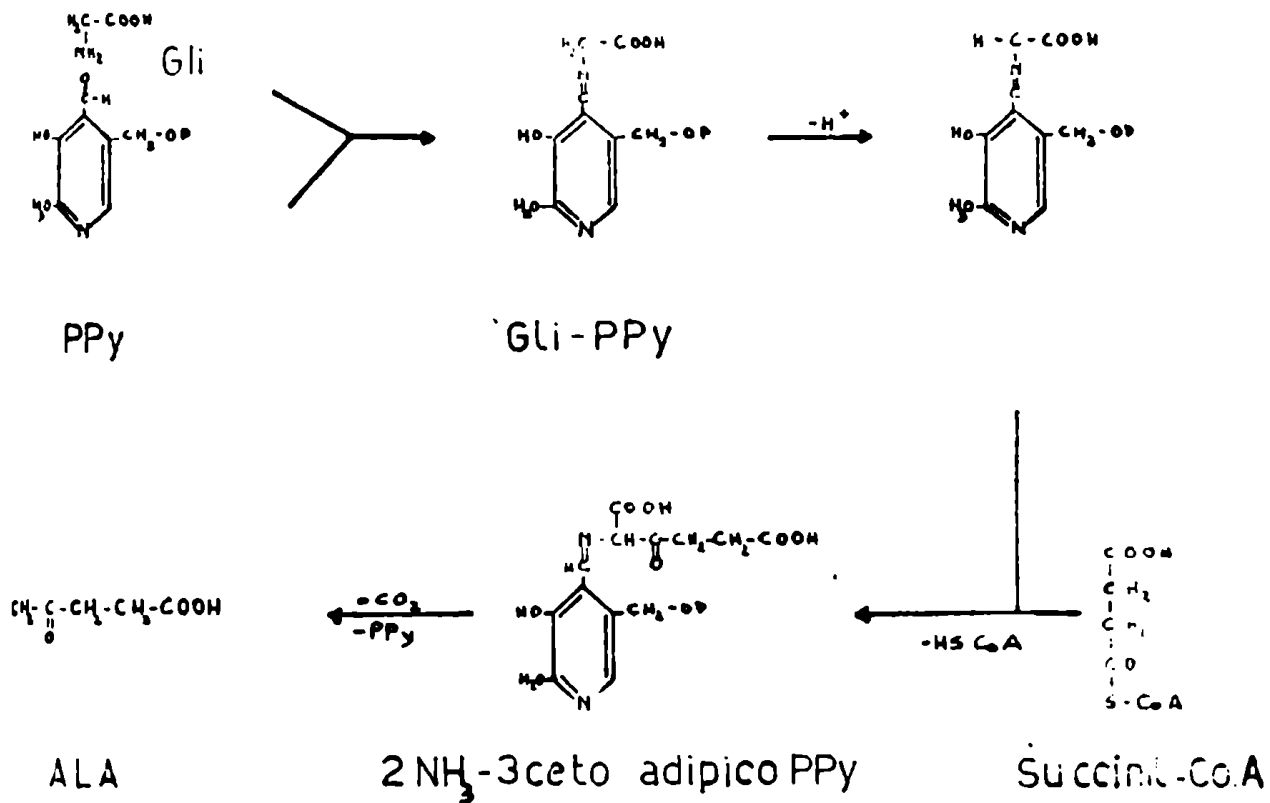
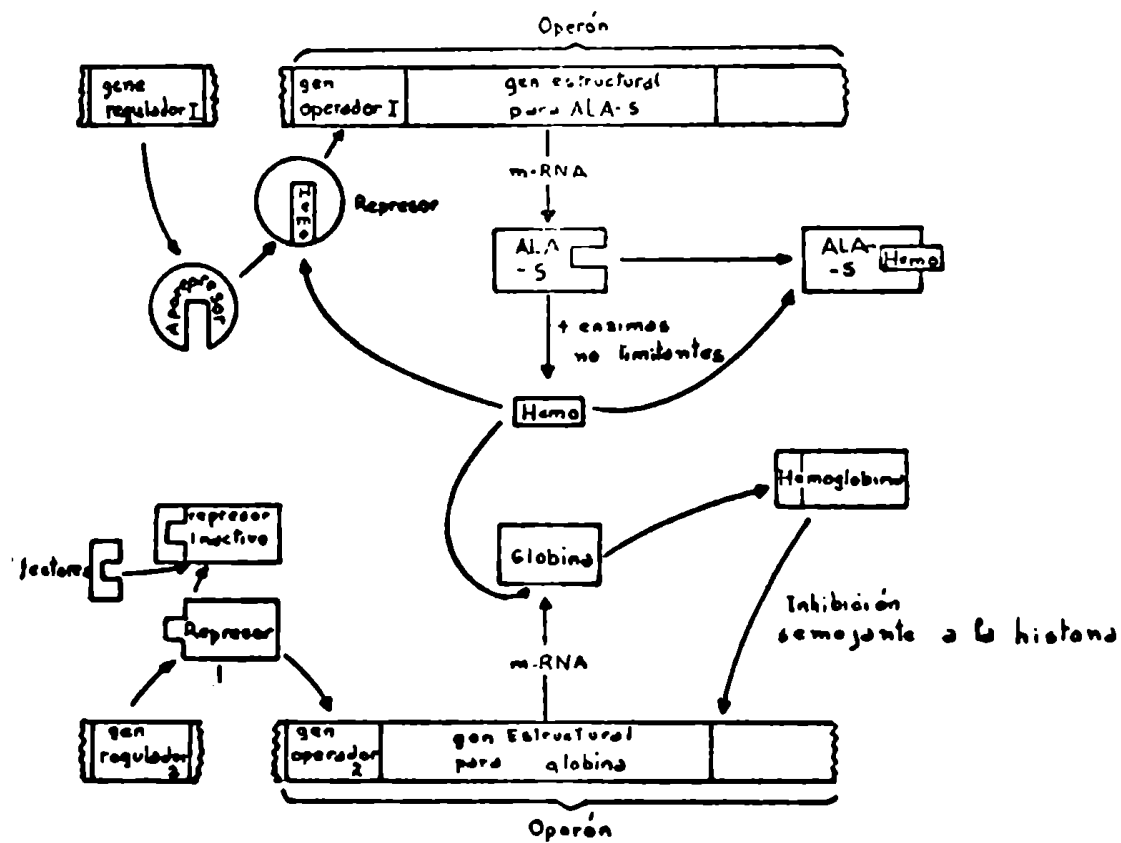


Fig.8 Mecanismo de biosíntesis de ALA



g9 Posible mecanismo de control de la biosíntesis de Hemoglobina

En los ejemplos de control por inhibición de la actividad de una enzima, el producto final inhibe la enzima que cataliza la primera etapa que conduce específicamente al producto final. En estos casos, el inhibidor (producto final), no reacciona en el sitio catalíticamente activo de la enzima, sino que lo hace en otro denominado sitio alostérico (Gerhart y Pardee, 1962). Cuando el inhibidor se combina en este sitio, posiblemente se modifica la estructura terciaria de la enzima en forma tal que los componentes del sitio catalítico pueden cooperar en la catálisis de la reacción. Una propiedad de este tipo de inhibición es su rápida reversibilidad.

En los casos de represión, el producto final actúa como represor de la formación de la primer enzima de ese camino metabólico, y en los casos de "represión coordinada", previene la formación de todas las enzimas del "pathway". Este tipo de inhibición está bajo control genético. De acuerdo al modelo de Jacob-Monod (1961), el producto final de una secuencia biosintética reacciona con una sustancia, aporrepresor, para formar el represor. Este a su vez reacciona con el gen operador para prevenir la síntesis de RNA mensajero, evitando así la formación de enzimas bajo control del gen. En este caso lo único afectado es la síntesis de una nueva enzima.

Los dos tipos de inhibición mencionados parecen tener importancia en la regulación de la biosíntesis de los tetrapirroles en microorganismos (Lascelles, 1964; Lessie y col. 1964; Gato y col. 1967). Sin embargo, sólo la represión parece controlar la síntesis del Hemo en el hígado de los animales superiores (Marver-Tschudy-Perlroth-Collins, 1966; Marver, Collins, Tschudy y Rechcigl, 1966; Granik, Levere, 1964; Granick, 1966; Gallo, 1952). Los primeros estudios de Lascelles (1956), sobre la acumulación de porfirinas y deficiencia de hierro en suspensiones de R. spheroides, establecieron claramente que la biosíntesis de los tetrapirroles era regulada por un mecanismo de inhibición por "feed-back" de alguna de las enzimas del "pathway". En efecto, se vió que el hierro actuaba catalíticamente, evitando la acumulación de porfirinas, lo que sugería que éste era necesario para formar un compuesto que controlara una de las primeras enzimas del camino biosintético por el mecanismo antes citado.

Trabajos posteriores con ALA-S parcialmente purificada (Burnham-Lascelles, 1963), dieron evidencias de que el compuesto en cuestión podría ser el Hemo y la enzima inhibida la ALA-S; ya que la acumulación de porfirinas era inhibida por hemina cuando los sustratos de la reacción eran glicina y 2-cetoglutarato, pero no cuando se usaba ALA como sustrato. La enzima aislada resultó ser extremadamente sensible a la hemina, aún a concentraciones muy bajas.

Por otro lado, estudios también de Lascelles (1960), señalaron una represión en la síntesis de la ALA-S en cultivos en crecimiento de R. spheroides por adición de bajas concentraciones de hemina. La síntesis enzimática no se afectó por otras porfirinas o complejos metálicos ensayados.

La hemina, podría tener entonces un doble efecto, reprimir la formación de la enzima, o inhibir la acción de la misma, lo que estaría de acuerdo con otras biosíntesis que son reguladas por ambos procesos de inhibición y represión, por producto final (Lascelles, 1968).

Granick (1963, 1966), basándose en el mecanismo clásico de regulación de un sistema reprimible de Jacob-Monod (1961), propuso un esquema para la regulación de la biosíntesis del Hemo, donde la ALA-S juega un papel muy importante (Fig. 9).

Ciclo de la glicina-succinato. Ciclo de Shemin

El ALA biosintetizado por la ALA-S, además de utilizarse para la síntesis de porfirinas puede ser metabolizado vía el ciclo de la glicina-succinato, propuesto por Shemin y ser utilizado como fuente de unidades de "C₁" (Shemin, Russell, 1953; Shemin-Russell-Abramsky, 1955) (Fig. 10).

De acuerdo a este esquema, el átomo de carbono 5 del ALA, proveniente del 2 de la glicina, es utilizado para la síntesis del grupo ureído de las purinas, en el átomo de carbono 3 de la serina y en grupos metilos activos. Por otra parte, el residuo de 4 átomos de carbono es nuevamente convertido en succínico.

Los estudios enzimáticos de este ciclo, se han dedicado principalmente a la primera reacción, es decir, la desaminación del ALA en cetoglutaraldehído. La enzima que cataliza esta reacción se ha encontrado en tejidos de mamíferos (Kowalski y col., 1958), en *Corynebacterium diphtheriae* (Bagdasarian, 1958), en *R. spheroides* (Gibson y col. 1962).

Gibson-Matthew-Neuberger-Tait (1961), sugieren que esta reacción está desplazada hacia la formación de ALA más que para su desaminación y que sólo una pequeña parte del ALA formado no es utilizado, en la síntesis de porfirinas. Estudios realizados con sustratos radioactivos han confirmado la existencia de este ciclo (Nemeth y col., 1957; Shemin, 1955). El significado metabólico del mismo fué discutido por Krebs y Lowenstein (1960) y por Granick y Mauzerall (1961).

Shemin, al proponer este ciclo, dá un mecanismo por el cual el carbono 2 de la glicina es utilizado en la síntesis de los distintos compuestos y relaciona además el ciclo de Krebs con la biosíntesis de porfirinas a través del ALA.

Formación de Porfobilinógeno- Ala-Dehidrasa

La formación del pirrol, PBG, precursor aromático de las porfirinas, se lleva a cabo por la condensación de dos moléculas de ALA, con pérdida de dos de agua, mediante una reacción que involucra una condensación del tipo de Knorr.

La enzima que cataliza esta reacción, la ALA-D, delta aminolevúlico de-

- SÍMBOLOS**
- : CARBONO
 - Ⓝ : NITRÓGENO
 - : OXÍGENO
 - : HIDRÓGENO

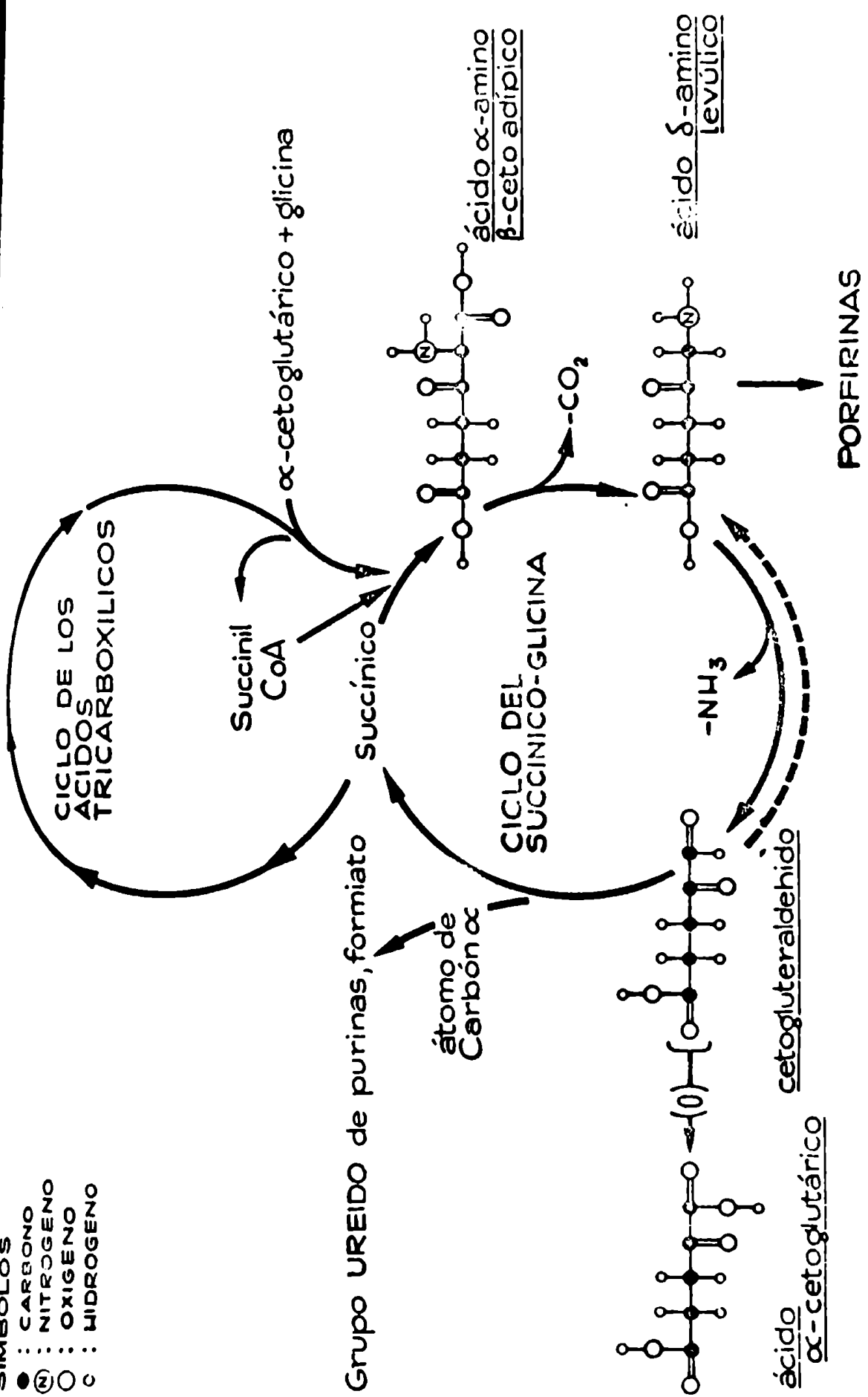


Fig.10 Ciclo del succinato-glicocola

hidrasa, 5-aminolevúlico-hidroliasa (E.C. 4.2.1.24), está ampliamente distribuida en la naturaleza y posiblemente esté presente en todos los organismos aeróbicos.

A diferencia de la ALA-S, esta enzima es fácilmente detectable en extractos provenientes de animales, plantas y bacterias. Además, mientras la ALA-S parece ser mitocondrial, en la mayoría de los tejidos, la ALA-D es una "enzima soluble", por lo que una vez formado el ALA debe salir de las mitocondrias antes de convertirse en PBG.

La actividad de la enzima, ha sido medida en distintos tejidos animales (Gibson, Neuberger y Scott, 1955; Gajdos y Gajdos-Török, 1955; Iodice y col. 1958; Granick, 1954 a; Granick y Mauzerall, 1958 a; Russell y Coleman 1963), en ciertos vegetales como en hojas de espinaca (Falk y col. 1956), en algunas leguminosas (Cori y Navari-Izzo, 1969), en hojas de poroto (Steer y Gibbs, 1969 b); en tejidos de callos de Kalanchoe Crenata (Stobart y Thomas, 1968), en Chlorella (Bogorad y Granick, 1953), en tejidos de Neoaemphitrite ficulus (Dales, 1968), en cloroplastos de Euglena gracilis (Carell y Kahn, 1964), en el hongo Neurospora crassa (Krishnan, Padmanaban y Sarma, 1968), y en bacterias como Gorynebacterium diptheriae y Bacterium cadaveris (Gibson y col. 1954, 1955), y R. Spheroides (Lascelles, 1956).

La ALA-D ha sido parcialmente purificada de hígado de buey (Gibson y Scott, 1955; Iodice y col. 1958), de hígado de rata y paloma (Schulman, 1955), de hígado y bazo de ratón (Coleman, 1966), de hígado de ratón (Doyle-Schimke, 1969), de glándula de Harder de ratas (Tomio y col. 1968), de eritrocitos de aves (Granick y Mauzerall, 1958 a; Schmid y Shemin, 1955), de reticulocitos de conejo (Granick y Mauzerall, 1958 a), eritrocitos humanos, Calissano, Sartasegna y Matteini, 1966), de R. spheroides (Burnham y Lascelles, 1963; Shemin, 1962; Nandi, Baker-Cohen y Shemin, 1968); de Propionibacterium shermanii (Walerych, 1963); de Spirillum itersonii (Ho y Lascelles, 1971); de Mycobacterium phlei (Yamasaki y Moriyama, 1971); de Ustilago sphaerogena (Komai y Neilands, 1969), de hojas de trigo (Nandi y Waygood, 1967), de hojas de tabaco (Shetty y Miller, 1969 a, 1969 b, Schneider, 1970), de hojas espinaca (Schneider, 1970), de Saccharomyces cerevisiae (Barreiro, 1967), de callos de semilla de soya (Tigier y col. 1970).

En los animales, aparte de los tejidos hematopoyéticos, el hígado es una de las fuentes más ricas de esta enzima, aunque otros tejidos, en especial riñón y médula ósea, también lo son.

Respecto a la localización de la ALA-D, ya se dijo que es una "enzima soluble". Se la ha encontrado en la fracción soluble de extractos de células animales, vegetales y microorganismos.

Estudios realizados por Gibson y col. (1955), sobre fracciones particuladas de hígado de ratas, señalan que no se ha encontrado actividad asociada con las mitocondrias, ni microsomas, sino que toda se recupera en la fracción soluble.

Sin embargo, Granick . (1961), encontró actividad de ALA-D en plástidos de hojas de poroto, tabaco y cebada. Por otra parte, en cultivos de Kalonchoë crenata, la enzima está íntimamente asociada con las membranas de los cloroplastos (Stobart y Thomas, 1968). Schneider (1970) sugiere que en cultivos en verdeo de Nicotiana Tabacum, esta enzima estaría localizada en los plástidos, pese a que luego de un fraccionamiento se encuentra toda la actividad de ALA-D en la fracción soluble.

La enzima de casi todas las fuentes es de naturaleza sulfhidrúlica, propiedad que se pone de manifiesto por su sensibilidad a los reactivos de grupos sulfhidrilos. La inhibición producida por estos reactivos es revertida por agentes reductores tales como cisteína y glutatión reducido, los que en la mayoría de los casos son requeridos para la activación enzimática.

— En general, esta pérdida reversible de la actividad, aumenta con el grado de pureza de la enzima, por lo que los grupos sulfhidrilos de la misma se deben de hallar moderadamente expuestos.

Las enzimas provenientes de S. cerevisiae (Barreiro, 1967) y de callos de semillas de soya (Tigier y col. 1970) no requieren cisteína ni glutatión para obtener máxima actividad. Un comportamiento similar se encontró para la ALA-D de hígado de cerdo, que se está estudiando actualmente en el laboratorio (Kivilevich, Sancovich, Ferramola y Grinstein).

La enzima aislada de callos de semilla de soya, no sólo no necesita activación por cisteína o glutatión, sino que por el contrario a determinadas concentraciones, estos compuestos son inhibidores. No obstante, se determinó la presencia de grupos tioles esenciales para la actividad enzimática, por la inhibición producida por reactivos de tales grupos. Pareciera que en esta enzima, la distribución de los grupos sulfhidrilos y la de los puentes disulfuros en la estructura terciaria, es distinta a la de otras fuentes (Tigier y col. 1968; 1970).

La ALA-D, se caracteriza por ser una enzima relativamente estable al calor. La velocidad máxima de la reacción se encuentra a una temperatura que oscila entre los 50° y 65°C, para enzimas provenientes de distintas fuentes. La ALA-D aislada de hojas de tabaco, presenta valores más bajos, ya que la actividad aumenta entre los 25 y 45°C, pero arriba de 45°C se observa una disminución de la actividad y a los 60°C inactivación completa. (Shetty Miller 1969a). La enzima purificada de hígado y bazo de ratón, en cambio, es notablemente estable al calor y tiene una vida media de alrededor de 80 min a 75°C. (Coleman, 1966). Otra enzima resistente al calor, es la aislada de Propionibacterium shermanii, cuya temperatura óptima, para su actividad catalítica son 60°C (Walerych, 1963).

El pH óptimo de la ALA-D de mamíferos es ligeramente inferior a 7 (Gibson y col. 1955; Tomio y col. 1968 b; Coleman 1966; Granick y Mauzerall 1958a). Este valor aumenta en tejidos vegetales y en ciertos microorganismos (Shetty y Miller, 1969; Nandi y Waygood, 1967; Burnham y Lascelles, 1963; Walerych, 1963; Ho y Lascelles, 1971), llegando a 9,2 y 9,5 para la enzima

aislada de Mycobacterium Phlei (Yamasaki y col., 1971) y de levadura (Barreiro, 1967) respectivamente. Los valores varían, un poco con el buffer utilizado en las determinaciones.

El valor de la constante de Michaelis, en las distintas especies varía entre $7,7 \times 10^{-3}$ M, dato hallado para la ALA-D de Mycobacterium phlei (Yamasaki y Moriyama, 1971) y 1×10^{-3} M para la enzima de hojas de trigo (Nandi y Waygood, 1967).

Pese a que la ALA-D de todas las fuentes estudiadas se comporta como una típica enzima sulfhidrúlica, el efecto del EDTA y el de ciertos cationes varía según el origen de la enzima.

Iodice y col. (1958) encontraron que la enzima de hígado de buey contenía cobre y magnesio en su composición, observando una disminución en la actividad de la enzima en ratas sometidas a una dieta deficiente en cobre. Sin embargo, estudios posteriores, revelaron que la ALA-D pudo ser preparada sin pérdida de su actividad, en ausencia de cobre, observándose además que no está relacionada con anemias por deficiencia en ese metal (Wilson y col. 1959).

La enzima parcialmente purificada de R. spheroides según Burnham y Lascelles (1963), requiere iones potasio para su actividad. Más recientemente, Shemin y Nandi (1967), encontraron que el requerimiento de este ion no es absoluto y lo que hace, es disminuir el Km de la enzima.

La enzima de hojas de trigo (Nandi y Waygood, 1967), tampoco requiere iones K^+ , pero a diferencia de enzimas de otras fuentes, es activada por ciertos cationes divalentes como Mg^{++} , Mn^{++} y Ca^{++} .

Se ha encontrado que el Mg^{++} es necesario para obtener la máxima actividad de la enzima en algunas bacterias, como R. spheroides (Burnham y Lascelles 1963, Propionibacterium shermanii (Walerych, 1963), Mycobacterium phlei (Yamasaki y Moriyama, 1971), Spirillum itersonii (Ho y Lascelles, 1971), y en la aislada de hojas de tabaco (Shetty y Miller, 1969).

El Fe^{++} y el Hg^{++} activan la ALA-D de hígado de ratón (Coleman, 1966), pero el Fe^{++} inhibe la de Nicotiana tabacum (Shetty y Miller, 1969), la de hojas de poroto (Steer y Gibbs 1969 b) y la de hígado vacuno (Gibson y col. 1955) Esta última también es inhibida por iones Zn^{++} y Mg^{++} .

En el hongo Ustilago Sphaerogena, Komai Neilands observaron una disminución en la actividad de la ALA-D en células deficientes en Zn^{++} . En extractos crudos del hongo, la actividad de la enzima depende de la concentración de este metal en el medio, y éste parecía estar involucrado en la síntesis de la enzima a nivel translacional (Komai y Neilands, 1963).

Por otra parte, trabajando con la enzima purificada, estos autores postulan la existencia de un metal, posiblemente cobre, unido fuertemente a la enzima que es esencial para la actividad de la misma (Komai y Neilands, 1969).

Tigier y col. (Tigier, Batlle y Locascio, 1970), encontraron que la ALA-D aislada de callos de semilla de soya, depende de la concentración de Zn^{++} en el medio de cultivo.

Pese a todos estos hallazgos, aún no hay prueba directa, de que la ALA-D requiere un metal. Es interesante, sin embargo, el hecho que el EDTA sea un potente inhibidor de la enzima de mamíferos (Gibson, Neuberger y Scott 1955; Granick y Mauzerall, 1958; Tomio y col. 1968), con excepción de la de ratones que es activada (Coleman, 1966).

La enzima de eritrocitos de ave, es sólo parcialmente inhibida aún a concentraciones altas de EDTA (Granick y Mauzerall, 1958a) y la de eritrocitos humanos es inhibida o activada según esté presente o no un compuesto tiólico (Calissano, Bonsignore y Cartasegna, 1966). La ALA-D de R. spheroides no es afectada por este agente quelante (Burnham y Lascelles, 1963; 1962), pero la aislada de otras bacterias como Propionibacterium shermanii (Walerych, 1963) y Micobacterium phlei (Yamasaki y Moriyama, 1971), son inhibidas fuertemente por EDTA, aunque en ambos casos esta inhibición es revertida por Mg^{++} . Un efecto semejante tiene el Mn^{++} sobre la inhibición producida en la ALA-D de hojas de trigo (Nandi y Waygood, 1967). Otras enzimas inhibidas por EDTA son las de hojas de tabaco (Shetty y Miller, 1969), la de callos de semilla de soya (Tigier y col. 1970), y la de S. cerevisiae (Barréiro, 1967).

Los metales pesados, como Cu^{++} , Hg^{++} , Ag^+ , inhiben marcadamente una preparación cruda de ALA-D de hígado de buey, en un orden que sigue los productos de solubilidad, de sus sulfuros (Gibson y col. 1955). Resultados semejantes fueron obtenidos por Granick y Mauzerall (1958a), quienes trabajaron con ALA-D de reticulocitos de pollo y conejo por Tomio y col. (1968) en glándula de Harter de rata; por Nandi y Waygood (1967), en hojas de trigo, y por Walerych (1963) en Propionibacterium shermanii. Por el contrario, Coleman (1966), en ratones encuentra que el Cu^{++} y el Pb^{++} a bajas concentraciones inhiben la ALA-D, pero el Hg^{++} , Fe^{++} y Ag^+ pueden ser inhibidores o activadores dependiendo de la concentración empleada. Cuando se usan a una concentración mayor que la del activador de sulfhidrilos, hay inhibición completa, pero cuando se trabaja con concentraciones menores, casi no tienen efecto o por el contrario activan la reacción marcadamente. Estos resultados se oponen a los encontrados en preparaciones enzimáticas crudas o purificadas de hígado de buey, que son inhibidas por Hg^{++} , Fe^{++} y Ag^+ a concentraciones mucho menores que las requeridas en el caso anterior.

Sin embargo, pese a estos hallazgos, en general, salvo el caso de la ALA-D de Ustilago sphaerogena (Komai y Neilands 1969), los agentes quelantes de metales, como el α , α -dipiridilo, 8-HO quinolina y otros, prácticamente no afectan la actividad específica de la enzima (Burnham y Lascelles, 1963; Coleman, 1966; Nandi y Waygood, 1967; Tomio y col. 1968).

Granick y col. (1955), trabajando con enzima de hígado de buey, observaron que los ácidos 5-sulfónico-3-hidroxiquinolina y 5-sulfónico 8 hidroxi-7-iodoquinolina a una concentración de 10^{-5} M, producían una inhibición del 30%. Este efecto se mantuvo aún en presencia de un exceso de Fe^{+++} .

La inhibición se atribuyó a la presencia de los grupos sulfónicos, más que a las propiedades quelantes de estos compuestos, ya que la 3-hidroxiquinolina, la 3-hidroxiquinaldina, el ácido quinaldínico y el ácido picrolónico no tuvieron efecto cuando se ensayaron sobre la misma preparación.

Estos mismos autores, encontraron que la enzima es completamente inactiva en buffer Tris, pero si lo es en una mezcla de Tris y fosfato o Tris y arseniato al mismo pH de reacción. El efecto activante del fosfato fué también observado por Shetty y Miller (1969) con ALA-D aislada de hojas de tabaco y de hígado de buey. Ellos encontraron además que ambas enzimas, son activas en buffer Tris, pero presentan un pH óptimo distinto. En general, salvo en los casos mencionados, el buffer Tris no tiene efecto inhibitorio sobre la enzima, por el contrario, a veces aumenta su actividad como en el caso de callos de semilla de soya (Tidier y col. 1970), siendo utilizado con enzimas de varias fuentes (Nandi y Waygood, 1967; Nandi y Shemin, 1968a; Yamasaki y Moriyama, 1970; Ho y Lascelles, 1971).

Respecto al sustrato de esta enzima, Onisawa y Labbe, (1962) observaron que la actividad de la ALA-D en hígado vacuno, varía mucho con la concentración de ALA, lo que probablemente indique que haya una actuación directa de la enzima por el sustrato.

Por otra parte, la ALA-D es bastante específica para el ALA y es inhibida por una serie de análogos de éste.

Cuando se incubó la enzima de hígado de buey (Gibson y col. 1955), con aminoacetona, con ácido 2-5 diaminolevúlico o ácido 6 amino 5 cetoheptanoico, ninguno de ellos sirvió como sustrato. Tampoco lo hicieron el 5 amino, 3 metil levúlico, ni el 5 amino, 2 metil levúlico, ensayados con ALA-D aislada de *R. spheroides* (Lartillot y Baron, 1967). Nandi y Waygood (1967), encontraron que de todos los amino y cetoácidos ensayados, análogos al ALA, sólo el ácido levúlico inhibe marcadamente la ALA-D de hojas de trigo, lo que también fué cierto para la de reticulocitos de conejo (Granick y Hauzerall, 1953a), y la de bacterias *R. spheroides* (Nandi y Shemin, 1965). En este último caso se pudo ver que la inhibición es competitiva y la relacionaron con el estudio del mecanismo de la reacción que ellos proponen (Nandi y Shemin, 1962b).

La inhibición de la ALA-D, por el ácido levúlico, también fué encontrada por Lascelles en *Spirillum itersonii* (Ho y Lascelles, 1971). Ellos observaron, que este inhibidor competitivo de la enzima "in vitro", causa acumulación de ALA "in vivo" y reduce también el contenido en citocromos en alrededor de un 50%, lo que indicaría una acción similar del ácido levúlico "in vivo". Esta acumulación de ALA ya había sido observada por Beale (1970), en cultivos de *Chlorella*. En *Micobacterium phlei*, Yamasaki y Moriyama (1971) con sus datos

confirmaron la naturaleza inhibitoria de este compuesto, junto al ácido 5 hidroxilevúlico y el aminoácido antituberculoso, 5 hidroxil 4 oxo-L-norvalina. La cinética de estos inhibidores fué también de naturaleza competitiva.

Tschudy y col. (1960), encontraron que en hígado de ratón, el ácido 5 oximinolevúlico a bajas concentraciones inhibe a la ALA-D, siendo esta inhibición de naturaleza competitiva. Ellos observaron además, que a varias concentraciones de ALA y ácido 5-oximinolevúlico la inhibición es relativamente constante para una dada relación de análogo a sustrato.

Estudiando el efecto de los nucleósidos sobre la ALA-D, Gajdos y Gajdos Török (1955), encontraron que el ATP y el AMP inhiben marcadamente a la enzima de hígado de ratas. En cultivos de R. spheroides se observó que todos los nucleósidos trifosfatados, disminuyen la excreción de porfirinas al medio, aunque no se pudo determinar en qué forma ellos pueden controlar dicha excreción (Gajdos y Gajdos-Török, 1965; Gajdos y col. 1967). Por otra parte, en animales porfiricos (Gajdos y col. 1967, 1968), la concentración de ATP en hígado es mucho menor que en hígados normales, por lo que se sugirió, que el nucleótido podría actuar por un mecanismo aún no dilucidado (Gajdos y col. 1969). Nandi y Waygood, (1967), proponen lo mismo al encontrar una fuerte inhibición de la ALA-D de trigo por ATP. Un efecto similar se encontró en las enzimas de hojas de tabaco (Shetty y Miller, 1969).

En callos de semilla de soya (Tigier y col. 1970), se vió también que los nucleótidos y compuestos relacionados disminuyen marcadamente la actividad de la enzima. En concentraciones equivalentes el AMP es menos efectivo que el ADP, el cual a su vez es menos efectivo que el ATP.

Relacionado con este efecto en la purificación de esta enzima se encontró un inhibidor de bajo peso molecular, de estructura desconocida, pero existen evidencias que sugieren el contenido de nucleótidos, bases púricas y pirimidicas en su composición.

Para la enzima aislada de esta misma fuente, se ha determinado un P.M. de 280.000, utilizando métodos de filtración por geles (Tigier y col. 1970). Coleman (1966) para la ALA-D de ratón encontró un P.M. aproximado de 70.000 por ultracentrifugación y coeficientes de difusión. Por este mismo método, para la de eritrocitos humanos se estimó un P.M. de 283.000 (Calissano-Jartasegna y Mateini, 1966).

Nandi y col. (1968), trabajando con R. spheroides asignaron un valor de 50.000 para el P.M. del monómero de la enzima el que puede ser disociado por urea 1 M y por diálisis en subunidades de menor P.M..

Por otra parte se vió que la adición de iones K^+ , promueve la asociación de la enzima, llegándose a establecer una mezcla de equilibrio formada por las tres especies, enzimáticamente activas, monómero, dímero y trímero de mayor P.M..

Estos autores han encontrado, que la ALA-D aislada de R. spheroides, reúne una serie de propiedades, además de la mencionada, que la caracterizan como una enzima alostérica. Vergnano y col. (1968), observaron lo mismo para la ALA-D de eritrocitos humanos.

La enzima de R. spheroides presenta una curva sigmoidea de velocidad de reacción en función de concentración de sustrato, que en presencia de efectores alostéricos de la enzima, K^+ , Li^+ , Rb^+ y NH_4^+ , se vuelve hiperbólica (Michaeliana).

Estos resultados no se cumplen para la ALA-D de R. capsulata, ya que su actividad no varía con la adición de iones metálicos y el sustrato no presenta efectos homotrópicos cooperativos.

La urea a bajas concentraciones inhibe la ALA-D de R. spheroides. El análisis de la cinética de inhibición, indica que la urea es un inhibidor competitivo (Nandi y Shemin, 1968a).

Nandi (1971), ha encontrado que esta enzima es inhibida no sólo por la urea, sino también por concentraciones relativamente bajas de guanidina y etil derivados de la urea, siendo la inhibición también de naturaleza competitiva. Estudios de inhibición mixta, parecen indicar que el sitio de unión podría ser el mismo que el del sustrato. Sin embargo, el efecto de la urea sobre la ALA-D, estudiado por centrifugación por gradiente de sacarosa, indica que la inactivación de la enzima es causada por su disociación en subunidades y el sustrato podría revertir esta inactivación, evitando la disociación más que compitiendo con la urea por el sitio activo.

S. van Heyningen y Shemin (1971), trabajando con R. spheroides han encontrado que la enzima purificada es inhibida en forma no competitiva por el fosfato de piridoxal. El efecto parece ser específico de la molécula de fosfato de piridoxal y no del carbonilo, pues el piridoxal y el fosfato de piridoxamina inhiben en la misma forma, en cambio la piridina-benzaldehído y la piridina 4-carboxaldehído no poseen esta propiedad. También observaron inhibición competitiva por el cianuro de sodio, esta inhibición está relacionada con el mecanismo propuesto por Nandi-Shemin (1968b), para esta enzima, que luego se discutirá.

La observación original de Burnham y Lascelles (1963), de que la ALA-D de R. spheroides es inhibida por bajas concentraciones de hemina, ha sido confirmada con enzimas de otras fuentes.

Galissano, Bonsignore y Cartasegna, (1966), estudiaron el efecto del hemo sobre la ALA-D de eritrocitos humanos, y observaron que éste inhibía fuertemente tanto a la enzima cruda como a la purificada, siendo el efecto en el último caso algo mayor. La enzima aislada de hígado de ratón (Coleman, 1966), también es inhibida por hemina y Proto. Nandi y col. (1968), trabajando con la enzima purificada por ellos, confirman lo hallado por Burnham Lascelles, al encontrar que cuando la hemina se incubaba con la enzima antes de la adición del ditiotreitol y del sustrato, causa una marcada inhibición. Estudios rea-

lizados con Proto señalaron que es un inhibidor tan efectivo como la hemina.

A diferencia de estos casos, recientemente Lascelles y Ho, (1971), encontraron que en S. itersonii la ALA-D es sólo levemente inhibida por concentraciones relativamente altas de hemina y Proto.

En M. phlei, la hemina no muestra efecto inhibitorio sobre la enzima.

La inhibición de la ALA-D por hemina, junto con las evidencias de que esta enzima está compuesta de subunidades y presente características atribuidas a las enzimas alostéricas (Monod-Wyman y Changeux, 1965), ofrecen la posibilidad de que sea, junto con la ALA-S, un posible punto de control en la biosíntesis de porfirinas.

La síntesis del ALA, así como la del pirrol PBG, son dos etapas comprometidas en la formación de porfirinas y compuestos relacionados que pueden estar sujetas a un control metabólico por "feed-back" y/o represión. En la mayoría de los sistemas estudiados pareciera que la etapa limitante, es la velocidad de síntesis del ALA. Sin embargo, últimamente se han encontrado evidencias de que, en varias fuentes la ALA-D pudiera tener una participación importante en la regulación de la biosíntesis del Hemo y derivados.

Respecto a la inhibición de la ALA-D de hígado de ratón por hemina y Proto, Coleman (1966), señala que estas dos sustancias son productos de etapas enzimáticas que tienen lugar, bastante después de la formación del PBG, en la biosíntesis del Hemo, por lo que podrían regular su síntesis por un mecanismo de "feed-back" actuando sobre la ALA-D. Los resultados obtenidos por Calissano, Bonsignore y Cartasegna (1966), en eritrocitos humanos, llevaron a una conclusión semejante respecto al efecto del Hemo sobre la ALA-D. Se observó además que cuando éste, se une a la globina, inhibe la enzima, no así cuando lo hace con otras proteínas. Estos resultados confirman el rol del Hemo en el metabolismo de la hemoglobina, ya que éste inhibe por lo menos dos de las enzimas involucradas en su biosíntesis, la ALA-S y la ALA-D. Por otra parte, se vio que el Hemo también estimula la formación de la globina (Bruns-London, 1965).

Rao y col. (1970), encontraron que el Coprógeno III también inhibe a la ALA-D en hígado, bazo y hemolizados de sangre de rata y ratón, sugiriendo que éste podría deberse a un efecto de inhibición por "feed-back".

Estudiando el papel del hierro en la síntesis del Hemo, Lascelles (1964), observó que éste ejerce un efecto catalítico previniendo la acumulación de porfirinas en cultivos de R. spheroides deficientes en este metal. Por otra parte, Komai-Neilands (1966), observaron que células de Ustilago phaerogena deficientes en hierro, producían menos porfirinas, y presentaban una baja actividad de ALA-D; por lo que el hierro en este hongo, podría estar involucrado no sólo en la etapa final de la síntesis del Hemo sino

en algún sitio que conduce a la síntesis de porfirinas.

Esto llevó a Padmanaban, Muthukrishnan y Sarma (1967) a hacer un estudio semejante en el hongo Neurospora crassa. En efecto, se vió que la adición de hierro a un cultivo deficiente en este metal, producía un incremento en la síntesis del Hemo, lo que sugeriría que éste estaría implicado en la inducción de alguna o algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis de las porfirinas. Ellos encontraron, que el hierro induce la síntesis de ALA-D cuando se agrega a cultivos deficientes en él, posiblemente inactivando un correpresor de esta enzima. Estos resultados indicarían que la ALA-D sería el sitio de mayor regulación de la biosíntesis del Hemo en este organismo (Muthukrishnan y col. 1969). Esta hipótesis, fué confirmada posteriormente al comprobar que la inducción de la ALA-D es reprimida por Proto y menos efectivamente por hemina y globina. Finalmente, los autores propusieron un modelo, en el que la Proto se visualiza como el correpresor de la ALA-D (Muthukrishnan y col. 1969) (Fig. 11).

Recientemente, este grupo de investigadores (Jayaraman y col., 1971), trabajando con S. cerevisiae, estudiaron la actividad de la ALA-D durante la fase de re-represión por glucosa, asignándole a esta enzima una posible función regulatoria.

Esta propiedad de la ALA-D, ya había sido sugerida por Onisawa y Labbe (1962), cuando al estudiar la enzima de hígado de ratón encontraron una relación constante entre la actividad de la misma y la concentración de LA, lo que sugería una posible activación de la enzima por su sustrato.

Por otra parte, en microorganismos, Menon y Shemin (1967), observaron en células de Propionibacterium shermanii crecidas aeróbicamente, una disminución en la síntesis de cobamida, debido a una disminución en las actividades de las enzimas involucradas en la síntesis del anillo porfirínico de la coenzima B₁₂. En efecto, encontraron una disminución parcial de la ALA-S y prácticamente no detectaron actividad de ALA-D. Esta disminución en las actividades de ALA-S y ALA-D, ya había sido observada en R. spheroides (Kikuchi, Kumar, Talmage y Shemin, 1958; Lascelles, 1960) y se habían atribuido a una represión enzimática; pero en estos organismos la represión no justificaba la falta completa de síntesis de clorofila observada en cultivos aeróbicos.

En P. shermanii, en cambio, la reducción de la ALA-D por oxígeno parece ser suficientemente grande como para estar de acuerdo con la inhibición de la síntesis de cobamida, por lo que los autores atribuyen a la represión de la ALA-D un importante rol regulatorio en la síntesis de porfirinas.

Algo semejante ocurre con las bacterias aeróbicas Spirillum itersonii (Lascelles y col. 1969), ya que si bien la ALA-S puede ser reprimida y re-reprimida, con los cambios de tensión de oxígeno, su actividad excede

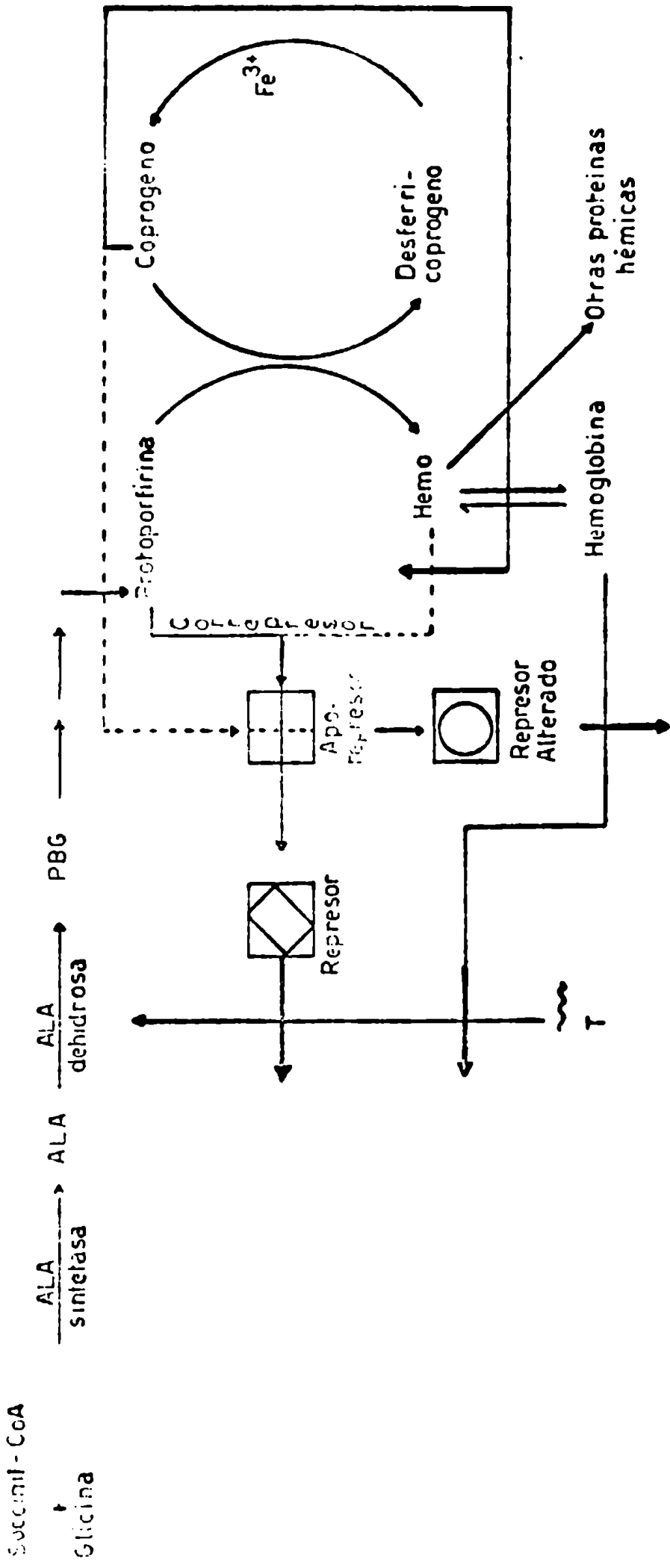


Fig. 1. Esquema para la regulación de la síntesis de Porfirinas en *N. crassa*

la de la ALA-D en todas las condiciones estudiadas, por lo que esta última enzima podría ser importante en la regulación de la formación del Hemo en este organismo.

Ebbon y Tait (1969), trabajando con Euglena gracilis, también asignan una propiedad regulatoria a la ALA-D. En hojas de poroto, Steer y Gibbs, (1969 b), observaron que el aumento de actividad de ALA-D es paralelo al de clorofila, sugiriendo un mecanismo de control común a los dos sistemas.

Todos estos ejemplos demuestran que la ALA-D podría estar sometida a un control del tipo "feed-back" y señalan también su capacidad de ser inducida o reprimida. Por otro lado Russell y Coleman (1963), han informado acerca de la regulación genética de la ALA-D hepática en ratón, y según ellos la velocidad de síntesis de la enzima, estaría bajo control de por lo menos dos genes en el locus levulinato. Trabajando con la misma enzima, Doyle y Schimke (1968), proponen tres mecanismos mediante los cuales la concentración de la ALA-D en los tejidos es regulada a nivel genético. Recientemente, Coleman (1971), por medio de un análisis genético confirma sus primeras teorías y establece que el locus estructural para la ALA-D es parecido o idéntico al locus que controla su velocidad de síntesis.

La actividad de la ALA-D puede modificarse "in vivo" por varios medios, parte de los mencionados anteriormente. En bacterias fotosintéticas, así como en otros microorganismos, modificando las condiciones de los medios de cultivo, se producen variaciones en los niveles de las distintas actividades enzimáticas. Se vió por ejemplo que cambios en la presión parcial de oxígeno, o en la iluminación, así como en el contenido en metales, por medio de cultivo de distintos microorganismos, producen modificaciones en la actividad de la ALA-D,

Por otra parte, Stobart y Thomas (1968), encontraron que la actividad de esta enzima, en cultivos de Kalanchoe crenata aumenta con el contenido de clorofila, el cual está relacionado con la iluminación.

Recientemente, Schneider (1971), trabajando con enzimas purificadas de cultivos de Nicotiana tabacum sometidas a una continua iluminación con luz blanca, observó un aumento en la actividad de la ALA-D, así como de la uroporfirinógeno-deaminasa y Uroporfirinógeno III Cosintetasa. El aumento de estas actividades específicas fué lineal, semejante al que presentó la clorofila; luego de una fase lag.

En animales, por otra parte, existen una serie de drogas, que administradas en distintas condiciones, aumentan notablemente la actividad de la enzima, debido a un desorden metabólico que se traduce en una sobreproducción de porfirinas en el hígado, estado que se conoce como porfiria experimental.

La alil isopropilacetamida (AIA) y la alil isopropil-acetil-carbamida (edormit), por ejemplo, en ratas y conejos producen incremento de la ALA-D en hígado y riñón (Gibson y col., 1955; Tancione y col., 1964; Tschudy y col.

62).

La administración, en cambio, de 3-amino, 1-2-4 tiazol, disminuye considerablemente la actividad de la enzima (Tschudy y col., 1957a).

Coleman (1966) encontró un comportamiento distinto para la ALA-D de ratón, ya que ni la enzima de hígado ni la de bazo es afectada por drogas que producen porfiria.

Se observó también, variación en la actividad de ALA-D en los distintos tipos de anemia. Así, por ejemplo, en animales anémicos por tratamiento con difenilhidrazina y por fenilhidrazina se encontró un aumento en la actividad de la ALA-D en bazo y sangre (Granick y Mauzerall, 1958a; Gibson y col., 1955). La enzima tiene un comportamiento similar en anemias hemolíticas, pero se encontró una disminución en su actividad en anemias producidas por deficiencia de hierro (Rubino y col. 1960). Recientemente en anemias macrocíticas, Battistini y col. (1971), han encontrado un aumento en la ALA-D eritrocitaria humana.

La actividad de la enzima, se encuentra también alterada, en una serie de estados, tales como intoxicación por Pb (Goldberg y col, 1956; Lichtman y Feldman, 1963; Bonsignore y col., 1965, 1966; Gibson y col. 1970; Nakao y col., 1968), en intoxicación por metanol (Moore y col., 1971), por efecto de los X (Dancewicz y col., 1958) y en tejidos con tumores (Tschudy y col., 1957b; Origenes y col., 1961).

La enzimología de la ALA-D, es particularmente interesante por tratarse en un caso poco común en que la enzima, cataliza una reacción entre dos moléculas de sustrato idénticas.

El mecanismo de acción de esta enzima en la formación de PBG, todavía no ha sido totalmente aclarado aunque se llevaron a cabo, importantes estudios en este campo.

Granick y Mauzerall (1958a), hicieron un detallado estudio cinético de la reacción y sus datos sugieren que en la formación del PBG, estaría involucrada una sola enzima posiblemente con dos sitios activos para el ALA, ya que la proteína aislada y purificada de varias fuentes indicó ser una única entidad, como se deduce de su análisis por distintos métodos analíticos.

La reacción que tiene lugar es semejante a la condensación de Knorr en la síntesis de pirroles que implica una condensación de tipo aldólica y la formación de una base de Schiff (B) (Fig. 12).

La cinética de esta reacción da evidencias de la formación de un complejo enzima-sustrato en relación 1:1, por lo que sugieren el siguiente mecanismo para la acción de esta enzima. Las dos moléculas de ALA se unen a la enzima, formando un complejo, pero la afinidad por la primera molécula es mucho mayor que para la segunda. En la unión de esta segunda molécula podría

formarse espontáneamente una cetoimina.

Nandi y Shemin (1968 b), trabajando con ALA-D purificada de R. spheroides, proponen un nuevo mecanismo para la biosíntesis del PBG (Fig. 13).

Según ellos, la síntesis se llevaría a cabo, por la formación de una base de Schiff, eliminación de agua y la formación de un aldol. Frente a este esquema, surge la pregunta de si en estas dos condensaciones estarían involucradas enzimas distintas. Los autores, confirman lo hallado por Granick y Mauzerall de que pareciera que una única enzima es la que cataliza la formación del pirrol a partir de dos moléculas de ALA.

Los resultados indican, que primero la enzima se une con una molécula de sustrato, formando la base de Schiff. A esto, sigue un ataque nucleofílico del grupo amino del intermediario enzima-ALA, recién formado, sobre el átomo de carbono del grupo carbonilo de una segunda molécula de sustrato. El aldol resultante pierde agua y el grupo amino de esta segunda molécula de ALA desplaza al grupo amino de la primera por transaminación o transaldiminación, formando así el PBG.

Estudios de especificidad, realizados con análogos del ALA, indican que bien tanto el ácido levúlico como el etil levulinato forman bases de Schiff con la enzima, sólo el ácido libre es un inhibidor competitivo del ALA, que indicaría que el grupo carboxilo está implicado en la unión con la enzima. De los datos de inhibición se deduce también, que el grupo 4 carbonilo del ALA es necesario para esta unión. Se vio además, que los grupos 4 ceto-5 no juntos, ni el 5 amino solo, son suficientes para la unión de la enzima ALA.

La afinidad del sustrato por la enzima, depende de la facilidad para formar la base de Schiff y de la formación de una unión iónica entre el ión carboxilato en posición β al grupo carbonilo y un grupo cargado positivamente en la enzima. Este no sólo aumenta su afinidad por el cetoácido, sino que también orientaría la molécula para que se forme sólo PBG.

Por la formación de pirroles mixtos con el ácido levúlico y su éster y el etil levulinato, los autores demuestran, que la molécula de ALA que da origen a la cadena lateral de ácido acético en la posición β del PBG, es la que estuvo unida a la enzima por la base de Schiff. La otra molécula de ALA que da origen al resto pirrólico, puede haber estado sobre otro sitio de la enzima, o bien directamente en solución.

Formación del Urógeno III. Porfobilinógeno deaminasa- Uroporfirinógeno III sintetasa.

La condensación de cuatro moléculas de PBG, con liberación de cuatro de agua, da lugar a la formación del primer tetrapirrol cíclico en la biosíntesis del Hemo, la Uroporfirina, la que a su vez resulta de la oxidación espontánea (Mauzerall y Granick, 1958a; Bogorad, 1958), o enzimática (Bogorad, 1958), del Urógeno, verdadero intermediario de la biosíntesis.

Cuando esta reacción ocurre químicamente en aerobiosis, lo que se obtiene es una mezcla de los isómeros de la uroporfirina (Fig. 5), en proporciones

se varían mucho con el pH y temperatura de la reacción (Waldeström y Ahlquist, 1939; Mauzerall, 1960; Cookson y Rimington, 1954).

De los cuatro isómeros posibles, sólo los correspondientes a las series I y III se encuentran en la naturaleza. De éstos los de la serie III son normales en pequeñas cantidades y los de la serie I sólo se encuentran en los estados patológicos de porfirias congénitas (Rimington, 1952; Canivet y Rimington, 1953; Rimington y Miles, 1959; Schmid y col. 1954; Chu y Chu, 1962; 1965), de porfiria cutánea tarda (Grinstein y col., 1945; Canivet y Rimington, 1953; Chu y Chu, 1959; Watson y col. 1960, Nacht y col. 1970) y de porfiria aguda (Grinstein y col., 1945; MC Swiney y col. 1950; Grinstein y col. 1955).

Cuando se trabaja con extractos crudos y en anaerobiosis, el PBG se transforma enzimáticamente a Urógeno III, como ha sido demostrado en preparaciones de varias fuentes, incluyendo bacterias, algas, plantas superiores y glóbulos rojos de aves y humanos (Bogorad y Granick, 1953; Falk y col., 1956; Rimington y Booiij, 1957; Lascelles, 1957; Lockwood y Rimington, 1957; Bogorad, 1958 a; 1958 b; Granick y Mauzerall, 1958 a; Heath y Hoare, 1959; Lockwood y Benson, 1966; Cornford, 1964; Levin y Coleman, 1967; Stevens y col. 1968; Sancovich y col. 1969 a; Llambías y Batlle, 1971).

Sobre los detalles de esta transformación se han hecho interesantes estudios que contribuyeron a aclarar en parte cómo transcurre, pero aún queda bastante por investigar.

En 1953, Bogorad y Granick trabajando con una preparación de *Chlorella*, observaron que ésta era capaz de formar Urógeno III a partir de PBG, pero vieron que cuando el sistema enzimático se calentaba previamente a 60°C, sólo se formaba Urógeno I. Esto hizo suponer, que en esta transformación, estarían posiblemente implicadas dos enzimas con distintas susceptibilidades a la acción del calor. Esta teoría, fué confirmada luego con distintos extractos enzimáticos, que al someterlos al mismo proceso, presentaban un comportamiento similar. (Rimington y Booiij, 1957; Bogorad 1958 c; Granick y Mauzerall, 1958 a; Hoare y Heath, 1959; Heath y Hoare, 1959; Lockwood y Benson, 1960; Cornford, 1964; Sancovich y col., 1969 a, Llambías y Batlle, 1971 a, 71 b).

Años más tarde, Bogorad (1958 a), logró aislar y purificar por primera vez de extractos acuosos de polvo acetónico de hojas de espinaca, una enzima que convertía el PBG en Urógeno I, a la que denominó Uroporfirinógeno I-sintetasa. La segunda enzima fué aislada también por Bogorad (1958 b), de un extracto acuoso de germen de trigo. Se vió que efectivamente era sensible al calor y que no tenía capacidad para transformar al PBG cuando se incubaba con este sustrato; en cambio, cuando se incubaba con la Urógeno I sintetasa y PBG, producía Urógeno III. Resultados similares se obtuvieron con

heroides (Heath y Hoare, 1959 a).

El sistema enzimático que cataliza la formación de Urógeno III, se encontró entonces constituido por dos enzimas, y se lo denominó "Porfobilinosa" (PBG-asa) o complejo "Porfobilinógeno Deaminasa- Uroporfirinógeno III sintetasa" o más simplemente complejo "Deaminasa-Isomerasa"(D-I).

La fracción enzimática relativamente estable al calor se la denominó "Porfobilinógeno Deaminasa" (PBG-D) , "Uroporfirinógeno I sintetasa" o simplemente "Deaminasa", y a la termolábil se la denominó "Uroporfirinógeno Iso-asa", "Uroporfirinógeno III cosintetasa", o simplemente "Isomerasa". Como tal, esta última sola, no tiene acción sobre el PBG ni sobre el Urógeno III. El sistema sería actuar con el PBG y un polipirrol preformado por acción de la "Deaminasa" (Boğoran 1958 b) o por acción del complejo total sobre el PBG (Sancovich y col. 1969, Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 a).

La PBG-asa es una enzima soluble y se la ha purificado de eritrocitos de pollo (Lockwood y Rimington, 1959; Granick y Mauzerall, 1958 a; Lockwood y Benson, 1960; Llambías y Batlle, 1971 b), de reticulocitos de conejo (Lockwood y Mauzeralla, 1958 a), de eritrocitos inmaduros en un caso de eritrocitosis humana (Granick y Mauzerall, 1958 a), de eritrocitos humanos (Lockwood y Benson, 1964), de hígado de vaca (Sancovich y col. 1969 a), de callos de soja (Llambías y Batlle, 1971 a).

La PBG-asa es una enzima sulfhidrúlica y es activa tanto en aerobiosis como en anaerobiosis (Cornford, 1964; Lockwood y Benson, 1960; Granick y Mauzerall, 1958 a; Sancovich y col. 1969; Llambías y Batlle, 1971 a, b).

Los datos cinéticos varían bastante con la fuente de aislamiento de la enzima. La PBG-asa de hígado vacuno (Sancovich y col. 1969 b), se comporta como una enzima alostérica, la aislada y purificada de eritrocitos de pollo por Lockwood y Batlle (1971 b) presenta también una cinética sigmoidea, resultando que difieren con los hallados por Lockwood y Benson (1960), para la enzima de la misma fuente.

Insayos realizados con distintos cationes, han indicado que el Na^+ y el K^+ activan la PBG-asa, aumentando la formación de Urógeno III (Cornford y Batlle, 1971 a; Llambías y col. 1971 a, Sancovich y col. 1969 a). El NH_4^+ en cambio, tiene propiedades inhibitorias (Cornford, 1964; Llambías y Batlle, 1971 a; Sancovich y col. 1969 a).

Salvo en el caso de la PBG-asa purificada de semillas de soja y de eritrocitos de pollo (Llambías y Batlle, 1971 a; b), el sistema purificado se comportó en los demás casos como una única entidad proteica al tratar de separarlo por electroforesis en gel de almidón o de poliacrilamida; por lo que se sugirió que podría tratarse de un complejo proteico (Granick y Mauzerall, 1958 a; Lockwood y Benson, 1960), que estaría formado por dos o más subunidades con dos actividades enzimáticas (Sancovich y col. 1969 a) y que existiría entre ellas una fuerte interacción.

Pese a que Lockwood y Benson (1960), trabajando con eritrocitos de aves pudieron separar la Deaminasa de la Isomerasa, ambas actividades han sido paradas en muchos casos.

En efecto, como ya se mencionó, Bogorad aisló la Deaminasa de hojas de linaza (1958 a) y la isomerasa de germen de trigo (1958 b).

Estas enzimas luego fueron aisladas y estudiadas de las siguientes fuentes, lográndose en algunos casos una purificación parcial; de R. sphaeroides (Hoare y Heath, 1959; Hoare y Heath, 1959; 1959), de eritrocitos humanos (Stevens y col. 1968), de bazo de ratones anémicos por tratamiento con feniltiazina (Levin y Coleman, 1967); de hígado de vaca (Sancovich y col. 1969 a), germen de trigo (Stevens y Frydman, 1968; Frydman y Frydman, 1970), de germen de semillas de soya (Llambías y Batlle, 1970 a), de eritrocitos de vaca (Llambías y Batlle, 1971 b).

La primera etapa, en la transformación del PBG, se llevaría a cabo por acción de la Deaminasa. Esta enzima, soluble y de naturaleza sulfhidrúlica, caracteriza como ya se mencionó, por ser moderadamente estable al calor, propiedad utilizada en muchos casos para separarla de la Isomerasa (Bogorad y Granick, 1953; Rimington y Boeij, 1957; Granick y Mauzerall, 1958 a; Bogorad, 1958 a; Hoare y Heath, 1959; Lockwood y Benson, 1960; Levin y Coleman, 1967; Sancovich y col. 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, 1971 b).

La Deaminasa, es específica para el PBG y ninguno de los análogos de este pirrol, actúa como sustrato (Frydman y col. 1967; Stevens y col. 1968; Carpenter y Scott, 1961; Bogorad, 1957), por el contrario algunos de ellos se comportan como inhibidores (Carpenter y Scott, 1959; 1961; Bogorad, 1963). En ausencia de Isomerasa, la Deaminasa cataliza la formación del Urógeno I.

La cinética de esta enzima, indicó en casi todos los casos, salvo para la aislada de callos de semilla de soya (Llambías y Batlle, 1970 b; 1971 b), un comportamiento "Michaeliano".

Es inhibida por metales pesados y por iones amonio e hidroxilamina (Bogorad, 1958 a; Frydman y Frydman 1970; Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1971 a).

En la biosíntesis del Urógeno I, se ha sugerido la intervención de un posible dipirrol o tripirrol intermediario (Bogorad y Granick, 1953; Falkow y col. 1953; Plusec y Bogorad, 1970; Llambías y Batlle, 1970 a; 1971 b).

La "Isomerasa" como se mencionó, es la segunda enzima involucrada en la conversión del PBG a Urógeno III y ha sido aislada y purificada de varias fuentes.

A diferencia de la "Deaminasa", es termolábil. Su actividad es protegida de la inactivación por la presencia del PBG (Stevens y Frydman, 1968; Stevens y col. 1968; Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col. a publicar) y de sus análogos. Se vio además, que la PBG-D tiene un efecto similar sobre la actividad de esta enzima (Stevens y col. 1968, Sancovich y col. 1969 a). Por otra parte

inhibida por el ión amonio e hidroxilamina (Bogorad, 1958 b; Stevens y ydman, 1963; Sancovich y col. 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a).

Como ya se mencionó anteriormente, en animales salvo en condiciones tológicas, sólo se encuentran en pequeñas cantidades porfirinas de la serie I. De aquí, que uno de los problemas más grandes en entender la condensación del PBG a Urógeno III es visualizar como, a partir de cuatro unidades de monopirrol PBG, pueden formarse porfirinas del tipo asimétrico III, cuando el producto de una polimerización lineal seguido de una ciclación sería, tipo simétrico I.

Luego de numerosos estudios, realizados sobre esta transformación enzimática, el problema no ha sido resuelto. Como producto de una serie de análisis químicos y de estudios sobre la condensación enzimática del PBG porfirinas, han surgido una serie de hipótesis para explicar el mecanismo de esta reacción de condensación.

Margoliash (1961) ha dividido estas hipótesis en cuatro grupos:

Hipótesis basadas en la formación de intermediarios de estructuras porfirínicos ramificadas.

Hipótesis que implican derivados oxidados distintos de los polipirrimidinos.

Hipótesis que involucran reacciones de intercambio o de condensación de dímeros lineales.

Hipótesis que involucran la migración intramolecular de cadenas laterales.

Recientemente, Llambías (1971) ha hecho una interesante recopilación de los los mecanismos propuestos y postula uno basado en los resultados experimentales obtenidos en cultivos de callos de semilla de soya (Llambías y Batlle, 1971 b) y por otros autores en distintas fuentes.

Formación del Coprógeno III. Uroporfirinógeno Decarboxilasa

La próxima etapa en la biosíntesis del Hemo, involucra la descarboxilación de las cuatro cadenas de ácido acético del Urógeno III, a cuatro grupos carboxilos, para formar el Coprógeno III con sólo cuatro grupos carboxilos.

Se ha determinado, que esta descarboxilación ocurre en etapas y durante el transcurso se liberan productos intermedios de 7, 6 y 5 grupos carboxilos (Bogorad, 1955; 1958 a; b; Mauzerall y Granick, 1958 a; Hoare y Heath, 1958, 1959; Cornford, 1964).

Esto fué confirmado en nuestro laboratorio por Batlle y Grinstein (1964) y por San Martín de Viale y Grinstein (1968).

El sistema enzimático que lleva a cabo esta reacción, ha sido estudiado en extractos de plantas, animales y bacterias fotosintéticas, y pese a que en varios casos ha sido aislado y parcialmente purificado, aún no se ha determinado si la descarboxilación es realizada por una única enzima o existen

enzimas distintas para cada etapa.

Como ya se ha mencionado, los verdaderos intermediarios en la síntesis del Hemo son los porfirinógenos y no las porfirinas (Cookson y Rimington, 1954; Neve y col. 1956; Bogorad, 1958 a; 1958 b; Mauzerall y Granick, 1958 a; Hoare y Heath, 1958; 1959), por lo que el verdadero sustrato de esta reacción es el Urógeno III.

En efecto, Batlle y Grinstein (1962), demostraron que la enzima es activa solo sobre el porfirinógeno completamente reducido. No es capaz de descarboxilar al ALA, ni al PBG, ni a la URO, pero sí a los cuatro isómeros del Urógeno, aunque con distintas velocidades de transformación; isómero III > IV > II > I (Mauzerall y Granick, 1958 a).

La fracción enzimática que interviene en esta transformación, la "Uroporfirinógeno Decarboxilasa" (Decarboxilasa) ó "Porphirinógeno carboxilasa" ha sido aislada y purificada de reticulocitos de conejo (Mauzerall y Granick 1958 a; Bogorad, 1962); de eritrocitos de pollo (Urata y Kimura, 1960; Tomio y col. 1970); de eritrocitos humanos (Cornford, 1964); de bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971); de R. spheroides (Hoare y Heath, 1959).

La "Decarboxilasa", normalmente se la encuentra en citoplasma y trabaja en anaerobiosis, sobre todo cuando se la purifica (Bogorad, 1958 c; Mauzerall y Granick, 1958 a; Hoare y Heath, 1959; Tomio y col., 1970), aunque también es activa en aerobiosis (Neve y col. 1958; Batlle y Grinstein, 1962, 1964; Martín de Viale y Grinstein, 1968).

Es una enzima sensible al calor y se inhibe por calentamiento (Tomio y col., 1970; Romeo y Levin, 1971). Se comporta como una típica enzima sulfhídrica y se inactiva en ausencia de glutatión reducido (Mauzerall y Granick, 1958 a), ó dimercaptopropanol (Hoare y Heath, 1959). La cisteína, cuando se utiliza en igual concentración que los reactivos anteriores, disminuye la actividad de la enzima purificada de eritrocitos de pollo (Tomio y col. 1970). También se produce inhibición por metales pesados, por iodoacetamida, p-cloro-mercuribenzoato y por DTNB (Mauzerall y Granick, 1958 a; Hoare y Heath, 1959; Romeo y Levin, 1971). El Na^+ inhibe la Decarboxilasa de eritrocitos de pollo (Tomio y col. 1970), y la de eritrocitos humanos, Cornford (1964).

Se ha observado, con la enzima aislada de varias fuentes (Falk y col., 1959; Heath y Hoare, 1959; Hoare y Heath, 1959; Urata y Kimura, 1960), el requerimiento de un cofactor termostable de bajo PM. Estos factores ultrafiltrables, capaces de activar la formación de C_{pro}, fueron encontrados en células de R. spheroides, en eritrocitos de pollo, en levadura de panadería e hongo de cerdo por Hoare y Heath (1959) y Urata y Kimura (1960), en eritrocitos de pollo encontraron un factor semejante.

Estudiando el efecto de las sales de sodio sobre esta enzima, se vio que los fosfatos y los cloruros inhiben parcialmente la Decarboxilasa aislada de eritrocitos humanos (Cornford, 1964). Resultados similares se obtuvieron con la enzima de eritrocitos de pollo (Tomio y col. 1970), observándose en este caso como en el anterior, una acumulación de porfirina heptacarboxílica.

Cuando las porfirinas de 7-, 6- y 5- grupos carboxilos se reducen a sus respectivos porfirinógenos y se incuban con la enzima, se observó que se produjo descarboxilación, comportamiento que corroboró que los grupos carboxilos se van eliminando de a uno por vez (Batlle y Grinstein, 1962; 1964; San Martín de Viale, 1968). Queda aún por aclarar en qué orden se produce la descarboxilación de las cadenas de ácido acético y si realmente existe un orden prefijado, así como si es necesaria más de una enzima.

Respecto a ésto último, estudios recientes sobre la "Decarboxilasa" aislada y purificada de eritrocitos de pollo, indican que se trataría de una única proteína, posiblemente con dos sitios catalíticos diferentes (Tomio col. 1970).

Formación de Protoporfirina IX. Coprogenasa

La conversión del Coprógeno III a Proto IX, es un proceso complejo y posiblemente represente una de las etapas menos conocidas en la biosíntesis del Hemo. En este paso se produce la descarboxilación y oxidación de las cadenas del ácido propiónico de las posiciones 2 y 4 del Coprógeno III, para dar dos grupos vinilos y la oxidación del porfirinógeno a su respectiva porfirina.

La enzima que cataliza estas reacciones parece ser mitocondrial. En efecto, Dresel (1955) Dresel y Falk, (1956), trabajando con sobrenadante de lulas, libre de partículas, proveniente de hemolizados de ave, observó que a partir de PPS, sólo se formaba Coprógeno, mientras que la biosíntesis era completa y se formaba Proto cuando se utilizaba el hemolizado completo. Experimentos similares, realizados por Booij y Rimington (1957), indicaron que este proceso era necesaria la mitocondria íntacta (Rimington, 1959).

Lo que no se sabe aún, es cuántas enzimas están involucradas en la transformación del Coprógeno III a Proto. De acuerdo a los resultados de Batlle col. (1963), aparentemente una sola enzima es la responsable de la descarboxilación oxidativa de los dos restos propiónico del Coprógeno III. En cuanto a la oxidación del porfirinógeno a porfirina, posiblemente ésta ocurra a partir del Protógeno, pues es más susceptible a autooxidación que el prógeno (Granick, 1955). Aún se desconoce si se produce espontáneamente, es catalizada por la misma enzima que realiza la descarboxilación oxidativa o por una segunda enzima. Experiencias realizadas por Sano y Granick (1961), dan pruebas de que se trataría de una reacción enzimática.

La fracción enzimática, que cataliza la descarboxilación oxidativa, denominada "Coproporfirinógeno oxidasa", "Coproporfirinógeno oxido-decarboxilasa", "Coproporfirinogenasa" (CPG-asa) o simplemente "Coprogenasa", fué determinada por primera vez, en preparaciones de "Euglena gracilis" (Granick (Mauzerall, 1958 b) y hemolizados de eritrocitos de ave (Granick y Mauzerall, 1958 a).

Se estudió luego en una gran variedad de tejidos de mamíferos y se observó que está presente en alta concentración en hígado, médula e intestino

hígado. Sano y Granick (1961), sugieren que en hígado estaría unida a la mitocondria por puentes disulfuros y pudieron solubilizarla por tratamiento con tioglicolato.

Esta enzima ha sido aislada y solubilizada de Chlorella (Granick, 1955), Spirillum (Mori y Sano, 1960), de levadura (Mikaye y Sugimura, 1968), de Sphaericles (Tait, 1969; 1970), de Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas nitrificans, E. Coli (Jacobs y col., 1970), de hojas de tabaco (Hsu y Miller 1970), de hígado vacuno (Sano, 1958; Sano y Granick, 1961; Porra y Falk, 1964) de hígado de rata (Rimington y Tooth, 1961; Batlle y col. 1965).

La Coprogenasa presente en mitocondria de hígado de vaca (Sano y Granick, 1961), fué purificada 20 veces, solubilizandola en tioglicolato y posterior precipitación con sulfato de amonio. Batlle y col. (1965), la purificaron de hígado de rata unas 60 veces obteniendo una preparación electroforéticamente homogénea, con un PM de 80.000.

Se ha observado que la enzima de estas fuentes tiene un requerimiento absoluto de oxígeno y no utiliza otro aceptor de electrones (Sano y Granick, 1961; Batlle y col. 1965; Jacobs y col. 1970). También es requerido un agente reductor, generalmente tioglicolato para proteger el Coprógeno que recién después de la oxidación de los dos restos propiónicos de los anillos A y B a anilos, se oxidaría a Proto (Sano y Granick, 1961).

A diferencia de la Decarboxilasa, esta enzima es altamente específica para Coprógeno III y no utiliza como sustrato el isómero I (Granick y Mauzeil, 1958 b; 1958 c; Sano y Granick, 1961; Batlle y col. 1965).

No se ha encontrado requerimientos de grupos prostéticos para la enzima. Sin embargo, su actividad se inhibió por o-fenantrolina y α - α -dipiridilo, que no por metales; la inhibición fué revertida por diálisis. Estos resultados, sugieren la presencia de un metal unido a la enzima, cosa que aún no está comprobada (Batlle y col., 1965).

Por otra parte, la reacción no fué inhibida por cianuro, iodoacetamida, nitrofenol, ni EDTA; tampoco fué estimulada por CoA y ATP (Granick y Mauzeil, 1958 b).

La enzima, no demostró requerimientos por ningún cofactor (Rimington y Tooth, 1961; Porra y Falk, 1964; Batlle y col. 1965).

Como ya se mencionó, la Coprogenasa catalizaría la decarboxilación y oxidación del Coprógeno III, pero aún no se ha dilucidado el mecanismo por el que se realiza este trabajo.

El hallazgo, en 1953, de que un cultivo de una mutante de Chlorella, llamada Hemato IX - mono hidroxietil-monovinil deuteroporfirina IX (Granick y Bogomol, 1953) sugirió que estos dos compuestos, podrían ser intermediarios en la conversión del Coprógeno III a Proto, siendo necesario para este proceso, un mecanismo similar al de la oxidación de ácidos grasos (Bogomol, 1960).

Sin embargo, una serie de hechos demostraron que esta teoría era incorrecta. Las células de Chlorella que catalizan la formación de Proto, a partir de PPS, son incapaces de utilizar el hematoporfirinógeno IX, o el α -hidroxietil-monovinil deuteroporfirinógeno IX: además, la hidroxilamina o semicarbazida y el cianuro, como se mencionó antes, no inhiben la reacción, lo que indicaría que la oxidación no involucra un intermediario que contenga un grupo carbonilo, (Granick y Mauzerall, 1957 b; Sano y Granick, 1961).

Otro mecanismo posible para esta reacción, implicaría la formación de; a 2-4 diacrílico-deuteroporfirina IX o de su hexahidroderivado (Separatore Mauzerall, 1960; Sano y Granick, 1961; Rimington y Tooth, 1961). Pero se descubrió, que ni éste compuesto sintetizado químicamente, ni su derivado reducido, sirven como sustratos de la "Coprogenasa" (Sano y Granick, 1961; Batlle col., 1965).

Batlle y col. (1965), sugirieron que el isómero cis del 2-4-diacrílico-deuteroporfirinógeno IX es inestable, y además difícil de sintetizar, podría ser en realidad el intermediario biológico. Esto fué en parte corroborado, por la inhibición producida por el maleato (de estructura cis) y por el fumarato, (estructura trans).

Otra hipótesis, una de las más interesantes, pues estaría de acuerdo con la participación del oxígeno molecular, implica la formación de un 2-4-isómero (3-hidroxi) deuteroporfirinógeno IX, como intermediario (Batlle y col., 1965; Sano, 1966).

Sano, (1966) sintetizó esta sustancia y comprobó que una mezcla de los isómeros de la misma, era utilizada en parte como sustrato por una preparación mitocondrial de la enzima. Esto confirmó la intervención de este compuesto como intermediario.

En base a estos resultados, Batlle y col. (1966), y Sano (1966), han propuesto independientemente un esquema, para la biosíntesis de Proto IX a partir de Coprógeno III.

Formación del Hemo. Ferroquelatasa

Pese a que el hierro puede incorporarse a las porfirinas químicamente (Weikel y col, 1958, Granick y Mauzerall, 1961), existen una serie de hechos que demuestran que "in vivo", la última etapa de la biosíntesis del Hemo, es decir, la inserción del metal en la Proto, se produce enzimáticamente (Granick, 1954 b; Goldberg y col. 1957; Minakami y col. 1958; Grinstein y col. 1959; Klein, 1959; Goldberg, 1959; Wishida y Labbe, 1959; Labbe, 1959).

La enzima que cataliza esta reacción, denominada "Hemosintetasa" o "ferroquelatasa", es una enzima particulada y se la ha encontrado en mitocondrias de células animales, en cloroplastos de vegetales superiores y en cromatóforos de bacterias fotosintéticas (Lascelles, 1964). Generalmente

halla firmemente unida a la pared de estas estructuras celulares, pero se puede solubilizar mediante el empleo de detergentes (Krueger y col. 1956; Minakami, 1958; Labbe, 1959; Labbe y Hubbard, 1960) o por dispersión mecánica (Schwartz y col. 1959 a; b).

Como se dijo su presencia se ha demostrado en una gran variedad de tejidos y organismos. Se la ha estudiado en hígado de ratas (Minakami y col. 1958; Minakami, 1958, Nishida G. y Labbe, 1959; Labbe y Hubbard, 1960; 1961), en mitocondrias de este mismo órgano (Jones, 1968 a; Jones y Jones, 1968), en mitocondrias de hígado de cerdo (Porra y Jones, 1963), en eritrocitos de pollo (Schwartz y col. 1959, 1959 a, 1959 b, Granick 1954), en eritrocitos de ratón (Krueger y col. 1956; Klein, 1959; Ohyama y col. 1961), en mitocondria de levadura (Labbe y col. 1968), en cloroplastos de hojas de espinaca (Jones 1967; Jones, 1968 b), en hojas de habas y avena (Porra y Lascelles, 1968), en comatóforos de bacterias fotosintéticas (Yoshikawa y Yoneyama, 1964; Zdanowska y col. 1966), y en R. spheroides, donde se han encontrado una ferroquelatasa soluble y una particulada (Jones y Jones, 1970).

Estudios realizados sobre los posibles sustratos de esta enzima, demostraron que los porfirinógenos y las porfirinas parcialmente reducidas son capaces de incorporar el hierro en su molécula (Labbe y col. 1963; Porra y Jones, 1963). Esto confirma lo demostrado anteriormente por Granick, 1954 (L. B. L. Ikel y col. 1958) cuando proponen a la Proto como precursor del Hemo.

Respecto a la especificidad de la enzima, se vio que es relativamente específica en cuanto al requerimiento de porfirinas. La enzima obtenida de eritrocitos de pato (Ohyama y col. 1961), es capaz de incorporar Fe^{++} en uroporfirina, mesoporfirina y hematoporfirina. Resultados semejantes, se tuvieron con enzimas de otras fuentes (Labbe y col. 1963; Porra y Jones, 1963; Yoneyama y col. 1961). Como se vé, pareciera que sólo las porfirinas con dos grupos carboxilos libres, son activas como sustrato, pues sus ésteres metílicos no lo son (Yoneyama y col. 1962; Porra y Jones, 1963).

En cuanto a los requerimientos por el metal, el sistema enzimático se muestra más específico. Labbe y Hubbard (1961), atribuyen ésto al hecho que "in vivo", la enzima se encuentra frente a una sola porfirina, Proto, mientras que para formar Hemo, debe seleccionar al ión ferroso, entre una serie de iones metálicos.

Se ha supuesto que la enzima se une a la Proto y al metal por dos sitios diferentes (Nishida y Labbe, 1959).

La "Ferroquelatasa" solubilizada de hígado de rata (Labbe y Hubbard, 1961), es activada por agentes reductores y presenta propiedades de una enzima sulfhidrúlica. Esto ocurre también con la enzima aislada de las demás fuentes encontrándose evidencias de que tiene grupos -SH presentes, requeridos para su actividad (Labbe y Hubbard, 1960; Porra y col. 1967), que posiblemente se oxidan a -S-S- en presencia del aire. En efecto, se ha observado

todos los casos que la enzima es sensible al aire, razón por la cual se debe de proteger con agentes reductores, los que son necesarios además, para mantener al hierro en su estado ferroso (Porra y Jones, 1963; Porra col. 1967).

Tait (1963), señala que trabajando con cromatóforos de bacterias foto-sintéticas y mitocondrias de hígado (Mazanowska y col. 1966; Yosikawa y Yoneyama, 1964), se observó que los lípidos podrían estar involucrados en la incorporación del metal a la Proto. En efecto, ellos vieron que el éter más aún una emulsión de agua-éter estimulaba la formación de Hemo, en los días por ellos estudiados, pero no afectaba la reacción no-enzimática.

Propusieron entonces, que este solvente orgánico podría actuar activando la enzima de características lipo-proteicas, o exponiendo la enzima a los cromatóforos y mitocondrias.

Sin embargo, con los resultados obtenidos, no se pueden aclarar el rol de los lípidos en esta reacción.

Otro hecho interesante, pero que también se halla en discusión, es la inhibición de la Ferroquelatasa por la globina encontrada por Ericksen, (1955) y Schwartz y col. (1959) y Gibson (1964). Sin embargo, Yoneyama y col. (1963), por su parte, afirman que la globina inhibe la formación de Hemo, habiéndose observado en su presencia, "in vitro", la formación de mioglobina y hemo-globina, a partir de hierro y Proto.

RESUMEN

Estudios tendientes a demostrar la intervención del ALA en la formación del Hemo, comprobaron efectivamente que este ácido aminocetónico era precursor de todos los átomos de carbono de la Protoporfirina III.

En los estudios del metabolismo de las porfirinas, es por otra parte de utilidad el empleo del compuesto radioactivo ALA 4^{14}C .

En este trabajo se propuso desarrollar un método práctico, accesible y fácilmente reproducible de síntesis química del ALA 4^{14}C .

Se propone asimismo aislar y purificar una fracción enzimáticamente activa para la conversión del ALA a PBG. La enzima, capaz de llevar a cabo la transformación denominada delta aminolevulico dehidrasa, está ampliamente distribuida en la naturaleza.

El motivo de la utilización de hígado vacuno como fuente apropiada para la obtención de esta enzima, reside en el hecho de que este órgano, además de los tejidos hematopoyéticos es una de las fuentes más ricas en las enzimas involucradas en la biosíntesis del Hemo, especialmente en delta aminolevulico dehidrasa.

Una vez aislada la fracción delta aminolevulico dehidrasa sobre la enzima purificada, se llevarán a cabo estudios de sus propiedades físicas y químicas, particularmente, se prevé un estudio que permita dilucidar el rol de esta enzima en la regulación de la biosíntesis del Hemo.

ARTE EXPERIMENTAL:

materiales:

⁴CNK: proveniente de New England Nuclear Corporation.

Actividad específica: 28,9 mC/mM

LA: proveniente de Sigma Chemical Co (U.S.A.), obtenido según el método de Mitta, Ferramola, Sancovich y Grinstein (1967).

LA¹⁴C: sintetizado en los laboratorios de Moléculas Marcadas de la Comisión Nacional de Energía Atómica, de acuerdo al método de Mitta, Ferramola, Sancovich y Grinstein (1967). El procedimiento se detalla en Resultados, I Parte.

BG: obtenidos de orinas provenientes de pacientes con porfiria aguda, siguiendo el método de Cookson y Rimington (1954), o biosintetizado según el método de Sancovich, Ferramola, Batlle y Grinstein (1970).

Organo vacuno: provisto por los laboratorios de Iffa-Estrella, Bs.As., proveniente del animal recién faenado y mantenido hasta el momento de su uso congelado.

Resinas de intercambio iónico: se usaron las resinas Dowex, de intercambio iónico ácido fuerte, en su forma ácida, provistas por la Dow Chemical Company.

Sol⁰ coloidal o "hierro dializado": (aproxim. Fe₂O₃ 5% (P/v)) provisto por British Drug Houses Ltd. (Poole, Dorset).

Sol de fosfato de calcio: preparado según el método de Keilin y Hartree (1951).

Sol de hidroxiapatita: preparado según la técnica descrita en Dixon y Webb (1964).

Phadex: Se empleó el producto proveniente de Pharmacia (Uppsala, Suecia).

Sol de Gel: se utilizó el producto proveniente de Bio Rad Laboratories (Richmond, California, U.S.A.).

el almidón: (para electroforesis): se utilizó el producto proveniente de
Might, Medical Research Laboratories (Toronto, Canadá).

la poliacrilamida: se preparó según el método de Raymond y Weintraub
(1958).

Reactivos utilizados en la determinación de grupos sulfhidrilo:

5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico) DTNB, proveniente de Aldrich Chemical
Company, a pureza se controló espectrofotométricamente (Ellman, (1958)).

Ditioeritrol y eritrol: proveniente de California Corporation for Bio-
cal Research.

Todos los reactivos utilizados y no mencionados aquí, fueron de grado
analítico, provenientes de distintas fuentes comerciales.

Preparación de los intermediarios usados en la síntesis del clorhidrato del ALA

C

Diazometano:

Se preparó según la técnica descripta por Vogel (1951)

Malonato de di-terbutilo

Se preparó según la técnica indicada en Organic Syntheses (1953).

Derivado sodado del malonato de di-terbutilo:

A la cantidad de malonato de di-terbutilo necesario, se adiciona el sodio en muy pequeños trozos, se cubre con éter anhidro y se agita durante horas; la aparición de un precipitado blanco indica la formación del produc-

La reacción se dió por finalizada cuando no se observó más sodio metálico, la evaporación del éter en atmósfera inerte se expuso el derivado sodado del éster.

Se ensayó el uso de otros agentes salificantes como el terbuti-sodio y el metilato de sodio, pero se obtuvieron rendimientos menores.

Ftalimida:

Se preparó según la técnica descripta por Vogel (1951).

N-oximetil ftalimida

En un tubo cerrado a la llama se calentó a 100°C durante 1-2 horas 10 g. de ftalimida con 25 ml de una solución acuosa al 10% de formaldehido. La disolución de la ftalimida ocurrió en el tubo con bastante rapidez; en general se terminó al cabo de media hora agitando de tanto en tanto.

Después de enfriar se abrió y se fundió la masa cristalina que se separó, luego el tubo abierto en un baño de maría hirviendo y se concentró con

uidado el contenido del tubo. La oximetil ftalimida así obtenida se recristalizó de alcohol-tolueno (1:1) y fundió a 146-148°C (S/literatura: de tolueno, 141-142°C Sachs, 1898).

) N-cloro metil ftalimida:

La N-oximetil ftalimida obtenida se hizo reaccionar durante dos horas, en condiciones anhidras, a temperatura ambiente con un exceso de cloruro de tionilo. La mezcla se calentó durante 30 minutos en un baño de glicerina a 90-100°C, y cuando se produjo la disolución total, la reacción se dejó por finalizada. El exceso de reactivo se eliminó por evaporación. El residuo se tomó con benceno anhidro y se llevó a sequedad en vacío a presión reducida. Esta operación se repitió tres veces. La N-cloro metil ftalimida recristalizada de tolueno fundió a 133-134°C (S/bibliografía: de benceno, 132-133°C, Calvin y col., 1949).

I. Identificación y determinación de ALA:

Para detectar la presencia de ALA, se hicieron ensayos colorimétricos sencillos, basados en la formación del complejo coloreado que se forma entre el reactivo de Ehrlich (PDAB) y el derivado pirrólico originado en una reacción de condensación del tipo de Knorr (1886), entre el ALA y la acetilacetona; en la formación de un complejo de picrato alcalino del ALA (modificación de los picratos de Jaffé, Hope-Seyler, 1886); o directamente en el complejo coloreado que forma la ninhidrina con el ALA.

Todas estas reacciones, se utilizaron en identificaciones cromatográficas, así como en determinaciones cualitativas y cuantitativas.

1. Identificación cromatográfica del ALA:

Cromatográficamente el ALA se identificó según dos técnicas, sobre papel Whatman N° 1 en capa delgada. En este último caso, se usó Kieselgel como soporte fijo y para la preparación de las placas se siguió la técnica descrita en Trutton (1963).

Cuando se trabajó con material radioactivo se hicieron autorradiografías y radiocromatogramas.

Las corridas cromatográficas se efectuaron según se indica a continuación:

a) Solvente de desarrollo: Fenol - H_2O (80:20 v/v). Cuando se hizo sobre papel se dejó correr durante 18 hs en forma ascendente y durante 20 hs en forma descendente. En capa delgada el tiempo de corrida fué de 2 hs. Como revelador se usó una solución de ninhidrina al 0,2% de acetona (p/v). En estas condiciones el ALA dá una coloración amarilla, que con el tiempo pasa a rosada y finalmente a violeta con un R_f 0,59 sobre papel y 0,20 en capa delgada.

b) Solvente de desarrollo: fase superior separada a 20°C, de una mezcla de Butanol-Acido acético- H_2O (31,5:5:15,5 en vol). Se corrió en forma ascendente durante 4 hs. en papel y 2 hs. en capa delgada. Como en el caso anterior, se usó ninhidrina como revelador: el ALA se identifica por una mancha amarilla con un $R_f = 0,25$ sobre papel y 0,29 en capa delgada.

En este caso y en el anterior, en que se usó ninhidrina como revelador los cromatogramas se fijaron con una solución de $(NO_3)_2 Cu$ en etanol al 1%, a la que se agregaron 2 gotas de NO_3H para evitar que el color se desvanezca con el tiempo.

c) Solvente de desarrollo: Butanol-Acido acético- H_2O (31,5 : 5: 15,5) igual que en el caso anterior, sólo que en éste se reveló con una solución de ácido pírrico saturada, luego con HONa 5N y finalmente con ClN 5N. El ALA dá una coloración anaranjada rojiza (Shuster, 1956). Este método es muy sensible pero tiene el inconveniente de que por el tipo de reactivos usados en la revelación, el papel del cromatograma se quiebra con facilidad. Esta reacción se utilizó a veces en placa de toque, para localizar el ALA en las purificaciones por columna Dox ex.

d) Solvente de desarrollo: Butanol- Acido acético- H_2O (4:1:5 en vol). En este caso se formó previamente el derivado pírrico del ALA, según se

a en su determinación cuantitativa. Tanto en papel como en capa delgada se fijó correr 2 hs., al cabo de las cuales se revelaron los cromatogramas con el Reactivo de Ehrlich (Mauzerall y Granick, 1956) preparado se indica luego en la determinación cuantitativa del ALA. En el lugar se halla el ALA aparece una mancha violeta característica del complejo pirrólico, con un $R_f = 0,88$ sobre papel y de $0,82$ en capa delgada.

) Solvente de desarrollo: Etanol 95%- Acido Acético 1 M- Piridina- H_2O 3:3:3 en volumen). El tiempo de corrida fué de 3 hs. Luego, se colocó el cromatograma, ya sea en papel o en capa delgada a la acción de los vapores de piridina y acetilacetona colocados en recipientes separados en la cuba de saturación y mantenidos a $50^{\circ}C$ durante 20 minutos.

Después entonces, se reveló con el reactivo de Ehrlich con Hg^{++} (Uratack, 1963) y como en el caso anterior, el ALA dió una coloración violeta con un $R_f = 0,36$.

Se observó que la identificación cromatográfica del ALA por su transformación en el derivado pirrólico es menos sensible que su identificación como clorhidrato.

En los ensayos de rutina, principalmente en los que se trató de localizar el ALA y separarlo de la glicina se usó el método b) al revelar con piridina el ALA como se dijo da una coloración amarilla que se distingue claramente de la glicina que da el color violeta característico de los derivados con un $R_f = 0,16$.

Cuando se quisieron conservar los cromatogramas en capa delgada por mucho tiempo se los fijó con una solución de "Plexigum" al 5% en tolueno de modo que la película de Kieselgel G queda adherida a la placa de vidrio.

determinación cualitativa y cuantitativa del ALA

En la mayoría de las veces se realizó siguiendo el método de Mauzerall y Granick (1956). Este se basa en la medición de la absorbancia del complejo formado que forma el ALA-pirrol con el reactivo de Ehrlich. Por lo general

ensayo se hizo sobre el ALA eluido de la columna Dowex, con ClH, por lo que fué necesario diluir previamente una alícuota del eluido con acetato de sodio 0,5 M, con lo que se llevó la solución al pH de la reacción. A 7 ml de esta dilución se agregaron 0,2 ml de acetilacetona y se llevó a 10 ml con acetato 0,1 M pH 4,6. Se calentó durante 10 minutos en un tubo cerrado a Baño María, para transformar el ALA en el derivado pirrólico. Luego de enfriar, 2 ml de esta solución se trataron con un volumen igual del reactivo de Ehrlich. Este es inestable y debe usarse en el día de su preparación. Su composición es la siguiente: a 1 g de PDAB disueltos en 30 ml de ácido acético, se agregan 8 ml de ácido perclórico al 70% y se llevan a 50 ml con acetato glacial. El color desarrolla totalmente a los 15 minutos con un máximo de absorbancia a 552 nm y un coeficiente de extinción $E \frac{1 \text{ cm}}{1 \text{ mM}} = 61.000$.

En algunos casos, se usó el reactivo de Ehrlich con Hg^{++} (Urata y Gra- 1963) que es algo más sensible y evita las interferencias de grupos sulfhidrilo. Su composición es la siguiente: 168 ml de ácido acético, 40 ml de ácido nítrico al 70%, 4 g de PDAB recristalizado y 0,7 g de Cl_2Hg ; la solución resultante se diluye a 220 ml.

El dosaje de ALA se hizo también midiendo la absorbancia del complejo formado que éste forma con el ácido nítrico, siguiendo la técnica descrita por Elliot (1960). Esta consiste en tratar 2,5 ml de la solución de ALA previamente diluida con 0,25 ml de solución de ácido nítrico saturada a temperatura ambiente, enfriar luego el sistema a 0°C y agregar 0,5 ml de Cl_2Hg 4 N. Se deja a esta temperatura 6 minutos, al cabo de los cuales se agregan 1,75 ml de ClH 4 N, se lleva a temperatura ambiente y se lee a 552 nm, luego de 10 minutos.

Identificación y determinación de PBG

Identificación cromatográfica del PBG

En algunos casos el PBG se identificó cromatográficamente según los métodos de Westall (1952) y Mauzerall y Granick (1956) ligeramente modificados.

Como solvente de desarrollo se utilizó una mezcla de Butanol- Acido
ético- H₂O (4:1:5 en volúmenes). La corrida se llevó a cabo en papel
Whatman N° 1, a temperatura ambiente, en forma ascendente, durante 7 hs.
El revelado se efectuó pulverizando el papel con reactivo de Ehrlich
(Mauzerall y Granick, 1956), observándose en presencia de PBG una mancha
de color característica del complejo que forma con el PDAB. En algunos casos
se reveló el cromatograma, colocándolo directamente a los vapores de ácido
ético durante 10 minutos. Al exponerlo luego a la luz ultravioleta, apa-
rece una fluorescencia roja, debida a Uro formada en el sitio donde corrió
PBG.

Determinación cuantitativa del PBG:

La estimación del PBG se hizo, midiendo nuevamente la absorbancia del
complejo que se forma entre el reactivo de Ehrlich y el monopirrol PBG. Pa-
ra esto se hizo reaccionar un volumen de la muestra con igual volumen del
reactivo, se dejó desarrollar el color rosado característico y se leyó su
absorbancia en un espectrofotómetro Beckman D.U., Beckman D.B. o bien
en Spectronic 20. El PBG presente en la muestra se calculó aplicando
coeficientes de extinción característicos, determinados usando como
standard PBG cristalino obtenidos de pacientes con porfiria aguda, mediante
el método de Cookson y Rimington (1954) o bien biosintetizado según el mé-
todo de Sancovich y col. (1970).

En un principio las determinaciones se hicieron usando el reactivo de
Ehrlich, preparado de acuerdo a la técnica de Mauzerall y Granick (1956),
como ya se dijo es inestable y debe prepararse en el día. Se vio luego
que la medición realizada de acuerdo a la técnica de Moore y Labbe (1964),
resultó más simple y por lo tanto se usó como ensayo de rutina. En este ca-
so el reactivo se prepara disolviendo 2 g de PDAB en 25 ml de ClH concentra-
do y se agregan luego 75 ml de ácido acético glacial. El color de la reac-
ción se desarrolla totalmente a los 8-9 minutos, y es estable dentro de los

mentos de la reacción con un máximo de 555 nm y un coeficiente de extinción $\epsilon_{555}^{1\text{ cm}}$: 25.000 para el PBG obtenido biosintéticamente. Este reactivo es le si se mantiene en oscuridad y en frío.

Autorradiografías

En la síntesis de ALA ^{14}C , se usó este método como identificación y cri- de pureza del compuesto radioactivo.

La técnica consiste en colocar el cromatograma ya desarrollado pero sin ar, en contacto con una película radiográfica, en oscuridad, durante un o prolongado (10-15 días), al cabo del cual se procede a revelar la pla-

En las películas reveladas, aparecen manchas en las zonas radioactivas, Rf se comparan con los del compuesto en un cromatograma duplicado y ado según la técnica usual.

Radio cromatografías

Como en el caso anterior, se utilizó este método cuando se trabajó con tal radioactivo. La identificación del ALA, así como la determinación pureza radioquímica y la medición de su radioactividad se efectuaron to los cromatogramas ya desarrollados pero sin revelar, por un registra- e radio cromatogramas automático.

El aparato utilizado (Radiochromatogram Scanner Packard Modelo 385, ling Radiometer), permitió además efectuar mediciones sobre los cromate- s desarrollados en capa delgada.

Con esta técnica y efectuando siembras cuantitativas se pudieron efec- ediciones automáticas de la radioactividad específica del ALA ^{14}C .

Medición de la Radioactividad

Las determinaciones de la radioactividad de los compuestos intermedios el ALA ^{14}C en su síntesis se hicieron por conteo a espesor infinito, tubo Geiger Müller de ventana fina (tipo TG- 2, de Tracerlab) sobre as purificadas hasta actividad constante y convenientemente diluidas decuar la actividad media a la de un standard.

La radioactividad específica del producto final se determinó además, un espectrómetro de centelleo líquido, Packard (Modelo 3365).

Para la medición se utilizó como líquido de centelleo, una solución de siguiente composición: PPO 1,25 g, POPOP 12,5 mg, naftaleno 20 g en 25 ml de tolueno, 96,25 ml de dioxano y 57,5 ml de etanol.

I. Cromatografías en columna

) Columnas de intercambio iónico

Para la preparación de las columnas, así como para el tratamiento pre- de las resinas, se siguió la técnica indicada en Dowex, Ion Exchange 64).

Una vez utilizadas las resinas se regeneraron, neutralizándolas con una e antes de ser empleadas nuevamente. Para esto el material se lavó pri- o con agua destilada, después se trató con 2 volúmenes de HONa 1,5 N el que se dejó toda una noche.

Se lavó luego con agua destilada hasta neutralidad y se llevó la re- a a su forma ácida, agregándole 1 volumen de ClH 4 N luego 6 volúmenes 2H 2 N y finalmente se lavó con agua destilada hasta neutralidad en el ldo.

) Columnas de Celulosa:

Para la preparación de las columnas, se utilizó celulosa en polvo man y se siguió la técnica descrita en Heftmann (1961).

Una vez equilibrada la columna con el solvente de desarrollo, la mues- se sembró agregándola a una pasta previamente formada con celulosa en o y el solvente al que se adicionaron unas gotas de colorante para poder ctar el frente de la corrida.

3) Columnas de Tamices Moleculares

La preparación de las columnas y el tratamiento previo de los geles se hicieron de acuerdo a las técnicas indicadas por Batlle y col. (1965).

Determinación de Pesos Moleculares

Las determinaciones realizadas con Sephadex como tamiz molecular, se hicieron según el método de Andrews (1964; 1965). Cuando se usó Bio-Gel se usó el desarrollado por Batlle (1966).

Para la estimación de los P.M. las columnas de Sephadex G-75, G-100, G-200 y Bio Gel P200 se calibraron con sacarosa, citocromo c, ovoalbúmina, albúmina, catalasa y ureasa. Para esto cada una de estas sustancias, de P.M. conocido, se hizo correr en la columna previamente preparada midiendo luego los respectivos volúmenes de elución, los que se representaron en un gráfico de elución del logaritmo del P.M. correspondiente. El gráfico obtenido de esta manera presentó una zona lineal que es el rango de P.M., para el cual resultó útil el gel y se utilizó luego, para determinar el P.M. aproximado de otros ácidos y otras macromoléculas. En el caso particular de las enzimas, este método tiene la ventaja de que no es necesaria una gran purificación de las enzimas y sobre todo puede trabajarse con pequeñas cantidades del material. Estas determinaciones están afectadas de un error del 10% debido principalmente a errores en la medición de los volúmenes de elución, diferencias de densidad entre las distintas proteínas y diferencias de densidad de las soluciones proteicas.

II. Determinación de la actividad enzimática de la ALA-D

Para determinar la actividad enzimática se siguió el método descrito por Gibson y col (1955), con algunas modificaciones.

Las incubaciones se llevaron a cabo en vacío en tubos de Thunberg a 37°C. La solución enzimática, junto con el buffer de fosfatos 0,067 M, pH 7,4, 0,1 ml de cisteína 0,025 M en un volumen final de 2 ml, se preincubó a 37°C para activar la enzima. Al cabo de este tiempo se dejó caer del tubo

ral 0,1 ml de ALA 0,05 M , pH 6,8. La incubación se prosiguió por 1 hora agitación mecánica a 80-90 oscilaciones por minuto. Luego de la incubación el contenido de los tubos se agregó a 1 ml de Fe_2O_3 coloidal y finalmente se añadió 0,1 ml de solución saturada de sulfato de cobre. Los tubos se agitaron vigorosamente durante 15 seg. y el precipitado formado se separó por centrifugación. La cantidad de PBG en el sobrenadante, se determinó por el método ya descrito. Se vio que la adición de hierro coloidal no fué necesaria luego de la primera etapa de purificación y la desproteinización entonces se hizo agregando directamente la mezcla de incubación al tubo de centrifuga conteniendo 0,1 ml de solución saturada de sulfato de cobre. Se observó que en el primer caso la recuperación del PBG, disminuyó un 20%, respecto a cuando sólo se agregó sulfato de cobre como agente proteínizante.

Actividad enzimática

Se define como una unidad enzimática la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de PBG/hora, bajo las condiciones standard establecidas. La actividad específica, son las unidades de enzima por mg de proteína.

Determinación de proteínas

Las proteínas se determinaron por dos métodos: por el de Lowry y col. (1951), y por el Warburg y Christian (1941).

En el primer caso, la concentración proteica se dosifica con el reactivo de Folin Ciocalteu. La técnica consiste en agregar 0,4 ml de la solución de proteína a 2 ml de una solución compuesta por carbonato de sodio 2%, en ácido de sodio 0,1 N y sulfato de cobre 0,5 % en sal de Segnette al 1% en solución, 50:1 (v/v).

Se mezcla y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Al final de los cuales se agregan 0,2 ml de reactivo de Folin Ciocalteu

diluido al medio con agua. Luego de 30 min. se lee la densidad óptica a 660 nm. Como patrón, para la curva de calibración se usó sueroalbúmina bovina.

Cuando se trató de soluciones diluidas y con bajo contenido en ácidos nucleicos, se usó el método espectrofotométrico de Warburg y Christian (1941), pues es más sencillo y da resultados comparables con el primer método. Por este método la lectura de la absorbancia a 280 nm, que es una medida directa de la concentración proteica, se descuenta la lectura a 260 nm que es el error introducido por la absorbancia de los ácidos nucleicos. De acuerdo a la fórmula propuesta por los autores la concentración de proteínas en una solución estaría dada por:

$$\text{Conc. prot. (mg/ml)} = (1,45 A_{280} - 0,74 A_{260}) D$$

Donde A_{280} = absorbancia leída a 280 nm

A_{260} = absorbancia leída a 260 nm

D = dilución de la solución original

Este método, se utilizó de rutina en las determinaciones realizadas en las eluciones de columnas.

X. Ultrafiltración

Las fracciones proteicas, provenientes de las columnas de Sephadex o Bio Gel, se concentraron por presión reducida usando un tubo de Visking, como indica la técnica de Wildy y col (1961).

El método consiste en colocar la proteína a concentrar en una ampolla de decantación cuyo vástago está conectado al tubo de diálisis. Todo este sistema se coloca en un kitasato y por medio de un tapón de goma se logra un cierre hermético pudiéndose aplicar vacío por medio de una bomba. La solución proteica a ultrafiltrar, se deja pasar al tubo de diálisis abriendo el robinete, el vacío hace que el líquido ultrafiltre con los iones capaces de atravesar la membrana, mientras que dentro del tubo, la solución se va concentrando en proteínas.

Por este método, no se modifica la composición del buffer, es decir se concentran la proteína manteniéndola en un buffer de molaridad y composición igual a la del comienzo.

Electroforesis en gel de almidón

La técnica empleada, se basa en la descrita por Bodman (1960).

Para preparar el gel, el almidón se trató con buffer de molaridad igual a la del buffer usado como puente en la electroforesis y se calentó la suspensión obtenida hasta obtener una masa viscosa. A esta mezcla, en un baño de agua hirviendo se le aplicó vacío durante 60 seg. para eliminar el aire disuelto. Luego se volcó sobre una bandeja, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se lo dejó a las 2 horas.

La muestra se aplicó embebida en un pequeño trozo de papel Whatman y se colocó en una ranura practicada en la línea de siembra. Se colocó la bandeja en la cuba electroforética y se dejó correr 4 horas a 35 mA para obtener una buena separación. Como testigo se usó albúmina teñida con azul de metileno. Terminada la corrida se separó la capa superior del gel con un alambre fino, para evitar la difusión de las fracciones. El revelado se hizo según la técnica de Smithies (1955), con una solución de azul de metileno 10-B al 1% en una mezcla de metanol - ácido acético - agua (1:50) en volumen, en la que se sumerge el gel durante 30 seg. Luego se lava con la misma mezcla hasta que el gel queda celeste, las fracciones coloreadas quedan coloreadas de azul intenso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Se realizó de acuerdo a la técnica de Raymond y Weintraub (1959).

La proteína se corre en pequeñas columnas (0,8 cm x 8 cm) de gel, preparadas previamente con una solución gelificante, según indica el método, durante 4 horas (5 mA por tubo).

El revelado se hace sumergiendo los geles en una solución de Amido-

wartz 10 B al 0,25 % en ácido acético al 7%, durante 15 min. y para eliminar el exceso de colorante se lava repetidas veces con una solución de ácido acético al 5%.

IV. Análisis por Ultracentrifugación

Se hicieron en una centrífuga analítica Spinco Modelo E, equipada con sistema óptico a 59.780 r.p.m. (260.000 x g).

Las fotografías se tomaron cada 8 min. En cada análisis se usó una concentración enzimática de 6 mg/ml.

V. Determinación de grupos sulfhidrilos

Se dosaron, usando DTNB de acuerdo al método de Ellman (1958, 1959). Los grupos -SH de la proteína reducen al reactivo, el que es ionizado a alcalino, presentando un intenso color amarillo.

La absorbancia de este anión se leyó a 412 nm y se usó un coeficiente de extinción molar de $13.600 \text{ moles}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Las determinaciones se hicieron a 25°C. El DTNB reducido, se reoxida gradualmente con el tiempo por lo que se agregó EDTA para evitar en parte este inconveniente. Las soluciones de DTNB, se prepararon en el momento con buffer fosfato 0,1 M (pH 6,8).

En algunos casos se usó una modificación de este método, descrito por Erworth y col. (1967). Mediante esta técnica, que consiste en aislar el disulfuro mixto, formado entre los grupos sulfhidrilos de la proteína y el grupo tionitrobenzoico (TNB-proteína) de la mezcla de incubación, seguido del desajuste del tionitrofinilato unido a la proteína, se confirmaron los resultados obtenidos por el primer método y se lograron salvar algunas limitaciones impuestas por el mismo.

En este caso lo que se hizo fue tratar la enzima, con un exceso molar de 10-20 veces, y se siguió la reacción a 412 nm hasta que el valor de absorbancia se mantuvo constante.

Luego se pasó la muestra por una columna de Sephadex G-25 (medium), equilibrada y desarrollada con buffer de fosfato 0,1 M pH 7,5, con lo que la TNB-proteína se separó cuantitativamente del exceso de DTNB y tionitrofenilato libre, como se comprobó siguiendo la absorbancia a 280 nm y 412 nm.

Para separar la proteína del tionitrofenilato en el complejo TNB-proteína, se agregó un agente reductor tal como ditioneitol o ditioneitol en un exceso molar de 50-60 veces. El anión tionitrofenilato liberado se determinó leyendo su absorbancia 412 nm (Ellman, 1959). La cantidad de tionitrofenilato liberado de la proteína se relacionó luego a la cantidad de proteína sembrada en la columna.

Para medir el número total de grupos sulfhidrilos con DTNB, se agregó urea a la mezcla de incubación y la lectura también se hizo a 25°C.

RESULTADOS

Parte I

Síntesis del clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C

Como ya se dijo, desde 1953 (Shemin y Russell, 1953; 1955; Neuberger y Witt, 1953, 1954), se sabe que el ALA es un precursor del monopirol PBG, el cual a su vez, lo es de las porfirinas. Además, como lo demostró Shemin et al. (1956), el ALA es también el precursor de una parte de la vitamina B₁₂.

Como hay relativamente pocos organismos que no sintetizan porfirinas, es probable que casi toda la materia viviente sea capaz de proveerse este intermediario, razón por la cual muchos investigadores se han interesado en su síntesis.

Shemin y Russell (1955), han demostrado la utilidad del ALA 4 ¹⁴C y ⁴C en estudios de formación y metabolismo de porfirinas y propusieron un método para su síntesis.

A estos intentos, de sintetizar el ALA, siguieron muchos otros, como los realizados por Neuberger y Scott (1954, 1956), Pichat y col. (1956), Shemin y Raphael (1958), Tschudy y Collins (1959), Sparatore (1960), Sparatore y Cumming (1963), Pichat y col. (1966), Lartillot y Baron (1966).

Pichat y Herbert (1957), sintetizaron el clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C a partir de glicina 1 ¹⁴C.

La importancia biológica de este intermediario, la sensibilidad y facilidad de detección de sus metabolitos, es lo que nos llevó a considerar la posibilidad de mejorar los métodos de síntesis de este compuesto.

Para la obtención del clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C se eligió como material reactivo de partida ¹⁴CNK, ya usado desde 1945 en la síntesis de compuestos marcados en el grupo carboxilo (Wainhouse y Medes Floyds, 1954).

La síntesis implica la formación intermedia de la ftalilglicina a partir de la N-clorometil ftalimida y del ^{14}C NK, con lo que se evita la ruta práctica de la síntesis de la glicina y su posterior fusión con anhídrido. El cloruro de ácido de la ftalil glicina, se somete a una síntesis Arnd-Eistert. Por posterior bromación se obtiene la correspondiente bromoacetona, la cual se condensa con el derivado sodado del malonato de di-tercilo en dimetil formamida. El producto de condensación hidrolizado conduce al clorhidrato del ALA ^{14}C (Fig.14).

nica :

Síntesis del Ftalil acetónitrilo ^{14}C

En un pequeño recipiente se disuelven 0,6517 g (10 milimoles) de CNK, que tienen 113 mg de ^{14}C NK (5 mC) en 20 ml de metanol anhidro, se le agregan con agitación 2,239 g (10 milimoles) de N-clorometil ftalimida, preparada según se indicó en "Métodos", disueltos en 9 ml de dioxano caliente. La reacción se continúa durante 5 horas; luego se centrifuga el CLK precipitado y la solución clara se separa por decantación. El precipitado se lava con pequeñas porciones de dioxano caliente. Esta operación se repite 3 veces y los lavados se reúnen luego con la solución. (En algunas preparaciones estos lavados se realizaron con porciones de metanol anhidro pero de esta forma se pierde parte de CLK y además, en el precipitado queda mayor cantidad de material radioactivo).

La solución resultante evaporada bajo vacío da una masa cristalina de ftalil acetónitrilo ^{14}C , con un rendimiento de 1,769 g (5%). El producto cristalizado de agua tiene un P.F. 121-122°C (s/bibliografía: de alcohol 125°C, Sakami y col. 1947).

Ftalil glicina ^{14}C

El ftalil acetónitrilo ^{14}C grado obtenido, 1,769 g (9,5 milimoles), se suspende en 20 ml de una mezcla de ácido acético, ácido clorhídrico concentrado (3 N), y se calienta a reflujo durante 1 hora. La solución ácida se lleva

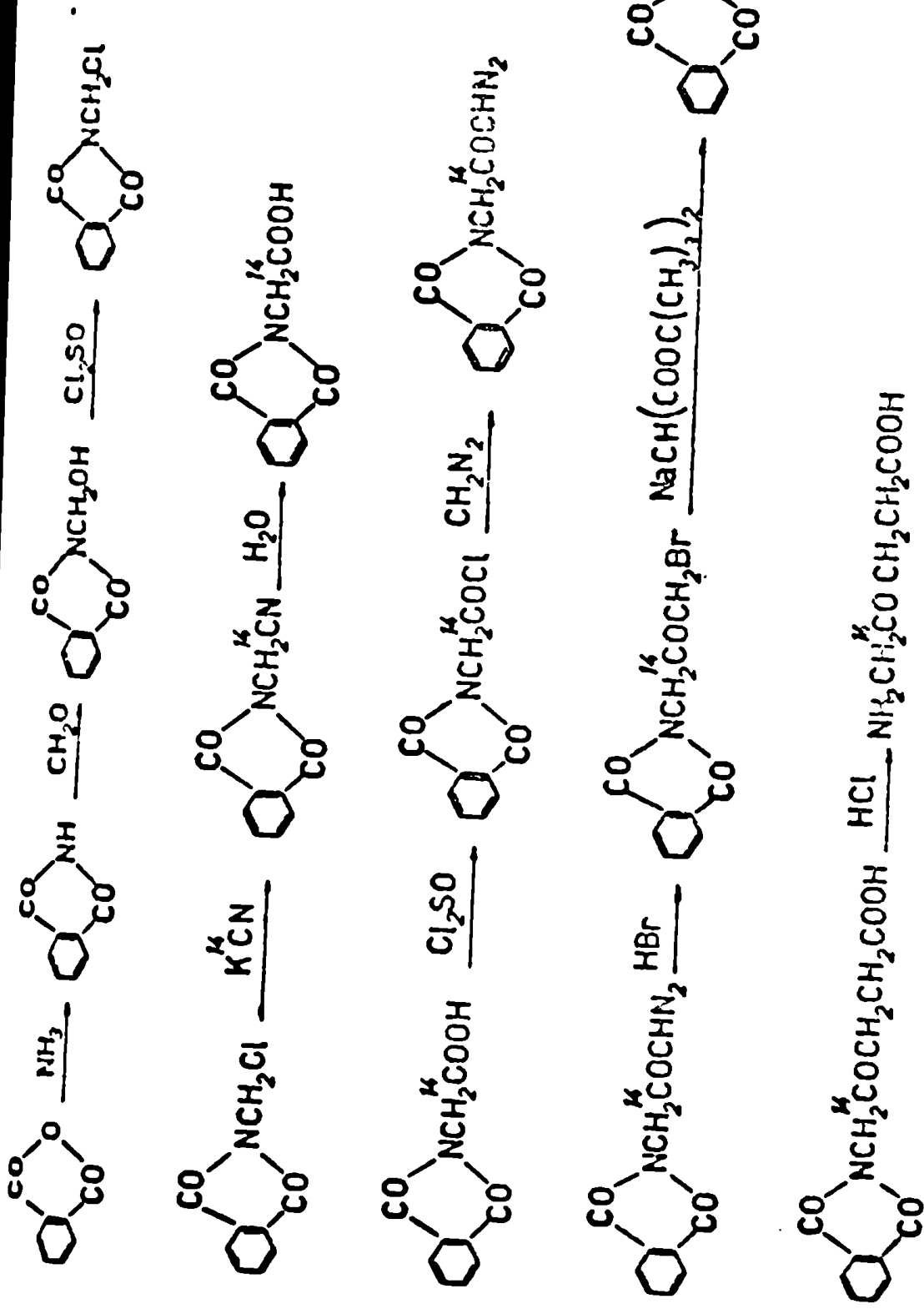


Fig.14 Síntesis del ALA 4 ¹⁴C - CIH

sequedad en vacío, usando un evaporador rotatorio, luego se agregan 5 ml de agua y se lleva nuevamente a sequedad; esta operación se repite 2 ó 3 veces.

El residuo cristalino se toma con 5 ml de agua helada, se filtra inmediatamente y se lava con otros 5 ml de agua helada, se filtra y se seca. Se obtiene así la ftalilglicina 1^{14}C , 1,753 g (8,6 milimoles) con un rendimiento de (85,5% respecto al 1^{14}C NK). P.F. 189-191°C (S/bibliografía 191-192°C, *ibid.* y col., 1963).

En las aguas de lavado se pudo comprobar la presencia de glicina 1^{14}C por cromatografía en papel ascendente y en capa delgada. Estas aguas se reunieron con las fracciones que en la purificación a través de la resina de intercambio iónico Dowex 50 revelaron la presencia de glicina 1^{14}C .

Cloruro de ftalilglicina 1^{14}C

A 1,753 g (8,6 milimoles) de ftalilglicina 1^{14}C se agregan en el mismo frasco 10 ml de cloruro de tionilo recientemente destilado. La mezcla se calienta a 40-50°C durante 2 horas y luego a 80-90°C hasta que la disolución sea completa (20 minutos). El exceso de cloruro de tionilo se elimina por destilación al vacío y por agregado de 3 ó 4 porciones de cloroformo o benceno anhidro, se asegura su completa eliminación. Se obtiene así, con un rendimiento aproximadamente 100% (1,922 g), un precipitado cristalino levemente amarillento de cloruro de ftalilglicina, que funde a 84-84,5°C (S/bibliografía 84-85°C). *ibid.* y col. 1951).

-Dialo-3-ftalimido-propanona 2^{14}C

1,922 g (3,6 milimoles) de cloruro de ftalilglicina 1^{14}C disueltos en aproximadamente 20 ml de éter anhidro se agregan gota a gota con agitación a una solución de 22 milimoles de diazometano contenidos en aproximadamente 10 ml de éter anhidro manteniendo la mezcla de reacción entre -10°C y -5°C. Inmediatamente después de agregadas las primeras porciones de cloruro de ftalilglicina se observa la aparición de un precipitado voluminoso blanco de

1-diazo-3-ftalimido-propanona 2^{14}C . En estas condiciones se deja toda la noche.

Al día siguiente se lleva a sequedad en vacío y a baja temperatura se obtiene 1,878 g (8,2 milimoles); rendimiento 95,1%. Respecto al ^{14}C NK da un rendimiento del 82% P.F. 168°C con descomposición (Pichat y col. 1957).

b) 1-Bromo-1-ftalimido-propanona 2^{14}C

A una suspensión de 1,878 g (8,2 milimoles) de 1-diazo-3-ftalimido propanona 2^{14}C en 30 ml de ácido acético glacial se agregan lentamente con agitación 2,5 ml de BrH al 48% (24 milimoles). Se observa al principio liberación de gas y disolución del precipitado. Se continúa la agitación durante 2-4 horas a 20°C.

Se lleva luego casi a sequedad al vacío, se toma con unos pocos mililitros de agua destilada que se eliminan por evaporación al vacío. Esta operación se repite varias veces para eliminar el exceso de ácido bromhídrico.

El residuo sólido se toma con benceno anhidro, se filtra y la evaporación en vacío de la solución bencénica da un precipitado cristalino de 1-bromo-3-ftalimido-propanona 2^{14}C , con un 77% de rendimiento en base al ^{14}CNK , 2,171 g (7,7 milimoles). Recristalizado de alcohol caliente, se obtiene un producto de P.F. 147-148°C (S/bibliografía de benceno 147-148°C Alenovic y col., 1952).

c) Clorhidrato del ALA 4^{14}C

El derivado sodado del malonato de di-terbutilo necesario para la síntesis malónica, se prepara, agitando a temperatura ambiente hasta el fin de la reacción, una solución etérea anhidra del éster, con sodio metálico. La relación molar usada es la siguiente: por cada mol de bromocetona se usan 2 moles del éster (malonato de di-terbutilo) y 2 moles de sodio.

5,712 g (24 milimoles) del derivado sodado del éster, suspendidos en

etil formamida recientemente destilada, se agregan con agitación sobre la solución, también en dimetilformamida, de la bromocetona obtenida, 2,711 (7,7 milimoles). La agitación se continúa durante 24 hs. a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la solución rojiza resultante se lleva a sequedad en vacío a baja temperatura.

En ensayos anteriores con material inactivo se probaron otros agentes salificantes para obtener el derivado sodado del ester malónico:terbutilato de sodio y metilato de sodio. En todos los casos, se determinó colorimétricamente la cantidad del clorhidrato del ALA formado antes de purificarlo por aje a través de una resina de intercambio iónico. Los rendimientos fueron bajos, encontrándose, en cambio, mejores resultados con el uso de sodio metálico como agente salificante.

El residuo cristalino obtenido de la síntesis malónica se toma con 20 ml de dioxano y se satura con Cl₂H gaseoso a 0°C; se deja a temperatura ambiente toda la noche.

Luego se evapora el dioxano, se lleva a sequedad y el residuo cristalino se toma con 30 ml de una mezcla ácido clorhídrico concentrado-ácido acético (1:1). En estas condiciones, se calienta a reflujo durante 24 horas. Luego se lleva a sequedad, el residuo sólido resultante se toma con agua destilada y se lleva nuevamente a sequedad. Esta operación se repite tres veces. Finalmente se toma con agua, se filtra y se lava el precipitado hasta que el agua del lavado pase sin color.

La solución amarilla resultante contiene ALA 4 ¹⁴C junto con otras impurezas revelables con ninhidrina, cuando se cromatografía sobre papel o capa delgada. La radioactividad se registró pasando el cromatograma por Radiochromatogram Scanner y efectuando una autorradiografía; así se comprobó la presencia de una impureza no revelable con ninhidrina.

) Purificación del clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C

La purificación del clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C se llevó a cabo por fijación del producto bruto sobre una columna de resina catiónica, Dowex 50 W en su forma ácida y posterior elución con un gradiente de concentraciones crecientes de ácido clorhídrico (Pichat y col.; (1957)).

En ensayos anteriores a la síntesis radioactiva se estudió la purificación con resinas de distintos grados de "Cross-linking", Dowex 50 x 4, Dowex 50 W x 8, Dowex 50 W x 12. La purificación del producto bruto se realizó usando la solución amarilla del clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C por una columna, 30 x 1 cm cargada hasta unos 15 cm del borde superior, con la resina Dowex 50 W x 12, malla 200-400 en forma ácida. La elución se hizo a temperatura ambiente y a una velocidad de 6 ml por hora. Con la ayuda de un colector automático se obtuvieron 300 fracciones de 3 ml cada una. La elución se comenzó con ClH N°20 (100 fracciones) y continuó con ClH N.

Las fracciones correspondientes al producto puro se liofilizaron y dieron 0,826 g (5 milimoles) de clorhidrato del ALA 4 ¹⁴C puro.

El ácido impuro que eluyó con glicina 1 ¹⁴C se liofilizó y se logró purificarlo en gran parte pasándolo por una columna (4 cm x 40 cm) de celulosa Whatman, previamente equilibrada con el solvente de elución. En este caso el solvente fue el mismo que el utilizado en las cromatografías. La elución se realizó a temperatura ambiente y la velocidad de goteo fue la misma que en la elución con Dowex 50 W x 12. Se recogieron 200 fracciones de 3 ml cada una.

Las fracciones correspondientes al ácido puro se liofilizaron y dieron 102 g (0,6 milimoles). La pureza del producto se comprobó nuevamente por cromatografía y su pureza radioactiva se verificó pasando el cromatograma por un Radiochromatogram Scanner.

Se obtuvo un producto final puro de 0,928 g (5,6 milimoles). Rendimiento %.

La medición de la radioactividad se hizo en un espectrómetro de centelleo líquido obteniéndose 0,47 mC/mM.

Su actividad biológica se comprobó por ensayos efectuados con la enzima ALA-D.

RESULTADOS

II Parte

A. Aislamiento y purificación de la enzima ALA-D

Todas las operaciones se llevaron a cabo a 4°C, excepto aquéllas en las cuales se indique lo contrario.

Preparación del homogenato

Se comenzó a trabajar con fracciones de 50 g de hígado vacuno, mantenido hasta el momento de su uso en las condiciones indicadas en Materiales. Se cortó en pequeños trozos, que se lavaron en un vaso de precipitados con solución fisiológica (ClNa 0,9%), para eliminar la sangre del tejido y luego se secaron sobre papel de filtro antes de homogeneizarlos, en solución de sacarosa 0.25 M, en relación de 10% peso/volumen. Para esta operación se utilizó un homogeneizador del tipo Potter-Elvehjem (con tubo de vidrio y émbolo de Teflón).

El producto homogeneizado se centrifugó a 700 x g durante 10 minutos para separar núcleos, células intactas y restos de tejidos del sobrenadante (extracto crudo) que se denominó "Homogenato".

Centrifugación a 11.750 x g

El "Homogenato" obtenido, se sometió a una centrifugación diferencial según la técnica de Schneider y Hogeboom (1950). Se centrifugó a 11.750 x g durante 10 minutos. En el sedimento no se encontró prácticamente actividad y se descartó. En el sobrenadante, en cambio, se halló más del 90% de la actividad.

En algunas preparaciones, el "Homogenato" se centrifugó a 105.000 x g durante 30 minutos. La actividad específica del sobrenadante fué sólo ligeramente mayor que la obtenida al centrifugar a 11.750 x g, por esta razón no se adoptó este procedimiento como método de rutina.

Tratamiento por calor

Para determinar si la ALA-D de hígado de vaca se comportaba como una enzima termolábil, propiedad que, presentaron las ALA-D obtenidas de otras fuentes (Valerych, 1963; Coleman, 1966), se sometió a distintos tratamientos. En primer intento, la ALA-D proveniente de la segunda etapa de la purificación, se sometió a un precalentamiento a 50°C durante distintos tiempos. En la Tabla I se presentan los resultados obtenidos; se trabajó sobre 300 ml de solución enzimática y a los tiempos indicados se retiraron alícuotas de 1 ml, que se enfriaron inmediatamente, y se centrifugaron a 1060 x g durante 10 minutos. Sobre 1 ml del sobrenadante se determinó la actividad enzimática.

Se observa que si bien la actividad no se alteró sensiblemente durante el proceso, los mejores resultados, en cuanto a su purificación, se obtuvieron durante los primeros 10 minutos de calentamiento.

Tabla I: "Estabilidad de la ALA-D a precalentamientos a 50°C en función del tiempo"

Se utilizó enzima proveniente de la segunda etapa de la purificación. El tratamiento se detalla en el texto. La determinación de la actividad enzimática se hizo según se indica en "Métodos".

Tiempo de calentamiento (minutos)	Actividad Remanente (%)	Purificación
1	100	1
2	99	1
5	82	1.6
10	70	1.5
15	65	1.2
20	62	1.3
25	60	1

Se investigó además, en tratamientos durante 10 minutos, cuál era la temperatura óptima. Para ésto, fracciones de 100 ml cada una, se calentaron durante 10 minutos a las temperaturas indicadas. Se enfriaron luego inmediatamente, se centrifugaron a 1060 x g durante 10 minutos y alícuotas de 1 ml del sobrenadante se utilizaron para determinar la actividad enzimática.

Se vió así, en la Tabla II, que a 60°C se obtuvo una mayor purificación. El rendimiento, no obstante, fué menor, por ello se disminuyó el tiempo de precalentamiento a 5 minutos, que, como se observó en la Tabla I, producía resultados comparables en cuanto a la purificación, con una mayor actividad de ALA-D remanente.

Tabla II: Estabilidad de la ALA-D a precalentamientos a distintas temperaturas durante 10 minutos.

utilizó enzima proveniente de la segunda etapa de purificación. El tratamiento se detalla en el texto. La determinación de la actividad enzimática hizo según se indica en "Métodos".

Temperatura °C	Actividad remanente (%)	Purificación
20	100	-
45	95	-
50	70	1,5
55	65	1,8
60	48	2,0
65	45	1,5
70	30	-
80	0	-
100	0	-

En la Tabla III se representan los resultados obtenidos, se vé que mejores condiciones resultaron ser, el precalentamiento durante 5 minutos entre 55-60°C. Por ello como método de rutina, se calentó el sobrena-

te obtenido en la centrifugación a 11.750 x g en fracciones de aproximada-
 te 300 ml con agitación constante hasta que la temperatura alcanzó los 50°C.
 retiró luego, la fuente de calor y el sistema se siguió agitando durante
 minutos. Durante este tiempo, la temperatura alcanzó los 56-58°C e inmediata-
 te se enfrió a 34-36°C en un baño de hielo. El sistema así tratado se
 trifugó a 1060 x g durante 10 minutos y se descartó el sedimento proteico
 actividad enzimática. El rendimiento obtenido en esta etapa de la purifi-
 cación fue de un 72%.

la III: "Estabilidad de la ALA-D a precalentamientos de distintas tempera-
 turas durante 5 minutos"

condiciones experimentales de trabajo son las mismas que las utilizadas
 la Tabla II.

Temperatura (°C)	Actividad remanente (%)	Purificación
45	92	-
50	82	1,6
55	78	2,3
60	70	2,8
65	52	1,8

En presencia de cisteína, la enzima resultó ser algo más estable a trata-
 tos por calor, aunque no se justificó emplear este procedimiento como mé-
 to de rutina.

Primer fraccionamiento con sulfato de amonio

El sobrenadante proveniente del tratamiento por calor, se sometió a un
 fraccionamiento salino.

La solución proteica se fue precipitando en estrechos rangos de satura-

ción, con sulfato de amonio y según se puede ver en la Figura 15, de acuerdo a las actividades específicas relativas, el 50% de la proteína enzimática precipitó entre 30-55% de saturación, se logró un aumento en la actividad específica de 3 veces, por lo cual se seleccionó esta zona de saturación para la purificación de la enzima.

En un principio, la precipitación se realizó utilizando solución saturada de sulfato de amonio, pero esta técnica trajo el inconveniente de aumentar en forma considerable los volúmenes, por lo que luego se utilizó directamente la sal sólida. La precipitación se hizo con sulfato de amonio finamente molido, agregado lentamente con agitación y evitando la formación de espuma. Después de cada agregado se llevó la solución a pH 7 con NH_3 al 7%. En esta forma, el sobrenadante del calentamiento se llevó de 0-30% de saturación, se dejó estabilizar una hora y se centrifugó a $11.750 \times g$ durante 10 minutos. El sedimento, con muy poca actividad enzimática, se desechó y el sobrenadante se llevó a 55% de saturación. Luego de una hora, se centrifugó nuevamente a $11.750 \times g$ durante 10 minutos, el precipitado obtenido se utilizó para continuar la purificación y el sobrenadante se descartó.

Para determinar la actividad enzimática, se disolvió una alícuota del precipitado en buffer de fosfato 0,134M y se procedió como se indica en el método.

Adsorción sobre gel de fosfato de calcio

La fracción precipitada entre 30 y 55% de saturación de sulfato de amonio se disolvió en buffer de fosfato 0,134 M, pH 6.8. Se probaron distintas relaciones de proteína:gel, obteniéndose en todos los casos adsorción de la enzima. Los mejores resultados en cuanto a purificación se obtuvieron con la relación de proteína:gel de 2,25.

La solución enzimática en una concentración proteica de aproximadamente 16 mg/ml, se trató con un volumen igual de una suspensión de gel de fosfato de calcio en agua destilada de 36 mg de gel/ml de suspensión, con lo que se disminuyó la fuerza iónica de la solución proteica a la mitad.

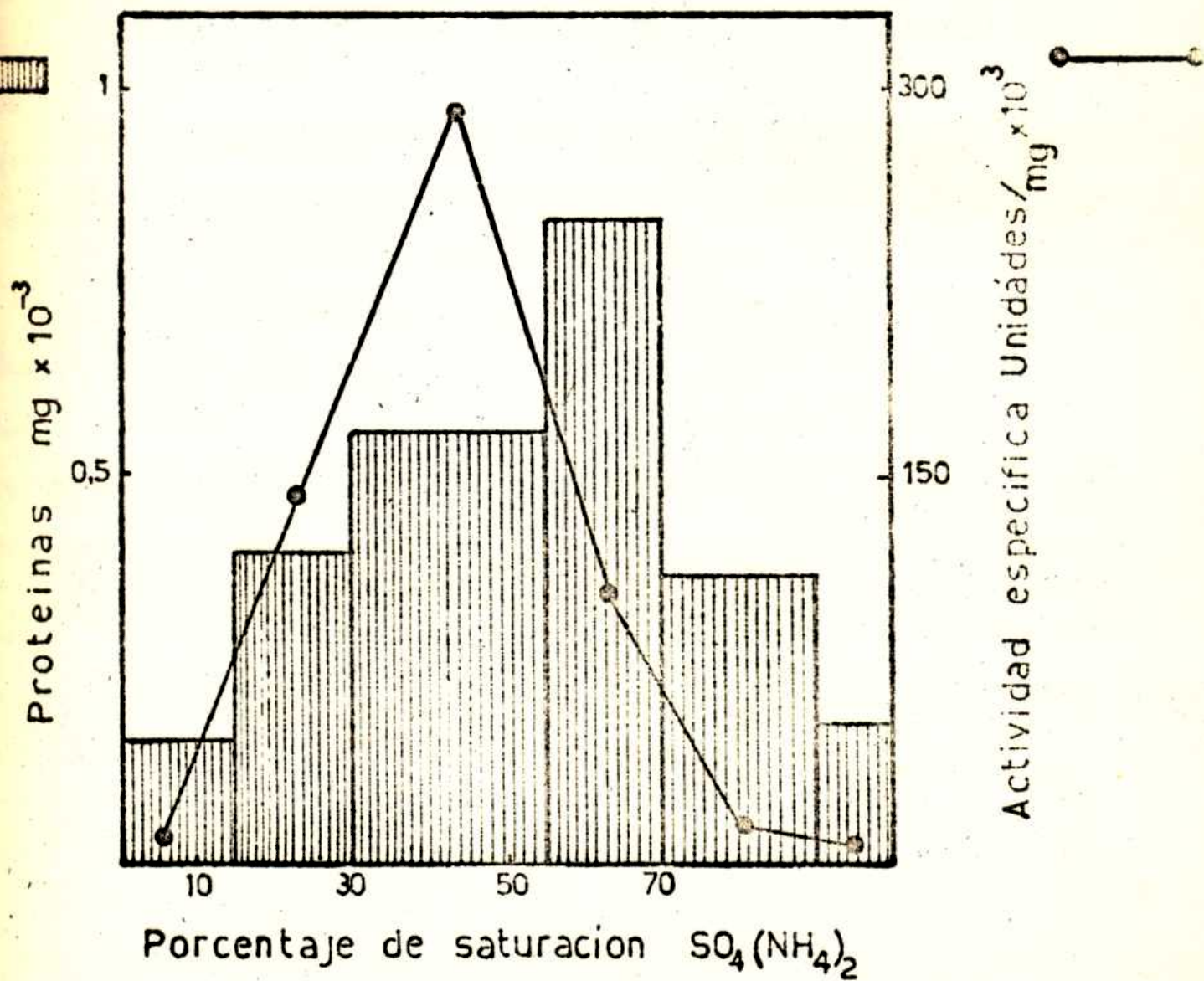


Fig. 15 Fraccionamiento salino con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ de la "ALA-D" de hígado vacuno. Las determinaciones de proteínas y actividad enzimática se efectuaron según se indica en "Métodos".

mezcla se agitó durante 10 minutos y luego se centrifugó a 1.060 x g durante 10 minutos. La enzima adsorbida en el gel, se eluyó del mismo agitándolo durante 10 minutos, con tres porciones de buffer de fosfato de potasio 0.134 M, pH 6,8 con 5% de sulfato de amonio, en forma tal, que el volumen de desadsorción final fuese igual al utilizado en la adsorción. En la Tabla IV se observan los resultados obtenidos por este procedimiento, se vé que efectuando las desadsorciones con mayor fuerza iónica (buffer de fosfato 0,134 M, pH 6,8, más 10% de sulfato de amonio), si bien se aumenta el rendimiento enzimático, la purificación disminuye, respecto del tratamiento anterior.

Tabla IV: Tratamiento de la ALA-D de hígado vacuno con gel de $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}$.

La adsorción y la desadsorción se efectuaron según se indica en el texto. Las terminaciones de la actividad enzimática y proteínas según se indicó en todos.

Fracción	Proteínas totales (mg)	Unidades totales $\times 10^3$	Actividad específica $\times 10^3$	Purificación
Disolución de la 1. etapa en bu- ffer de PO_4^{3-} 0,134M pH 6,8	90	400	4,4	1
Preparado del tratamiento por gel	38,6	24	0,6	0,14
Desadsorción con bu- ffer PO_4^{3-} 0,134 M, pH 6,8 + 5% $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	19,5	340	17,4	3,95
Desadsorción con bu- ffer PO_4^{3-} 0,134 M, pH 6,8 + 10% $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	41,3	352	8,5	1,93

Con la técnica descrita, se logra una purificación de la enzima de 1,2 veces con un rendimiento de 84,5%.

En ensayos paralelos se estudió el comportamiento de la enzima frente al gel de hidroxapatita, pero se obtuvieron resultados menos reproducibles, que los obtenidos con gel de fosfato de calcio, por lo que éste último se utilizó entonces en el método de purificación.

Segundo fraccionamiento con sulfato de amonio:

Con el objeto de concentrar la fracción enzimática, los tres eluidos provenientes del tratamiento por gel, se reunieron, neutralizaron y llevaron a 55% de saturación con sulfato de amonio. Luego de una hora el material se centrifugó a 11.750 x g durante 10 minutos.

Pasaje a través de columnas de tamices moleculares

El precipitado proveniente de la segunda precipitación con sulfato de amonio, se suspendió en un pequeño volumen de buffer de fosfato 0,067 M, pH 6,8, conteniendo cloruro de potasio (0,1 M), hasta llevar a una concentración proteica de aproximadamente 8-10 mg/ml. La solución enzimática se pasó luego por una columna de Sephadex G-100 (1,8 cm x 30 cm), previamente equilibrada con buffer de fosfato 0,067 M, pH 6,8 conteniendo cloruro de potasio (0,1 M). La proteína se eluyó luego con este mismo buffer, a una velocidad de 16-18 ml/h, reuniéndose fracciones de 3-4 ml.

En cada fracción eluida de la columna, se determinaron actividad específica y proteínas, reuniéndose las fracciones activas. La Fig. 16 representa un diagrama de elución típico. Como se vé, la mayor cantidad de proteína eluyó prácticamente en un único pico y la actividad de la ALA-D se encontró asociada a él.

Segundo pasaje por columna de Sephadex G-100

Las fracciones eluidas de la columna de Sephadex G-100, con actividad de ALA-D, se reunieron y se concentraron por ultrafiltración, hasta llevar a solución a una concentración proteica de 10 mg/ml, la cual fué recromatizada.

tografiada en una segunda columna de Sephadex G-100. En este caso, como se vé en la Figura 17, que muestra el diagrama de elución, se obtuvo un único pico proteico con una actividad específica de aproximadamente 310 veces la del homogenato. Nuevamente las fracciones con actividad de ALA-D se reunieron, dando una solución levemente coloreada de amarillo. Las soluciones se conservaron a -15°C .

En la purificación, luego de la 6ta. etapa se probó pasar la enzima por columnas de Bio-Gel P-200, pero por esta técnica se obtuvo una fracción enzimática, con una actividad específica de sólo 25 veces la de la etapa anterior; como los resultados obtenidos utilizando Sephadex G-100 fueron mejores se adoptó este gel en el método de purificación.

Los resultados obtenidos en un caso típico, siguiendo el procedimiento indicado, se detallan en la Tabla V.

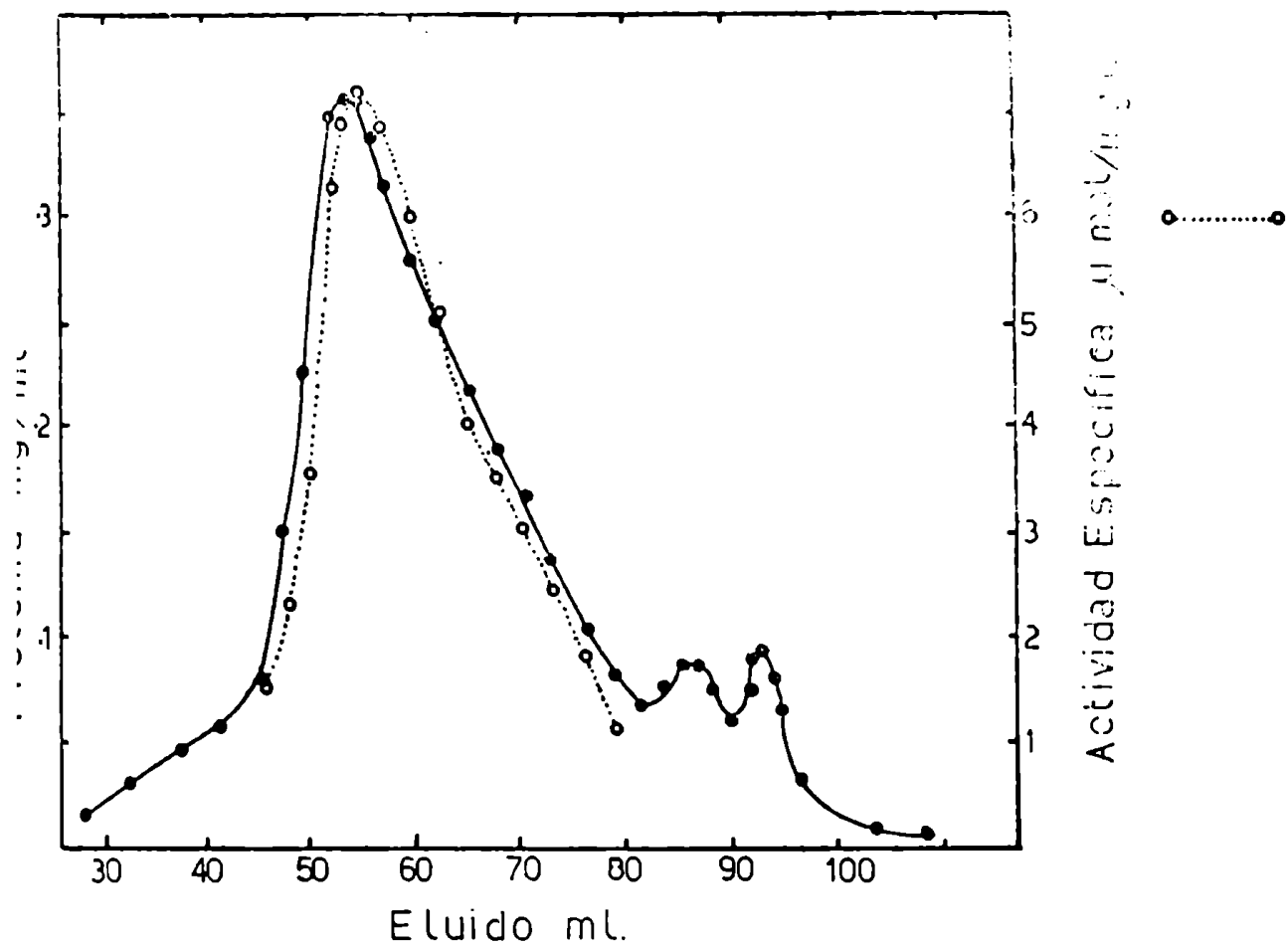
5. Propiedades de la ALA-D de hígado vacuno.

Estabilidad

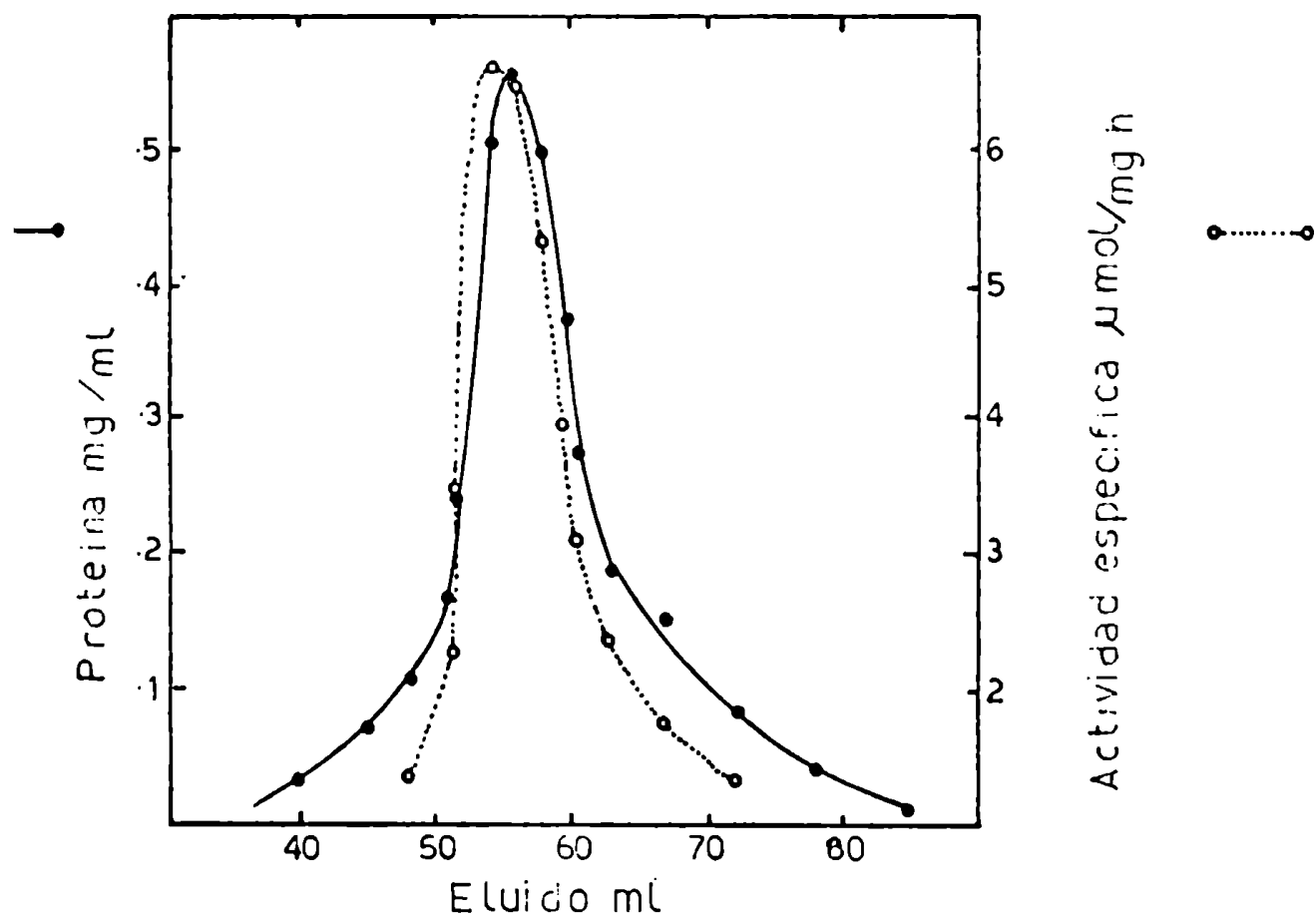
La actividad de la enzima en el hígado no varió, durante la conservación del mismo en las condiciones indicadas en Métodos, desde el momento del faenamiento del animal hasta más de 30 días, a -15°C . La enzima se inactiva parcialmente por repetidos procesos de congelamiento y descongelamiento: por mantenimiento prolongado a -15°C y por mantenimiento a 4°C durante 7-10 días, pierde el 50% de su actividad cuando se mantiene a temperatura ambiente durante 24 horas. La enzima precipitada de sulfato de amonio, 55% de saturación, es muy estable a -15°C .

Pureza de la enzima

La fracción de la 8a. etapa de purificación, se mostró como una única proteína por análisis electroforético en gel de almidón a distintos pHs y en gel de poliacrilamida, procesos efectuados según la técnica indicada en Métodos (Dodman, 1960). La enzima proveniente de otros grados de purificación mostró más de una banda proteica (Figura 18). En análisis electroforéticos



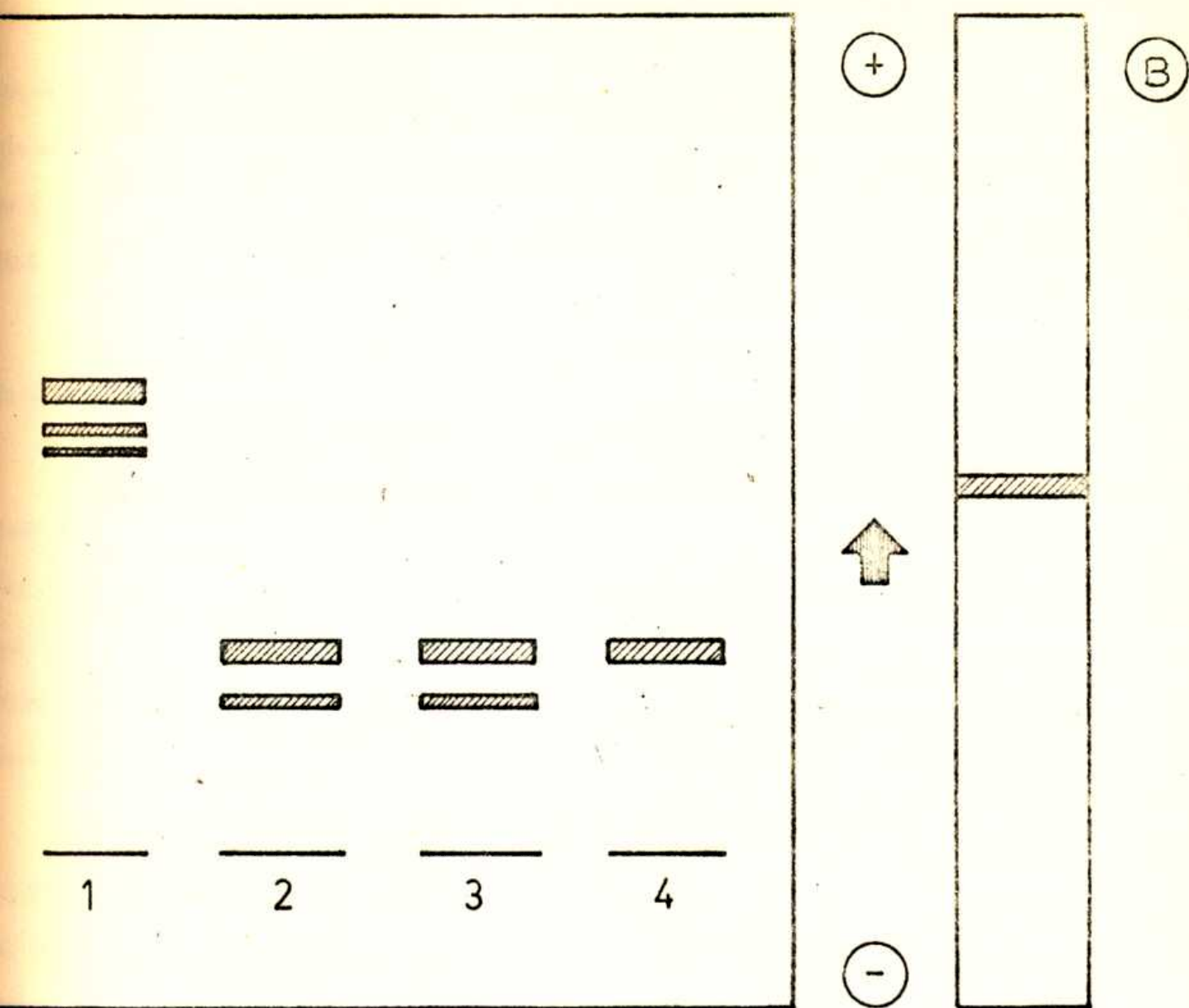
Comportamiento cromatográfico sobre Sephadex G-100 de la preparación enzimática proveniente de la etapa 6. Se sembró 14 mg de la solución enzimática (14 mg de proteína) en una columna de Sephadex G-100 (1,8 cm x 30 cm) en buffer fosfato 0,067 M, pH 6,8, con Cl K (0,1 M) y se eluyó con el mismo buffer a una velocidad de 0,3 ml/min a 4°C. ●-Actividad específica, determinada en condiciones standart. ○-proteínas



Comportamiento cromatográfico sobre Sephadex G-100 de la preparación enzimática proveniente de la etapa 7. Las condiciones de trabajo son las mismas que la fig. 16

Tabla V: Purificación de la ALA-D de hígado vacuno. Las determinaciones de la actividad enzimática y proteínicas se efectuaron según se indican en métodos.

Fracción	Proteínas totales (mg)	Unidades totales x 10 ³	Rendimiento %	Actividad específica x 10 ³	Purificación
1. Homogenato	23.800	443,5	100	18,7	1
2. Sobrenadante 11.75% x g	10.650	418,9	91	39,8	2,1
3. Tratamiento por calor	3.089	299,6	69	96,7	5,25
4. Fracción 30-55% SO ₄ (NH ₄) ₂	486	137,8	29	283,9	17,75
5. Tratamiento con gel (PO ₄) ₂ 3 ⁺	104,6	114,4	24,5	1092,0	59,6
6. 2da. fracción 55%-SO ₄ (NH ₄) ₂	61,1	100,1	21	1633,6	89,9
7. Fracciones combinadas de la 1a. columna Sephadex C-100	17,7	87,0	18,2	4917,5	272,7
8. Fracciones combinadas de la 2da. columna Sephadex C-100					



Comportamiento electroforético de la 'ALA-D'

Electroforesis en gel de almidón: se usó buffer de borato, pH 8,8; tiempo durante 3 horas, con una corriente de 21 mA.

1- Albúmina, 2- Fracción 30-55% saturación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, 3- Fracción turbida de gel, 4- Segunda columna de Sephadex G-100

Electroforesis en gel de poliacrilamida, se ensayó la enzima proveniente de la segunda columna de Sephadex G-100. En ambos se siguió la técnica descrita en 'Métodos'

comparativos sobre gel de almidón, la ALA-D de hígado de vaca mostró además una movilidad electroforética similar a la de la enzima purificada de glándula de Harlow de ratas normales y de callos de semilla de soya (Tomio y col. 1968 b; Tindler y col. 1968).

Por electroforesis en gel de almidón se pudo determinar además el punto isoeléctrico de la ALA-D que resultó ser $pI = 4,9$.

Como ya se mencionó en la purificación de la enzima, ésta se comportó también como una única entidad proteica después del primer pasaje por Sephadex G-100. En efecto, cuando se la pasa por columnas de Sephadex G-100 o por Bio-Gel P-200 de mayor resolución, en todos los casos el pico proteico coincide con el pico de actividad enzimática, como se observa en la Figura 17 para su segundo pasaje por Sephadex G-100.

Por último se estudió la pureza de la ALA-D de hígado vacuno, siguiendo el perfil de sedimentación en una centrífuga analítica Spinco modelo E, como se indicó en Métodos. En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos con la enzima de la 8a. etapa de purificación: se observa que la ALA-D sedimentó como un único pico simétrico. Con preparaciones parcialmente purificadas, como por ejemplo la proveniente de la 6ta. etapa de purificación, se obtuvieron 2 picos proteicos.

Todos estos análisis indican la presencia de una entidad proteica con actividad enzimática.

Determinación del Peso Molecular

La determinación del PM, se realizó utilizando columnas de tamices moleculares, de acuerdo a la técnica indicada en Métodos (Andrews, 1964; Batlle, 1966). El PM, promedio de una serie de determinaciones realizadas con distintas concentraciones de enzima, se estimó en 140.000 ± 14.000 . Por determinaciones realizadas a bajas concentraciones y en columnas calibradas de Sephadex P-200, se obtuvieron evidencias de una posible disociación de la enzima en sub-unidades de PM de 70.000 ± 7.000 . No se observó disociación completa.

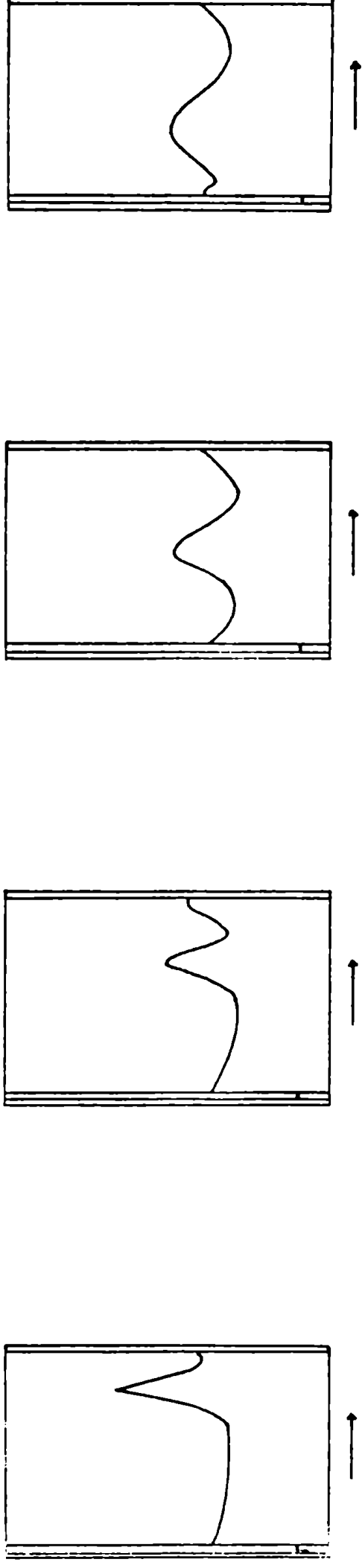


Fig19 Diagrama de sedimentación de la 'ALA-D' de higado vacuno. Se utilizó una velocidad de 59.780 r.p.m (260000xg), una temperatura de 14,2 °C, el ángulo de incidencia 40 y un voltaje de 92 V. La concentración inicial de la enzima fue de 7 mg/ml de buffer de PO_4^{3-} . Las fotografías se tomaron a intervalos de 8 min.

Condiciones de incubación

La actividad enzimática de la ALA-D de hígado vacuno, es estrictamente dependiente de condiciones anaeróbicas. En la Tabla VI, se puede observar e aún en las primeras etapas de la purificación, la actividad enzimática es casi nula aún en presencia de protectores de grupos -SH. La necesidad de estos reactivos en cambio, si bien es estricta después de la 6ta. etapa de purificación, no es absoluta en las primeras, observándose una mayor dependencia con el grado de purificación. Estas condiciones mostrarían una gran necesidad del grupo o grupos -SH en el centro activo de la enzima y además que estos estarían lo suficientemente expuestos por su gran susceptibilidad a la oxidación.

Tabla VI. Condiciones de incubación de la ALA-D

Los incubados se efectuaron utilizando como fracción enzimática 5 mg de sobrenadante 11.750 x g, 1 mg de precipitado 30-55% de $SO_4(NH_4)_2$, 0,5 mg del residuo de la 1a. columna de Sephadex G-100, según se indique en cada caso, en aerobiosis o anaerobiosis según el caso. Se utilizó la cantidad de ALA-D aplicada en Métodos, la cisteína se agregó a pH 6,8.

Fracción enzimática	Condiciones de incubación	Cisteína 10^{-2} M	Actividad enzimática (μ moles PBG/h)
sobrenadante 11.750 x g	Aerobiosis	-	0,08
		+	0,12
	Anaerobiosis	-	0,59
		+	0,70
55% sat. $(NH_4)_2$	Aerobiosis	-	0
		+	0,05
	Anaerobiosis	-	0,16
		+	0,25
columna Sephadex G-100	Aerobiosis	-	0
		+	0
	Anaerobiosis	-	0,12
		+	1,12

Como se observa, la cisteína es necesaria para la actividad de la ALA-D dependiente de la preincubación con este reactivo.

En efecto, se estudió la concentración óptima de acción para la cisteína; para esto, se preincubaron fracciones de 1,5 mg de ALA-D de la 6a. etapa de purificación, en vacío, durante 30 minutos con distintas concentraciones de cisteína. Transcurrido este tiempo, en la misma forma que se indicó para la terminación de la actividad, se hizo caer el ALA desde la cabeza del tubo de unberg y se comenzó la incubación. En la Tabla VII se observa que la actividad enzimática aumentó con la concentración de cisteína hasta que la misma osciló entre 10^{-3} y 10^{-2} M, aumentando alrededor de 12 veces respecto a la muestra sin cisteína.

Tabla VII. Activación de la ALA-D en función de la concentración de cisteína

Los incubados se hicieron con enzima proveniente de la 6a. etapa de purificación. Las condiciones de trabajo se detallan en el texto. La actividad enzimática se determinó según se indica en Métodos.

Adición	Concentración M	PBG formado μ moles/h
Ninguna	-	0,16
Cisteína	10^{-5}	0,21
	5×10^{-5}	0,32
	10^{-4}	0,55
	5×10^{-4}	1,27
	10^{-3}	1,85
	5×10^{-3}	1,83
	10^{-2}	1,80
	5×10^{-2}	0,82
	10^{-1}	0,19

Con la concentración óptima de cisteína, 10^{-3} M se estudió la influencia del tiempo de preincubación. Se observa en la Figura 20 que aproximadamente los 50 minutos de preincubación ya se obtuvo el máximo de activación de la

ALA-D, por lo que se utilizó como método de rutina en la determinación de la actividad enzimática, la preincubación, durante 1 hora en vacío y en presencia de Cisteína 10^{-3} M.

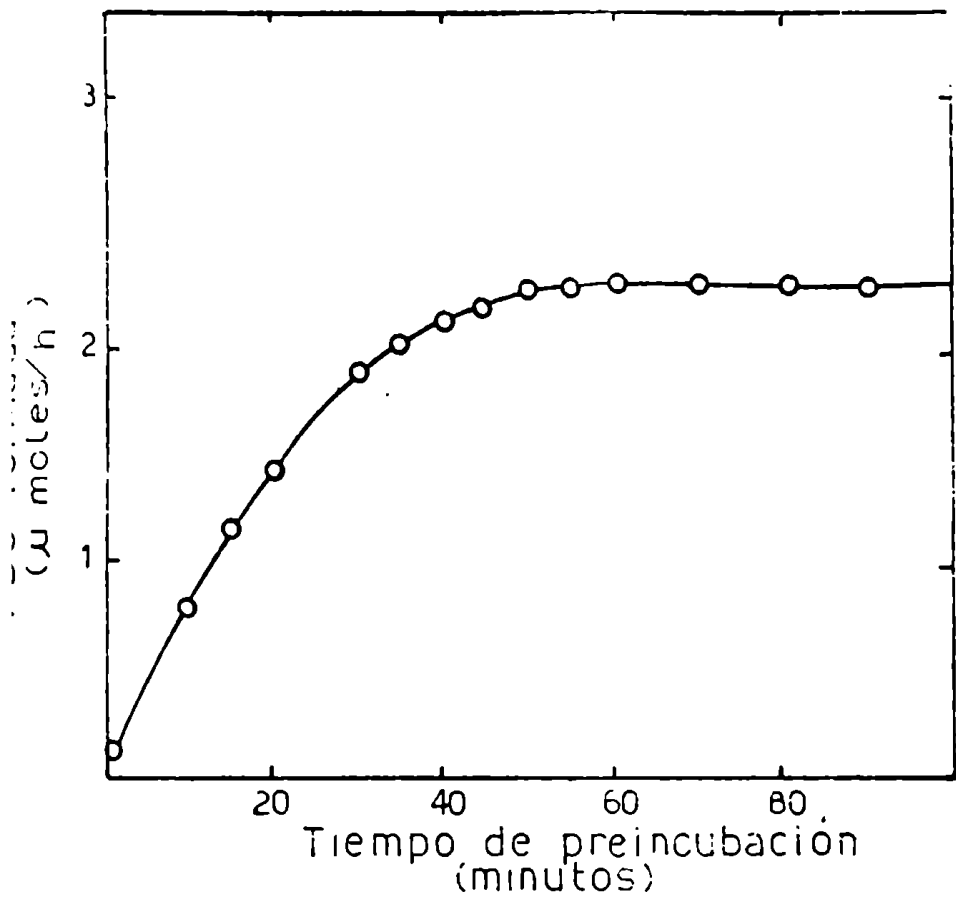
Producto y estequiometría de la reacción:

El único producto de la reacción fué el Porfobilinógeno, sustancia que se determinó en el desproteínizado del medio de incubación, cuantitativamente por los métodos colorimétricos de Mauzerall y Granick (1956), y Granick y Urata (1963) y cromatográficamente según Westall (1952), y Mauzerall y Granick (1956), de acuerdo a las técnicas ya detalladas en Métodos. En la Tabla VIII se observa además que la transformación ALA en PBG fué cuantitativa, ya sea utilizando distintas fracciones enzimáticas, como distintos tiempos.

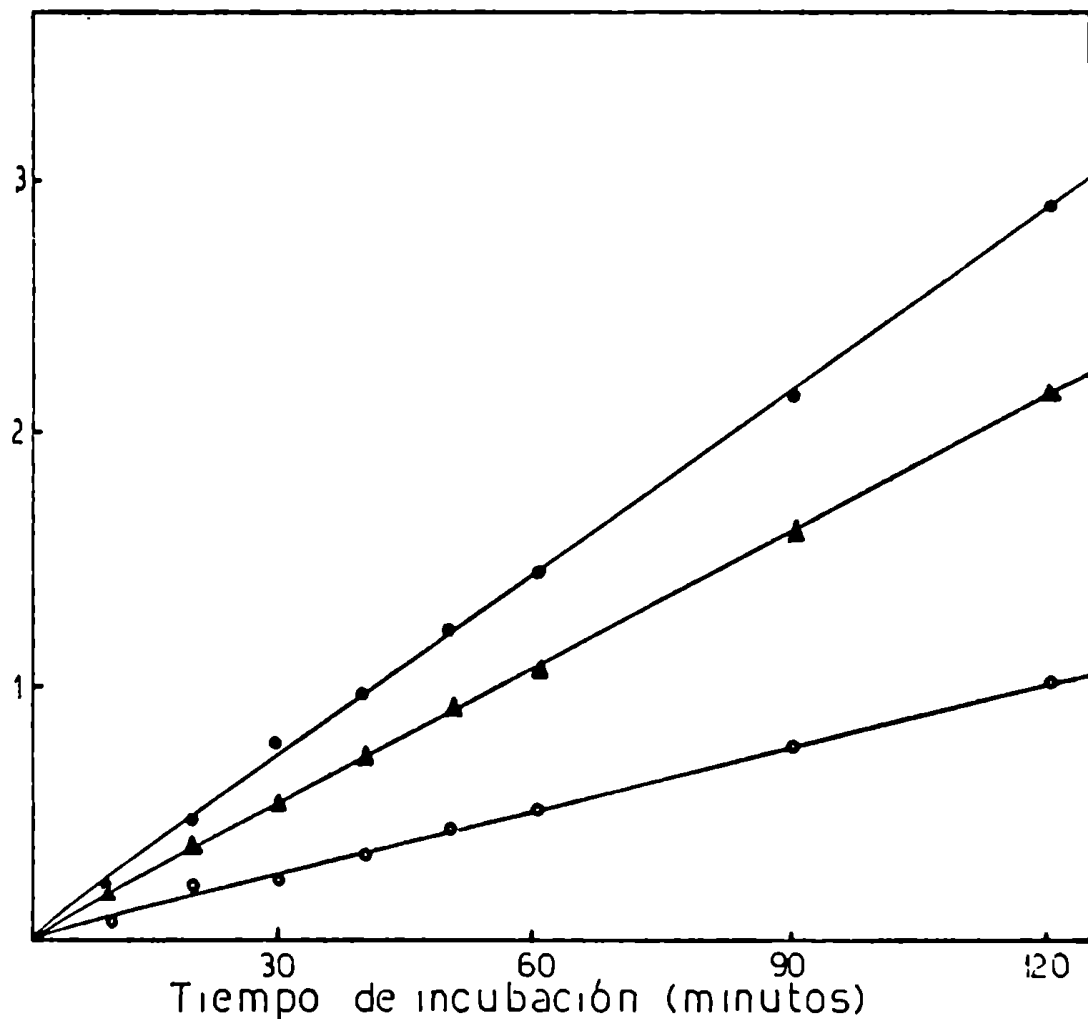
Tabla VIII: Estequiometría de la reacción catalizada por ALA-D

Se utilizaron por incubado 3 mg de la fracción 30-55% de saturación con $SO_4(NH_4)_2$ y 0.5 mg de la enzima proveniente de la 8a. etapa de purificación, se incubaron los tiempos indicados y la determinación de ALA y PBG remanentes se efectuó según se describe en Métodos.

Fracción enzimática	Tiempo de incubación (minutos)	ALA Remanente (μ moles)	PBG formado	ALA consumido / PBG formado
Precipitado 30-55% de sat. con $SO_4(NH_4)_2$	0	5	-	-
	10	4,7	0,15	2
	20	4,3	0,32	2,1
	30	4,0	0,52	1,9
Eluido de la 8a. columna de Sephadex G-100	0	5	-	-
	10	4	0,45	2,2
	20	3,25	0,90	1,9
	30	2,25	1,40	2,0



10. Actividad de la 'ALA-D' en relación al tiempo de preincubación. Las condiciones de incubación son las indicadas en Métodos, se varió el tiempo de preincubación según se indica



11 Curso de la reacción de la 'ALA-D' en relación al tiempo de incubación. Las condiciones de la incubación son las indicadas en el texto. Se utilizó 'ALA-D' de la etapa 4. de purificación: g, de la etapa 7: ○-0,1 mg, ●-0,3 mg

En base a estos resultados, la fracción de ALA-D precipitada entre 30-55% de saturación con sulfato de amonio, se utilizó como preparación enzimática en el método de biosíntesis de PBG desarrollado en nuestro laboratorio (Sancovich y col. 1967, Sancovich y col., 1970).

Curso de la reacción en función del tiempo de incubación

La formación de PBG catalizada por la ALA-D de hígado vacuno, resultó lineal con el tiempo de incubación, por lo menos dentro de los primeros 120 minutos.

En la Figura 21 se muestran los resultados obtenidos utilizando fracciones enzimáticas de distintos grados de purificación, provenientes de la 4a. y 7a. etapa, y a distintas diluciones de la más purificada.

Las incubaciones se efectuaron en las condiciones indicadas en Métodos salvo que se paró la reacción enzimática, después de una hora de preincubación en todos los casos, a los tiempos indicados.

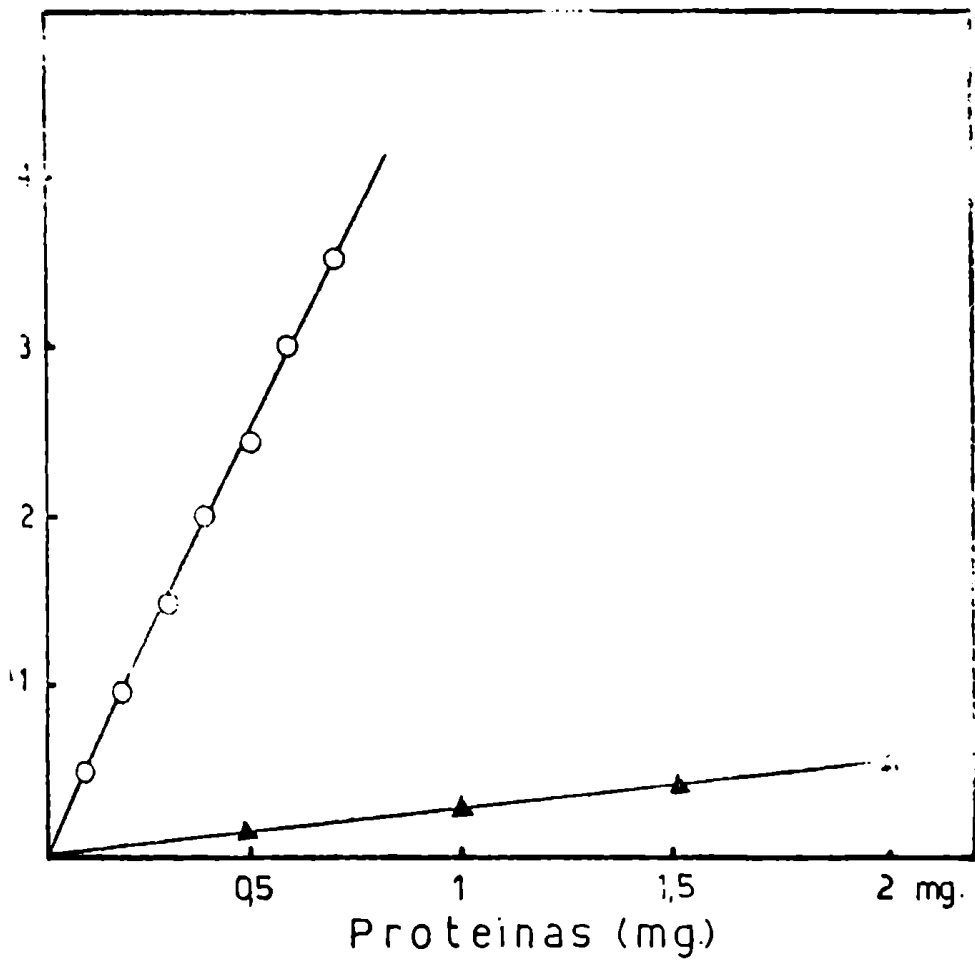
Relación de la actividad enzimática y la concentración de ALA-D en el sistema de incubación

En la Figura 22, se graficaron los resultados obtenidos, en la formación de PBG en función de la concentración de ALA-D. Como en el caso anterior, para el estudio del curso de la reacción en función del tiempo, se utilizaron fracciones enzimáticas provenientes de distintos estados de purificación etapas 4 y 7; en ambos casos se observa perfecta linealidad.

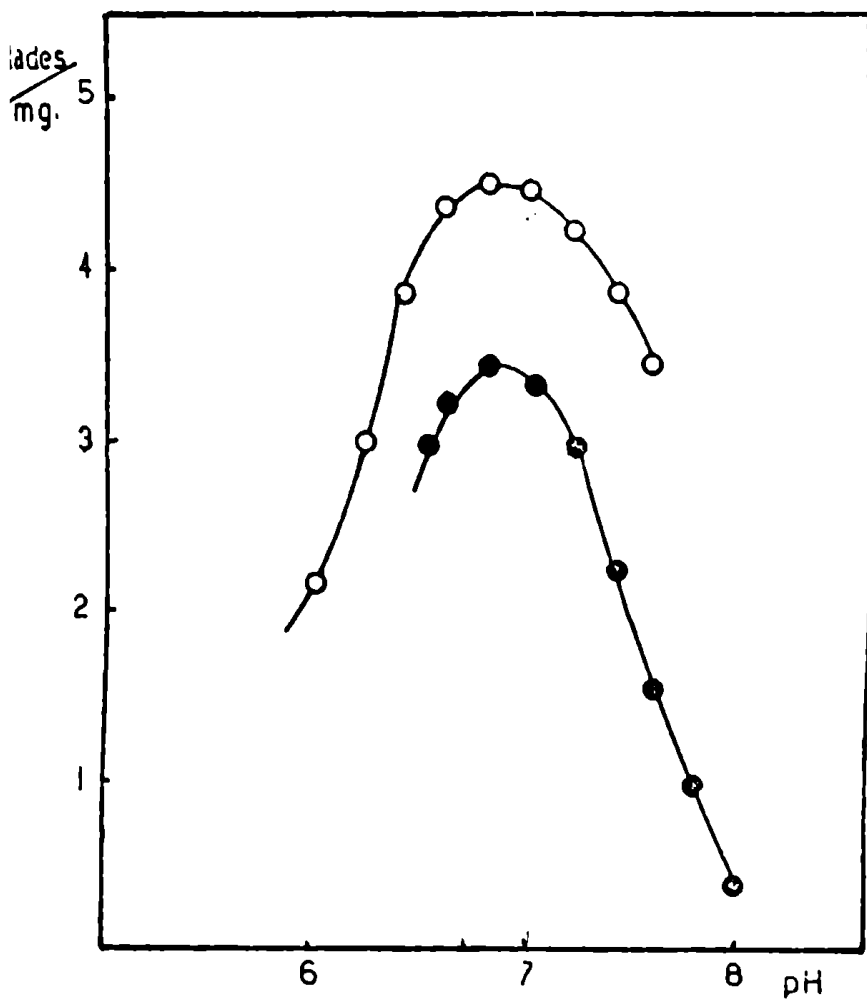
Las incubaciones se hicieron como se indica en Métodos y sólo se fue variando la cantidad de proteínas en cada incubado, de acuerdo a lo indicado en el gráfico.

pH óptimo:

La variación de la velocidad de la reacción de la ALA-D en función de pH, se ilustra en la Figura 23. Para este estudio se utilizaron buffers de fosfato y Tris-ClH.



Curso de la reacción en relación a la concen-
 de 'ALA-D'. Las condiciones de la incubación son
 icadas en el texto. Se utilizó 'ALA-D' de la etapa 7 -o- y
 etapa 4 -▲-



pH de incubación para la 'ALA-D' de hígado vacu-
 só enzima proveniente de la etapa 7 de purificación.
 ubaciones se realizaron como se indica en el texto,
 r PO_4 0,067M - ●- Buffer Tris =ClH 0,05M

Se empleó enzima, proveniente de la etapa 7 de purificación, que se concentró previamente por ultrafiltración y se pasó luego en cada caso por una columna de Sephadex G-25 previamente equilibrada con el buffer de pH a ensayar, utilizando este mismo buffer en la elección de la proteína.

La determinación de la actividad enzimática se hizo según se indicó en Métodos, sólo que se reemplazó el buffer de fosfato 0,067 M, pH 6,8, usado habitualmente, por buffer fosfato de la misma molaridad pero a pHs que fueron de 6 a 7,5 y por buffer Tris ClH 0,05 M a pH entre 6,5 y 8.

Se observó, que la ALA-D de hígado vacuno presenta su actividad óptima a pH 6,8, tanto en buffer fosfato como en buffer Tris-ClH, pero en este último caso la actividad es un 30% menor. Se vé en el gráfico, que la disminución de la actividad enzimática hacia los pH ácidos es mayor que la que se observa hacia los pH alcalinos.

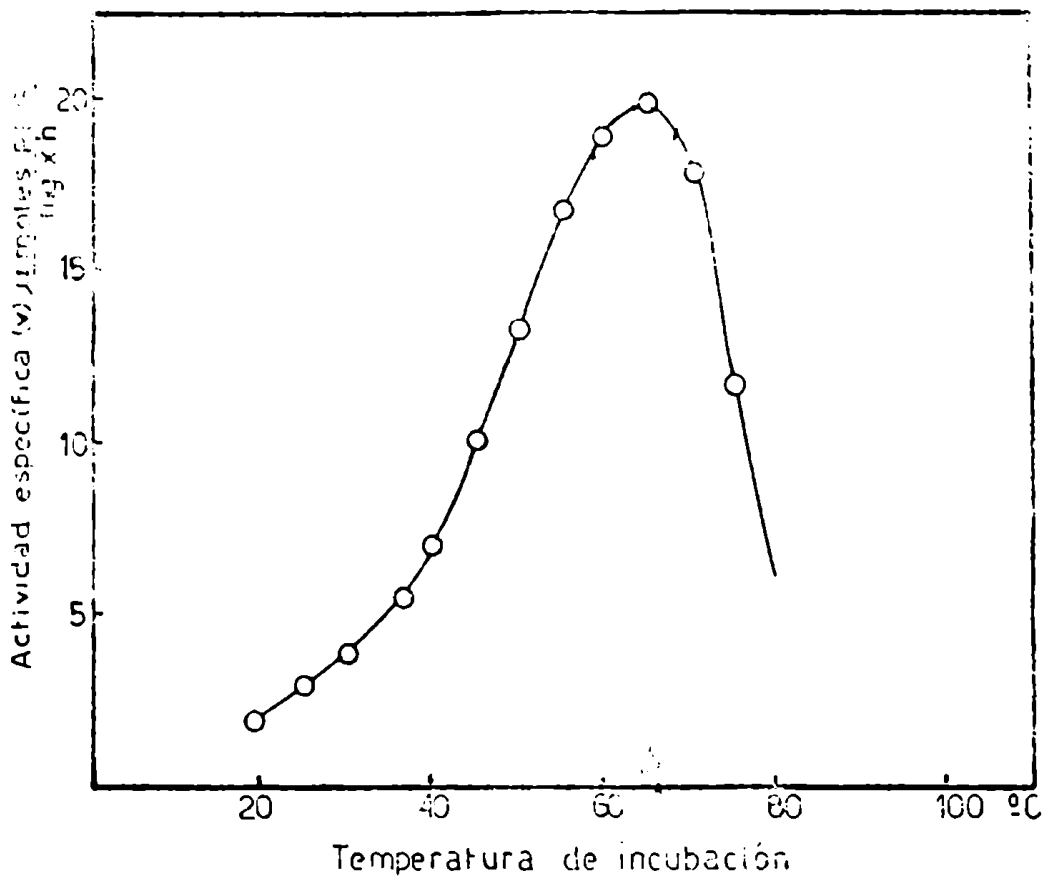
Efecto de la temperatura sobre la ALA-D

La actividad de la ALA-D, se midió en un rango de temperatura que abarcó de los 20 a los 80°C. La experiencia se efectuó determinando la actividad de la ALA-D proveniente de la etapa 7 de purificación, según se indicó en Métodos, sólo que aquí se fué variando la temperatura de incubación de acuerdo a lo señalado en el gráfico. (Figura 24)

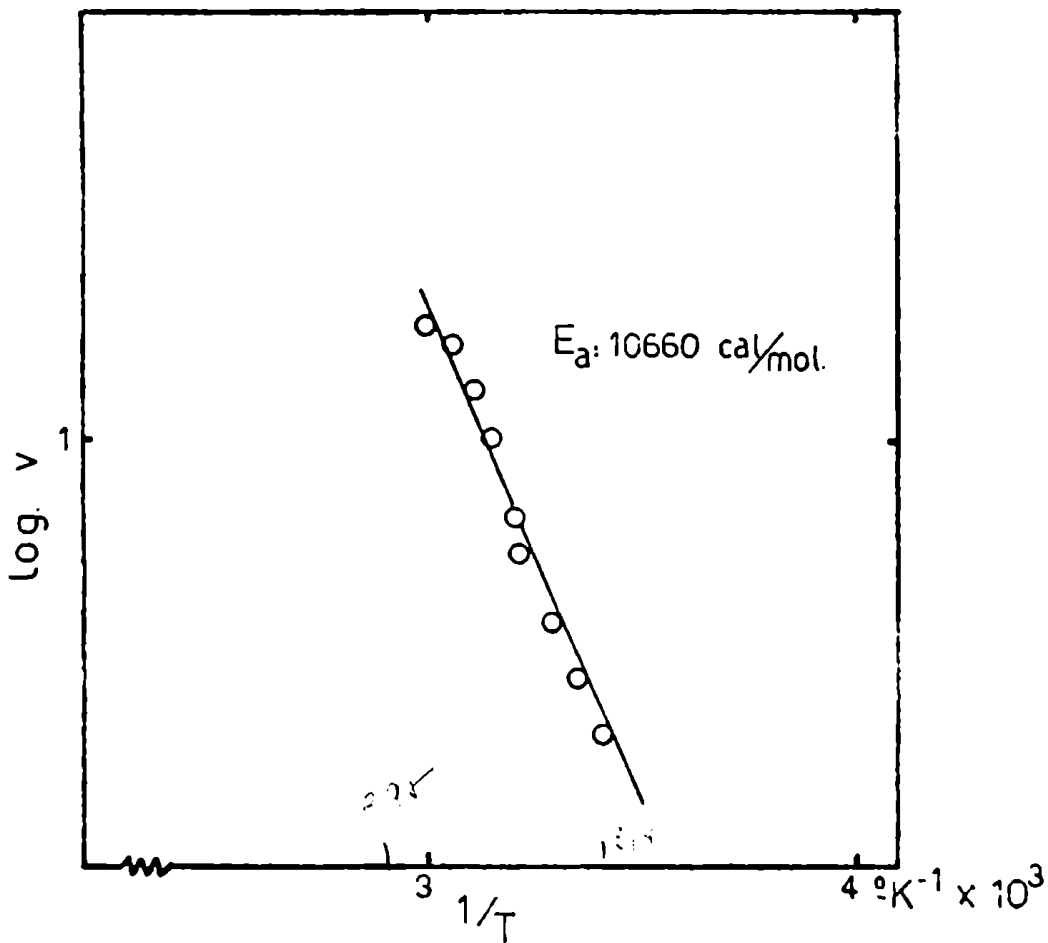
Se observó, que en estas condiciones, la velocidad máxima de reacción se alcanzó a los 65°C. Cuando se calentó el sistema arriba de los 85°C, se destruyó completamente su actividad. Con los datos aquí obtenidos, aplicando la ecuación de Arrhenius se calculó la energía de activación de la reacción de la ALA-D que resultó $E_a = 10.660$ calorías/mol (Figura 25).

Cofactores

Se estudió la posible presencia de cofactores dializables. Durante la purificación de la enzima, se había observado que la diálisis del sobrenadante obtenido luego de la segunda etapa de la purificación contra agua destilada durante 24 y 48 horas a 4°C, producía un abundante precipitado floco-



24 Efecto de la temperatura sobre la actividad de la A-D Las incubaciones se hicieron segun se indica en el texto, variando en cada caso la temperatura de incubación



25 Gráfico de Arrhenius. Se calculó con los datos de la 24

Se centrifugó entonces la mezcla y se determinó actividad en el sobrenadante y en el precipitado previamente suspendido en buffer fosfato 0,067 M, pH 6,3 en el que fué imposible lograr una completa disolución. Como resultado, observó que luego de 24 horas de diálisis, la actividad se hallaba distribuida casi por igual entre el sobrenadante y el precipitado; después de las 48 horas de diálisis más del 90% del total de la actividad se encontró en el precipitado. La actividad específica del mismo, aumentó ligeramente por este proceso, pero el rendimiento de esta etapa fué muy bajo y no justificó el uso de un tratamiento tan prolongado en el método de purificación rutinario de la enzima.

Por otro lado, la diálisis entre buffer fosfato a varios pHs, comprendidos entre 5,4 y 7,0 a distintas molaridades, que fueron desde 0,42 mM a 6,7 mM y durante distintos tiempos (entre 24 y 48 horas) produjo resultados bastante interesantes. En efecto, luego de una diálisis de 48 horas se observó que a medida que se aumentaba el pH y la molaridad del buffer, se producía una disminución en la precipitación de la proteína y en la actividad específica de la misma. Por otra parte, no se encontró actividad de ALA-D en el dializado y éste fué incapaz de aumentar la actividad, tanto del precipitado anterior, como de una preparación activa.

Con el objeto de observar la presencia de algún cofactor fuertemente unido a la enzima, 10 ml de la fracción proveniente de la segunda etapa de purificación, se calentaron con un baño a 100°C durante 5 minutos, al cabo de los cuales se enfrió en baño de hielo y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos. Se incubó 1 ml de este sobrenadante (sobrenadante 11.750 x g calentado) durante 1 hora en las condiciones descriptas en Métodos, y como se observa en la Tabla IX perdió totalmente la actividad de ALA-D. Sin embargo, en otro sistema que contenía 0.3 ml de la solución enzimática proveniente del gel de fosfatos y 0.7 ml de este sobrenadante calentado, la actividad incrementó en alrededor de 20% respecto a la misma fracción sin adición. Esto sugeriría la presencia de un cofactor termoestable, fuertemente unido a la enzima y que actuaría como estimulante de la actividad de ALA-D, aunque aún no se posee información alguna acerca de su naturaleza.

Tabla IX. Propiedades del sobrenadante de 11.750 x g calentado a 100°C

Se utilizaron 15 mg de la fracción sobrenadante de 11.750 x g, 1 mg de la fracción desadsorbida de gel de $PO_4^{=}$. Las fracciones se incubaron durante 1 hora según se detalla en el texto y en Métodos.

Fracción	Actividad μ moles/h
Sobrenadante 11.750 x g	0,46
Sobrenadante 11.750 x g calentado	0
Desadsorbido de gel de $PO_4^{=}$	1,05
Desadsorbido de gel de $PO_4^{=}$ + sobrenadante gel calentado	1,26

Precisamente tratando de dilucidar la naturaleza de este factor y debido a que la enzima, aún en las etapas de mayor purificación, presentó un leve color amarillo, se determinó el espectro de absorción de la misma. Para esto a una muestra de ALA-D proveniente de la etapa 7 de la purificación, de 0,9 mg/ml de proteínas en buffer fosfato, 0,067 M, pH 6,8, se le determinó su espectro de absorción entre los 230 y 600 nm. Como puede verse en la Figura 26 éste presentó dos máximos, uno a 273 nm, característico de las proteínas y un segundo máximo a 406 nm, mucho más pequeño. Esto se repitió con enzima proveniente de la misma etapa de purificación, pero con una concentración proteica mayor, 3,5 mg/ml. Nuevamente se obtuvo un gráfico similar al anterior, donde el pico a 406 nm se hizo más notorio. Este comportamiento podría atribuirse a la presencia de un grupo hémico unido a la proteína ya que éste presentó absorción característica alrededor de los 400 nm, pero no se logró obtener evidencias confirmatorias de esta suposición.

La enzima proveniente de la etapa 4 de purificación presentó además

una fluorescencia amarilla-verdosa al ser irradiada con luz ultravioleta, que en parte desapareció cuando se pasó la muestra por la columna de Sephadex G-100. Esto sugeriría, que el segundo pico podría atribuirse a un grupo flavínico más que a uno hémico, aunque en realidad tampoco se pudo confirmar este resultado.

Efecto de los agentes quelantes

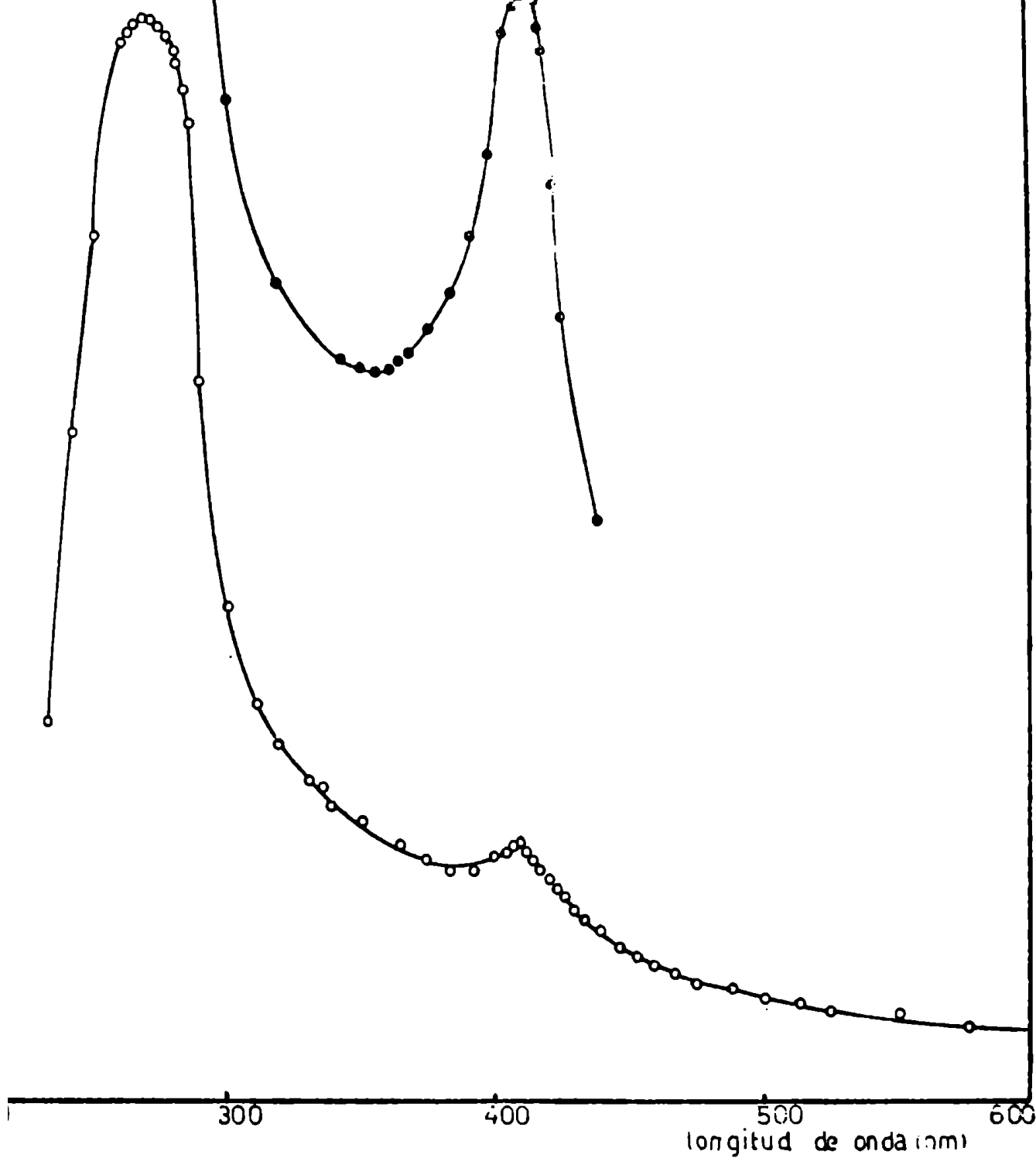
Se estudió también la posible existencia de algún metal unido a la enzima, necesario para su actividad. En la Tabla X se vé el efecto de algunos reactivos. Se observa que en casi todos ellos presentan sensible inhibición a la actividad enzimática, pero es de notar que el EDTA produjo inhibición total; por ello, se hizo un estudio más detallado del efecto de este último reactivo en función de la concentración.

Tabla X. Efecto de los agentes quelantes

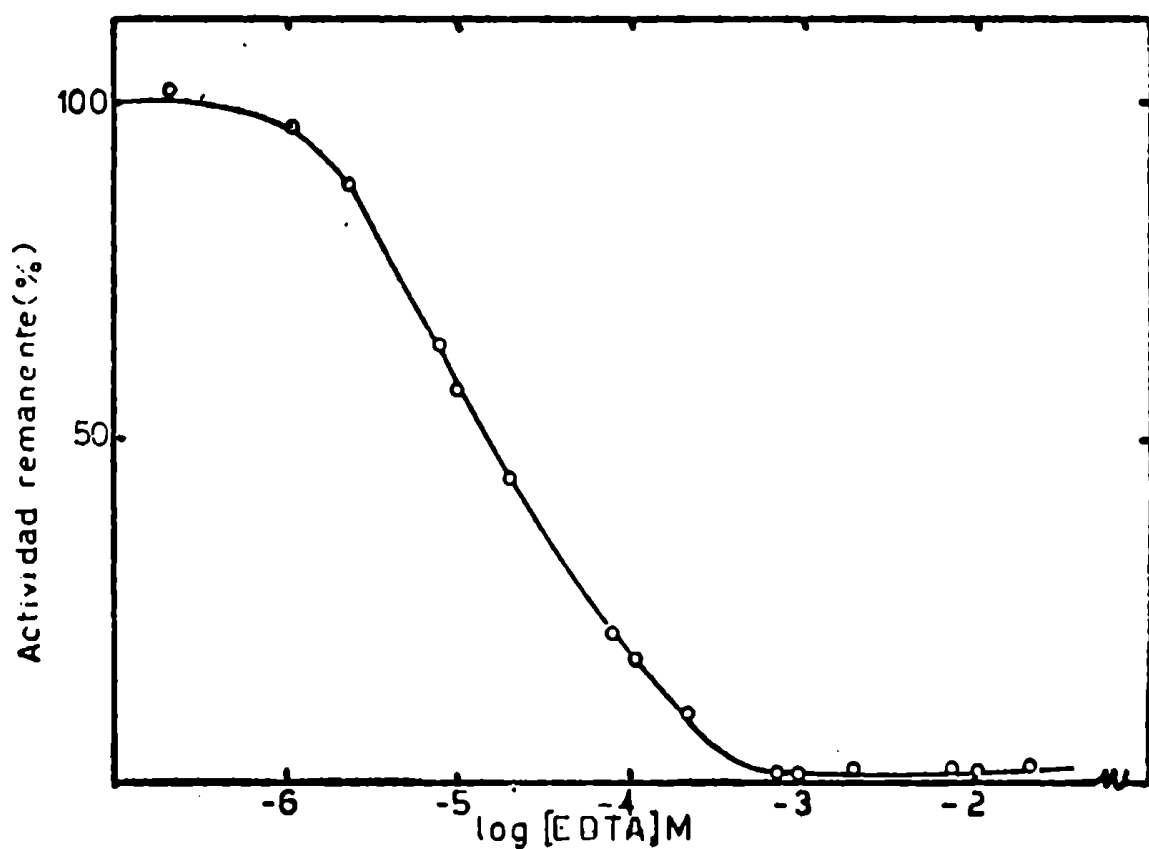
Se trabajó con enzima proveniente de la etapa 7. Las incubaciones se hicieron según se indicó en Métodos; los reactivos se agregaron a pH 6,8.

Adición	Concentración (mM)	Actividad (%)
Control		100
8-HO quinolina	5	38
O-fenantrolina	5	45
α - α dipiridilo	1	11
EDTA	5	0
N_3Na	5	94

En la Fig. 27 se observa que, a concentraciones de 10^{-6} M, el EDTA no produce inhibición pero entre 10^{-6} y 10^{-4} M la actividad disminuye en forma lineal siendo nula a concentraciones superiores a 5×10^{-3} M.



Espectro de absorción de la 'ALA-D' se determinó sobre enzima de la etapa 7 - 0,09 mg/ml; • 3,5 mg/ml según se indica en texto



Variación de la actividad de la 'ALA-D' con la concentración [A]. Se trabajó con enzima de la etapa 7 La actividad se deter-

Efecto de reactivos de grupos -SH

Por analogía con ALA-D aisladas de distintas fuentes, era de esperar que el comportamiento de esta enzima revelara una naturaleza sulfhidrónica de manera que se estudió la acción de varios compuestos protectores de grupos -SH.

En la Tabla XI se muestran una serie de reactivos que, a las concentraciones señaladas, se preincubaron durante una hora con 0.1 mg de la ALA-D proveniente de la etapa 8 de la purificación, en las condiciones indicadas en Métodos, incubándose luego durante una hora. Se puede observar que la actividad enzimática en esta etapa de la purificación fue totalmente dependiente de la presencia de protectores de grupos -SH. La actividad óptima se obtuvo con cisteína 10^{-3} M y no hubo considerable variación hasta una concentración 10^{-2} M, resultando a 10^{-1} M una actividad de sólo aproximadamente un 10% respecto a la actividad con cisteína 10^{-3} M. Por debajo de 10^{-4} M el efecto de la cisteína es casi nulo.

Se observó que de los reactivos estudiados, el más efectivo fue la cisteína, aunque todos presentaron la máxima actividad con preincubaciones a concentraciones de 10^{-3} M.

Acción de inhibidores de grupos -SH

Con enzima proveniente de la etapa 8 de purificación, se ensayó el efecto de algunos inhibidores de grupos sulfhidrilos. Para ello la enzima se activó previamente con cisteína como se indicó en Métodos durante 1 hora, y luego se agregó el inhibidor indicado, con el ALA, desde la cabeza del tubo de Thunberg, y se incubó durante 1 hora. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XII. Todos los reactivos estudiados produjeron marcada inhibición de la actividad, aunque debido a la presencia de cisteína usada para poder medir la actividad enzimática surge la duda si estos reactivos reaccionaron en realidad con los grupos -SH de la enzima o sólo lo hicieron con la cisteína, disminuyendo así la concentración de la misma en el medio de incubación y éste es el factor que produce la disminución de la actividad de la enzima.

Tabla XI. Activación de la ALA-D

Se trabajó con enzima, proveniente de la etapa 8. Las incubaciones se hicieron según se explica en el texto. Los reactivos se usaron previamente neutralizados a pH 6,8.

Añición	Concentración (M)	PBG formado (nm moles/h)
Control	-	0
Cisteína	10^{-1}	60
	5×10^{-2}	210
	5×10^{-3}	542
	10^{-3}	580
	5×10^{-4}	310
	10^{-4}	100
	5×10^{-5}	15
	10^{-5}	-
	10^{-6}	-
	DTT	10^{-3}
10^{-4}		125
Glutation	10^{-2}	325
	1×10^{-3}	530
	1×10^{-4}	131
Tioglicolato	10^{-2}	325
	10^{-3}	550
	10^{-4}	82

Tabla XII. Efecto de inhibidores de grupos -SH sobre la ALA-D purificada

Se usó enzima purificada. 31^o veces. Las incubaciones se hicieron como se indica en el texto.

Adición (10 ⁻³ M)	Actividad (%)
Control	100
PCMB	27
HEMI	29
Iodacetamida	27
MMB	39
Iodosobenzoato	28

Con el objeto de corroborar, que realmente la inhibición se producía por reacción de estos reactivos sobre los grupos -SH de la enzima, se procedió a estudiar el efecto de varios inhibidores de grupos -SH. Para esta experiencia se utilizó enzima proveniente de la etapa 4 de la purificación, es decir, una fracción considerablemente activa aún en ausencia de protectores de grupos -SH, como para poder observar variaciones de la misma. En este caso, los reactivos, a las concentraciones indicadas, se preincubaron en vacío durante 30 minutos en las condiciones descritas en Métodos, en ausencia de cisteína. Transcurridos los 30 minutos se dejó caer de la cabeza del tubo de Thunberg el ALA y se preincubó durante 1 hora.

En la Tabla XIII se muestran los resultados obtenidos. Los reactivos se agruparon de acuerdo a su acción específica; los del grupo A representan los agentes alquilantes y formadores de mercaptidas con los grupos SH, se observa que todos presentan inhibición casi total de la actividad de la ALA-D, siendo más marcada la del PCMB.

Tabla XIII. Acción de inhibidores de grupos SH sobre la ALA-D

Se utilizó 2 mg de ALA-D de la etapa 4. Las incubaciones se hicieron según se indica en el texto. Los resultados se expresan en porcentaje de un blanco sin adición. Los reactivos se llevaron a pH 6,2 antes de usarlos.

Grupo	Adición	Concentración (mM)	Actividad remanente (%)
A	PCMB *	1	2
	NEMI	1	12
	Iodoacetamida	1	15
B	DTNB	1	3
	Glutation oxidado	3	17
	Cistina	10	28
	Iodosobenzoato	1	5
C	Arsenito	1	95
		10	63
D	Ag ⁺	1	0
	Hg ⁺⁺	1	0
	Pb ⁺⁺	1	1
E	CN Na	10	85
		1	92
	SO ₃ Na ₂	10	70
		1	95
	Tiourea	1	102

Los reactivos agrupados en B, actúan como oxidantes de grupos SH, todos ellos inhibieron la enzima, siendo más marcado el efecto del DTNB y del Iodo sobenzoato.

El arsenito de sodio, a concentraciones de 10^{-3} M, actúa sobre estructuras con grupos -SH vecinas: se observa que a dicha concentración, no tuvo acción sobre la enzima, sólo a 10^{-2} M se apreció considerable inhibición, pero en este caso se podría pensar que ha actuado sobre -SH aislados.

El grupo D reúne una serie de iones metálicos cuyos sulfuros presentan productos de solubilidad muy bajos, se vé que todos ellos inhibieron totalmente la enzima.

En el último grupo se reúnen una serie de reactivos que actúan sobre puentes -S-S-, se observa que si bien la tiourea no tuvo efecto sobre la actividad enzimática, tanto el CNNa como el SO_3Na_2 a 10^{-2} M, inhibieron significativamente la enzima, no descartándose entonces la posible existencia de puentes -S-S- en el sitio activo.

En algunos casos se estudió la reversión de la inhibición, producida por algunos de estos productos. Aquí, el reactivo tióxico (cisteína), se colocó en la cabeza del tubo de Thunberg junto con el ALA y luego de los 30 minutos de preincubación con el inhibidor, se dejaron caer y se incubó durante 1 hora. Se utilizó enzima 18 veces purificada, los inhibidores a una concentración de 10^{-3} M, y cisteína 10^{-3} M.

En la Tabla XIV se señalan los resultados obtenidos. Se vé que la cisteína aunque no logra revertir totalmente la inhibición producida por estos reactivos, su efecto es más marcado respecto al PCMB que a los agentes alquilantes.

Tabla XIV. Efecto de la cisteína, sobre la inhibición de la ALA-D, producida por inhibidores de grupos SH.

Las incubaciones se hicieron como se indica en el texto; los reactivos se usaron a pH 6,8.

Reactivo ($10^{-3}M$)	Cisteína ($10^{-3}M$)	Actividad (%)
-	-	100
PCMB	-	2
PCMB	+	85
NEMH	-	12
NEMH	+	53
Iodoacetamida	-	15
Iodoacetamida	+	61

Número y reactividad de los grupos -SH de la ALA-D

La posibilidad de obtener ALA-D altamente purificada, permitió efectuar un estudio sobre el rol de los grupos sulfhidrilos en la actividad de la enzima. Por otra parte, se hizo un estudio comparativo con la ALA-D aislada y purificada de callos de semilla de soya, según el método de Tigier y col. (1970), que contribuyó a obtener más información sobre la naturaleza de los grupos esenciales requeridos para la actividad catalítica y aquellos requeridos para la integridad conformacional.

Se trató de efectuar un análisis de los grupos sulfhidrilos normalmente activos de la ALA-D de hígado vacuno y de callos de semilla de soya, determinando su número y su velocidad de reacción con DTNB, bajo ciertas condiciones standard en presencia y ausencia de agentes disociantes, por medio de la formación de disulfuros con DTNB y siguiendo su actividad enzimática.

Para este estudio, se usó DTNB pues ofrece la ventaja de que reacciona específicamente con grupos SH y la reacción puede ser fácilmente medida.

En las Figuras 28 y 29, se puede ver el curso de la reacción de la ALA-D de hígado vacuno y de semilla de soya respectivamente, con DTNB en presencia y ausencia de Urea 8 M.

Para la ALA -D de hígado vacuno (Figura 28), se encontró que a los 20-30 minutos reaccionó un solo grupo sulfhidrilo por mol de enzima y durante el tiempo indicado no se reveló ningún otro grupo SH titulable ya que la absorbancia de la mezcla de reacción permaneció constante durante 2 horas; luego disminuyó ligeramente hasta cerca las 20 horas en que comenzó a aumentar de nuevo, debido posiblemente a precipitación de la proteína, apareciendo cierta turbidez en la solución. En presencia de Urea 8 M, la reacción fue más rápida en 10-15 minutos, reaccionaron alrededor de 3 grupos sulfhidrilos y a los 30 minutos la absorbancia empezó a disminuir posiblemente debido a una autooxidación del ión tionitrofenilato.

Se observó además que si a un sistema de ALA-D y DTNB en el que la reacción había alcanzado el plateau (20-30 minutos), se añadía urea 8 M, inmediatamente se producía un aumento en la absorbancia equivalente a 2 grupos SH, es decir, también se demostró la titulación de 3 grupos SH. Se vió entonces, que con Urea 8 M, se pudieron titular grupos sulfhidrilos adicionales, normalmente no reactivos.

La velocidad de la reacción de los grupos SH de la ALA-D de callos de semilla de soya, con DTNB puede verse en la Figura 29. En ausencia de urea, también en este caso, sólo un grupo SH reaccionó rápidamente (10 minutos), aunque aquí siguió un período en el que la absorbancia aumentó luego lentamente durante el cual reaccionó otro grupo más y prácticamente después de las 2-3 horas se mantuvo constante permaneciendo en el mismo valor durante 4-5 horas. Por adición de Urea 8 M, la reacción tuvo lugar rápidamente como en el caso anterior, pero en este caso reaccionaron 4 grupos -SH en 5-20 minutos.

En presencia de un gran exceso de DTNB, la reacción para la ALA-D de hígado vacuno resultó ser de pseudo primer orden (Figura 30), con una constante $K = 0,055/\text{min}$ para el único grupo SH reactivo. El comportamiento de la ALA-D de callos de semilla de soya fue distinto; la curva de pseudo primer

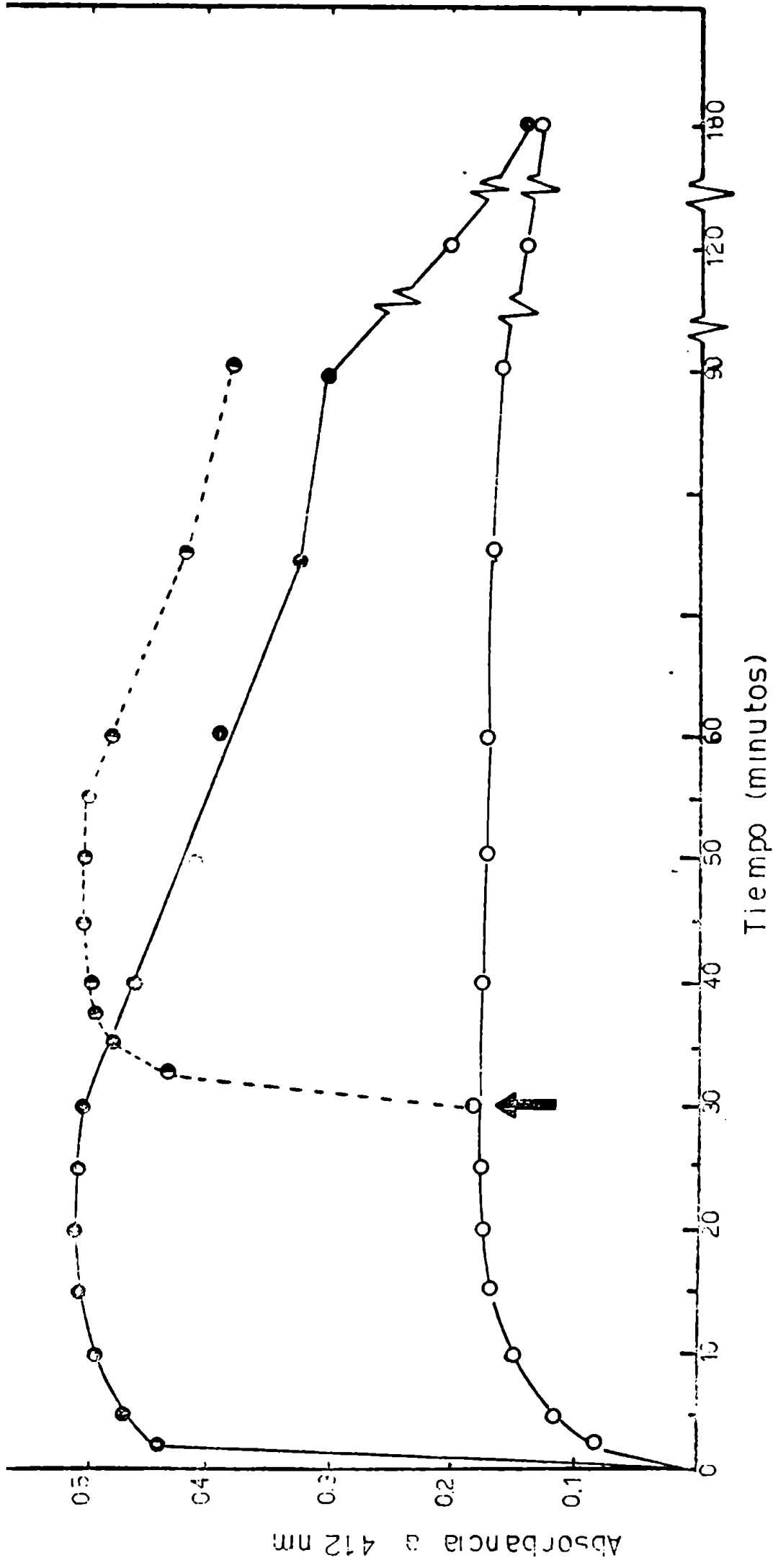


Fig 28 Velocidad de reacción de los grupos sulfhidricos de ALA-D de hígado vacuno con DTNB en presencia y ausencia de Urea 8M. Se trabajó con enzima de la etapa 8. Se empleó la técnica descripta en Métodos. Concentraciones iniciales DTNB: 3×10^6 , proteína 3×10^{-3} con urea, \circ con urea 8M, \bullet con ure 8M pero al tiempo indicado por la flecha

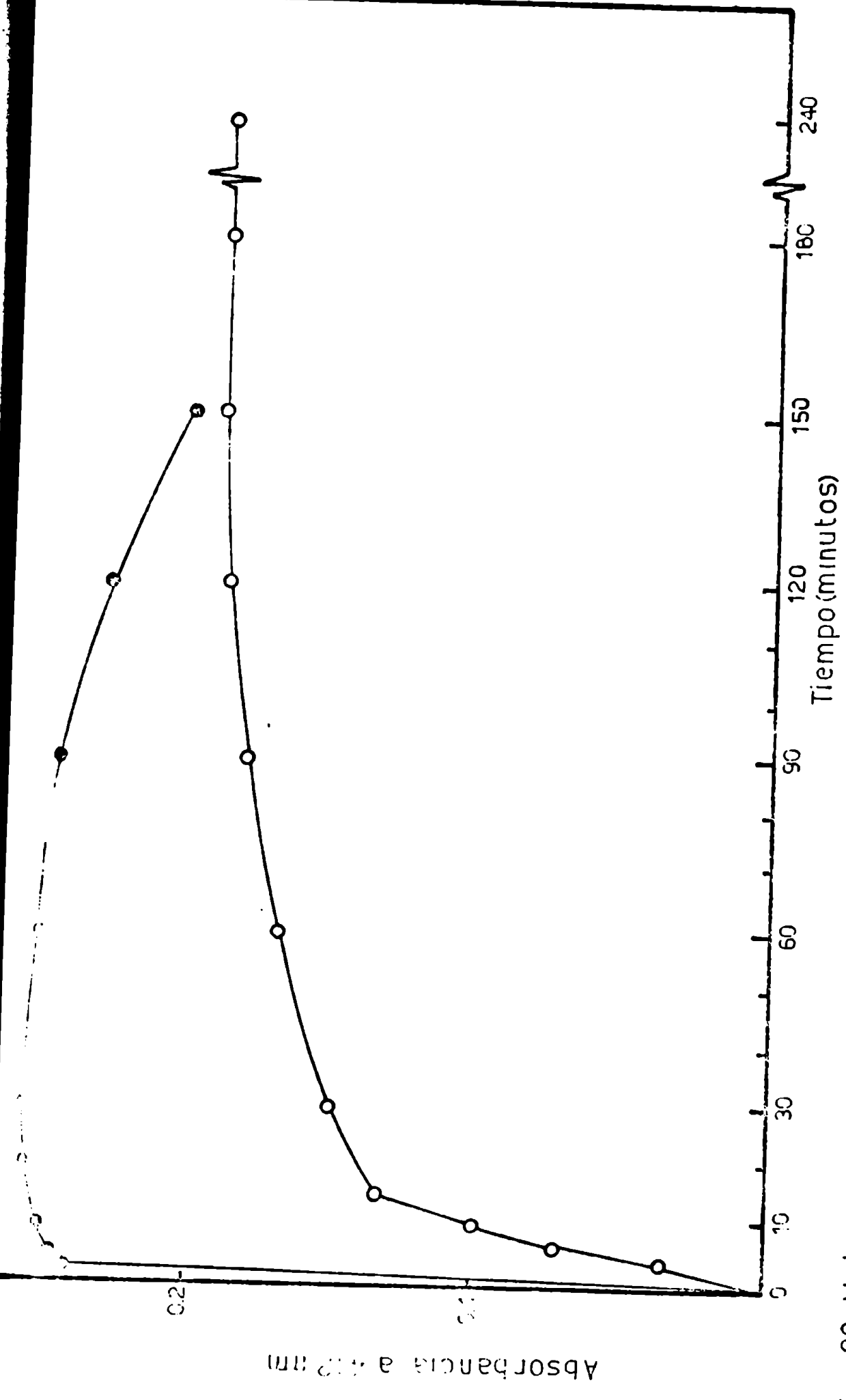


Fig. 29 Velocidad de reacción de los grupos sulfhidricos de la ALA-D de callo de semilla de soya con DTNB en presencia y ausencia de urea 8M. Se empleó la técnica descrita en M. J. Jones. Concentraciones iniciales: DNTB $8.7 \times 10^{-4} M$, proteína 8.7×10^{-2} o-osir urea • con urea 8M

orden fué bifásica, (Figura 31), indicando una diferencia en la reactividad del segundo grupo SH; las constantes de pseudo primer orden fueron $K = 0,166$ y $0,047/\text{min}$ para el primer y segundo grupo tiol respectivamente. Se observó además que para esta enzima el valor de K obtenido en presencia de urea 8 M, fué el mismo que el obtenido, para el primer grupo SH reactivo.

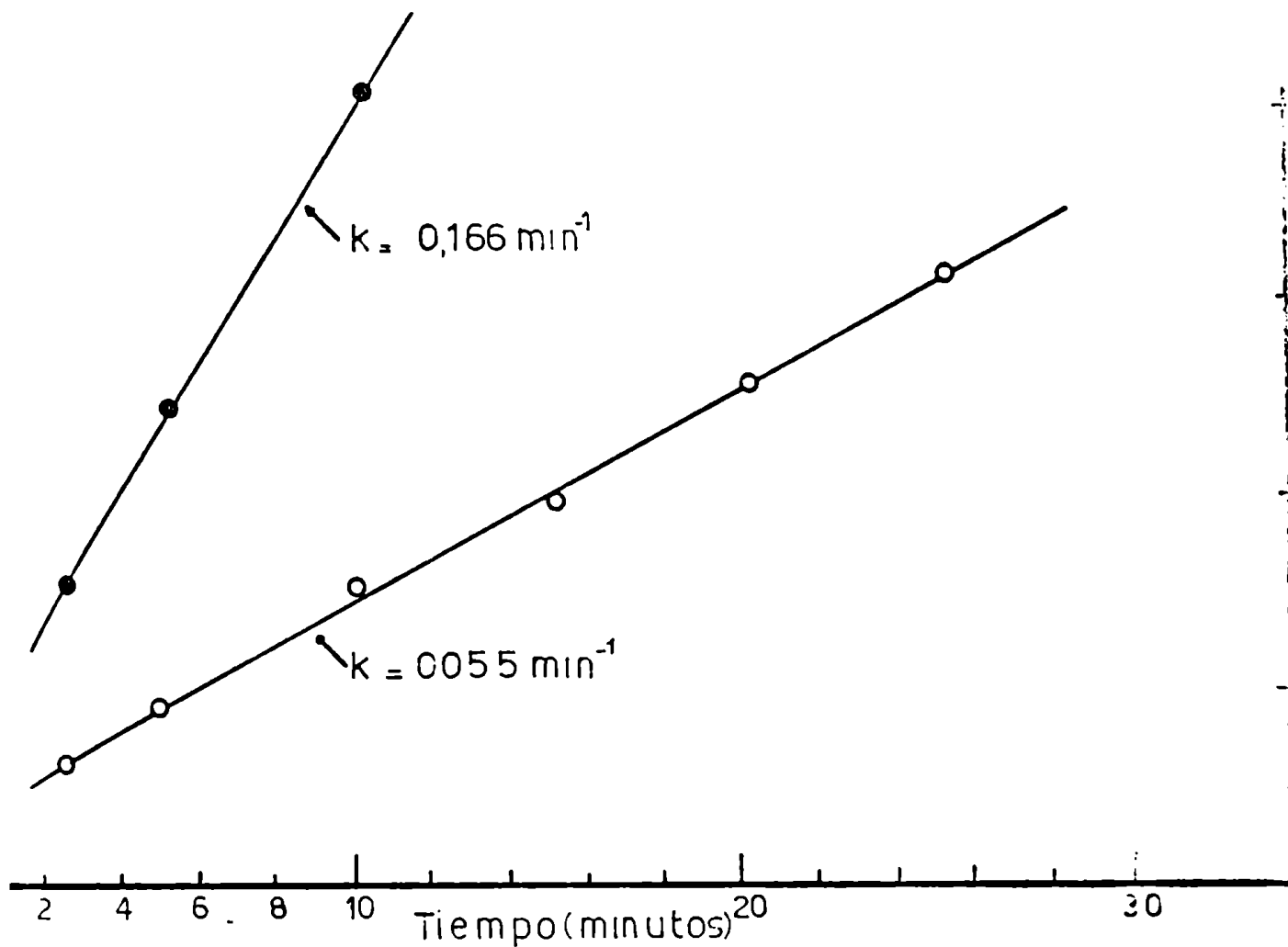
De acuerdo a su reactividad, fué posible dividir entonces a los grupos de la ALA-D de callos de semilla de soya en 3 categorías. Se los designó SH_I , SH_{II} y SH_{III} , siendo el orden de reactividad para estos grupos el siguiente: $\text{SH}_I > \text{SH}_{II} \gg \text{SH}_{III}$.

En el caso de la ALA-D de hígado de vaca, la velocidad de reacción para el primer grupo SH, fué aparentemente menor que el de la enzima de callos de semilla de soya, no obstante se designó SH_I a este grupo altamente reactivo y SH_{III} a los dos grupos tioles restantes que sólo se expusieron en Urea 8 M.

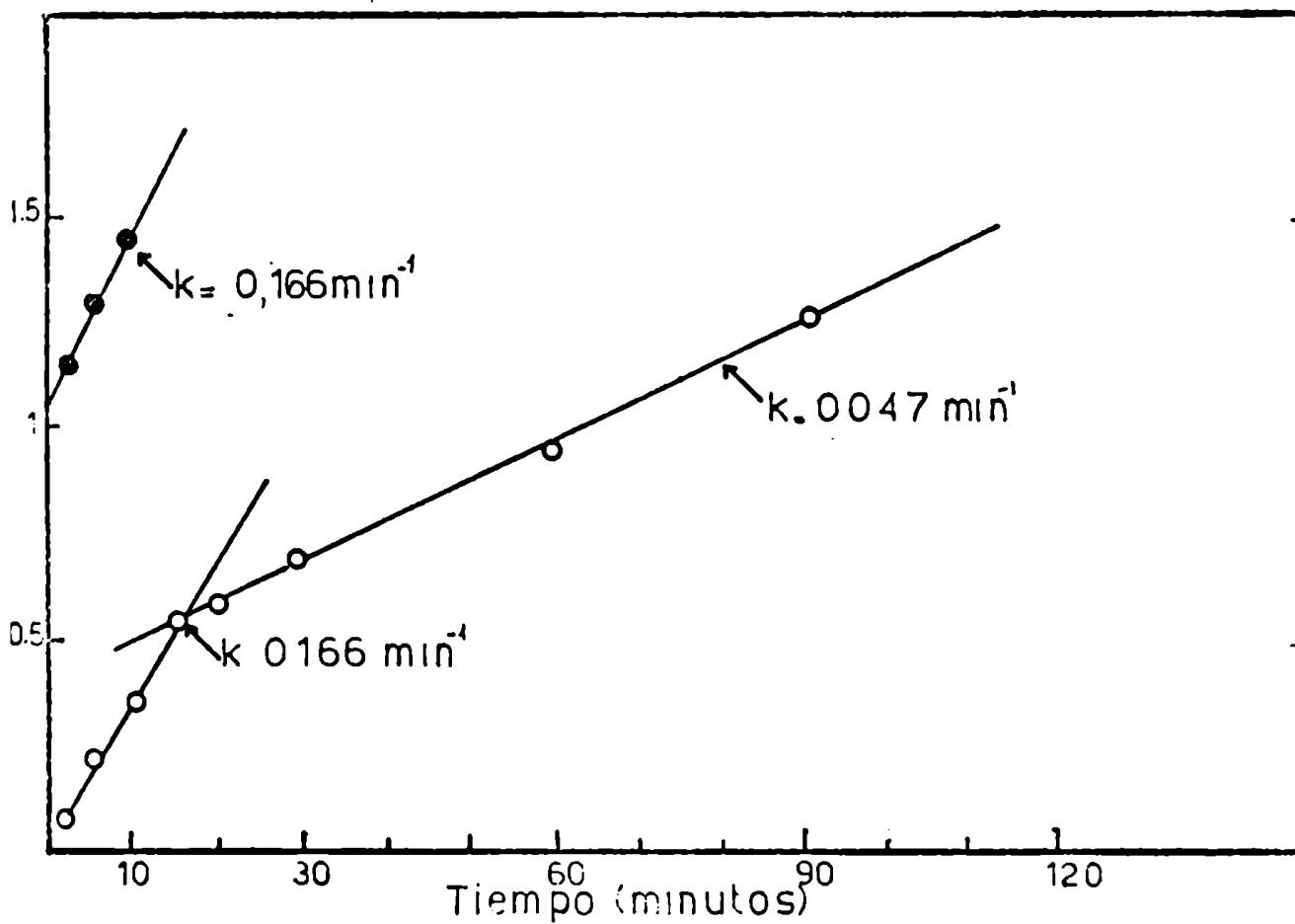
Resumiendo, se puede decir que hay un grupo SH_I por mol de enzima en ambos casos y un grupo SH_{II} por mol de ALA-D de callos de semilla de soya, pero ninguno de este tipo en la ALA-D de hígado vacuno, encontrándose en cambio un total de 2 grupos SH_{III} en las 2 ALA-D estudiadas, los cuales se hallan normalmente enmascarados cuando la enzima está en su estado natural.

Se estudió el efecto del buffer sobre la reactividad de los grupos tioles frente al DTNB, hallándose que es independiente frente al tipo de buffer empleado cuando la reacción tiene lugar en buffer TRIS-HCl o fosfatos.

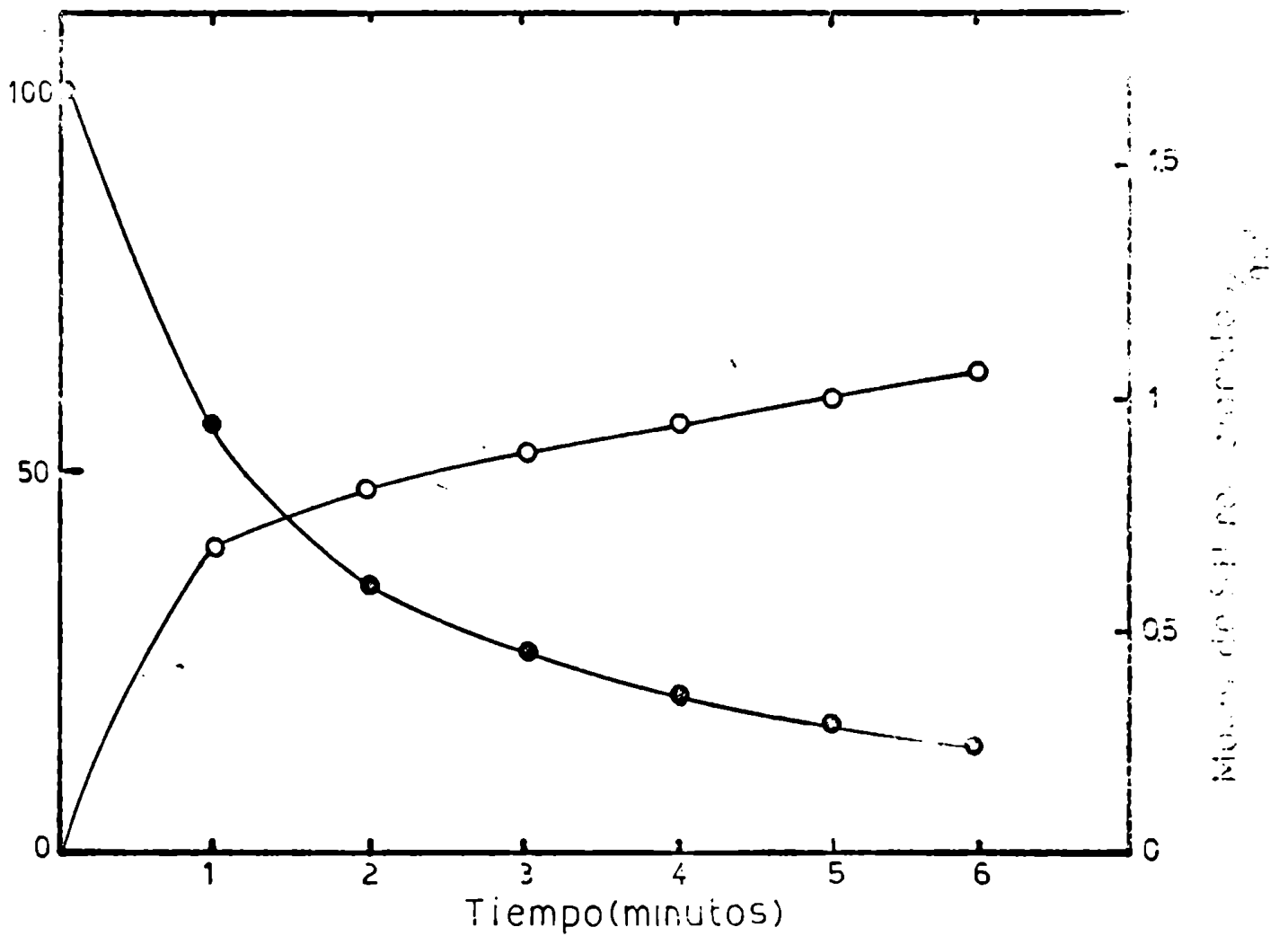
Se estudió además el efecto del DTNB sobre la actividad de la ALA-D de callos de soya. Los resultados se muestran en la Figura 32, para ello soluciones conteniendo "ALA-D" de soya purificada 35 veces se incubaron en cubetas a 25° aproximadamente 5 minutos, luego se agregó el DTNB y se continuaron las incubaciones por los tiempos señalados, al cabo de los cuales se terminaron retirando 0,1 ml de muestra, en la cual se ensayó actividad en la forma usual ya indicada.



Cinética de la reacción entre los grupos SH de la ALA-Dgado vacuno y DTNB. Los datos aquí representados provienen de la Fig. 28



Cinética de la reacción entre los grupos SH de la ALA-D de semilla de soya. Los datos aquí representados provienen de la Fig. 29



32 Inactivación de la ALA-D de callos de semilla de soya. NB Las determinaciones se hicieron según se indica en el texto. Concentraciones iniciales: DTNB, $6,6 \times 10^{-4}$, Proteína $2,14 \times 10^{-5}$ M. Actividad de la enzima, \bullet — \bullet número de SH que reaccionaron por gramo de enzima.

Según se aprecia en la Figura 32, la actividad enzimática disminuyó rápidamente con el tiempo. La velocidad de disminución de grupos SH_I libres fue aproximadamente la misma que la velocidad de inactivación. Cuando el DTNB había reaccionado con 1 grupo SH_I por mol de ALA-D, ésta se inactivó aproximadamente 80%, dicha inactivación, sin embargo, se revirtió por agregado de CySH o GSH.

De esta figura también se deduce que es posible titular con DTNB este grupo SH_I más expuesto, lo cual inactiva casi totalmente la enzima, antes de que se expongan otros grupos menos reactivos como los SH_{II} , o los SH_{III} , de donde este grupo SH_I , en la ALA-D de callos de soya, parece ~~ser~~ necesario tanto para la actividad catalítica como para la integridad de la molécula proteica.

En el caso de la ALA-D de hígado vacuno, no fue posible hacer un estudio comparativo del efecto del DTNB sobre la actividad enzimática, pues esta enzima altamente purificada como se vió, es completamente inactiva en ausencia de reactivos para grupos tioles.

Como se demostró anteriormente, la titulación directa de los grupos tioles de esta enzima, indicó que sólo un grupo SH_I se encuentra expuesto. Para confirmar estos resultados, se titularon los grupos tioles según una modificación del método aquí utilizado, propuesto por Butterworth y col. (1967). Los resultados obtenidos, señalaron una relación molar de SH_I : ALA-D de 1:1.

Por otra parte, también se encontró solamente un grupo -SH por mol de ALA-D, de hígado vacuno, cuando ésta se preincubó con cisteína en las condiciones óptimas para activarla, antes de titular con DTNB y se procedió luego a eliminar el agente reductor, el exceso de DTNB y el anión tionitrofenilato liberado, por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25, como se indicó en Métodos (Butterworth y col., 1967), procediéndose luego a romper el disulfuro mixto del TNB-ALA-D con DTT, determinándose el anión coloreado liberado. Cuando esta técnica se repitió en presencia de urea 8 M, se volvieron a titular 3-SH.

Efecto de cationes y aniones sobre la ALA-D

Se investigó la acción ejercida sobre la ALA-D por varios aniones y cationes en un rango muy amplio de concentraciones.

En este caso el estudio se efectuó en las condiciones indicadas en Métodos, salvo que se reemplazó el buffer de fosfato 0,067 M, pH 6,8, por el de Tris-ClH, 0,05 M, pH 6,8,, que aunque como se vé en la Figura 23, la actividad representa un 70% de la obtenida en buffer de fosfato, se usó para poder observar mejor el efecto de los aditivos, descontando la presencia de los cationes Na o K.

En la Tabla XV se puede ver que los iones K^+ , cualquiera sea el anión empleado, prácticamente no afectaron la actividad de la enzima, por el contrario a las concentraciones más altas ensayadas, lo inhibieron y de todas las sales probadas el acetato produjo mayor inactivación.

Tabla XI. Efecto de los iones K^+ sobre la ALA-D

Se usó enzima de la etapa 8. Los incubados se hicieron de acuerdo a la técnica descrita en Métodos, sólo que se reemplazó el buffer PO_4^{3-} por el de Tris-ClH según se explica en el texto.

Adición	Concentración (M)	Actividad (%)
Control		100
ClK	0,05	75
	0,03	92
	0,01	104
	0,001	90
	0,0001	90
$SO_4^{2-} K$	0,05	80
	0,03	87
	0,01	91
	0,001	93
	0,0001	107
CH_3COOK	0,05	47
	0,03	74
	0,01	85
	0,001	93
	0,0001	98

En la Tabla XVI se muestra el efecto de los iones Mg^{++} ; se encontró que su acción es muy similar a la de los iones K^+ , no hubo activación a ninguna de las concentraciones ensayadas y los iones acetato nuevamente produjeron inhibición. Tanto en este caso como en el anterior, así como para otras sales no señaladas en estas tablas, el anión acetato produjo inhibición enzimática, el $SO_4^{=}$ en menor proporción y el Cl^- , no modificaron la actividad, en tanto que otros cationes como Li^+ , NH_4^+ , Mn^{++} no tuvieron mayor efecto: el Na^+ como veremos luego es inhibidor.

Tabla XVI. Efecto de los iones Mg^{++} sobre la ALA-D

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Tabla XV.

Adiciones	Concentración (M)	Actividad (%)
Control		100
Cl_2Mg	0,05	76
	0,03	86
	0,01	102
	0,001	100
	0,0001	102
SO_4Mg	0,05	93
	0,03	83
	0,01	96
	0,001	95
	0,0001	96
$(CH_3COO)_2Mg$	0,05	35
	0,03	46
	0,01	75
	0,001	95
	0,0001	107

Sin embargo, se muestra en la Tabla XVII que los iones Zn^{++} en mayor grado, aunque también los iones Fe^{++} , a concentraciones de 10^{-3} y $10^{-4}M$ activaron significativamente la ALA-D, cualquiera sea el anión, la activación fué mayor a $10^{-3}M$ y nuevamente en forma comparativa, el acetato y sulfato tenían menor efecto, debido a su acción opuesta.

Tabla XVII. Efecto de los iones Zn^{++} y Fe^{++} sobre la ALA-D.

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Tabla XV.

Adiciones	Concentración (M)	Actividad (%)
Control		100
$SO_4 Zn$	0,05	0
	0,03	0
	0,01	0
	0,001	136
	0,0001	119
$Cl_2 Zn$	0,05	0
	0,03	0
	0,01	0
	0,001	171
	0,0001	129
$(CH_3COO)_2 Zn$	0,05	0
	0,03	0
	0,01	0
	0,001	157
	0,0001	142
$SO_4 Fe$	0,05	0
	0,03	0
	0,01	35
	0,001	99
	0,0001	111

El Fe^{++} que sólo se pudo probar como sulfato, a 10^{-4} M presentó un efecto más o menos del mismo grado que el correspondiente a la sal de Zn^{++} ; concentraciones más altas de cualquiera de estos iones aparecen inhibitorias, debido al consumo de la cisteína presente en el medio de incubación y necesaria para activar la enzima.

Los iones Na^+ también disminuyen la actividad en tanto que Ca^{++} , Co^{++} y Cd^{++} 10^{-3} M, o menos no la afectaron, pero Pb^{++} 10^{-3} o más alta la inactivan totalmente, resultado por demás esperado de acuerdo a la naturaleza sulfidrica de la enzima.

Estos resultados se muestran en la Tabla X'III.

Tabla X'III. Efecto de varios cationes sobre la ALA-D.

Las condiciones experimentales son idénticas a las de la Tabla X.

Adiciones	Concentración (M)	Actividad (%)
Control		100
ClNa	0,01	45
	0,05	61
	0,1	75
Cl_2Ca	0,001	101
Cl_2Co	0,001	106
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$	0,001	108
$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$	0,001	16

Dependencia de la concentración de sustrato

Se estudió la variación de la velocidad de reacción de la ALA-D, en función de la concentración de ALA-. Se trabajó con enzima proveniente de

la etapa 3 de la purificación, y las incubaciones se hicieron según se indica en Métodos, sólo que en cada caso se usó una cantidad de sustrato, ALA distinta que varió entre 10^{-5} y 10^{-3} M. El PBG formado, se midió a varios tiempos y luego por extrapolación se calcularon las Velocidades a tiempo cero. En la figura 33 se representaron los Valores obtenidos : puede observarse que la ALA-D de hígado Vacuno presentó un comportamiento cinético normal, con una curva hiperbólica para las determinaciones realizadas en buffer de fosfato, 0,067 M, pH 6,8 y a 38°C. De acuerdo al método gráfico de Lineweaver-Burk (1934), representando las inversas de las Velocidades de formación de PBG en función de las inversas de la concentración de sustrato, se calculó para esta enzima un $K_m = 1,5 \times 10^{-4}$ M, y una $V_{m\acute{a}x.} = 6,25$ μ moles de PBG/mg h (Figura 34).

Con el objeto de estudiar el efecto de los iones que actuaron como activantes o inhibidores de la enzima, se estudió también el comportamiento de la ALA-D de hígado Vacuno en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 6,8. Se observó, Figura 35, que la gráfica clásica de Velocidad de reacción en función de concentración de sustrato, exhibió una trayectoria sigmoidea que no se modificó por el agregado de activador o inhibidor, los cuales simplemente actuaron como tales, describiendo el mismo tipo de gráfica.

Se efectuaron las determinaciones de los n de Hill (1913) adaptadas para el caso de una enzima, con la consideración que la Velocidad de la reacción enzimática es en este caso proporcional a los sitios de unión al sustrato con interacción.

Gráficamente se obtiene una recta cuya pendiente expresa el número de sitios de unión del sustrato a la enzima y da además una idea de la interacción entre ellos.

La intersección de la misma con el eje de las abscisas da el valor $(S_{0,5})$ concentración de sustrato que produce la mitad de la velocidad máxima de reacción comparable al K_m de una enzima Michaeliana. Se observó, Figura 36, que en buffer Tris-ClH 0,05 M, pH 6,8 la enzima presentó un $n = 2,2$ con un $(S_{0,5})$ 3×10^{-4} M y una $V_{m\acute{a}x.} = 4$ μ moles PBG/mgx h.

En presencia de $Cl_2Zn \cdot 10^{-3}$ M, se vé que si bien la velocidad máxima varió obteniéndose una $V_{m\acute{a}x.} = 6$ μ moles PBG/mgx h, se mantuvo constante el

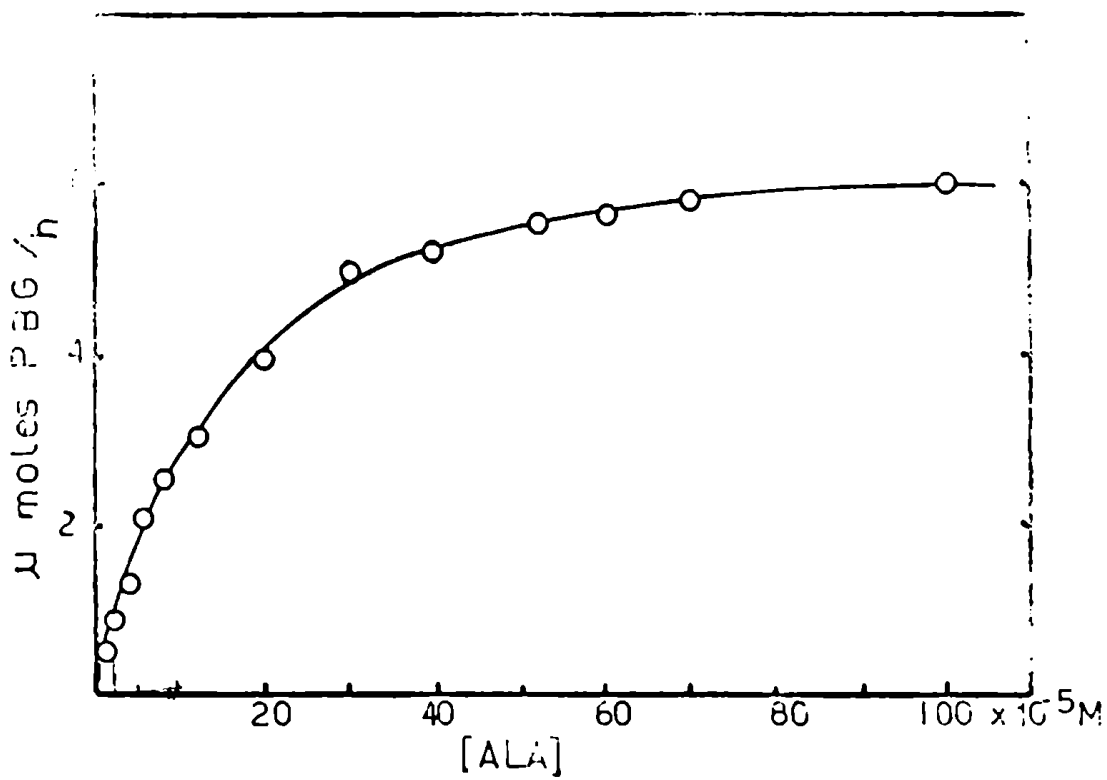


Fig.33 Efecto de la concentración de sustrato Se usó 0.5 mg de la enzima de la etapa 8, las condiciones de incubación son las señaladas en 'Métodos', las concentraciones de sustrato-se indican en el gráfico

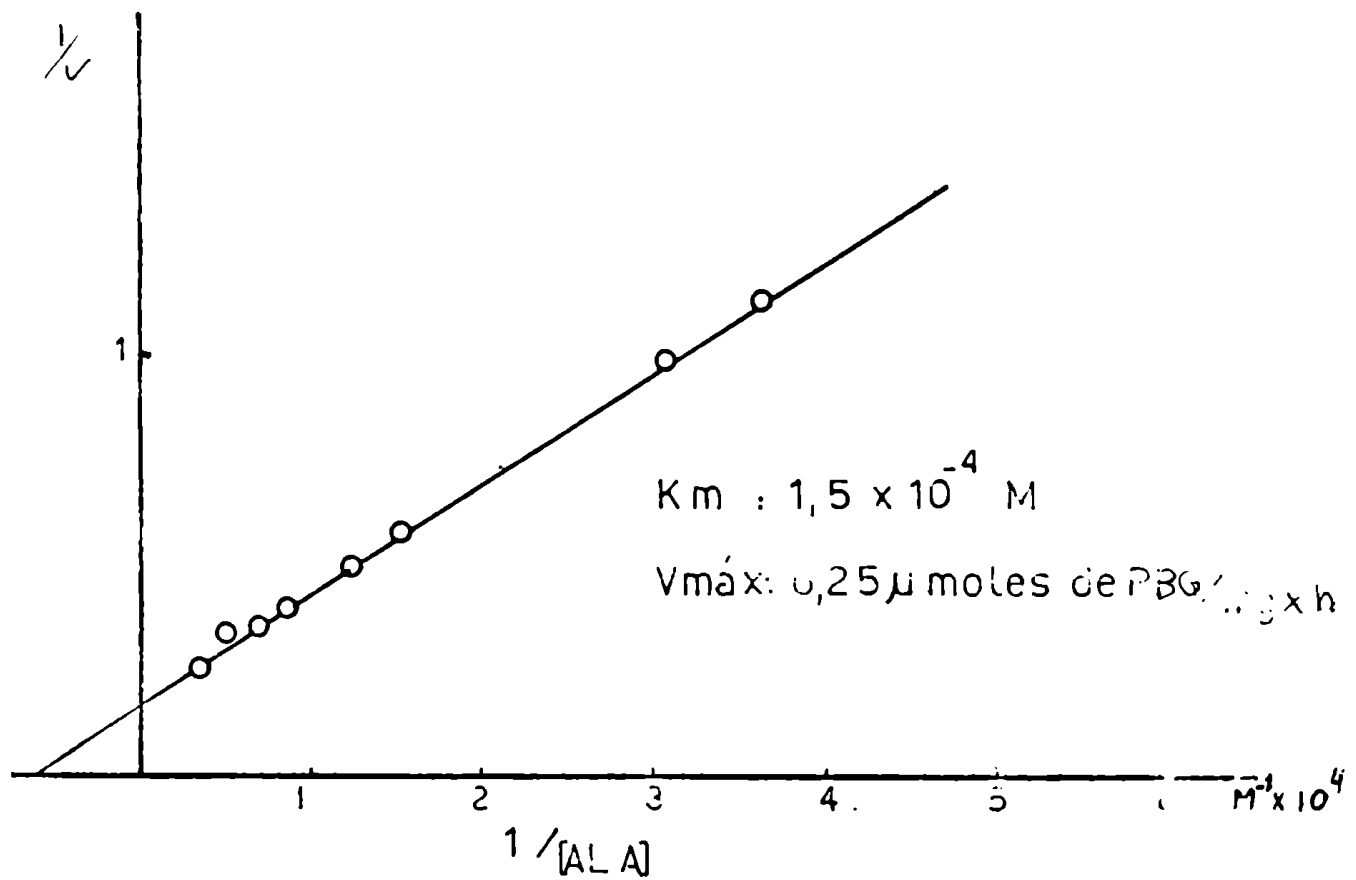
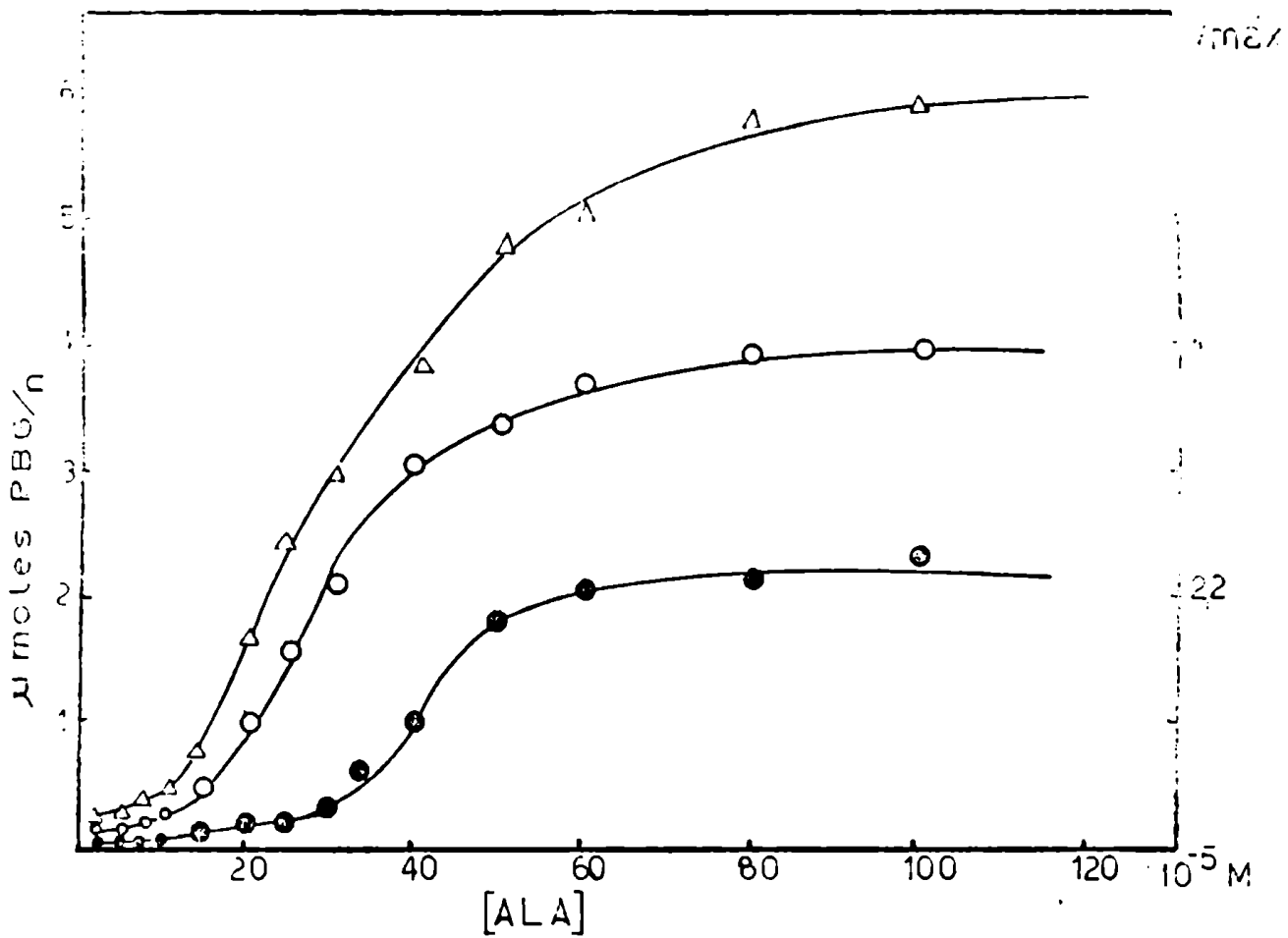


Fig.34 Representación gráfica de Lineweaver-Burk. Los datos corresponden a la Fig.33



5 Comportamiento cinético de la ALA-D en presencia de adores e inhibidores Se uso 1mg de la enzima de la etapa 8. Condiciones de incubación son las indicadas en Metodos, salvo se usó buffer Tris-Cl H 0,05 M, pH 6,8 en lugar de buffer PO_4^{3-} . Las concentraciones de sustrato son las indicadas en el gráfico. In adición, $\bullet-\bullet$ $(\text{AcO})_2\text{Mg}$ 3×10^{-2} M, $\Delta-\Delta$ Cl_2Zn 10^{-3} M

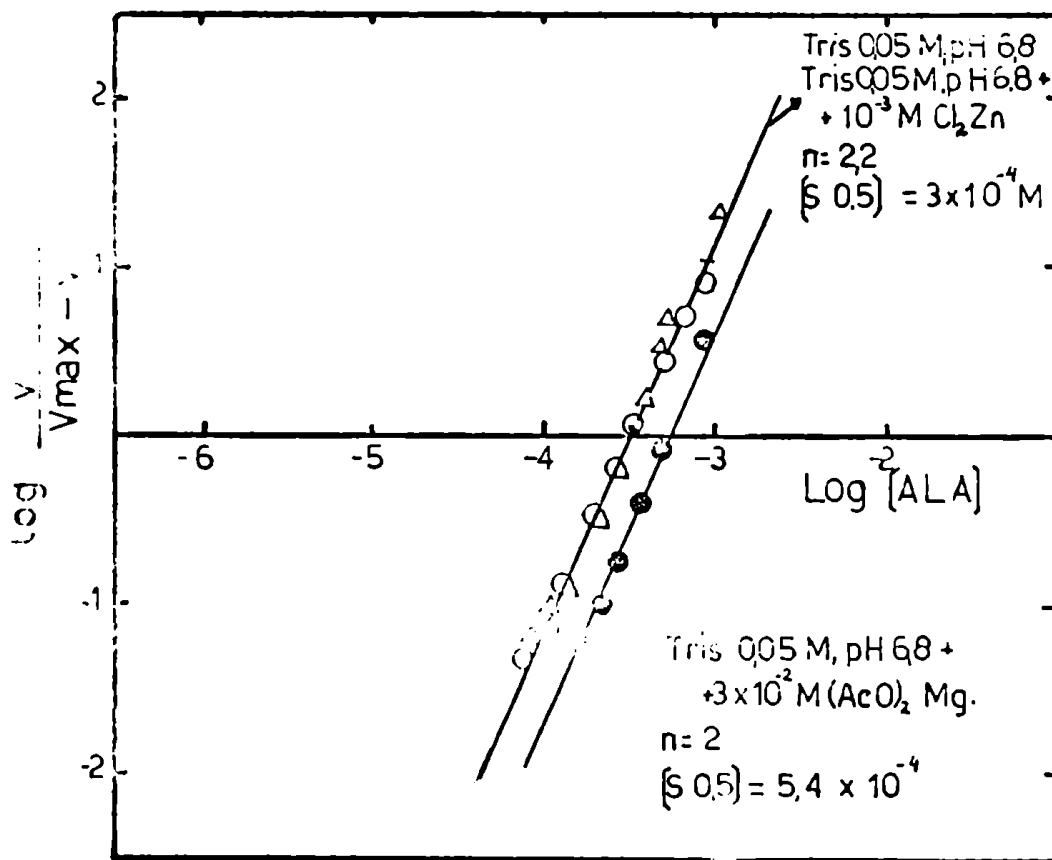


Gráfico de Hill. Los datos corresponden a la Fig 35

$n = 2,2$ y la $[S_{0,5}] = 3 \times 10^{-4}$ M. Sin embargo, la presencia de acetato de magnesio 3×10^{-2} M, modificó sensiblemente la $v_{\text{máx}}$ $2,2 \mu\text{moles PPG}/\text{mg} \times \text{h}$ y la $[S_{0,5}] = 5,4 \times 10^{-4}$ M.

Estudios realizados con K^+ y Na^+ no presentaron cambios notorios respecto al perfil de la curva de saturación de la ALA-D de hígado vacuno, ni modificar sensiblemente sus parámetros.

De acuerdo a las diferencias en el comportamiento, observadas en buffer de fosfato de potasio 0,067 M pH 6,8, respecto al buffer Tris-ClH 0,05 M del mismo pH, en ausencia o presencia de Zn^{++} , Mg^{++} , K^+ y Na^+ , se efectuó un estudio comparativo de la cinética de la ALA-D en buffer Tris-ClH respecto al mismo, con el agregado de buffer fosfato de potasio. Las determinaciones se hicieron como en los casos anteriores, variando la cantidad de sustrato según se indica, salvo que en este caso el buffer de la reacción fué una mezcla de buffer Tris-ClH 0,05 M más buffer fosfato de potasio 0,013 M, pH 6,8.

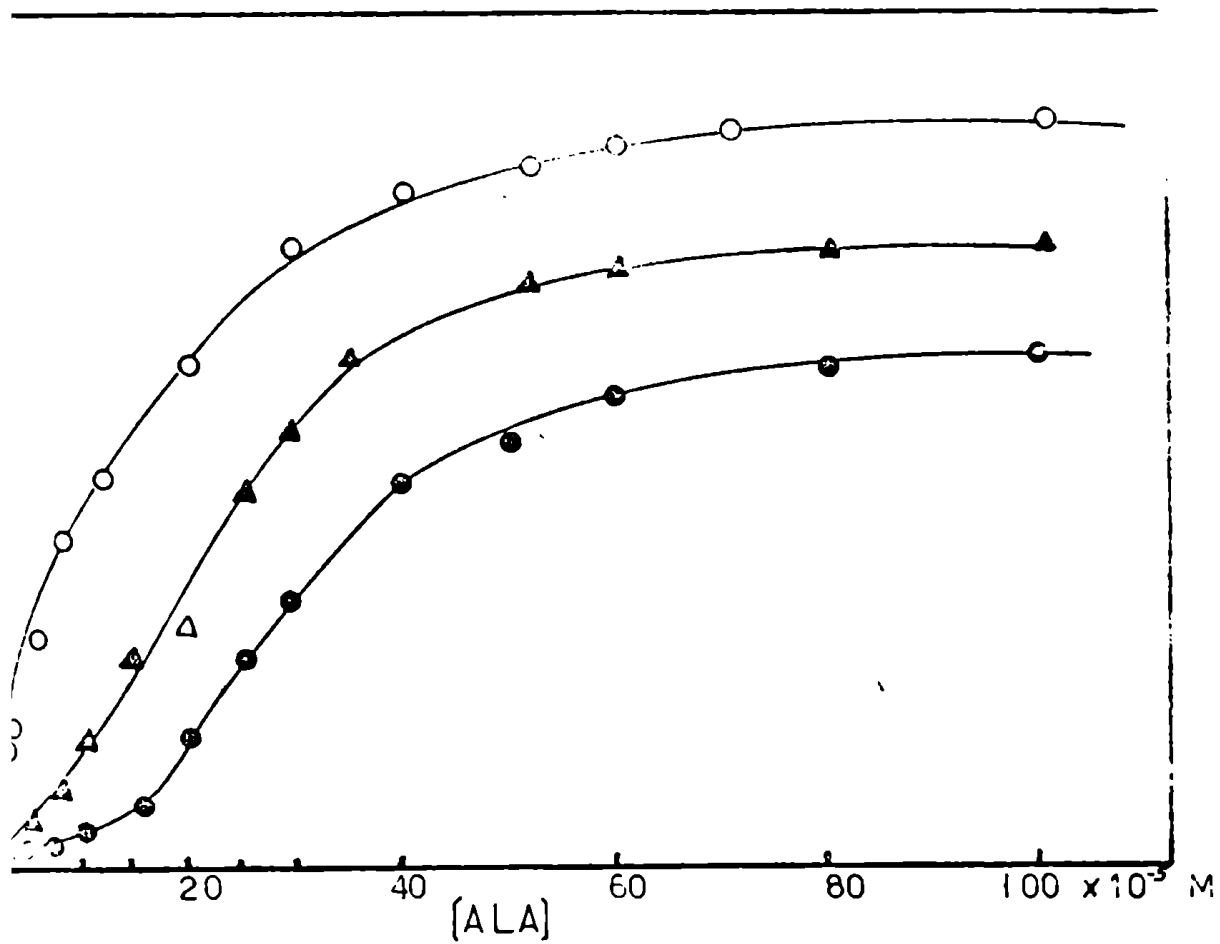
Se vió (Figura 37), que aún a bajas concentraciones, el fosfato, además de aumentar la actividad enzimática modifica el perfil de la curva de saturación, acercándose al comportamiento Michaeliano, obtenido cuando se utilizó sólo buffer de fosfato de potasio. En este último caso, al aumentar la molaridad del buffer, no se modificó sensiblemente la actividad enzimática, ni la cinética de la reacción.

En la Figura 38 se observa que cuando se trabaja con una mezcla de buffers con PO_4^- se produce una disminución de los n obtenidos de la gráfica de Hill, concomitante con una disminución de la $[S_{0,5}]$, la que se acerca al valor del K_m de la enzima en buffer PO_4^- 0,067 M, pH 6,8.

Efectos de otros aditivos sobre la actividad de la ALA-D

Se estudió el efecto de los nucleótidos de adenina y se observó que éstos, así como la base misma y también la guanina, a 10^{-2} M produjeron inhibición total, aunque a 10^{-3} M o menos, no afectaron considerablemente la actividad.

En este caso, como en los ensayos anteriores se trabajó con enzima pura,



Curso de la reacción en función de la concentración de ALA en presencia de buffer PO_4^{3-} y Tris. Se utilizó 1mg de la 8ª etapa de purificación por incubado. Los incubados fueron según se indica en el texto. \circ -Buffer PO_4^{3-} 0,067M pH 6,8 \bullet -Tris-Cl H 0,05M pH 6,8 \blacktriangle -Buffer Tris-Cl H 0,05M pH 6,8 + Buffer 0,3M pH 6,8

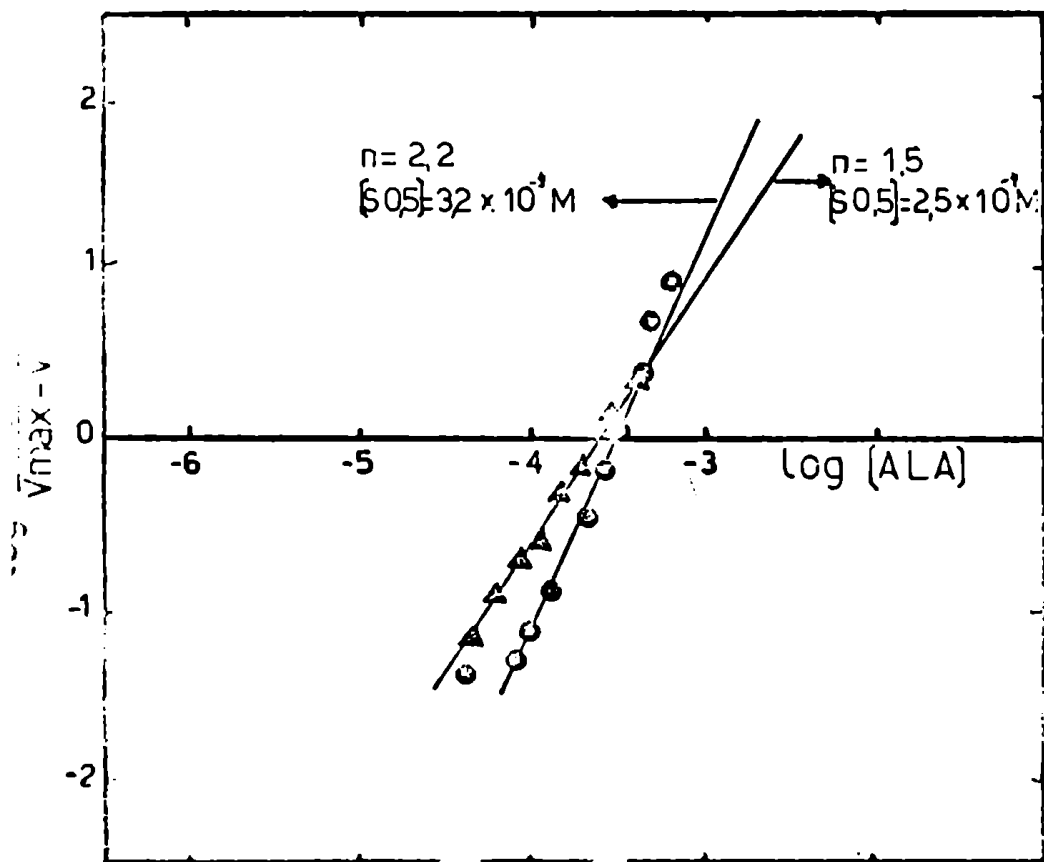


Gráfico de Hill. Los datos corresponden a la Fig 37

proveniente de la etapa 8, y las incubaciones se llevaron a cabo según se indica en Métodos, usando buffer Tris-ClH en lugar de buffer fosfato. En la Tabla XIX se señalan los resultados obtenidos con este grupo de sustancias.

Tabla XIX. Efecto de nucleótidos y bases púricas sobre la ALA-D

Se trabajó con enzima de la etapa 8 en las condiciones indicadas en el texto.

Añición	Concentración (M)	Acti idad (%)
Control		100
AMP	0,01	0
	0,001	96
ADP	0,01	0
	0,001	114
ATP	0,01	0
	0,001	93
AMP _c	0,0075	80
Adenina	0,01	0
	0,001	132
	0,0001	102
Guanina	0,01	0
	0,001	40
	0,0001	114

Se estudió también el efecto de otros compuestos sobre la actividad de ALA-D, tales como fosfato de piridoxal, e hidroxilamina que a concentraciones de 10^{-3} y 5×10^{-3} M respectivamente, inhibieron un 45% de la actividad enzimática.

Finalmente, se ensayaron la hemina y la protoporfirina, sustancias éstas de especial interés por tratarse de productos finales en la biosíntesis del Hemo y a concentraciones de 10^{-4} y 10^{-5} M inhibieron marcadamente la enzima.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la primera parte de este trabajo, se describió un método para sintetizar el compuesto cuya transformación en PBG constituye una etapa fundamental en la síntesis del Hemo.

La introducción del uso de radioisótopos en la bioquímica, produjo resultados de considerable importancia en estudios sobre la biosíntesis de constituyentes orgánicos o de sus productos metabólicos.

Por otra parte, el empleo de esta técnica señaló el comienzo de una nueva era en la investigación de las porfirinas, y mediante el uso de precursores isotópicamente marcados, pudo dilucidarse el origen de todos los átomos del Hemo.

El ^{14}C resultó ser particularmente útil en los estudios referentes al mecanismo de formación de porfirinas y la intervención del ALA en dicha síntesis se comprobó con el empleo de este isótopo.

Para la obtención del clorhidrato del ALA ^{14}C , se eligió como material radioactivo de partida ^{14}CNK . El primer intermediario en la síntesis fué la ftalilglicina ^{14}C , cuyo rendimiento en ^{14}C fué apreciablemente superior cuando el cianuro radioactivo reaccionó con la N-clorometil ftalimida, que cuando se usó glicina ^{14}C como material de partida, pues ésta debe sintetizarse previamente para luego condensarla con anhídrido ftálico (Pichat y Herbert, 1957).

En esta forma se logró aumentar el rendimiento a partir del precursor radioactivo y por ende disminuir el costo del producto, lo que justifica las etapas extras que implica la nueva síntesis.*

En la segunda parte de este trabajo, se estudió la transformación enzimática del ALA en PBG.

Se aisló y purificó de hígado bovino la enzima δ -aminolevúlico dehidrasa (5 aminolevúlico hidrolasa, E.C. 4.2.1.24) que cataliza dicha transforma-

* Es de hacer notar que el método desarrollado en nuestro laboratorio es actualmente utilizado por la New England Nuclear para la síntesis comercial de este compuesto.

ción.

Esta enzima, como la de todas las otras fuentes estudiadas, resultó no estar unida a fracción subcelular alguna; caracterizándose entonces por ser una enzima soluble. La disponibilidad de su sustrato, ALA, depende de la existencia del mismo en el citoplasma, debido a que la síntesis del mismo se produce en la mitocondria. La permeabilidad de la membrana podría ser entonces un buen medio de regulación en la célula, para la síntesis de porfirinas.

La enzima resultó ser termestable, al igual que la obtenida de otras fuentes (Walerych, 1963; Coleman, 1966; Nandi y Waygood, 1967; Shetty y Miller, 1969 a; Tijer y col. 1970).

En relación a su estabilidad al calor, presentó una temperatura óptima relativamente alta, 65°C, en incubaciones durante una hora, habiéndose calculado una $E = 10.660$ cal/mol.

Estos datos coinciden con los de la mayoría de las ALA-D, siendo notable la aislada de hígado de ratón (Coleman, 1966), que resultó ser estable aún por calentamientos a 75°C durante 80 minutos.

El rango de saturación con sulfato de amonio en que precipitó, su peso molecular y su precipitación por diálisis contra buffers de muy baja fuerza iónica o agua destilada, la presentan como una típica globulina.

La preparación más pura de la enzima, se comportó como una única proteína tanto por electroforesis en gel de almidón a distintos pH con diferentes buffers y fuerzas iónicas, como en gel de poliacrilamida; además el pico enzimáticamente activo proveniente de la última columna de Sephadex coincide exactamente con el pico de actividad obtenido por repetidos pasajes en idénticas condiciones (concentración, buffer, pH, fuerza iónica), por distintos tamices moleculares (Sephadex G-100, Sephadex G-200, Sepharosa 4-B, 6-B, Bio-Gel P-100 y Bio Gel P-200). Estos resultados, apoyados por el hecho de que la proteína sedimentó como un único pico simétrico por ultrafiltración, indican que la ALA-D está presente como una única entidad proteica.

En gel de almidón, presentó la misma movilidad electroforética que las enzimas provenientes de glándula de Harder y de callos de semilla de soya

(Tomio y col. 1968; Tigier y col., 1970):

Para la ALA-D de hígado vacuno, se determinó un peso molecular de 140.000 ± 14.000 , por pasaje a través de columnas de tamices moleculares (Andrews 1964; 1965; Batlle y col. 1965).

Por otra parte, por pasaje de la enzima pura a bajas concentraciones por columnas calibradas de Sephadex G-200, se observó la aparición de un pico en la zona correspondiente a un PM de 70.000 ± 7.000 también con actividad enzimática. Esto sugeriría que la dilución de la enzima podría inducir una disociación parcial de la misma en subunidades. Este fenómeno de asociación y disociación de proteínas a bajas concentraciones ya fue observado en otros casos y estudiado por Andrews (1964; 1965). Por otra parte, Nandi y col. (1968), encontraron que la ALA-D de R. spheroides con un PM de 250.000, también puede disociarse en subunidades, de menor peso molecular en presencia de urea 1 M y por diálisis. Empleando la misma metodología Tigier y col. (1970), encontraron un PM de 280.000 para la ALA-D de callos de semilla de soya.

El único producto de la actividad catalítica de la enzima, resultó ser el PBG, siendo la transformación una reacción exactamente estequiométrica,

El curso de la reacción enzimática, resultó lineal tanto en función de la concentración de la enzima como del tiempo de incubación.

En cuanto a su pH óptimo, la ALA-D de hígado vacuno como todas las ALA-D aisladas de mamíferos (Gibson y col. 1955; Granick y Mauzerall, 1958 a; Coleman, 1966), presentó un óptimo cercano a la neutralidad pH 6,8 tanto en buffer de fosfato de potasio como en buffer Tris-ClH, siendo en este último caso alrededor de un 30% menos activa, observándose una mayor sensibilidad a pH ácidos que alcalinos.

La actividad de la enzima, resultó estrictamente dependiente de condiciones anaeróbicas, además de requerir una preincubación con agentes protectores de grupos -SH, exigencia que aumentó con el grado de purificación y se hizo indispensable después de la 6a. etapa de la purificación. Si bien este requerimiento es común para la mayoría de las ALA-D estudiadas, son excepciones...

la enzima aislada de callos de semilla de soya (Tigier y col. 1970), y la de levadura (Barreiro, 1967).

De los reactivos ensayados, con la ALA-D de hígado vacuno, se observó que los mejores resultados se obtuvieron con preincubaciones de 1 hora y cisteína 10^{-3} M. Esto señalaría la existencia de grupos -SH, en el centro activo de la enzima fácilmente oxidables, probablemente por encontrarse muy expuestos sobre la molécula proteica.

La presencia de grupos SH necesarios para la actividad enzimática, se comprobó utilizando distintos agentes reactivos con estos grupos. En efecto, se encontró inhibición completa de la actividad enzimática con reactivos capaces de formar mercaptidas como el PCMB, con alquilantes como el NEMI y la iodoacetamida, oxidantes como el DTNB, cisteína y glutatión oxidado, iodosobenzoato y con metales que forman sulfuros con muy bajos productos de solubilidad.

También se observó reversión de la inhibición producida por agentes alquilantes y PCMB con cisteína.

El arsenito, a una concentración de 10^{-3} M que actúa sobre -SH vecinos, no inhibió la enzima, aunque sí reaccionó a 10^{-2} M quizás debido a la presencia de grupos -SH aislados, en el centro activo de la enzima.

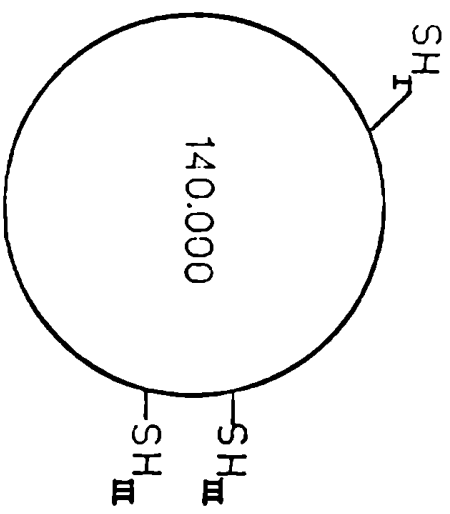
En el estudio comparativo realizado entre la ALA-D aislada de hígado vacuno y de callos de semilla de soya, se observó que los grupos SH de la enzima presentaron diferente reactividad hacia el DTNB. En efecto, se encontró un grupo SH por mol, en ambos casos, que reaccionó rápidamente con el DTNB y se lo denominó SH_I; en la enzima de callos se encontró un grupo SH designado SH_{II}, que reacciona más lentamente con el DTNB, sin embargo no se detectó ningún grupo SH de estas características en la ALA-D bovina; en cuanto al tercer tipo de grupos SH que denominamos SH_{III}, que sólo reaccionaron en presencia de urea 8 M, se titularon dos de ellos en ambas dehidrasas.

La pérdida de la actividad enzimática de la ALA+D de callos de semilla de soya, fué paralela a la disminución de los grupos SH_I . Si bien el efecto del DTNB sobre la actividad de la enzima proveniente de hígado vacuno no se pudo investigar en virtud de las propiedades de ésta última en cuanto a su preactivación con tioles, es aceptable pensar que la acción del DTNB sobre la dehidrasa bovina, es similar a la observada en la de callos de semilla de soya: ya que aún en aquellas condiciones en que se activó la enzima previo su titulación con DTNB reveló un solo grupo $-\text{SH}$ en ausencia de urea 8 M.

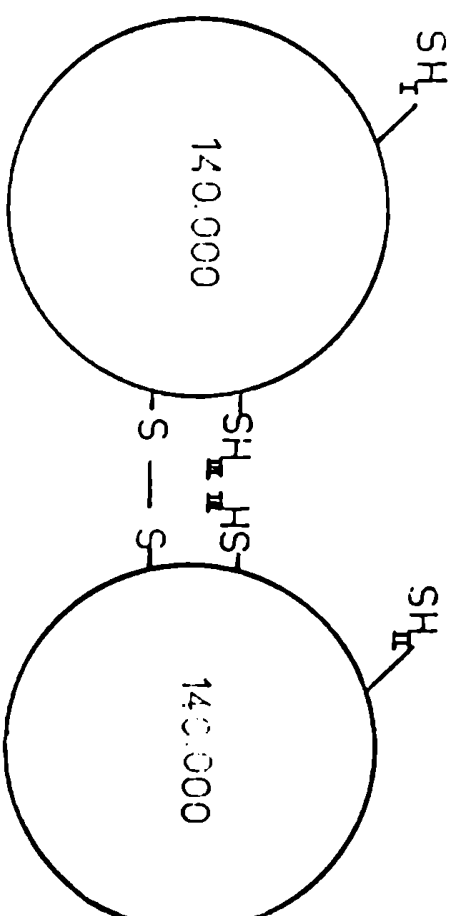
Sobre la base de estos resultados y considerando un peso molecular de 140.000 para la enzima de hígado vacuno y de 280.000 para la de callos de semilla de soya, se propone un modelo en el que ésta última, estaría constituida por dos subunidades idénticas, de peso molecular 140.000, con igual número de grupos SH, pero de distinta reactividad, como se muestra en la Figura 39.

La titulación de uno de los grupos más reactivos SH_I , conduce a la pérdida de actividad y a cambios estructurales; este tiol responsable del 80% de la actividad, estaría probablemente en el sitio activo. En el caso de la enzima de semilla de soya, es probable que durante la reacción del grupo SH_{II} con DTNB se produzcan algunos cambios conformacionales. Finalmente, los dos grupos SH_{III} , son tan inaccesibles y están tan bien protegidos por la estructura de la enzima, que normalmente no se titulan, salvo que la proteína sea previamente desnaturalizada, también es probable que esos dos grupos SH_{III} estén muy cerca en la estructura de la proteína intacta y los efectos estéricos jueguen un papel importante en cuanto a la reactividad con el DTNB, ya que la molécula de éste requiere cierta distancia entre los grupos SH para reaccionar.

Se sugiere además, que los grupos SH_I y SH_{II} están localizados sobre la superficie de la proteína, y por lo tanto resultarían más accesibles a la acción del DTNB; que los grupos SH_{III} situados posiblemente muy cerca o en el espacio entre las dos subunidades y sólo podrían reaccionar con el reactivo luego de la desagregación de la molécula.



ALA-C de hígado vacuno



ALA-D de callos de semilla de soya

Fig.39 Modelo propuesto para la localización de los grupos SH en ALA-D de hígado vacuno y de callos de semilla de soya

Los grupos SH_{III} podrían también estar involucrados en la estructura terciaria y cuaternaria de la ALA-D; así como en la formación de agregados, probablemente a través de puentes disulfuros intermoleculares, siendo en estas condiciones estos dímeros o agregados mayores, más activos que los monómeros de allí la disminución en la actividad encontrada con los reactivos de grupos -S-S- en la ALA-D bovina.

Por calentamiento a 100°C durante 5 minutos, de la enzima proveniente de la 2a. etapa de la purificación, se obtuvieron evidencias de la presencia de un cofactor que estimuló la actividad enzimática de la ALA-D. Este factor no resultó ultrafiltrable ni dializable, razón por la cual se supone además de su termocstabilidad que se encontraría fuertemente unido a la enzima.

La ALA-D aún en sus más altos grados de purificación, presentó una leve coloración amarillenta y una fluorescencia característica al exponerla a la acción de la luz ultravioleta. Esto hizo pensar en la presencia de un grupo flavínico, pero el espectro de absorción de la enzima reveló solamente el pico característico de proteínas a 280 nm y otro más pequeño en la zona de Soret, a 406 nm, sugiriendo más bien la presencia de algún grupo hémico. Sin embargo, hasta ahora, no se ha podido confirmar la existencia de cofactor alguno ni determinar la naturaleza del mismo.

El EDTA, que resultó ser un inhibidor de la enzima aislada de mamíferos, (Gibson y col. 1955; Granick y Mauzerall, 1958 a; Tomio y col. 1968), con excepción de la de ratones (Coleman, 1966), produjo una inhibición en la ALA-D de hígado vacuno que fué completa a 5×10^{-3} M. Por otra parte, también se encontró inhibición con ciertos agentes quelantes específicos, tales como α - α dipiridilo y 8-HO quinolina, sin embargo, pese a estos resultados, en la ALA-D bovina, aún no se ha podido demostrar ni la presencia de metal específico alguno unido a la enzima, ni su requerimiento.

Esta enzima, como la mayoría de las dehidrasas estudiadas, es inhibida completamente por los metales pesados lo cual era de esperar si se tiene en

cuenta la naturaleza sulfhidrúlica de la misma.

Al estudiar el efecto de varios aniones y cationes se vió, que la actividad de la ALA-D de hígado vacuno no fué modificada mayormente por el agregado de distintos iones. A diferencia de los resultados obtenidos por Shemin con la enzima de R. spheroides, que requiere iones K^+ para un máximo de actividad, en este caso, los iones K^+ no sólo no son necesarios, sino que a altas concentraciones inhiben la enzima.

Sin embargo, es notable que los iones Zn^{++} a 10^{-3} M, producen una activación de la ALA-D, resultado que podría explicarse, relacionándolo con el hecho de que la enzima de callos de semilla de soya requiere cierta concentración de iones Zn^{++} en el medio de cultivo del tejido, para la obtención de un máximo de actividad enzimática, habiéndose ~~sugerido~~ además que estos iones estarían involucrados en la biosíntesis de la enzima.

Se vió también, que con los distintos aniones estudiados, el acetato fué el que produjo mayor inhibición enzimática, el sulfato en menor proporción y el cloruro no modificó directamente la actividad.

Cuando se estudió el efecto de los nucleótidos y compuestos relacionados sobre la ALA-D de hígado vacuno, se vió que éstos inhibieron marcadamente la actividad de la enzima. Se sabe, por otra parte, que el ALA no sólo está involucrado en la síntesis de porfirinas, sino que deriva en parte al camino de las purinas, de manera que éste efecto obtenido con los distintos derivados nucleótidos podría deberse entonces a una acción de control de los mismos sobre la síntesis de porfirinas en la célula.

En lo que respecta a la cinética de la ALA-D, si bien en buffer de fosfato de potasio 0,067 M pH 6,8 ésta mostró un comportamiento normal, presentando una curva de saturación con un perfil hiperbólico y un $K_m = 1,5 \times 10^{-4}$ M, valor que está dentro del orden de los K_m obtenidos, para las dehidrasas de varias fuentes. En el mismo estudio efectuado en buffer Tris-ClH 0,05 M pH 6,8 la enzima, además de presentar una actividad 30% inferior a la encontrada en el buffer de fosfato de potasio al mismo pH, mostró un comportamiento cinético diferente presentando una curva de saturación sigmoidea, resultado concin-

dente con las ALA-D purificadas de eritrocitos humanos (Vergnano y col., 1968), y con la de R. spheroides (Nandi y col., 1968 a). En estas condiciones se obtuvo una $\{S_{0,5}\} 3,2 \times 10^{-4} M$ y un "n" de Hill $n=2$, sugiriéndose de ello, que en estas condiciones, se revelaría la existencia e interacción de por lo menos dos sitios de unión para el sustrato, por molécula de enzima.

Estos resultados desecharían en parte las suposiciones de que la segunda molécula de ALA quedaría en solución durante el proceso de biosíntesis del PBG, no se descarta por supuesto que la molécula que en el mecanismo propuesto por Nandi y Shemin (1968 b) no forma la base de Schiff tenga una menor energía de unión a la enzima.

En estas condiciones, en la ALA-D de hígado bovino, el ALA presentaría un efecto cooperativo positivo.

Estos resultados cinéticos, sumados a la posibilidad del desdoblamiento de la ALA-D en fracciones de menor peso molecular o subunidades, indicarían que la ALA-D bovina se comportaría como una enzima alostérica.

El cloruro de Zn $10^{-3} M$, aumentó la actividad enzimática, pero no modificó la $\{S_{0,5}\}$ ni el n, el acetato de magnesio $10^{-3} M$, en cambio, que actúa como inhibidor de la ALA-D, aunque tampoco cambió el valor del n, disminuyó el $\{S_{0,5}\}$

Con el objeto de encontrar algún ligando que modificara la cinética de la ALA-D, se estudió el efecto de K^+ utilizando sales con diferentes aniones; como ya se señaló el K^+ no presentó ningún efecto sobre la actividad enzimática y tampoco modificó el comportamiento cinético de esta enzima. Se estudió entonces, el efecto del PO_4^{3-} , como fosfato de potasio, este anión a una concentración de $1,3 \times 10^{-2} M$, (un 20% de la utilizada en la determinación de la actividad enzimática en el método de rutina), produjo una disminución de un 25% en la $\{S_{0,5}\}$ modificando también el n a un valor de $n=1,5$, observándose además que en buffer de fosfatos de potasio 0,067 M pH 6,8, la enzima se comportó como Michaeliana, como ya se dijo, con un $K_m 1,5 \times 10^{-4} M$.

Esto indicaría que realmente el ión fosfato actuaría como efector heterotrópico positivo de la ALA-D bovina, siendo responsable de la transición, en la estructura de la proteína enzimática a estados en los cuales la afinidad

por el sustrato resultasen mayores (Monod y col., 1963, 1965; Koshland, 1963; 1964).

Todos estos datos unidos a la inhibición producida por hemina y Proto productos finales de la biosíntesis de las porfirinas, apoyarían las hipótesis propuestas por varios investigadores para ALA-D aisladas de distintas fuentes (Onisawa y Jabbe, 1962; Coleman, 1965; Calissano, Bonsignore y Cartasegna, 1966; Menon y Shemin, 1967; MuthuKrishnaa y col. 1969; Lascelles y col., 1969; Jayaraman y col., 1971) de que esta enzima, estaría también involucrada en la regulación de la biosíntesis de las porfirinas, ya que además debe recordarse que es una enzima ubicada en un punto de divergencia en la utilización del ALA, metabolito utilizado ya sea, para la biosíntesis de porfirinas (destino principal), o en el camino de las purinas. Asimismo, conviene señalar que se trata de la enzima que cataliza la síntesis del primer intermediario pirrólico exclusivamente utilizado en la biosíntesis de las porfirinas.

RESUMEN

Se describe un método para la síntesis química del ALA 4^{14}C .

Se hace un estudio detallado sobre el aislamiento, purificación y propiedades de la enzima "Delta aminolevúlico dehidrasa".

Se logró purificar la delta amino levúlico dehidrasa aislada de hígado vacuno unas 310 veces, resultando ser una enzima soluble.

Es una enzima sulfhidrúlica, cuya actividad es dependiente de la activación de grupos SH, con agentes tiol reductores, especialmente cuando se la purifica y estrictamente anaeróbica aún en las primeras etapas de su purificación.

Presenta un pH óptimo a 6,8 en buffer de fosfato de potasio 0,067 M como en buffer Tris-ClH 0,05 M, aunque en este último buffer, la enzima es 30% menos activo.

Es estable al calor y tiene una temperatura óptima de acción a 65°C, habiéndose determinado una energía de activación de 10.600 cal/mol.

La formación de PBG resulta función lineal de la concentración de delta aminolevúlico dehidrasa, y del tiempo.

Se determinó un PM de 140.000 ± 14.000 por el método de tamices moleculares, obteniéndose además evidencias que sugieren la existencia de subunidades de peso molecular 70.000 ± 7.000 .

Por electroforesis en gel de poliacrilamida y en gel de almidón a distintos pH, así como por ultracentrifugación se comportó como una única entidad proteica; determinándose un pI = 4,9.

Tanto para la enzima previamente activada con cisteína, como para una preparación sin activar, se determinó sólo un grupo -SH funcional catalíticamente en cambio se titularon 3 grupos SH en presencia de urea 8M.

Por estudios comparativos con la delta amino levúlico dehidrasa purificada de callos de semilla de soya se ha propuesto un modelo estructural para ambas enzimas, con respecto a la distribución de los grupos -SH, en base a unidades de PM 140.000.

En buffer Tris ClH la enzima presentó una curva de saturación sigmoidea con una $[S_{0,5}] = 3 \times 10^{-4}$ M y un "n" de Hill igual 2,2, sin embargo en buffer de fosfato de potasio, el perfil cinético fué Michaeliano con un Km de $1,5 \times 10^{-4}$ M. Se considera el ión fosfato, un efector heterotrópico positivo de la enzima.

De los iones estudiados, sólo el Zn^{++} produjo una ligera activación. No se determinó requerimiento de metales en especial, aunque la enzima fué inhibida por distintos agentes quelantes.

Las bases púricas y nucleótidos de adenina a 10^{-2} M inhibieron marcadamente la actividad de la enzima.

La delta amino levúlico dehidrasa de hígado vacuno fué inhibida por bajas concentraciones de Protoporfirina y Hemina.

En base a esta inhibición, por producto final, al hecho de que esta enzima se encuentra ubicada en el punto de divergencia en la utilización del ALA, a que cataliza la síntesis del primer intermediario pirrólico exclusivamente utilizado en la biosíntesis de porfirinas a que en ciertas condiciones se comporta cinéticamente como una enzima alostérica, la delta amino levúlico dehidrasa en hígado vacuno estaría también involucrada en la regulación de la biosíntesis del Hemo en este tejido.

BIBLIOGRAFIA

- Aktar, M. y Jordan, P.M. (1968), *Chem. Commun.* 24, 1691.
- Altman, K.I., Casarett, G.W., Masters, R.E., Noonan, T.R. y Salomon, K. (1948), *J. Biol. Chem.*, 176, 319.
- Altman, K.I., Salomon, K. y Noonan, T.R. (1949), *J. Biol. Chem.*, 177, 489.
- Andrews, P. (1964), *Biochem. J.*, 91, 222.
- Andrews, P. (1965), *Biochem. J.*, 96, 595.
- Aoki, Y., Wada, O., Urata, G., Takaku, F. y Nakao, K. (1971), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 42, 568.
- Balenovic, K. y Bregant, N. (1952), *J. Org. Chem.*, 17, 1328.
- Balenovic, K., Bregant, N., Čarar, D. y Kačičić, M. (1951), *J. Org. Chem.*, 15, 1328.
- Bagdasarion, I., (1958), *Nature* 181, 1399.
- Banfi, D., Teplán, I. y Otvos L. (1963), *Acta Chim. Hung.* 35, 213.
- Barriero, G. Clara de (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 139, 479.
- Batlle, A. M. del C., (1967), *J. Chromat.* 28, 82.
- Batlle, A. M. del C., Benson A. y Rimington, C. (1965) *Biochem. J.*, 97, 731.
- Batlle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, 57, 191.
- Batlle, A. M. del C. y Grinstein, M. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, 82, 13.
- Batlle, A. M. del C. y Rimington, C. (1966), *Ciencia e Investigación* 22, 369.
- Beale, S.I. (1970) *Plant Physiol.* 45, 504.
- Benson, R. W., Robinson, J. L. y Boyer, P.D. (1969) *Biochemistry*, 8, 2496.
- Berlin, N. I., Neuberger, A. y Scott, J.J. (1956), *Biochem. J.* 64, 80.
- Bloch, K. y Rittenberg, D. (1945), *J. Biol. Chem.*, 159, 45.
- Bodman, J. (1960) en "Chromatographic and Electrophoretic Techniques", Vol. 2 Ed. Smith, I. Londres: William Heinemann, Ltd.; New York: Interscience Publishers Inc. p. 129.
- Bogorad, L. (1955) *Science*, 121, 879.
- Bogorad, L. (1957) *Plant. Physiol. Suppl.* 32, xli.
- Bogorad, L. (1958a) *J. Biol. Chem.*, 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b) *J. Biol. Chem.*, 233, 510.

- Bogorad, L. (1958 c) *J. Biol. Chem.*, 233, 516.
- Bogorad, L. (1960) *Symposium of Comparative Biochemistry. Vol. I, Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems.* Ed. Mary Belle Allen, New York; Academic Press Inc. p. 227.
- Bogorad, L. (1962) en "*Methods in Enzymology*", Vol. 5, Ed. S.P. Colowick y N.O. Kaplan. New York; Academic Press, p. 893.
- Bogorad, L. (1963) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 104, 676.
- Bogorad, L. y Granick, S. (1953) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 39, 1176.
- Bonsignore, D., Calissano, P. y Cartasegna, C. (1965) *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* 41, 443.
- Bonsignore, D., Calissano, P. y Cartasegna, C. (1966), *Panminerva Med.* 9, 292.
- Booij, H. L. y Rimington, C. (1957), *Biochem. J.*, 65, 4.
- Brown, E. G. (1958 a), *Biochem. J.*, 70, 313.
- Brown, E.G. (1958 b) *Nature*, 182, 313.
- Bruns, G.P. y London, I. (1965) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18, 236.
- Burnham, B.F. (1963), *Acta Chem. Scand.* 17, 123.
- Burnham, B.F. (1969) en *Metabolic Pathways*, vol. III, Ed. Greenberg, D. M. New York and London, Academic Press, p. 403.
- Burnham, B.F. y Lascelles J. (1963), *Biochem. J.*, 87, 462.
- Butterworth, D.H.N., Baum, H. y Porter, J. W. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 118, 716.
- Calissano, P., Bonsignore, D. y Cartasegna, C. (1966) *Biochem. J.* 101, 550.
- Calissano, P., Cartasegna, C. y Mateini, M. (1966), *Giorn. Biochim.* 15, 18.
- Calvin, M., Heifberg, Ch., Reid, J. C., Tolbert, M. B. y Jankwich, P. E. (1949) en "*Isotopic Carbon*", Ed. J. Wiley y Sons; New York, p. 215
- Canivet, J. y Rimington, C. (1953) *Biochem. J.*, 55, 867.
- Carell, E. P., Kahn, J. S. (1964), *Arch. Biochim. Biophys.* 108, 1.
- Carpenter, A.T. y Scott, J.J. (1959) *Biochem. J.*, 71, 325.
- Carpenter, A.T. y Scott, J.J. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 52, 195.
- Clark-Walter, G.D., Rittenberg, B. y Lascelles, J. (1967), *J. Bact.* 94, 1643.
- Coleman, D. L. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 5511.

- Coleman D.L. (1971) *Science* 173, 1245.
- Cookson, G.H. y Rimington, C. (1953) *Nature*, 171, 875.
- Cookson, G. H. y Rimington, C. (1954) *Biochem. J.* 57, 476.
- Cornford, D. (1964) *Biochem. J.* 91, 64.
- Cori A. y Nigamari-Izzo, F. (1969) *Agrochimica*, 14, 4.
- Chu, T.C. y Chu, E.J.H. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 2741.
- Chu, T.C. y Chu, E.J.H. (1962) *Biochem. J.* 83, 318.
- Chu, T.C. y Chu, E.J.H. (1965) *Clin. Chem.* 11, 395.
- Dales, R.P. (1968) *Nature* 217, 553.
- Dancewicz, A.M. y Lipiński, B. (1958), *Nukleonika*, 3, 79.
- Dixon, M. y Webb, E.C. (1958) en "Enzymes", Ed. Longmans y Green Co. Ltd., London, p. 419.
- Dixon M. y Webb, E.C. (1964) en "Enzymes", cap. III, 2da. edición, Ed. Longmans London, p. 42.
- Dowex, "Ion Exchange" (1964) The Dow Chemical Company, Midland, Michigan.
- Doyle, D. y Schimke, R.T. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 5449.
- Dresel, E.I.B. y Falk, J. E. (1953), *Nature*, 172, 1185.
- Dresel, E.I.B. y Falk, J. E. (1956), *Biochem. J.* 63, 80.
- Ebbon, J. G. y Tait, G. (1969), *Biochem. J.*, 111, 573.
- Elliot, W.E. (1960), *Biochem. J.* 74, 90.
- Ellman, P. (1958) *Arch. Biochem. Biophys*, 74, 443.
- Ellman, P. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70.
- Eriksen, L. (1955) en CIBA, Foundation Symposium Porphyrin Biosynthesis and Metabolism", B. Wolstenholme, G.E.W. y Miller, E.C.P., London, J. and A. Churchill Ltd. p. 63.
- Falk, J.E., Appleby, C.A. y Porra, R.J. (1959), *Symp. Soc. Exptl. Biol.*, 13, 73.
- Falk, J. E., Dresell, E.I.B., Benson, A. y Knight, B.C. (1956), *Biochem. J.*, 63, 87.
- Falk, J. E., Dresel, E.I.B. y Rimington, C. (1953) *Nature*, 172, 292.
- Feldman, F. y Lichtman, H.C. (1967), *Biochem. Biophys. Acta*, 141, 653.
- Fischer, H. y Orth, H. (1937) "Die Chemie des Pyrrols", Vol. 2, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig.

- Frydman, R.B. y Frydman, B. (1970), Arch. Biochem. Biophys. Acta, 136, 193.
- Frydman, R.B., Stevens, D. y Frydman, B. (1967), Anales Asoc. Quim. Argentina, 55, 287.
- Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1955) Compt. Rend. Soc. Biol. 149, 2138.
- Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1965), Nature 207, 640.
- Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1968), Bull. Soc. Chem. Biol. 50, 1809.
- Gajdos, A. y Gajdos-Török, M. (1969), Biochem. Med. 2, 372.
- Gajdos, A., Gajdos-Török, M. Gorchein, A. Neuberger, A. y Tait, G.H. (1967), Biochem. J., 106, 185.
- Gallo, R.C. (1952), J. Clin. Invest. 46, 124.
- Gerhart, J.C. y Pardee, A.B. (1962) J. Biol. Chem. 237, 891.
- Gibson, K. D. (1958) Biochem. Biophys. Acta, 28, 451.
- Gibson, K. D. (1964), J. Biol. Chem. 239, 3282.
- Gibson, K. D., Laver, W.G. y Neuberger, A. (1958) Biochem. J., 70, 71.
- Gibson, K.D., Mattew, M., Neuberger, A. y Tait, G.H. (1961), Nature, 192, 204.
- Gibson, K. D., Neuberger, A. y Scott, J.J. (1954) Biochem. J. 53, XLI.
- Gibson, K.D., Neuberger A. y Scott, J.J. (1955), Biochem. J., 61, 618.
- Gibson, K.D., Neuberger, A. y Tait, G.H. (1962), Biochem. J., 83, 539.
- Gibson, S.L. y Goldberg, A. (1970), Clin. Sci. 38, 63.
- Goldberg, A. (1959) Brit. J. Haematolog. 5, 150.
- Goldberg, A., Ashenbrucker, H., Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M. (1956), Blood, II, 821.
- Goto, K., Higuchi, M., Sakai, H. y Kikuchi, G. (1967), J. Biochem., Tokyo, 61, 186.
- Granick, S. (1950), Harvey Lectures, 44, 220.
- Granick, S. (1951), A. Rev. Plant. Physiol. 2, 115.
- Granick, S. (1954a), Science, 120, 1105.
- Granick, S. (1954 b), Federation Proc. 13, 219.
- Granick, S. (1955), en CIBA Foundation Symposium Porphyrin Biosynthesis and Metabolism, E.L. Wolstenholme, G.E.W. y Miller, E.C.P., London; J. and A. Churchill Ltd. p. 143.

- Granick, S. (1961), *Plant. Physiol.* 36, XLVIII
- Granick, S. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 1359.
- Granick, S. y Bogorad, L. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3610.
- Granick, S. y Levere, R.D. (1964), *Progress in Haematology*, 4, 1.
- Granick S. y Mauzerall, D. (1958 a), *J. Biol. Chem.* 232, 1119.
- Granick, S. y Mauzerall, D. (1958 b), *Federation Proc.* 17, 233.
- Granick, S. y Mauzerall, D. (1958 c), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 75, 115.
- Granick, S. y Mauzerall, D. (1961), en *Metabolic Pathways*, Vol. II, Ed. Greenberg, D.H. :New York and London, p. 525.
- Granick, S. y Urata G. (1962), *Federation Proc.* 21, 156.
- Granick, S. y Urata, G. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 821.
- Grinstein, H., Bannerman, R.M. y Moore, C.V. (1959), *Blood*, 14, 476.
- Grinstein, H., Kamen, M. D. y Moore, C. V. (1948), *J. Biol. Chem.* 174, 767.
- Grinstein, H., Kamen, M. D. y Moore, C.V. (1949) *J. Biol. Chem.* 179, 359.
- Grinstein, H., Schwartz, S. y Watson, C. J. (1945), *J. Biol. Chem.* 157, 323.
- Gunsalus, I.C. (1954) en *Symposium on the Mechanism of Enzyme Activity*, Ed. Mc Elry, W.D. y Glass, B.; Baltimore, J. Hopkins Press, p. 545.
- Heath, H. y Hoare, D. S. (1959), *Biochem. J.*, 72, 14.
- Heftmann, B. (1961), "Chromatography", Ed. Reinhold Publishing Corporation; New York.
- Heikel, T., Lockwood, W.H. y Rimington, C. (1950), *Nature* , 182, 313.
- Hift, H., Challet, L., Littlefield, J. W., y Sanadi, D.R. (1953), *J. Biol. Chem.* 204, 565.
- Higuchi, H., Ohno, T., Sakai, H., Kurashima, Y. y Kikuchi, G. (1968), *J. Biochem. Tokio* 164, 795.
- Hill, A.V. (1913) *Biochem. J.*, 7, 471.
- Ho, Y.K., y Lascelles, J. (1971) *Archs. Biochem. Biophys.*, 144, 734.
- Hoare, D.S. y Heath, H., (1958) *Nature*, 191, 1592.
- Hoare, D.S. y Heath, H. (1959), *Biochem. J.*, 73, 679.
- Hoppe-Seyler, F. (1880), *Z. Physiol. Chem.* 4, 193.
- Hoppe-Seyler, F. (1886), *Z. Physiol. Chem.*, 10, 391.
- Hsu, W.P., y Miller, G.W. (1970) *Biochem. J.*, 171, 215.
- Hutton, J. y Gross, S. (1970) *Archs. Biochem. Biophys.*, 141, 284.

- Iodice, A.A., Richert, D.A. y Schulman, M.P. (1958) *Federation Proc.* 17, 248.
- Irving, E.A. y Elliot, W.H. (1969), *J. Biol. Chem.*, 244, 60.
- Jacob, F. y Monod, J. (1961) *J. Molec. Biol.* 3, 318.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J. y Brent, P. (1970) *J. Bacteriol.* 102, 398.
- Jayaraman, J., Padmanaban, G., Malathi, K., Sarma, P.S. (1971) *Biochem. J.*, 121, 531.
- Jones, O.T.G. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 671.
- Jones, O.T.G. (1968 a) en "Porphyrins and Related Compounds", Ed. Godwin, T.W. New York: Academic Press, p. 131.
- Jones, O.T.G. (1968 b) *Biochem. J.* 107, 113.
- Jones, M. S., Jones, O.T.G. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 977.
- Jones, M. S. y Jones O.T.G. (1970) *Biochem. J.*, 119, 453.
- Kauffman, S. (1951) en "Phosphorous Metabolism", Ed. Mc Elredy W.D. y Glass, B; vol. 5; Baltimore, U.S.A., p. 370.
- Kauffman, S. y Alivisatos, S.G. (1955), *J. Biol. Chem.* 216, 141.
- Kauffman, S., Gelbarg, G., Cori, O. y Ochoa, S. (1953) *J. Biol. Chem.* 203, 860.
- Keilin, D. y Hartree, E.F. (1951) *Biochem. J.*, 49, 88.
- Kennard, A. (1953) *Nature*, 171, 876.
- Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. y Shemin, D. (1958) *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kikuchi, G., Shemin, D. y Bachman, B.J. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, 28, 219.
- Klein, J. R. (1959) *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 101, 6.
- Knorr, B. (1886) *Liebigs. Ann.* 236, 240.
- Komai, H. y Heilands, J. B. (1966) *Science*, 153, 571; (1969) *Archs. Biochem. Biophys.* 124, 456
- Komai, H. y Heilands, J. B. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 171, 311.
- Koshland, D.E. (1963) *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.* 28, 477.
- Koshland, D.E. (1964) *Federation Proc.* 23, 719.
- Kowalski, E., Daniewicz, A.M. y Scot, Z. (1957) *Bull. Acad. Polon. Sci.* 5, 223.
- Krebs, H. A. y Lowenstein, J. M. (1960) en *Metabolic Pathway*, Vol. I, Ed. Greenberg, D.M.; New York and London; Academic Press, p. 129.
- Krishnan, S., Padmanaban, G. y Sarma, P.S. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 333.

- Krueger, R.C., Helnick, I. y Klein, J. R. (1956) Arch. Biochem. Biophys. 64, 302.
- Labbe, P., Holland, C. y Chaix, P. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 159, 527.
- Labbe, R.F. (1959) Biochim. Biophys. Acta, 31, 589.
- Labbe, R.F. y Hubbard, N. (1960) Biochim. Biophys. Acta, 41, 185.
- Labbe, R.F. y Hubbard, N. (1961) Biochim. Biophys. Acta, 52, 130.
- Labbe, R.F., Kurumada, T. y Onisawa, J. (1965) Biochim. Biophys. Acta, 111, 100.
- Labbe, R.F., Hubbard, N. y Caughey, W.P. (1963) Biochemistry, 2, 372.
- Lartillot, S. y Baron C. (1966) Bull. Soc. Chim. Franc. 12, 3792.
- Lartillot, S. y Baron C. (1967) Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 81.
- Lascelles, J. (1956) Biochem. J. 62, 78.
- Lascelles, J. (1957) Biochem. J. 66, 65.
- Lascelles, J. (1959) Biochem. J. 72, 508.
- Lascelles, J. (1960) J. Gen. Microb. 23, 487.
- Lascelles, J. (1964) en "Tetrapyrrol biosynthesis & its regulation", Benjamin, W.A. Inc. New York & Amsterdam.
- Lascelles, J., Ho, Y. K. y Rittenberg, B. (1969) Ann. N. Y. Acad. Sci., 165, 305.
- Laver, W.G., Neuberger, A. y Scott, J.J. (1959 a) J. Chem. Soc., 1474.
- Laver, W.G., Neuberger, A. y Scott, J.J. (1959 b) J. Chem. Soc., 1483.
- Laver, W.G., Neuberger, A. y Udenfriend, A. (1958), Biochem. J., 70, 4.
- Lemberg, R. y Legge, J. W. (1949) en "Hematin Compounds and Bile Pigments", Interscience Publishers, Inc. New York.
- Lessie, T.G. y Siström W.R. (1964) Biochim. Biophys. Acta, 86, 250.
- Levin, E.Y. y Coleman, D.L. (1967) J. Biol. Chem., 242, 4248.
- Lichtman, H.C. y Feldman, F. (1963) J. Clin. Invest. 42, 830.
- Lineweaver, H. y Burk, D. (1934) J. Am. Soc., 55, 558.
- Lockwood, W.H. y Benson, A. (1960) Biochem. J. 75, 372.
- Lockwood, W.H. y Rimington, C. (1957) Biochem. J., 67, 832.
- London, I.M., Shemin, D. y Rittenberg, D. (1950) J. Biol. Chem., 187, 749.
- Lovry, O.H., Rosebrough, N.W., Farr, A. L. y Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
- Llambías, E.B.C. (1971) "Investigaciones sobre la conversión enzimática del Porfobilinógeno en Uroporfirinógenos". Tesis, Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A.

- Llambías, E.B.C. y Batlle, A.M. del C. (1970 a) *Febs Letters*, 6, 285.
- Llambías, E.B.C. y Batlle, A. M. del C. (1970 b) *Biochim. Biophys. Acta*, 220, 552.
- Llambías, E. B. C. y Batlle, A. M. del C. (1971 a) *Biochem. J.* 121, 327.
- Llambías, E. B. C. y Batlle, A. M. del C. (1971 b) *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 180.
- Mac Donald, D. L. y Mac Donald, S. F. (1955) *Can. J. Chem.* 33, 573.
- Mac Donald, S.F. y Michl, K. H. (1956) en *CIBA Foundation Symposium Porphyrin Biosynthesis and Metabolism*, Ed. Wolstenholme G.E. W. y Miller, E.C.P.: London, J. and A. Churchill Ltd. p. 285.
- Mac Donald, S.F. y Michl, K.H. (1956) *Can. J. Chem.* 34, 1768.
- Mac Donald, S.F. y Stedman, R. J. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* 75, 3040.
- Mac Donald, S.F. y Stedman, R. J. (1954) *Can. J. Chem.* 32, 896.
- Marei, A.A. y Raphael, R.A. (1958) *J. Chem. Soc.* 2624.
- Margoliash, E. (1961) *Ann. Rev. Biochem.* 30, 549.
- Marks, G. S. (1962) *Ann. Repts.* 59, 385.
- Marriot, J., Neuberger, A. y Tait, G.H. (1969) *Biochem. J.* 111, 385.
- Marriot, J., Neuberger, A. y Tait, G.H. (1970) *Biochem. J.* 117, 809.
- Marver, H. S., Collins, A., Tschudy, D. P. y Rechcigh, M. (1966) *J. Biol. Chem.* 241, 4323.
- Marver, H. S., Tschudy, D.P., Perlroth, M. y Collins, A. (1966), *J. Biol. Chem.* 241, 2803.
- Muthukrishnan, S., Padmanaban, G. y Sarma, P. S. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, 31, 333.
- Muthukrishnan, S., Padmanaban, G. y Sarma, P. S. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 4241.
- Mauzerall, D. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* 82, 2605.
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1956) *J. Biol. Chem.* 219, 435.
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1958) *J. Biol. Chem.*, 232, 1141.
- Mazanowska, A. M., Neuberger, A. y Tait, G.H. (1966) *Biochem. J.* 98, 117
- Mc Swiney, R.C., Nicholas, R.E.H. y Prunty, F.T.G. (1950) *Biochem. J.* 46, 147.
- Menon, A. y Shemin, D. (1967) *Archs. Biochem. Biophys.* 121, 304.
- Mikaye, S. y Sugimura, T. (1968) *J. Bacteriol.* 96, 116.

- Minakami, S. (1958) *J. Biochem. (Tokyo)* 45, 833.
- Minakami, S., Yoneyama, Y. y Yohikawa, H. (1958) *Biochim. Biophys. Acta*, 29, 447.
- Mitta, A.E.A., Ferramola, A.M., Sancovich, H. A. y Grinstein, M. (1967), *J. Labell. Compounds*, III, 20.
- Monod, J., Changeux, J. P. y Jacob, F. (1963) *J. Mol. Biol.* 6, 306.
- Monod, J., Wyman, J. y Changeux, J. P. (1965) *J. Molec. Biol.*, 12, 88.
- Moore, D. J. y Labbe, R. F. (1964) *Clin. Chem.* 10, 1105.
- Moore, M. R., Beattie, A.D., Thompson, G.G. y Goldberg, A. (1971) *Clin. Sci.* 40, 81.
- Mori, M. y Sano, S. (1968) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 32, 610.
- Moyed, H. S. y Umbarger, H. E. (1962) *Physiol. Rev.* 42, 444.
- Muir, H. H. y Neuberger, A. (1949) *Biochem. J.* 45, XXXIV.
- Muir, H. H. y Neuberger, A. (1950) *Biochem. J.* 47, 97.
- Nacht, S., San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1970) *Clin. Chim. Acta*, 27, 445.
- Nakao, K., Wada, O. y Jano, Y. (1968) *Clin. Chim. Acta* 19, 319.
- Nandi, D.L. (1971) *Archiv. Biochem. Biophys.* 142, 157.
- Nandi, D.L., Baker-Cohen, K. F. y Shemin, D. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1224.
- Nandi, D. L. y Shemin, D. (1965) *Federation Proc.* 24, 153.
- Nandi, D. L. y Shemin, D. (1968a) *J. Biol. Chem.* 243, 1231.
- Nandi, D. L. y Shemin, D. (1968 b) *J. Biol. Chem.* 243, 1236.
- Nandi, D. L. y Waygood, E. R. (1963) *Can. J. Biochem.* 43, 1605.
- Nandi, D. L. y Waygood, E.R. (1967) *Can. J. Biochem.* 45, 327.
- Narisawa, K. y Kikuchi, G. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, 99, 580.
- Nemeth, A.H., Russell, G.S. y Shemin, D. (1957) *J. Biol. Chem.* 227, 415.
- Nenky, Piloty, Marchlewski, Küster, Willstatter (Willstatter, R., 1920, en *Über Pflanzenfarbstoffe*, 1-12, Nobelstiftelsen, Stockholm, 1920; citado por Granick, 1951).
- Neuberger, A. (1961) *Biochem. J.*, 78, 1.
- Neuberger, A. y Scott, J.J. (1953) *Nature*, 172, 1093.
- Neuberger, A. y Scott, J.J. (1954) *J. Chem. Soc.* 1820.

- Neuberger, A.J., Scott, J.J. (1956) *Biochem. J.* 64, 137.
- Neve, R.A., Labbe, R.F. y Aldrich, R.A. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 691.
- Nishida, G. y Labbe, R.F. (1959) *Biochim. Biophys. Acta*, 31, 519.
- Onisawa, J. y Labbe, R.F. (1962) *Biochim. Biophys. Acta*, 56, 618.
- Organic Syntheses* (1953) Ed. Chapman and Hall, London, 33, p. 20
- Origenes, M., Lester, E.L. y Labbe, R.F. (1961) *Cancer Research*, 21, 1430.
- Oryama, H., Sugita, Y., Yoneyama, Y. y Yoshikawa, H. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 413.
- Padmanaban, G., Muthukrishnan, S. y Sarma, P.S. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 141, 190.
- Palmer, J. H. y Wedding, R.T. (1966) *Biochim. Biophys. Acta*, 113, 167.
- Pawelkiewicz, J., Zodruck, (1956) *Acta Biochim. Polon.* 3, 225.
- Pichat, L. y Herbert, M. (1957) *Bull. Soc. Chim. Franc.* 673.
- Pichat, L., Hucleux, M. y Herbert, M. (1956) *Bull. Soc. Chim. Franc.*, 1750.
- Pichat, L., Loheac, C. y Herbert, M. (1966) *Bull. Soc. Chim. Franc.* 3268.
- Plusec, J. y Bogorad, L. (1970) *Biochemistry*, 9, 4736.
- Porra, R.J. y Falk, J. E. (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5, 179.
- Porra, R. J. y Falk, J. E. (1964) *Biochem. J.* 90, 69.
- Porra, R.J. y Irwing, E.A. (1970) *Biochem. J.* 116, 428.
- Porra, R.J. y Jones, O.T.G. (1963) *Biochem. J.*, 87, 186.
- Porra, R.J. y Lascelles, J. (1968) *Biochem. J.* 108, 343.
- Porra, R.J., Mitols, Y. S., Labbe, R.F. y Newton, N.A. (1967) *Biochem. J.* 104, 321.
- Radin, M. S., Rittenberg, D. y Shemin, D. (1950) *J. Biol. Chem.* 184, 745.
- Rao, M., Satyanarayana, R., Padmanaban, G, Muthukrishnan, S. y Sarma, P.S, (1970) *Indian J. Biochem* 7 132.
- Raymond, S. y Weintraub, L. (1959) *Science*, 130, 711.
- Rimington, C. (1952) *Acta Med. Scand.*, 143, 117.
- Rimington, C. (1955) en *CIBA Foundation Symposium, Porphyrin Biosynthesis and Metabolism*, Ed. Weolstenholme, G.E.W. y Miller, E.C.P.: Lond. J. and A. Churchill Ltd. p. 300.

- Rimington, C. (1957) A. Rev. Biochem. 26, 561.
- Rimington, C. (1959) Brit. Med. Bull. 15, 19.
- Rimington, C. (1966) Acta Med. Scand. 179, supp. 445, p. 11.
- Rimington, C. y Booiij, H. L. (1957) Biochem. J. 65, 3 p.
- Rimington, C. y Miles, P.A. (1959) Biochem. J., 50, 202.
- Rimington, C., y Tooth, S.E. (1961) J. Biochem. Tokyo, 49, 456.
- Romeo, G. y Levin, E. (1971), Biochim. Biophys. Acta, 230, 330.
- Rubino, G.F., Teso, G. y Rosetti, L. (1960) Acta Haematol. 24, 300.
- Russell, C.S. y Coleman, D.L. (1963) Genetics, 48, 1033.
- Sachs, F. (1898) Ber. 31, 3232.
- Sachs, P. (1921) Klin. Wochenscher 10, 1123.
- Sakami, W., Evans, W.E. y Gurin, S. (1947) J. Ann. Chem. Soc. 69, 1110.
- Sanadi, D.R., Gibson, D.M., Ayengar, P. y Jacob, M. (1956), J. Biol. Chem. 218, 505.
- Sancovich, H.A., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1969a) Biochim. Biophys. Acta, 191, 130.
- Sancovich, H.A., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1969 b) Febs Letters, 3, 223.
- Sancovich, H.A., Ferramola, A.M., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1967) Anales Asoc. Quim. Arg. 55, 279.
- Sancovich, H. A., Ferramola, A.M., Batlle, A.M. del C. y Grinstein, M. (1970), en "Methods in Enzymology", Vol. XVII, Ed. Tabor, H. y Tabor, C. W.; New York y London; Academic Press, p. 220.
- San Martín de Viale, L.C. y Grinstein, M. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 153, 79.
- Sano, S. (1958) Acta Haematol. Japon, 21, 377.
- Sano, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. y Spanick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Sawyer, E. y Smith, R.A. (1958) Bacteriol. Proc. Soc. Ann. Bacteriologists, 111.
- Schmid, R. y Shemin, D. (1955), J. Am. Chem. Soc. 77, 506.
- Schmid, R., Schwartz, S. y Watson, C.J. (1954) Arch. Internal. Med. 93, 167

- Schneider, H.A.W. (1970) Z. Pflanzenphysiol. 62, 328.
- Schneider, H.A.W. (1971) Phytochem. 10, 319.
- Schneider, H.C. y Hogeboom, G.H. (1950) J. Biol. Chem. 183, 123.
- Schulman, M.P. (1955) Federation Proc. 14, 277.
- Schulman, M. P. y Richert, D.A. (1957) J. Biol. Chem. 226, 181.
- Schwartz, H. C., Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M. (1957), Clin. Research Soc. 5, 29.
- Schwartz, H.C., Cartwright, G.E., Smith, E.L. y Wintrobe, M.M. (1959) Blood, 14, 468.
- Schwartz, H.C., Hill, R.L., Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M. (1959 a) Federation Proc. 18, 545.
- Schwartz, H.C., Hill, R.L., Cartwright, G.E. y Wintrobe, M.M. (1959 b) Biochim. Biophys. Acta, 36, 567.
- Shemin, D. (1955) en CIBA Foundation Symposium Porphyrin Biosynthesis and Metabolism; Ed. Wolstenholme, G.W. y Miller, E.C.P., London, J. and A. Churchill, Ltd. p. 4.
- Shemin, D. (1957) J. Biol. Chem. 225, 623.
- Shemin, D. (1962). "Methods in Enzymology", Ed. Colowick, S.P. y Kaplan, N.O.; New York, Academic Press, Vol. V, p. 883.
- Shemin, D. y Kumin, S. (1952 a) Federation Proc., 11, 285.
- Shemin, D. y Kumin, S. (1952 b) J. Biol. Chem. 198, 827.
- Shemin, D. y Nandi, D.L. (1967) Federation Proc. 26, 745.
- Shemin, D. y Rittenberg, D. (1945) J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946 a) J. Biol. Chem. 166, 621.
- Shemin, D. y Rittenberg, D. (1946 b) J. Biol. Chem. 166, 627.
- Shemin, D. y Russell, C.S. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- Shemin, D. y Rittenberg, J. (1951) J. Biol. Chem. 192, 315.
- Shemin, D., Abramsky, T. y Russell, C.S. (1954), J. Amer. Chem. Soc. 76, 1204.
- Shemin, D., Corcoran, J. W., Rosenblum, G. y Miller, J.M. (1956) Science, 124, 272.
- Shemin, D, London, I.M. y Rittenberg, D. (1948) J. Biol. Chem. 178, 799.
- Shemin, D. London, I.M., y Rittenberg, D. (1950) J. Biol. Chem., 183, 757.

- Shemin, D., Russell, C.S. y Abramsky, T. (1955) J. Biol. Chem. 215, 613.
- Shetty, A.S. y Miller, G.W. (1969 a) Biochem. J. 114, 331.
- Shetty, A.S. y Miller, G.W. (1969 b) Biochim. Biophys. Acta, 185, 458.
- Shuster, L. (1956) Biochem. J. 64, 101.
- Smithies, O. (1955) Biochem. J., 61, 629.
- Sparatore, F. (1960) Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 36, 144.
- Sparatore, F. y Cumming, W. (1963) Biochem. Prepn. 10, 6.
- Sparatore, F. y Mauzerall, D. (1960) J. Org. Chem. 25, 1073.
- Stain, J. A., Tschudy, D.P., Corcoran, P.L. y Collins, A. (1970), J. Biol. Chem. 245, 2213.
- Steer, B. I. y Gibbs, M. (1969 a) Plant. Physiol. 44, 775.
- Steer, B.T. y Gibbs, M. (1969 b) Plant. Physiol. 44, 781.
- Stevens, E. y Frydman, B. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 151, 429.
- Stevens, E., Frydman, R.B. y Frydman, B. (1969) Biochim. Biophys. Acta, 151, 496.
- Stobart, A.K., y Thomas, D.R. (1968), Phytochem. 7, 1313.
- Tait, G.H. (1968) en "Porphyrins and Related Compounds", Ed. Goodwin, T.W. Academic Press, New York, p. 19.
- Tait, G.H. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun., 37, 116.
- Tait, G.H., (1970) Biochem. J., 118, 288.
- Tancione, A., Tigier, H.A. y Grinstein, M. (1964) Biochem. Pharm. 13, 1005.
- Tigier, H. A., Batlle, A.M. del C. y Locascio, G.A. (1968), Biochim. Biophys. Acta, 151, 300.
- Tigier, H. A., Batlle, A.M. del C. y Locascio G.A. (1970) Enzymologia, 38, 43.
- Tomio, J. H. y Grinstein, M. (1968) European J. Biochem. 6, 80.
- Tomio, J. H., Tuzman, V y Grinstein, M. (1968), European J. Biochem., 6, 84.
- Tomio, J.H., García, R.C., San Martín de Viale, L. C. y Grinstein, M. (1970), Biochim. Biophys. Acta, 198, 353.
- Trutton, E. . (1963) Thin Layer Chromatography.
- Tschudy, D.P. y Collins, A. (1957a) Science, 126, 168.
- Tschudy, D.P. y Collins, A. (1957 b) Cancer Research, 17, 976.

- Tschudy, D.P. y Collins, A. (1959) *J. Org. Chem.*, 24, 556.
- Tschudy, D.P., Collins, A., Caughey, W.S. y Kleinspehn, G.G. (1960) *Science*, 131, 1380.
- Tschudy, D.P., Rose, J., Hellman, E., Collins, A. y Reichcigl, M. (1962) *Federation Proc.*, 21, 400.
- Tuboi, S., Kim, H. J. y Kikuchi, G. (1969), *Archiv. Biochem. Biophys.*, 130, 92.
- Urata, G. y Granick, S. (1963) *J. Biol. Chem.*, 238, 811.
- Urata, G y Kimura, H. (1960) *J. Biochem.* 47, 150.
- Van Heyninga, S. y Shemin, D. (1971), *Biochemistry*, 10, 4576.
- Vergnano, C., Cartasegna, C. y Bonsignore, D. (1968) *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.*, 44, 692.
- Vogel, A.I. (1951) en "Practical Organic Chemistry", A.I. Vogel, Longmans, Green and Co. London, 2a.edic., p. 731.
- Vogel, W., Richert, B.Q., Pixly, B.Q. y Schulman, M.P. (1960) *J. Biol. Chem.* 235, 1769.
- Waldeström, J. y Vahlquist, B. (1939) *Z. Physiol. Chem.*, 260, 189.
- Walerych, M. (1963) *Acta Biochim. Polon.*, 10, 243.
- Warburg, O. y Christian, W. (1941) *Biochem. Z.*, 310, 384.
- Watson, C.J., Berg, M. H., Hawkinson, J. E. y Bossensaier, I. (1960) *Clin. Chem.* 6, 71.
- Westall, R.G. (1952) *Nature*, 170, 614.
- Wider de Miñra, E.A., Batlle, A.M. del C. y Tigier, H. A. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 235, 511.
- Wildy, J., Nizet, A. y Benson, A. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, 54, 414.
- Wilson, H.L., Iodice, A.A., Schulman, M. P. y Richert, D.A. (1959), *Federation Proc.* 18, 352.
- Wittenberg, J. y Shemin, D. (1949) *J. Biol. Chem.* 178, 47.
- Wittenberg, J. y Shemin, D. (1950) *J. Biol. Chem.*, 185, 193.
- Woinhouse y Moses Floyd (1954) *J. Biol. Chem.*, 158, 411.
- Wynn, R. M. y Corwin, A. H. J. (1950) *J. Org. Chem.*, 15, 203.
- Yamasaki, H. y Moriyama (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 698.

Yoneyama, Y., Ohyama, H., Sugita, Y. y Yoshikawa, H. (1962) Biochim. Biophys. Acta, 62, 267.

Yoshikawa, H. y Yoneyama, H. (1964) en "Iron Metabolism", F. Gross (Ed.) Berlin, Spinger-Verlang, p. 24.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'M. Yoneyama', written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Mrs. María Teusmala', written in a cursive style and underlined.

INDICE

INTRODUCCION	1
Porfirinas en la Naturaleza	1
Química de las porfirinas. Propiedades	1
Biosíntesis del Hemo	4
Precursores del Hemo y enzimas involucradas en su biosíntesis. Glicocola y Succinil CoA como precursores	8
Porfobilinógeno y Acido aminolevúlico como precursores	11
Formación del ácido delta amino levúlico. ALA sintetasa	12
Ciclo de la glicina-succinato. Ciclo de Shemin	17
Formación del Porfobilinógeno. ALA-Dehidrasa	17
Formación del Urógeno III. Porfobilinógeno deaminasa. Uroporfirinógeno III Cosintetasa	32
Formación del Coprógeno III. Uroporfirinógeno Decarboxilasa	37
Formación de Protoporfirina IX. Coprogenasa	39
Formación del Hemo. Ferroquelatasa	41
PROPOSITOS	44
PARTE EXPERIMENTAL	45
MATERIALES	45
METODOS	47
Preparación de los intermediarios usados en la síntesis del clorhidrato del ALA 4^{14}C	47
Identificación y determinación de ALA	48
Identificación y determinación de PBG	51
Autorradiografías	53
Radiocromatografías	53
Medición de la Radioactividad	53
Cromatografías en columnas	54
Determinación de pesos moleculares	55
Determinación de la actividad enzimática de la ALA-D	55
Determinación de proteínas	56

Efecto de la temperatura sobre la ALA-D. 87

Cofactores 87

Efecto de agentes quelantes 91

Efecto de reactivos de grupos SH 93

Acción de los inhibidores de grupos SH 93

Número y reactividad de los grupos SH de la ALA-D 97

Efecto de cationes y aniones sobre la ALA-D 106

Dependencia de la concentración de sustrato 109

Efectos de otros aditivos sobre la actividad de ALA-D 113

DISCUSION Y CONCLUSIONES 116

RESUMEN 126

BIBLIOGRAFIA 128