

Tesis de Posgrado

Estudios sobre la porfobilinógeno deaminasa y la uroporfirinogeno III cosintasa

Feinstein, Lidia Graciela

1980

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Feinstein, Lidia Graciela. (1980). Estudios sobre la porfobilinógeno deaminasa y la uroporfirinogeno III cosintasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1639_Feinstein.pdf

Cita tipo Chicago:

Feinstein, Lidia Graciela. "Estudios sobre la porfobilinógeno deaminasa y la uroporfirinogeno III cosintasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1980. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1639_Feinstein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Tesis 1639
ej.2

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO
DEAMINASA Y LA UROPORFIRINOGENO III
COSINTASA

Autor: Lidia Graciela Feinstein

Director: Prof. Dra. Rosalía Bryks de Frydman

Lugar de Trabajo: Orientación Fitoquímica, Departamento de Bioquímica
Vegetal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1980

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIOS SOBRE LA PORFOBILINOGENO
DEAMINASA Y LA UROPORFIRINOGENO III
COSINTASA

1639

Ej=2

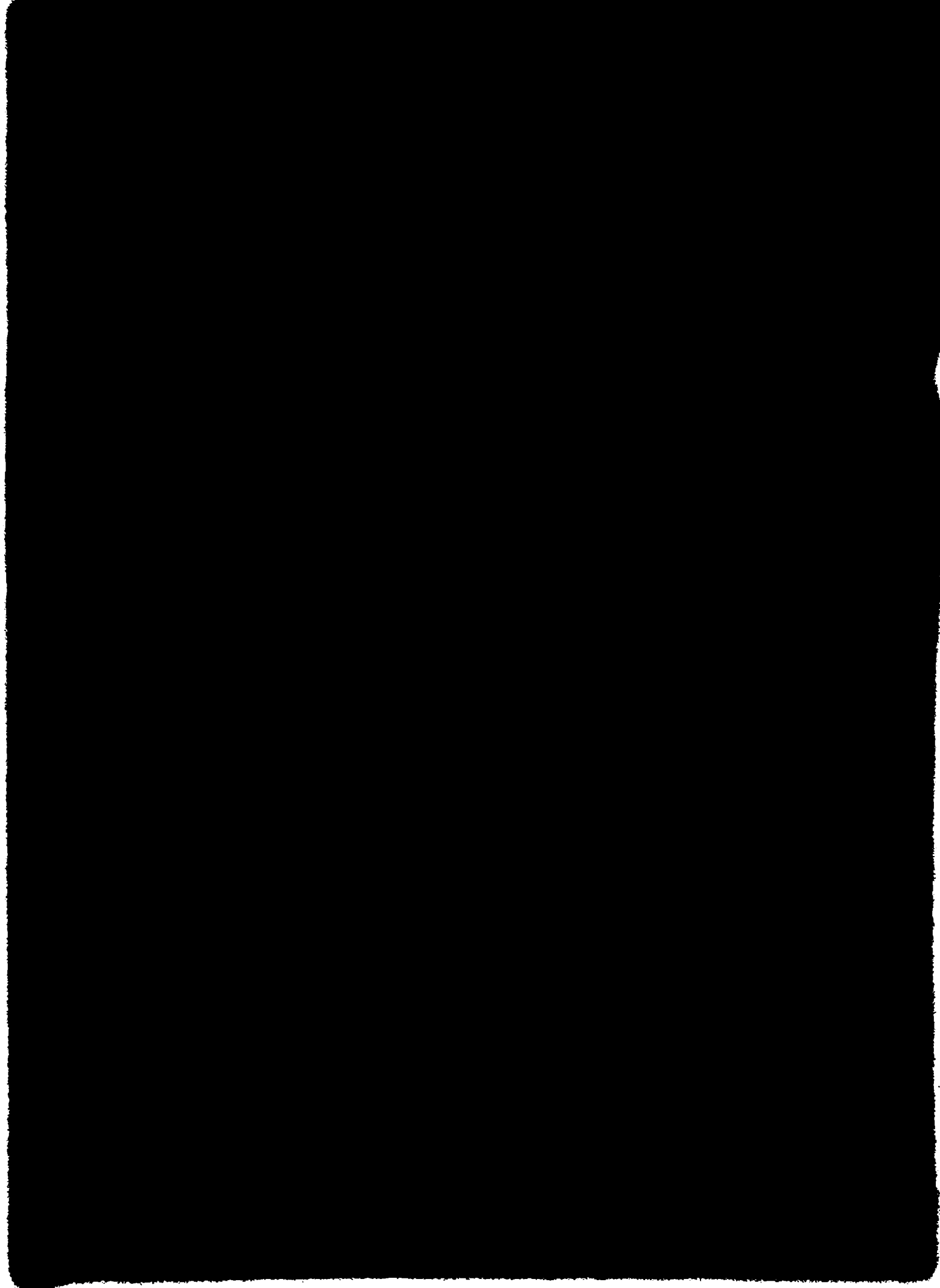
Autor: Lidia Graciela Feinstein

Director: Prof. Dra. Rosalía Bryks de Frydman

Lugar de Trabajo: Orientación Fitoquímica, Departamento de Bioquímica
Vegetal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA

Tesis presentada para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

1980



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosalía Frydman por las valiosas enseñanzas y consejos que me brindó durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Benjamín Frydman por haberme dado la oportunidad de trabajar en la Orientación Fitoquímica y por el aporte de sus ideas y enseñanzas prácticas.

Al Dr. Cánepa del Instituto de Investigaciones Hematológicas por su generosa colaboración.

A mis compañeros de laboratorio por su colaboración y afectuoso estímulo.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica por haberme permitido realizar este trabajo en ella.

A la SEC y T por haber concedido subsidios que ayudaron a la realización de este trabajo.

Al Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos por el aporte económico al laboratorio.

INDICE

pág.

CAPITULO I - INTRODUCCION

Rol de las porfirinas en diversos procesos biológicos.....	5
Distribución natural de las porfirinas.....	8
Camino metabólico de las porfirinas.....	12
Mecanismo de la biosíntesis del uroporfirinógeno.....	38

CAPITULO II - MATERIALES Y METODOS

Materiales.....	53
Preparación de las enzimas de germen de trigo.....	53
Preparación de las enzimas de eritrocitos humanos.....	58
Activación de Sepharosa 4B y unión a proteínas.....	59
Activación de Sepharosa 4B y unión a azul dextrano.....	59
Ensayos de actividad enzimática.....	60
Succinilación de enzimas.....	61
Determinaciones y preparados varios.....	61
Medición de actividad enzimática en discos de gel de poliacrilamida.....	61
Fotooxidación.....	62

CAPITULO III - RESULTADOS

Purificación y propiedades de la porfobilinógeno deaminasa de eritrocitos humanos.....	64
Efecto de los análogos del porfobilinógeno sobre la deaminasa.	73
Efecto de inhibidores.....	75

Modificaciones de la PBG deaminasa.....	76
Purificación y propiedades de la uroporfirinógeno III cosin- tasa de eritrocitos humanos.....	86
Efecto de la concentración de porfobilinógeno sobre la forma- ción del uroporfirinógeno III.....	95
Velocidad de formación de uroporfirinógeno III.....	97
Efecto del amonio y de la hidroxilamina sobre la interacción deaminasa-cosintasa.....	97
Efecto de los reactivos sulfhidrúlicos.....	100
Efecto de las oxidaciones sobre la actividad de cosintasa.....	102
Peso molecular de la cosintasa.....	102
Interacción de la cosintasa con el PBG y con la deaminasa.....	103
 CAPITULO IV - RESUMEN Y CONCLUSIONES.....	 110
 BIBLIOGRAFIA.....	 114

ABREVIATURAS

A

ALA

DEAE-celulosa

EDTA

min

nmoles

PBG

umoles

uro I

uro III

DMB

absorbancia

ácido 5-aminolevulínico

dietilaminoetilcelulosa

etilendiamino tetraacetato

minutos

nanomoles

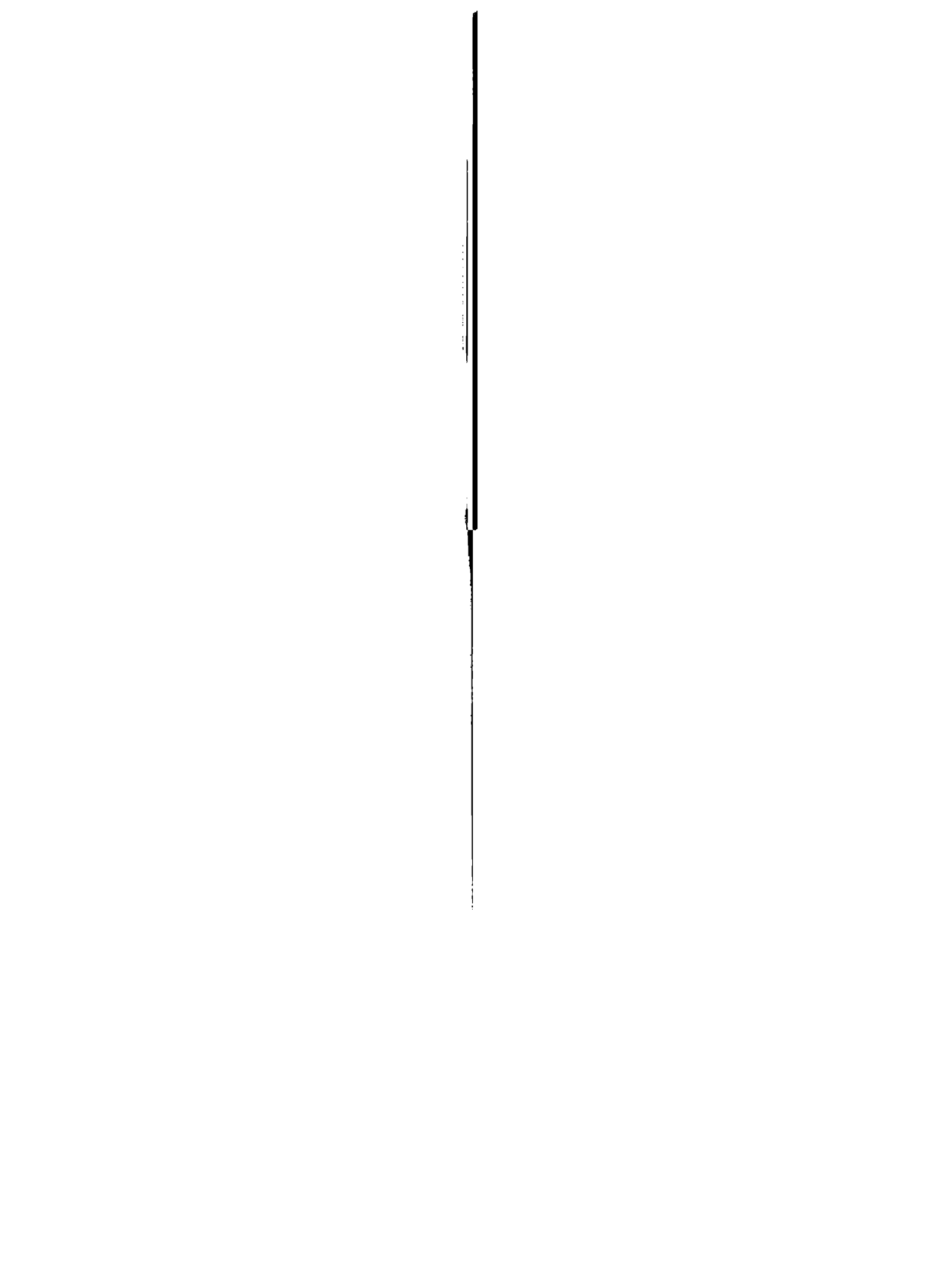
porfobilinógeno

micromoles

uroporfirinógeno I

uroporfirinógeno III

dimetilbenzoimidazol



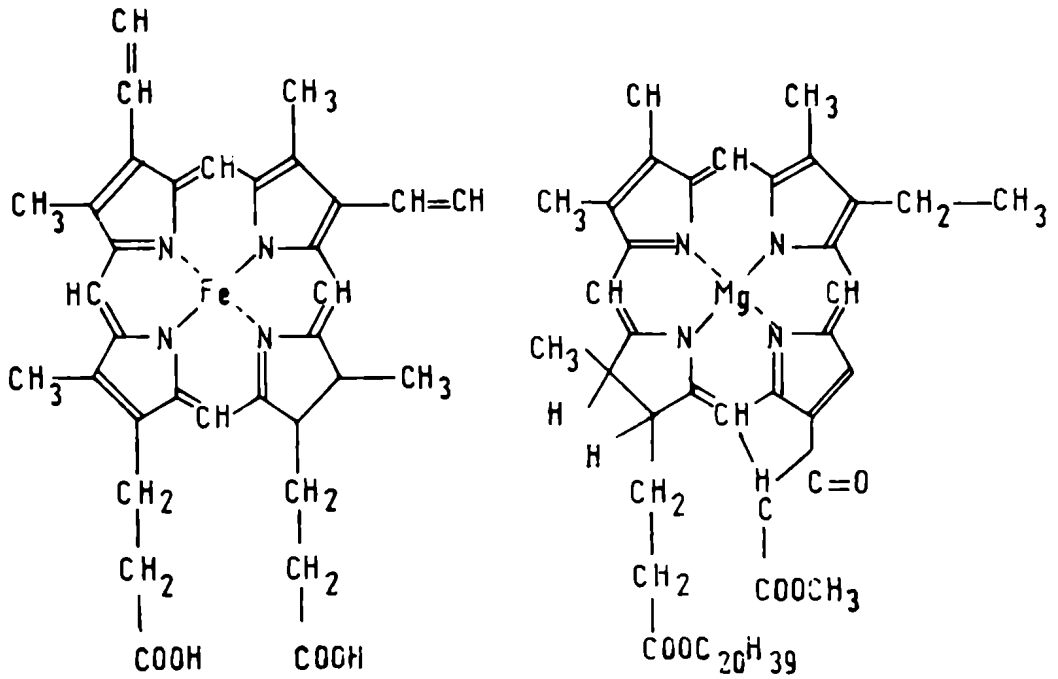
ROL DE LAS PORFIRINAS EN DIVERSOS PROCESOS BIOLÓGICOS

La captación biológica de la energía solar y su transformación en energía química está mediada por las clorofilas y por los citocromos. La clorofila a es la porfirina más abundante en las plantas verdes. Se la encuentra junto con cantidades más reducidas de clorofila b en las plantas superiores y de clorofilas b, c, d, o e en las algas. Los citocromos funcionan en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria. El citocromo P-450, hemoproteína ampliamente distribuida en el reino animal y, dentro del reino vegetal, encontrada en algunas leguminosas, está involucrado en mecanismos de desintoxicación por oxigenasas. La hemoglobina, transportador de oxígeno en la sangre, la catalasa, y la peroxidasa son hemoproteínas de gran importancia en el metabolismo. Por último, la vitamina B₁₂ fue conocida primero por ser un factor esencial en la nutrición y, más recientemente, por su función como coenzima en reacciones de metilación.

Todas estas moléculas tienen en común su estructura, derivada del anillo pirrónico; son tetrapirroles modificados. (Figura 1)

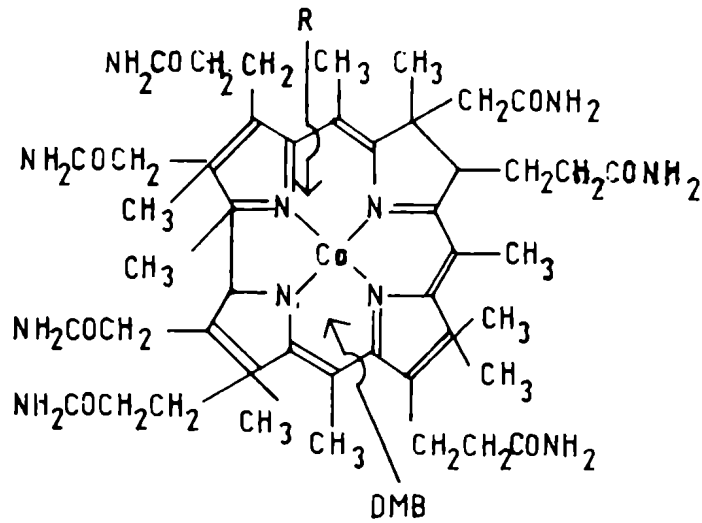
Granick (1948) comprobó experimentalmente que la clorofila y el hemo (grupo prostético de las hemoproteínas) tienen un camino metabólico común. Burnham (1966 y 1969) sugirió que las cobalaminas comparten el camino metabólico del hemo y de las clorofilas más allá de la etapa del porfobilinógeno. Ian Scott y colaboradores (1972 y 1975)

FIGURA 1



hemo

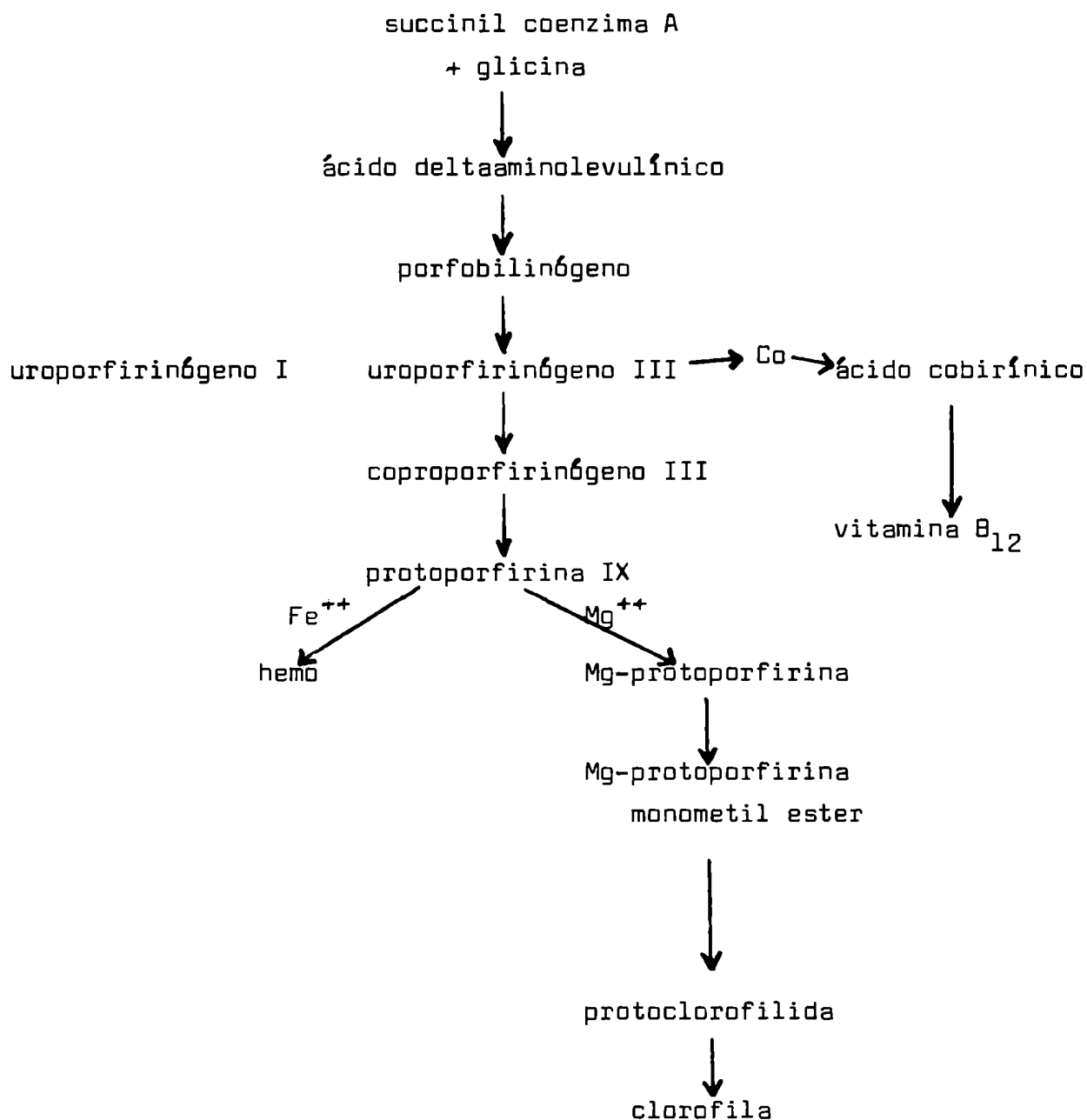
clorofila a



vitamina B₁₂

consiguieron demostrar la incorporación de uroporfirinógeno marcado con ^{14}C en un sistema libre de células de Propionebacterium shermanii, que sintetiza vitamina B_{12} .

Figura 2



La figura 2 esquematiza las tres ramas del camino metabólico de las porfirinas: la rama del hierro, que da origen al hemo, la rama del magnesio, que da origen a las clorofilas, y la rama del cobalto, que da origen a la vitamina B₁₂.

Como en el caso de otras moléculas orgánicas de gran tamaño, las porfirinas se forman a partir de moléculas muy simples. La compleja estructura final se produce por una autopolimerización secuencial e irreversible de cada nuevo intermediario formado. Los sucesivos compuestos sintetizados son cada vez más grandes y complejos, hasta dar origen a una gran molécula con muchos sitios reactivos, en los cuales tienen lugar reacciones secundarias, con poco o ningún gasto de energía.

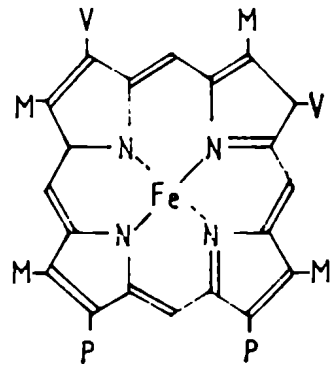
DISTRIBUCION NATURAL DE LAS PORFIRINAS

Las hemoproteínas y las clorofilas están ampliamente distribuidas en los sistemas vivos, y su importancia cuantitativa es grande. En contraste con la abundancia de estos productos finales de la biosíntesis de porfirinas, la aparición de porfirinas libres intermediarias del camino metabólico es rara y cuantitativamente escasa. Lemberg (1954) sugirió que esto se debería a que la producción de hemo es muy eficiente, no permitiendo, por lo tanto, la acumulación de intermediarios.

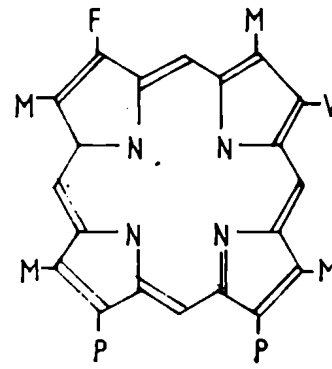
En invertebrados, donde se investigó sistemáticamente la presencia de porfirinas libres, se encontró que algunos grupos se caracterizan por la presencia de un tipo de porfirina libre en particular. Por ejemplo, la protoporfirina IX se encuentra en los celenterados y en los equinodermos, la coproporfirina III en los anélidos, y la uroporfirina I en los moluscos. Estas porfirinas libres pueden representar los vesti

FIGURA 3

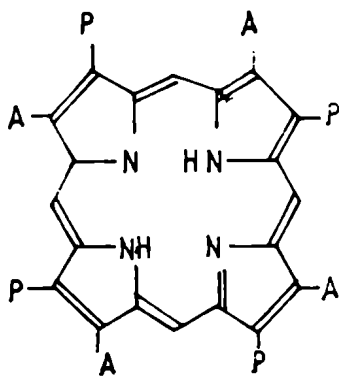
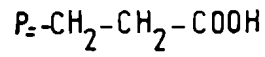
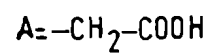
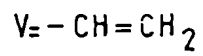
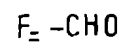
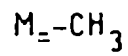
Algunos pigmentos encontrados en invertebrados



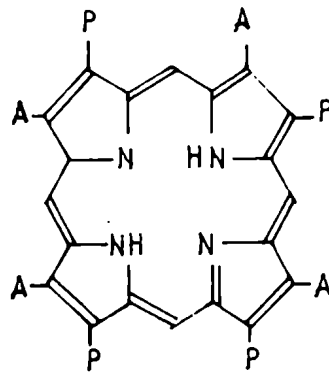
hemo



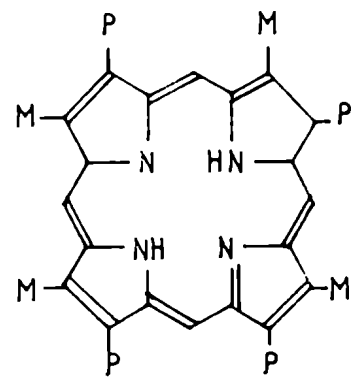
clorocruorina



uroporfirina I



uroporfirina III



coproporfirina III

gios de la biosíntesis de hemo en los filos nombrados. Algunos autores interpretan, en cambio, la existencia de estas porfirinas intermedias como un estado patológico homólogo de las enfermedades conocidas como porfirias en los mamíferos, en que la biosíntesis del hemo está bloqueada en alguno de sus pasos (Kennedy, 1975). Otros consideran que sería la evidencia de un metabolismo normal del hemo distinto al que se encuentra en animales superiores. Aún otros, (Mauzerall y Granick, 1958 a) sostienen que la acumulación de porfirina se debe a una limitación en la cantidad de decarboxilasas que decarboxilan uroporfirinógeno a coproporfirinógeno y no a una autooxidación de los porfirinógenos.

En el amplio y diversificado fílum de los moluscos, se ha registrado la presencia de cantidades apreciables de uroporfirina I. Dentro de este fílum, hay géneros en los cuales funciona como pigmento respiratorio la hemoglobina y otros en los cuales está ausente la hemoglobina y cuyo pigmento respiratorio es la hemocianina. Este último compuesto, a pesar de su nombre, no contiene hemo ni está relacionado con las porfirinas. (Figura 3). La presencia de uroporfirina I (que no es el intermediario natural del camino biosintético de las porfirinas) nótase en géneros de moluscos que no tienen hemoglobina, y en cambio tienen hemocianina. Este hecho podría indicar que estos organismos probablemente alguna vez hayan poseído un camino para la biosíntesis de hemo. Este en la actualidad ya no sería funcional por estar bloqueada la formación del uroporfirinógeno III, el verdadero intermediario en la biosíntesis de hemo. El porfobilinógeno es convertido en uroporfirinógeno I, y este se acumula en esos moluscos.

No sólo se encuentra uroporfirina I en moluscos. En las val-

vas de algunos moluscos, como Pteria, Pinctada, y Trochus, se encuentran además de uroporfirina I, coproporfirina, y, según algunos autores (Fischer y col. 1930, Fischer y col. 1931, Kennedy y Vevers, 1954) una porfirina pentacarboxílica. En una especie del género Haliotis se encuentra protoporfirina IX. Las porfirinas en los moluscos se encuentran localizadas en las valvas, y también en tegumentos y vísceras. Una característica notable de la presencia de porfirinas en los moluscos es que se las encuentra en especies marinas, raramente en especies acuáticas o terrestres.

En el fílum de los platelmintos se encuentran uroporfirinas y coproporfirinas. La planaria Dugesia dorotocephala tiene uroporfirinas y coproporfirinas libres. En la epidermis de Dugesia tigrina, Dugesia gonocephala y Cura foremanii se detectaron uroporfirinas. Phagocata gracilis, Phagocata iwanai, Phagocata virida y Bdellocephala brunea contienen coproporfirina. La aparición de coproporfirina en un género y uroporfirina en otro puede representar un avance evolutivo (Krugelis-Macrae, 1956), aunque es más probable que representen mutaciones que han bloqueado parcialmente la síntesis de hemo a distintos niveles, ya que todos estos organismos sintetizan citocromos.

En el fílum Anélidos, se encuentra con mucha frecuencia la coproporfirina III, trazas de coproporfirina I, uroporfirina III y raras veces porfirinas de tres y de cinco grupos carboxilo. En algunos poliquetos, por ejemplo Chaetopterus variopedatus se encuentra una mezcla de feoforbidas a y b, en esférulas verdes epiteliales cuya función es desconocida. En Nereis diversicolor se encontró coproporfirina III junto con biliverdina. Flabelligera affinis contiene coproporfirina y el quelato de cobre del feoforbido a: Considerando estos ejemplos, to-

dos géneros de poliquetos, surge el interrogante del porqué de la retención de un determinado pigmento y la eliminación de un pigmento muy relacionado. Entre los poliquetos, algunos géneros tienen hemoglobina y otros clorocruorina (tetrametil-4-vinil, 2-formil deuteroporfirina). (Figura 3). El género Serpula tiene hemoglobina y clorocruorina. En los oligoquetos, en Lumbricus terrestris se identificó protoporfirina IX, coproporfirina III y porfirina tricarbóxica. Igualmente de Allolobophora chlorotica se aisló protoporfirina IX, coproporfirina III, y una porfirina tricarbóxica. En una forma verde de esta especie se encontró una bilina con 4 grupos carboxilo similar a la turboglaucobilina (Kennedy, 1975). Entre las sanguijuelas se encontraron quince pigmentos, entre ellos la protoporfirina y la coproporfirina (isómero sin de terminar).

En equinodermos, se encontró protoporfirina IX libre en numerosas especies: Uraster rubens, Luidia ciliaris, Astropecten irregularis. En estos dos géneros también hay clorocruorina. Warburg (1932) sostuvo que la presencia de un grupo carbonilo en una cadena lateral (el grupo formilo de la clorocruorina) sería una característica primitiva.

El enigma de la distribución y funciones de las porfirinas en los invertebrados es motivo de enconada discusión entre los investigadores. Mangum y Dales (1965) sostienen que la presencia de porfirinas libres en invertebrados es normal, mientras que varios otros autores, como Kennedy (1975) insisten en que toda concentración excesiva de porfirina libre en un tejido es no fisiológica, y puede considerarse como un estado porfírico, es decir patológico. No obstante,

en la mayor parte de estos animales, especialmente en los marinos, la aparición de síntomas de porfiria semejantes a los que conocemos en el hombre, es evitada por su forma de vida y su anatomía. Es decir, que por vivir en un tubo, o en profundidades donde la intensidad de luz es baja, o por tener una valva en la cual las porfirinas libres pueden ser incorporadas, los invertebrados no manifiestan los síntomas que las porfirias producen en los vertebrados, y que dan como resultado la enfermedad y la muerte.

En el hombre y en algunos otros mamíferos, la presencia de porfirinas intermediarias de la biosíntesis del hemo está invariablemente asociada con defectos metabólicos congénitos o adquiridos que bloquean parcialmente esta biosíntesis, produciendo el grupo de enfermedades conocidas como porfirias.

CAMINO METABOLICO DE LAS PORFIRINAS

Los precursores de las porfirinas y el esquema general de la biosíntesis de éstas es conocido, así como también los mecanismos detallados de algunos pasos. Otros puntos, en cambio, como el mecanismo de la formación del isómero funcional de las porfirinas a partir del pirrol porfobilinógeno, el control de la síntesis de porfirinas y hemo, y posibles diferencias genéticas en cuanto al mecanismo de acción de algunas enzimas en diferentes células, no han sido aclarados aún.

El siguiente es un resumen de lo conocido hasta hoy sobre las reacciones enzimáticas que conducen a la biosíntesis del hemo y

de la clorofila. El estudio de una de estas reacciones, precisamente la polimerización del pirrol porfobilinógeno para dar el primer tetra pirrol cíclico, es el tema de la presente tesis.

Las reacciones iniciales, comunes a las tres ramas del camino metabólico de las porfirinas, comienzan con la condensación del aminoácido glicina con la succinil coenzima A, en presencia de fosfato de piridoxal y la enzima ALA sintetasa, para dar el ácido 5-aminolevulínico. Dos moléculas de éste se condensan para formar el porfobilinógeno. A su vez éste se autopolimeriza dando el uroporfirinógeno III, siempre que estén presentes la porfobilinógeno deaminasa y la uroporfirinógeno III cosintasa. (Figura 4). El producto de la reacción no es una porfirina, sino una hexahidroporfirina o porfirinógeno. Puesto que el porfobilinógeno tiene dos cadenas laterales distintas, hay cuatro isómeros posibles de uroporfirinógeno.

En el isómero I, formado por la porfobilinógeno deaminasa en ausencia de la cosintasa, las cuatro moléculas de porfobilinógeno se polimerizan en el mismo sentido. En el isómero III, uno de los monómeros de PBG está orientado en sentido inverso a los demás, de manera que hay dos cadenas propiónicas adyacentes y dos cadenas acéticas adyacentes. (Figura 5). Estos dos isómeros, el I y el III, son los únicos que se encuentran en la naturaleza, y el hemo, la clorofila y el anillo de corrina de la vitamina B₁₂ tienen una disposición del tipo III de sus cadenas laterales. El uroporfirinógeno III es el último intermediario común a la rama del magnesio, a la del hierro y a la del cobalto. La decarboxilación secuencial de los cuatro restos acéticos del uroporfirinógeno III por acción de la decarboxilasa produce copro-

FIGURA 4

Reacciones iniciales comunes a las tres ramas del camino metabólico

glicina + piridoxal-P + succinil Coa

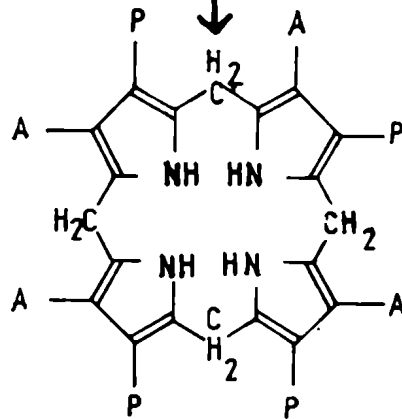
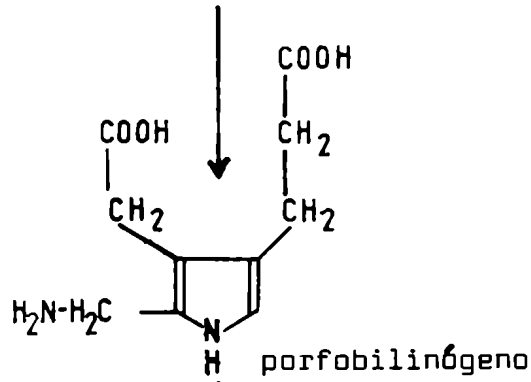
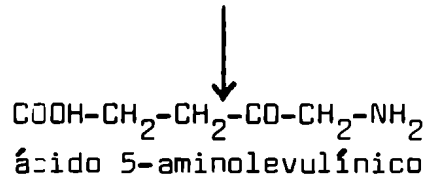
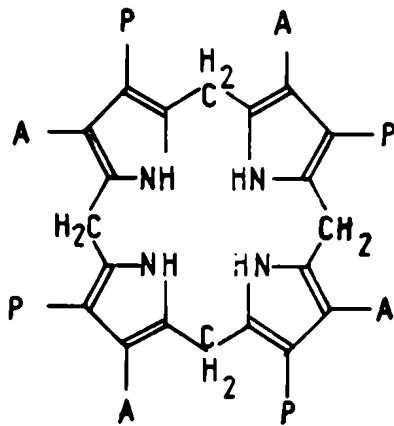
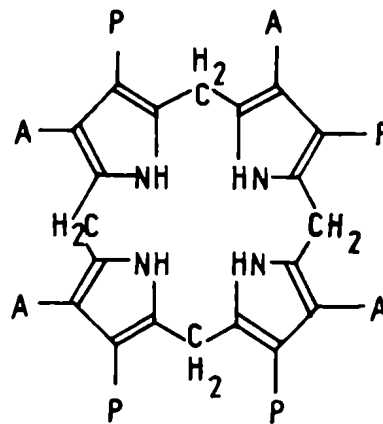


FIGURA 5

Uroporfirinógenos I y III



uroporfirinógeno I



uroporfirinógeno III

A = acético = -CH₂-COOH

P = propiónico = -CH₂-CH₂-COOH

porfirinógeno III. La coproporfirinógeno oxidasa cataliza la conversión de dos cadenas laterales de ácido propiónico a grupos vinilo; los dos grupos propiónicos restantes, que son los adyacentes entre sí, no son atacados. Este es el protoporfirinógeno IX, precursor común del hemo y de las clorofilas, que, por pérdida de 6 átomos de hidrógeno da la protoporfirina IX.

Todas estas reacciones en la biosíntesis de la protoporfirina IX han sido observadas en sistemas libres de células. La protoporfirina IX, al quelatarse con el hierro, da origen al hemo. La quelatación con magnesio, en cambio, determina una sucesión de pasos ulteriores, incluyendo la formación de un anillo de ciclopentanona y la reducción de uno o más anillos, que origina las clorofilas aclarados aún.* Entre estos últimos está el sistema enzimático dual que cataliza la formación del primer tetrapirrol en la biosíntesis, el uroporfirinógeno III.

El voluminoso trabajo realizado con las enzimas de este camino metabólico ha sido revisado por varios autores (Bogorad 1966 a, Granick 1967, Lascelles 1964).

Consideraremos brevemente los interrogantes que aún subsisten con respecto a las reacciones catalizadas y expondremos algunas propuestas sobre posibles mecanismos.

Formación de succinil coenzima A y de ácido 5-aminolevulínico (ALA)

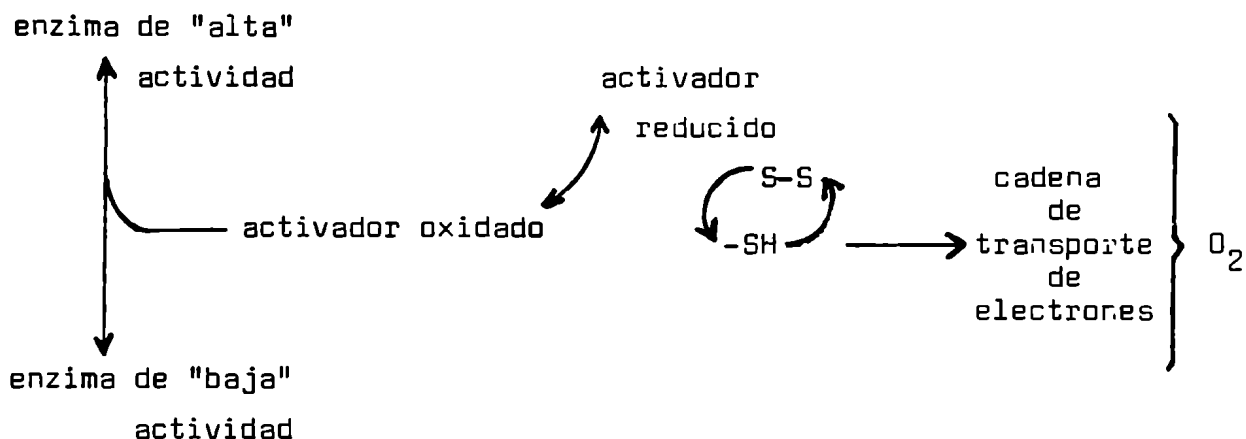
Los estudios de Shemin y colaboradores (1953) con precursores marcados demostraron que el ALA es el primer intermediario específico del camino metabólico de las porfirinas. Se comprobó que el ALA provenía de la condensación de glicina con succinil coenzima A. Se pudo aislar una enzima, la ALA sintetasa de eritrocitos de ave, de bacterias

* ver Erratas, al final.

fotosintéticas y de ratas tratadas con drogas inductoras de porfirias. Esta enzima, excepto en algunos casos aislados, no fue aislada de plantas superiores. El ácido 5-aminolevulínico es el precursor de este camino metabólico en todos los organismos estudiados, pero su biosíntesis sigue dos vías alternativas; una en animales, bacterias y algas y otra en plantas superiores. La ALA sintetasa es una enzima mitocondrial, así como son mitocondriales también las enzimas responsables de la formación de succinil Co-A. Es la enzima de velocidad limitante en el camino biosintético de las porfirinas y, además, es regulable por producto final de la biosíntesis (hemo), por producto de la reacción (ALA) y por un mecanismo de enzima activa \rightleftharpoons enzima inactiva. Se encontraron en Rhodopseudomonas spheroides dos fracciones con actividad de ALA sintetasa, ambas con un peso molecular de 100.000 ± 20.000 , y con constantes cinéticas similares (Tuboi y col., 1970) pero con diferente contenido en sulfhidrilos. Una de las isoenzimas de Rhodopseudomonas spheroides existía en una forma de "alta actividad" y la otra en una forma de "baja actividad". La activación de esta última tiene lugar ya sea por oxidación con oxígeno o por agentes oxidantes (Marriot y col. 1970), o por agregado de disulfuro junto con una fracción proteica. Los trabajos más recientes de este grupo presentan evidencias de la activación in vivo por un trisulfuro cuya concentración intracelular está relacionada con el estado de oxido-reducción de las células. El factor es inactivado por reducción a disulfuro, y es regenerado por un par sulfhidrilo-disulfuro dependiente de enzima, acoplado a la cadena de transporte de electrones.

FIGURA 6

Mecanismo propuesto para la activación de ALA sintetasa



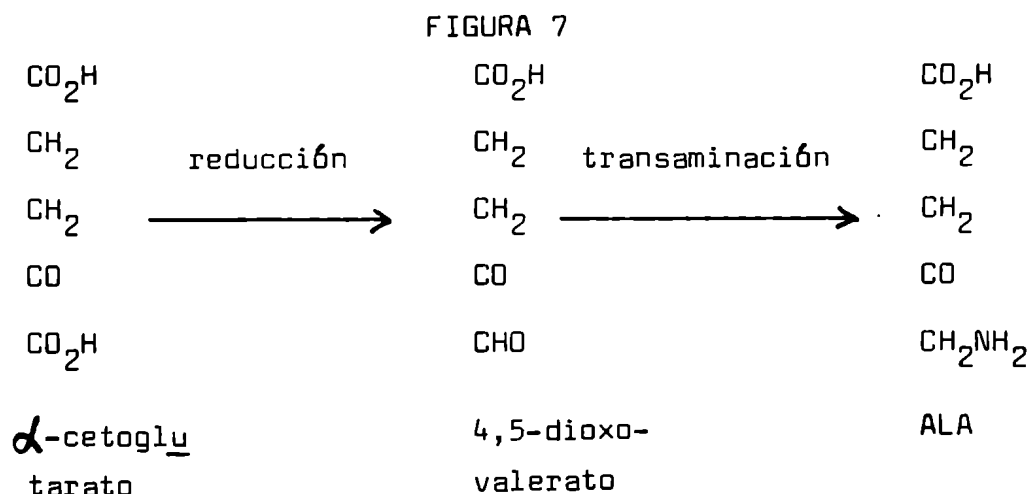
La ALA sintetasa tiene una especificidad absoluta para la glicina pero no para la succinil Co-A, ya que el éster metílico de la succinil Co-A es buen sustrato también.

Biosíntesis de ALA en plantas superiores

En experimentos realizados con ^{13}C glicina no se pudo detectar ninguna incorporación de este aminoácido en clorofila (B. F. Burnham, resultados no publicados). Cuando se trataron hojas etioladas de maíz y semillas de porotos con ácido levulínico se encontró que se acumulaba ácido 5-aminolevulínico y se inhibía la síntesis de clorofila (Harel y Klein, 1972). Esta fue la primera evidencia cierta de que el ALA es también precursor de porfirinas en plantas superiores. El α -ceto glutarato, el glutamato, y la glutamina son eficientemente incorporados en forma intacta en el ácido 5-aminolevulínico. En cambio, ni la glicina-1- ^{14}C ni la glicina-2- ^{14}C lo son. Estas experiencias se realizaron en cotiledones de pepino en crecimiento (Beale y Castelfranco, 1974). El glutamato se incorporaba con igual eficiencia ya estuviera marcado en 1- ^{14}C , en 3- ^{14}C ó en 4- ^{14}C .

De acuerdo a estos resultados, la succinil-S-Co-A formada a expensas del α -cetoglutarato, que a su vez provendría del glutamato, no puede ser precursor del ácido 5-aminolevulínico.

La biosíntesis del ALA a partir de α -cetoglutarato o glutamato intactos puede ser racionalizada proponiendo una reducción a 4,5-dioxovalerato seguida por una transaminación a ALA.



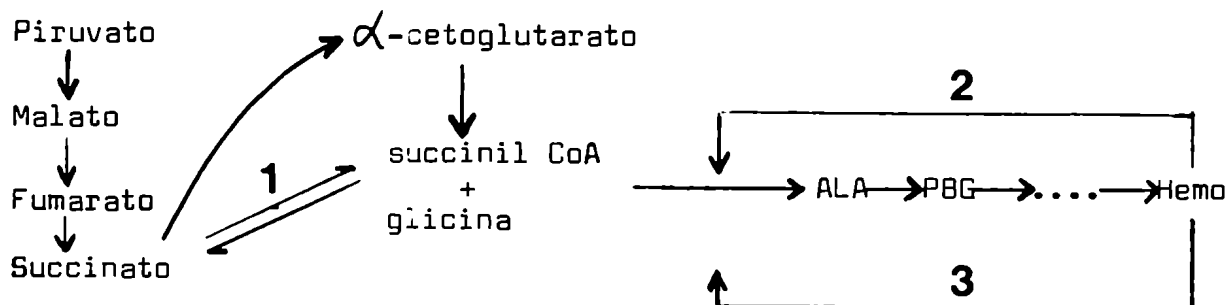
El 4,5 dioxovalerato es un metabolito de ALA en varios organismos. La reductasa fué hallada recientemente. Posiblemente, este mecanismo de síntesis de ALA sea el más común en plantas superiores.

Existen por lo menos tres mecanismos que regulan la velocidad de síntesis de ALA. (Figura 8).

Todos los factores capaces de afectar la concentración necesaria de succinil CoA disponible para su condensación con glicina pueden, en última instancia, afectar la velocidad de síntesis de ALA. Como la succinil CoA puede sintetizarse biológicamente ya sea por oxidación de α -cetoglutarato o directamente a partir de succinato y CoA por la enzima succinil CoA sintetasa, la velocidad de ambas reacciones,

FIGURA 8

Regulación de la síntesis de ALA



- 1** Formación de succinil CoA
- 2** Inhibición de ALA sintetasa por producto final
- 3** Represión de ALA sintetasa por producto final

y la velocidad a la cual el succinato desaparece por oxidación en el ciclo de los ácido tricarboxílicos pueden afectar la formación de ALA.

Los otros dos mecanismos de regulación de la síntesis de ALA se relacionan con la enzima ALA sintetasa; uno involucra cambios en la actividad de la enzima, y el otro, cambios en la cantidad de enzima por variación en su velocidad de síntesis. Los trabajos de Lascelles demostraron que ambos mecanismos regulatorios, el control sobre la actividad de la enzima y el control sobre la formación de la enzima, se ejercen durante la biosíntesis de bacterioclorofila en la bacteria fotosintética Rhodospirillum rubrum (Lascelles, 1960). Existe una represión de la ALA sintetasa por producto final y además, tanto la luz como el oxígeno regulan la síntesis de ALA sintetasa. La introducción de oxígeno en cultivos anaeróbicos resulta en una inmediata represión de la ALA sintetasa. Altas intensidades de luz también la reprimen.

La forma en que el oxígeno y la luz actúan para reprimir a la enzima no ha sido aclarada, se sugirió que podría deberse a cambios en el estado de oxidorreducción de un "carrier" en la cadena de transporte de electrones (Nishimura y colab, 1963). De estos estudios se concluye que la represión de la ALA sintetasa actuaría a dos niveles diferentes: uno a nivel del hemo, producto final de esta biosíntesis, y otro a nivel de factores ambientales.

En animales, la ALA sintetasa es inducida por una gran variedad de agentes extraños como también por esteroides. El hemo, producto final del camino metabólico, reprime actuando en contra de esta inducción. Granick (1966) propuso que el hemo funciona como un corepresor controlando la inducción de ALA sintetasa por combinación con el aprepresor para formar el represor funcional y sugirió que tanto las drogas extrañas como los esteroides competirían con el hemo impidiendo la formación del represor funcional provocando así la derrepresión de la enzima.

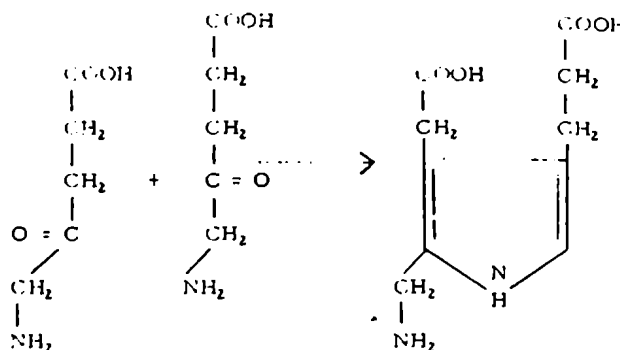
Una de las drogas más usadas para inducir ALA sintetasa es la alilisopropilacetamida. El efecto primario de esta droga sería producido por una disminución en el contenido de citocromo P450 del hígado (De Matteis, 1970). Se encontró que existe una relación inversa entre el contenido de citocromo P450 y la actividad de ALA sintetasa (Padmanasan y colab, 1973). La disminución del citocromo P-450 y de la actividad causada por AIA involucra la degradación del hemo; esta sería una de las condiciones para que la ALA sintetasa sea inducida por AIA.

Conversión del ácido 5-aminolevulínico en porfobilinógeno

La enzima ALA dehidrasa condensa dos moléculas de ALA para formar el único monopirrol precursor de porfirinas, que es el porfobilinógeno (PBG). Esta enzima, a diferencia de la ALA sintetasa, es

FIGURA 9a

Formación de porfobilinógeno a partir de ácido 5-aminolevulínico.



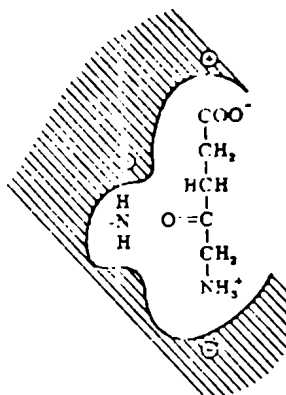
citoplasmática y está ampliamente distribuída en animales, vegetales y bacterias. Se la ha encontrado en hígado bovino (Gibson, 1958; Batlle, 1967) eritrocitos humanos (Calissano, 1966); levadura (Barreiro, 1967), callo de soja (Tigier) hojas de trigo (Nandi y Waygood); R. spheroides (Burnham y Lascelles).

El mecanismo de la reacción ha sido presentado por Nandi y Shemin (1968).

El paso inicial es la formación de una base de Schiff entre la enzima y el sustrato (Figura 9 b). Esto fué comprobado por inactivarse la enzima al reducir con borhidruro de sodio. Esta inactivación sólo se producía en presencia del sustrato. Un análisis de las características de la enzima aislada de muchas células diferentes indica que todas las preparaciones examinadas parecen tener pesos moleculares

FIGURA 9b

Formación de una base de Schiff entre la enzima y el sustrato



comparables y estructuras cuaternarias probablemente similares. Aunque todas forman la base de Schiff intermedia con el sustrato, el requerimiento de cationes metálicos para su activación varía. Este requerimiento divide a las ALA dehidrasas en dos clases: (Shemin, D, 1972). La enzima aislada de la bacteria fotosintética Rhodospseudomonas spheroides, requiere K^+ o iones relacionados (Li^+ , Rb^+ , NH_4^+ , Mg^{2+}) para activarse a bajas concentraciones de sustrato, (Nandi y Shemin, 1968), mientras que la enzima proveniente de células eucarióticas es estudiada hasta el momento no requiere agregado de cationes metálicos para activarse. Además, esta enzima es inhibida por EDTA, mientras que la dehidrasa de R.spheroides no lo es. Una excepción a esta regla ha sido encontrada por Nandi en R. capsulata. La dehidrasa de este organismo no requiere cationes para su activación, ni es inhibida por EDTA. (Nandi y Shemin, 1973). La ALA dehidrasa se activa por grupos sulfhidrilo y su K_m es de $1,4-5 \times 10^{-4}$, dependiendo de su origen.

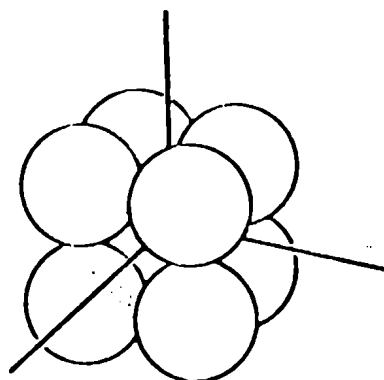
Investigaciones detalladas de la estructura cuaternaria de la enzima de diversos orígenes han llevado a la conclusión de que las enzimas de R.spheroides, en hígado de ratón y bovino, se componen de seis subunidades.

Más recientemente, Wilson, Burger y Dowdle (1972), han descrito una enzima de hígado bovino compuesta por siete subunidades diméricas. Wu, Shemin y colaboradores (1974), en un exhaustivo estudio con el fin de determinar la naturaleza y número de sitios activos y la estructura y composición de esta enzima, volvieron a determinar la estructura cuaternaria de la dehidrasa de hígado bovino por una combinación de microscopía electrónica y determinaciones de peso molecular. Era de especial interés determinar la estructura cuaternaria de esta enzima pues esta podía aclarar el mecanismo de este paso de aromatización y también el control de la actividad catalítica de la enzima.

La dehidrasa de hígado bovino fue purificada y cristalizada por Wu y apareció como homogénea por varios criterios. El peso molecular calculado a partir del coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}^0=11.75$) y el coeeficiente de difusión fue de 289.000 y el determinado por equilibrio de sedimentación fue de 282.000. Por este último método se determinó un peso de 34.900 para cada subunidad. Este valor fue obtenido con una muestra dializada contra clorhidrato de guanidina 6M y ditiotreitól. Un valor similar de 35.000 fue obtenido por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio. Parece, entonces, que la enzima estaría compuesta por ocho subunidades, lo cual concuerda con la forma en que aparece al microscopio electrónico. Las partículas parecen estar formando cuatro lóbulos bien diferenciados dispuestos en los cuatro vértices de un cuadrado. La estructura cuaternaria sería pues, la que se observa en la figura 10. Las subunidades, de $44 \overset{0}{\text{Å}}$ de diámetro, están dispuestas con simetría diédrica (D_4). Si se supone que las subunidades son esféricas y que poseen una densidad de 1.36 g/cm^3 ,

FIGURA 10

Modelo de la estructura
cuaternaria de ALA dehidrasa



el peso molecular del octámero sería de 292.000, lo cual concuerda con las demás determinaciones. Las ocho subunidades parecen idénticas.

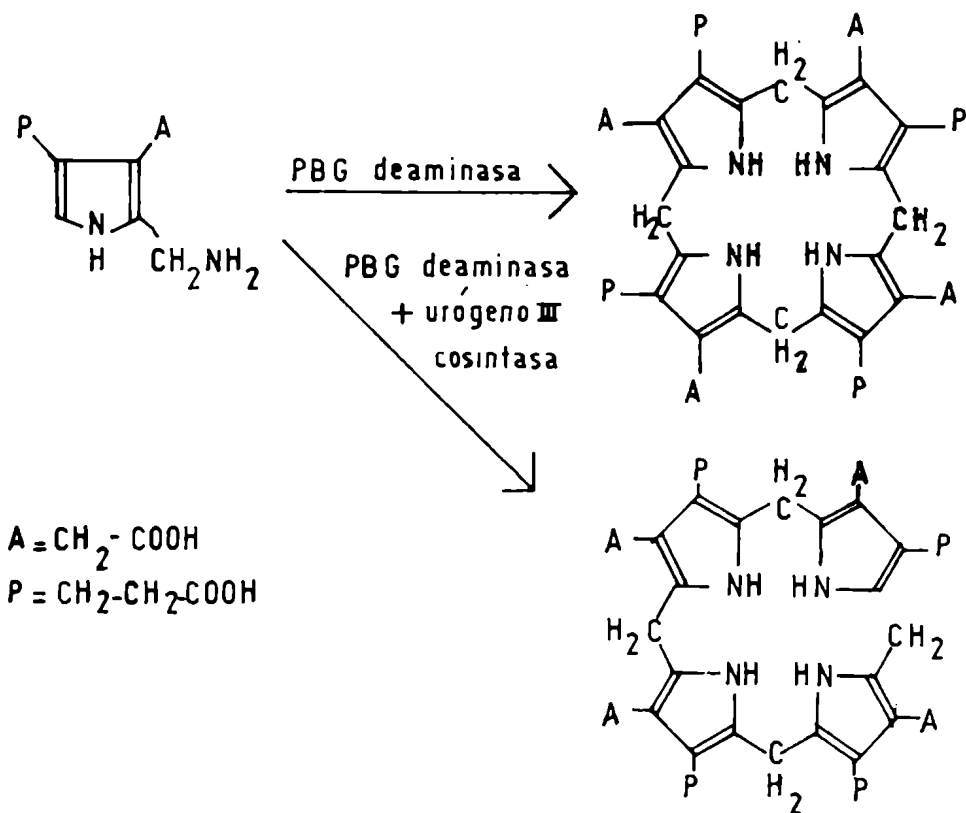
La ALA dehidrasa de R.spheroides tiene las características de una enzima alostérica: efecto cooperativo homotrópico del sustrato, efectos cooperativos heterotrópicos de algunos cationes, y asociación de subunidades de la enzima en presencia de los mismos iones (K^+ , NH_4^+ , Li^+ y Rb^+). Queda por dilucidar si esta enzima puede ejercer un efecto regulatorio en la biosíntesis de porfirinas, como fue sugerido para la biosíntesis de bacterioclorofila por Lascelles (1975).

Biosíntesis del uroporfirinógeno III.

El uroporfirinógeno III es el primer tetrapirrol cíclico en el camino biosintético de la protoporfirina IX. La conversión de cuatro moléculas de PBG al tetrapirrol uroporfirinógeno III requiere dos enzimas, la PBG deaminasa y la uroporfirinógeno III cosintasa. (Figura 11).

La PBG deaminasa sólo cataliza la condensación secuencial cabeza-cola de las moléculas de PBG, dando como único producto el uro-

FIGURA 11
Biosíntesis de los uroporfirinógenos I y III



porfirinógeno I. Este no es un precursor natural del camino metabóli-
 co de las porfirinas, se lo encuentra como producto de excreción en
 las porfirias y en algunos taxones animales, notablemente en el
 phylum Mollusca, como ya se ha visto en la página 9 .

El mecanismo de acción de la cosintasa no está aún totalmen-
 te aclarado, como así tampoco la forma en que ambas enzimas cooperan
 para la formación del uroporfirinógeno III, el precursor natural del
 camino metabólico.

Ya que el estudio de este sistema enzimático dual que inter-
 viene en la biosíntesis del uroporfirinógeno III es el tema de la pre-
 sente tesis, haremos mención aparte (ver página 38 de esta Introduc-
 ción) de los mecanismos postulados y de los estudios ya realizados para

dilucidar este paso en la biosíntesis.

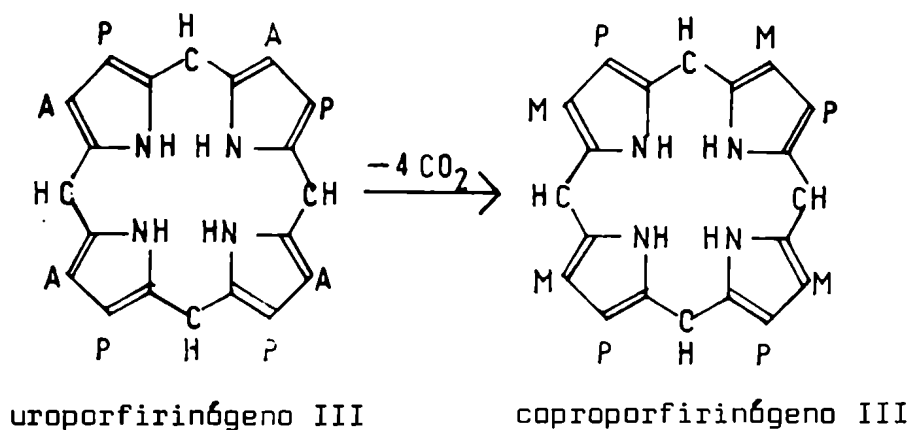
Biosíntesis de coproporfirinógenos.

Los uroporfirinógenos III y I son decarboxilados a coproporfirinógenos III y I por un sistema enzimático presente en el citosol.

El sistema enzimático de decarboxilación fue aislado de diversos organismos, y está presente aún en bacterias que producen vitamina B₁₂.

FIGURA 12

Decarboxilación del uroporfirinógeno III



Mauzerall y Granick (1958) aislaron el sistema enzimático y encontraron que decarboxilaba los cuatro isómeros de uroporfirinógeno en el orden III > IV > II > I. Se observó que el isómero III reaccionaba al doble de la velocidad con la cual reaccionaba el isómero I. Se encontró que la decarboxilación ocurría por etapas y fue posible detectar intermediarios que contenían de siete a cinco grupos carboxilo. Estos eran rápidamente convertidos a coproporfirinó-

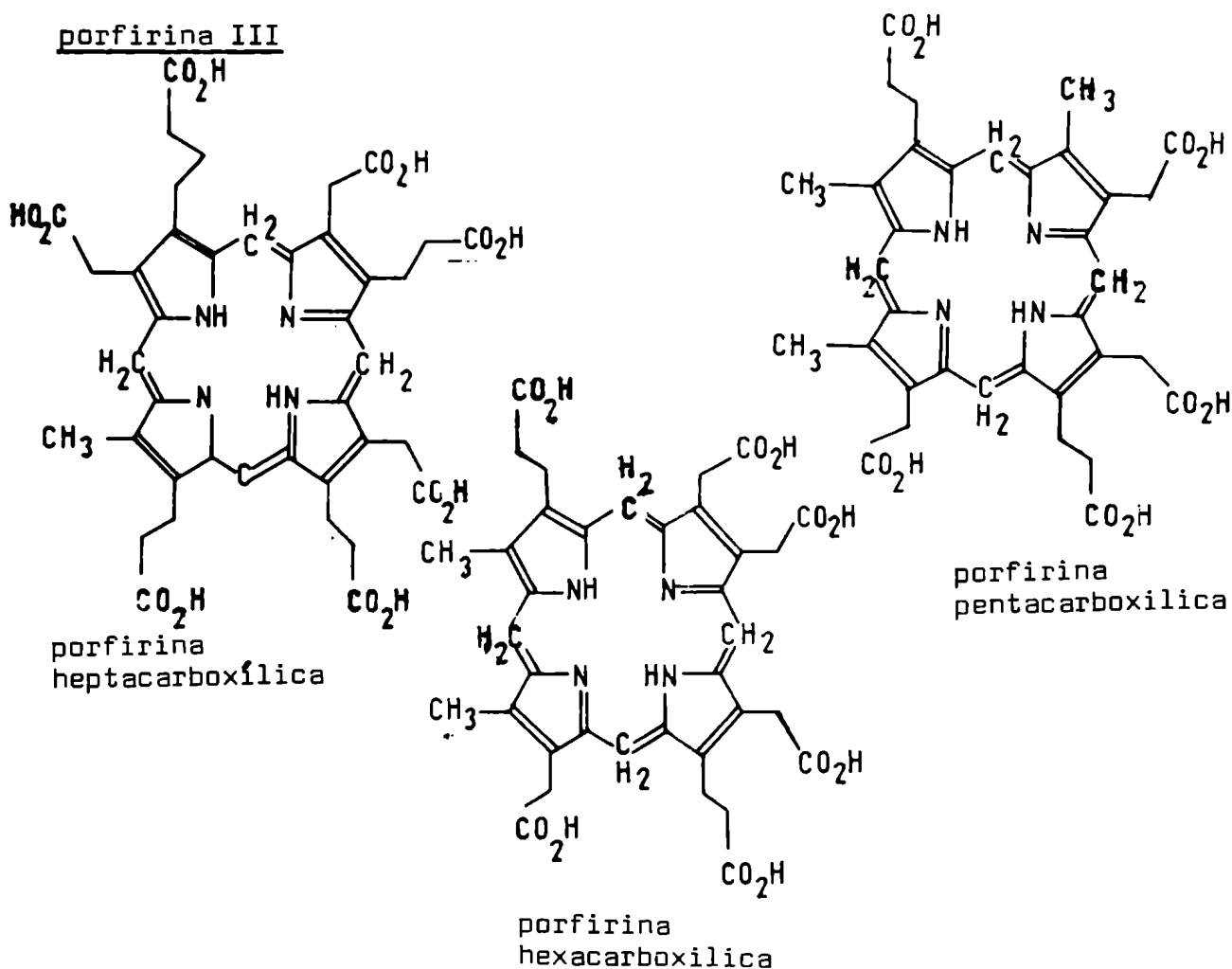
geno. Por estudios electroforéticos con la enzima de hemolizado de glóbulos rojos, Mauzerall y Granick dedujeron que se trataba de una sola enzima. Estos estudios fueron confirmados por Tomio y colaboradores (1970) trabajando con decarboxilasa parcialmente purificada de eritrocitos de ave. Ratas envenenadas con hexaclorobenceno durante un largo período de tiempo excretaron porfirinas hepta, hexa, y pentacarboxílicas (San Martín de Viale y Grinstein, 1968) (Elder, 1972).

Después del fraccionamiento de las porfirinas desconocidas hepta, hexa y pentacarboxílicas excretadas en las heces de ratas envenenadas con hexaclorobenceno, Jackson y colab. pudieron identificarlas. Cada porfirina resultó ser un compuesto simple y no una mezcla aleatoria de isómeros con el mismo número de grupos carboxilo (Jackson y colab. 1976). Por comparación con muestras sintéticas de las posibles porfirinas isómeras de siete, seis y cinco grupos carboxilo, se identificaron los distintos isómeros (Stoll y colab, 1973). Pudo identificarse así la porfirina heptacarboxílica, la hexacarboxílica y la pentacarboxílica, que son las que se indican en la figura 13. La estructura de estas tres porfirinas sugiere que la decarboxilación del uroporfirinógeno III se produce en el sentido del movimiento de las agujas de un reloj, empezando por el resto acético del anillo D y siguiendo con los anillos A, B, y C en forma sucesiva, para dar finalmente coproporfirinógeno III.

Al probar las porfirinas sintéticas hepta-, hexa-, y pentacarboxílicas como sustratos de un hemolizado de eritrocitos de pollo, se encontró que todas ellas eran transformadas en protoporfirina IX aproximadamente a la misma velocidad. Estos resultados así como la

FIGURA 13

Porfirinas intermediarias entre la uroporfirina III y la coproporfirina III



inespecificidad de la enzima hacia los cuatro uroporfirinógenos isómeros sugerirían que no es indispensable que la decarboxilación se haga estrictamente en el sentido del movimiento de las agujas del reloj.

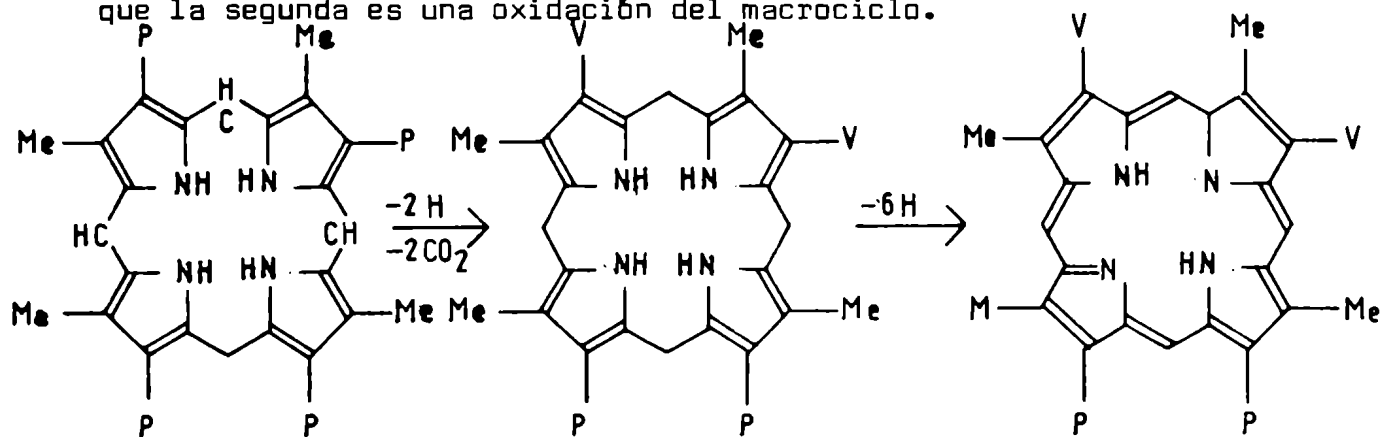
La incubación de decarboxilasa parcialmente purificada de eritrocitos de pollo (Tomio y colab, 1970) de acelga, o de eritrocitos humanos (Stevens, 1971) con uroporfirinógeno III da como producto principal un uroporfirinógeno heptacarboxílico. Si la enzima está constituida por una sola proteína, debe aceptarse que la proteína tiene por lo menos dos sitios activos con distinta afinidad y distintas velocidades de reacción para los posibles intermediarios entre uroporfirinó

geno y coproporfirinógeno. La velocidad de decarboxilación de uroporfirinógeno al uroporfirinógeno hepta carboxílico debe ser mayor que la decarboxilación subsiguiente de éste a coproporfirinógeno. Otra posibilidad sería que la decarboxilasa consistiera de varias unidades proteicas, y que una lesión en la función de una de ellas bloqueara parcialmente la reacción a nivel de 7-COOH.

Biosíntesis de protoporfirina IX

La última etapa en el camino biosintético hacia la protoporfirina IX es la conversión enzimática de coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX seguido de la oxidación enzimática de éste a protoporfirina IX.

La primera reacción es una decarboxilación oxidativa mientras que la segunda es una oxidación del macrociclo.



La formación de protoporfirinógeno IX es catalizada por un

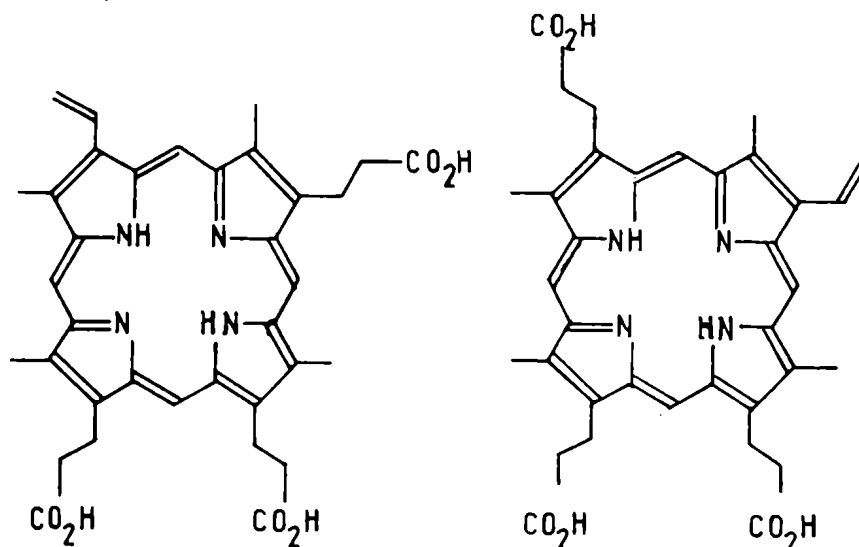
sistema enzimático muy difundido, la coproporfirinogenasa, caracterizado por Sano y Granick (1961). La enzima tiene un requerimiento absoluto de oxígeno, que es el aceptor de electrones (o de hidruros) durante la decarboxilación oxidativa de 2 residuos propiónicos. Sólo los coproporfirinógenos (y no las porfirinas) son sustratos del sistema enzimático. Se pudo detectar actividad de coproporfirinogenasa en cultivos

aeróbicos de Saccharomyces cerevisiae, y también en una fracción soluble de células de levadura, en condiciones anaeróbicas y en presencia de sulfato ferroso, L-metionina, ATP y NADP (Pouison y Polglase, 1974).

El oxígeno como aceptor de electrones podría ser reemplazado por un nucleótido, el NADP, en condiciones anaeróbicas, siempre que estén presentes los cofactores necesarios. La coproporfirinogénasa no actúa sobre los coproporfirinógenos I y II, sino solamente sobre los coproporfirinógenos III y IV (Porra y Falk, 1964). Frydman y Frydman (1975) encontraron que el isómero IV es mejor sustrato que el isómero III para un sistema de eritrocitos de pato.

Se ha podido determinar que la oxidación de los grupos propiónicos en C-2 y C-4 a vinilo es secuencial y no simultánea. Sano y Granick detectaron un intermediario tricarboxílico que rápidamente se convertía en protoporfirinógeno IX. Kennedy (1970) aisló de glándula harderiana de ratas una porfirina tricarboxílica de la serie IX cuya estructura era la que se observa en la Figura 15a).

Fig. 15a

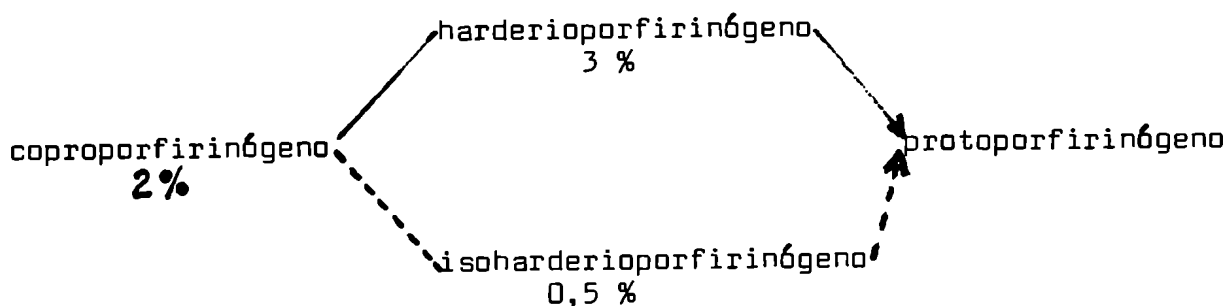


harderioporphyrina

isoharderioporphyrina

Los porfirinógenos derivados de la harderioporfirina y de la isoharderioporfirina (obtenida ésta por síntesis) fueron tritiados y usados como sustrato de un extracto de Euglena gracilis, encontrándose la siguiente relación entre las incorporaciones en la protoporfirina IX (Cavaleiro y colab, 1974).

FIGURA 15b



O sea que el verdadero intermediario es la harderioporfirina (2-vinil-4-ácido propiónico deuteroporfirina), y la decarboxilación oxidativa tiene lugar primero en el C₂ y luego en el C₄.

La oxidación final de protoporfirinógeno a protoporfirina IX es un proceso enzimático (Sano y Granick, 1961). Esto fue confirmado inhibiendo a la enzima oxidativa protoporfirinogenasa en cultivos de levaduras sobre medio enriquecido con glucosa (Poulson y Polglase, 1974). Como resultado, se acumulaba el protoporfirinógeno IX, que es el grupo prostético de las hemoproteínas.

Hemo

La introducción del hierro en la protoporfirina IX, último paso en la biosíntesis del hemo, está catalizada por una enzima ~~sele-~~
~~ta~~ encontrada en mitocondrias de hígado de rata, la ferroquelatasa.

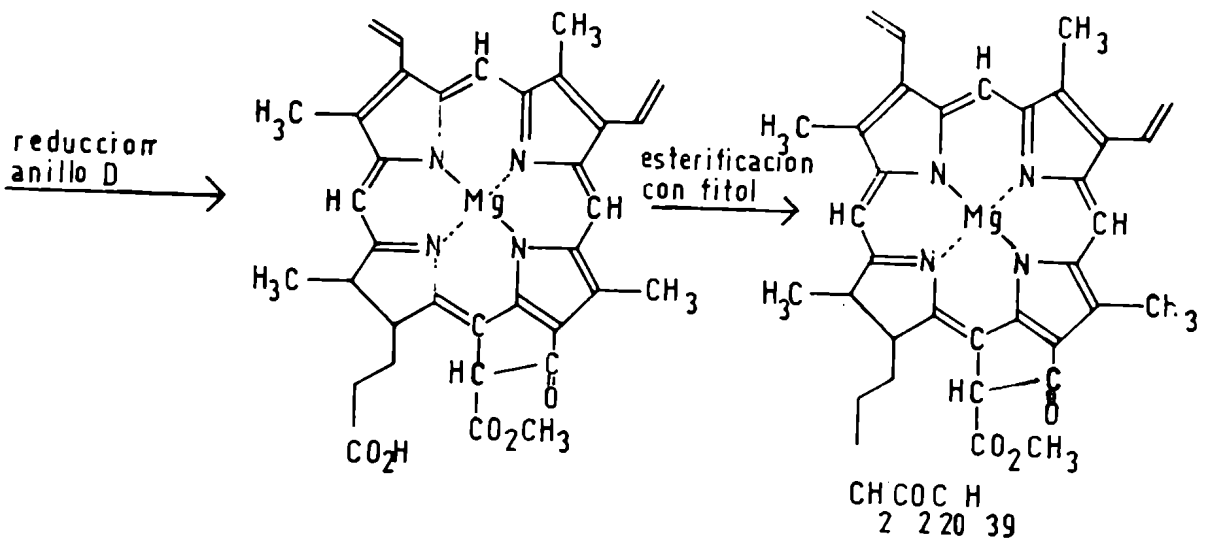
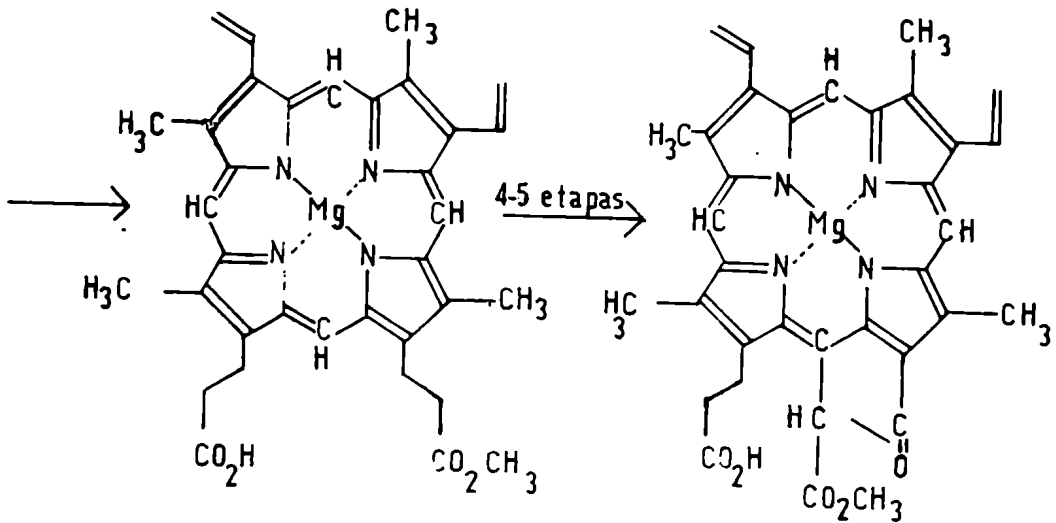
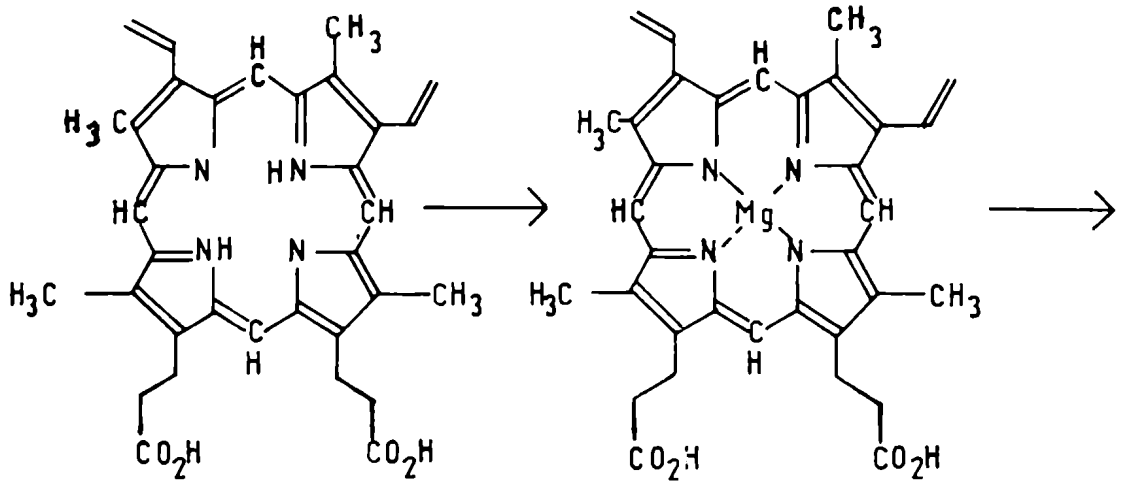
Esta enzima inserta iones ferroso en la protoporfirina IX. Los iones del Mg, Ca, Ni, Pb, Cd, Cu, Mn, Zn y Hg inhiben la utilización de los iones ferroso. El ión férrico no se incorpora. Además de ser activa con la protoporfirina IX, la enzima puede catalizar la quelatación del Fe^{++} con deuteroporfirina, hematoporfirina y mesoporfirina y 2,4-dibromo deuteroporfirina pero no con uroporfirina, coproporfirina, 2,4-diacetil deuteroporfirina, ni 2,4-bis (2-carboxiciclopropil) deuteroporfirina. Una enzima similar, aislada de hígado de cerdo, es inactiva con la porfirina a y con la porfirina c, grupos prostéticos de los citocromos a y c, respectivamente. De estos estudios sobre la especificidad de sustrato, se concluye que la enzima tendría dos sitios: uno para el metal y otro para la porfirina. La ferroquelatasa ha sido aislada de eritrocitos de pato y de pollo, de mitocondrias de hígado de cerdo, de levadura de cerveza, de *Escherichia coli*, de *Thiobacillus X* y de la cepa D de Chromatium.

Magnesio-Protoporfirina IX.

El aislamiento de una mutante de *Chlorella* que acumula protoporfirina IX y de otra que produce Mg-protoporfirina IX llevó a Granick (1948) a sugerir que la protoporfirina es el último intermediario común de las cadenas biosintéticas del hemo y de la clorofila. La inserción de hierro da como resultado la utilización de la protoporfirina como grupo prostético de los citocromos, de la hemoglobina y de otras hemoproteínas; la inserción de magnesio da como resultado la formación de clorofila. La inserción enzimática del Mg fue comprobada en células enteras de *Rhodospseudomonas spheroides* en cultivo semianeróbico. (Gorchein, 1972). Estas bacterias fotosintéticas incorporaban mag-

FIGURA 16

Biosíntesis de clorofila



nesio en protoporfirina exógena, por incubación con EDTA en anaerobiosis, o en oscuridad con baja presión parcial de oxígeno.

El producto de reacción aislado no era la magnesio protoporfirina, sino el monometil ester de la magnesio protoporfirina. Si se agota la metionina y la S-adenosil metionina, (de donde proviene el grupo metilo), la formación de magnesio protoporfirina monometil éster decrece notablemente sin que se acumule magnesio protoporfirina. Estos resultados indican una íntima asociación entre la inserción de magnesio y la metilación. Quizá esté involucrado un complejo multienzimático. Aunque esencial para la inserción de magnesio, la metilación no limita la velocidad de reacción, habiéndose encontrado que la formación del magnesio protoporfirina monometil éster es más rápida a partir de magnesio protoporfirina exógena que de protoporfirina, y que no se inhibía por oxígeno.

Los detalles del mecanismo de la reacción aún no están aclarados, puesto que aún no se ha podido detectar actividad enzimática de magnesioquelatasa en extractos libres de células. Los efectos de numerosos inhibidores del transporte de hidrógeno y electrones y de reacciones de conservación y transformación de energía fueron probados en anaerobiosis y con bajas tensiones de oxígeno sin luz.

A pesar de las dificultades en interpretar resultados con células enteras, parecían estar involucrados un transporte de electrones entre citocromos b y c acoplado a la síntesis o utilización de ATP en la reacción enzimática de quelatación de magnesio en el macrociclo.

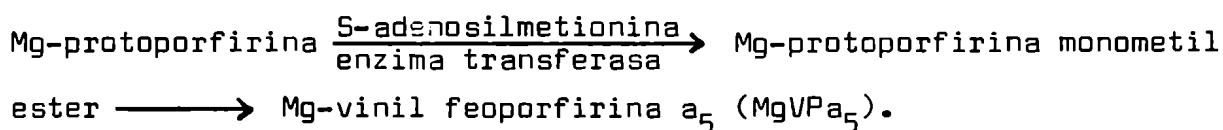
Biosíntesis de clorofila a partir de magnesio protoporfirina IX

Con el fin de aislar compuestos intermediarios en la biosín-

tesis de clorofila, Granick preparó, irradiando con rayos X, mutantes del alga verde Chlorella vulgaris. En las mutantes donde la síntesis de clorofila estaba bloqueada, se investigó la presencia de compuestos tetrapirrólicos. Una mutante acumulaba protoporfirina IX, otra Mg-protoporfirina IX, otra Mg-2-vinil feoporfirina a_5 . Luego, se encontró una mutante que acumulaba protoporfirina monometil éster y otra con Mg-protoporfirina monometil éster. La Mg-vinil feoporfirina a_5 ó protoclorofilida a, es la protoclorofila a la que le falta el grupo fitilo. Este compuesto fue posteriormente identificado en plántulas de ave na. En cultivos de Rhodospseudomonas spheroides en presencia de -hidroxiquinolina en condiciones en que normalmente hay síntesis de bacterioclorofila, se encontró Mg-2-4-divinil feoporfirina a_5 . La formación de Mg-vinil-feoporfirina a_5 a partir de magnesio protoporfirina monometil éster, requiere las siguientes modificaciones de este último:

- c) reducción del vinilo en el anillo a etilo.
- b) ciclación del grupo propiónico en el anillo C para dar un anillo ciclopentanona.
- a) esterificación del grupo carboxilo del resto propiónico en el anillo C.

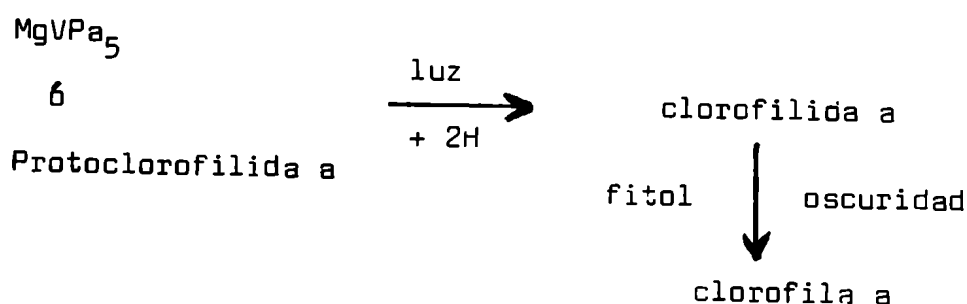
Esto sugiere que, en camino a la formación de bacterioclorofila y de clorofila a, posiblemente el anillo de ciclopentanona se forma antes de la reducción del grupo vinilo en la posición 4.



Las etapas para llegar a la clorofila a, a partir de MgVPA₅ involucran la reducción del anillo D y una esterificación de la cadena lateral propiónica del C₇ con fitol.

Hay evidencias de que la esterificación ocurre después de la reducción del anillo D, ya que la transformación de $MgVPa_5$ a clorofila a en hojas etioladas pudo ser separada en una reacción fotoquímica y una reacción oscura. Si la reacción tiene lugar en oscuridad y luego se expone a la luz se observa que se forma clorofilida a y muy poca clorofila a, en cambio cuando la iluminación es seguida de una incubación en la oscuridad, se observa un gran aumento en la clorofila a.

FIGURA 17



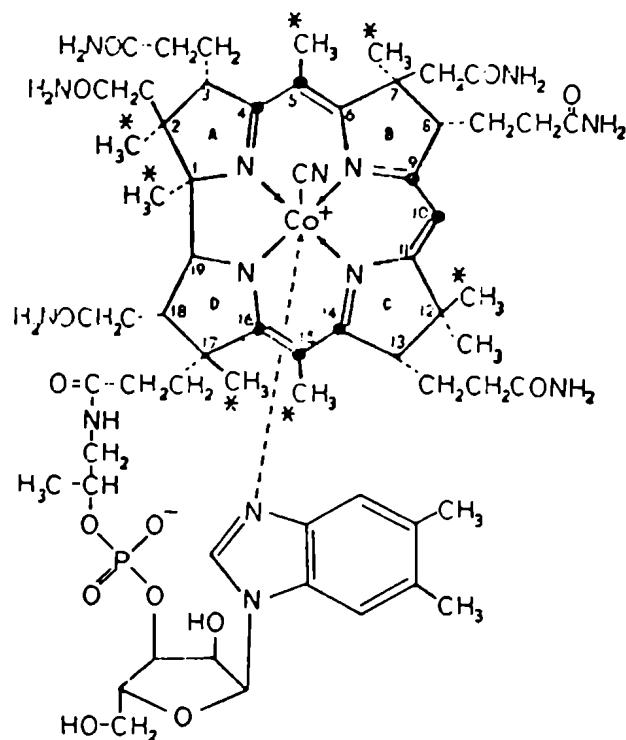
Ha sido detectado fitol libre en cloroplastos, no en hojas etioladas. Ya que el fitol es altamente insoluble en agua, la etapa final de la síntesis de clorofila podría ocurrir en la fracción lipoproteica de los cloroplastos en plantas o en los cromatóforos bacterianos.

Biosíntesis de la vitamina B₁₂

Se pudo comprobar la incorporación en la vitamina B₁₂ de PBG marcado con ¹⁴C en ocho carbonos. Por lo tanto, el PBG, unidad fundamental en la síntesis de las porfirinas, también es precursor de la vitamina B₁₂. (Figura 18).

Se comprobó también la incorporación específica de uroporfirinógeno III-¹⁴C en el anillo de la corrina de la vitamina B₁₂ en célu

FIGURA 18

Molécula de la vitamina B₁₂

las recién cosechadas de *Propionebacterium shermanii*. (Scott, 1972). Es muy probable a la luz de estos datos que la corrina de la vitamina B₁₂ se origine por contracción reductiva del uroporfirinógeno III.

Este resultado fue confirmado suministrando uroporfirinógenos I-IV marcados con ¹³C, y sometiendo a la vitamina B₁₂ resultante a un análisis de nmr.

Por lo tanto, el uroporfirinógeno III, cuya biosíntesis es objeto de este trabajo, es el último precursor común de las ramas cobalto, magnesio, y hierro, y la primera bifurcación se produciría luego de la síntesis de este compuesto.

Control metabólico

El camino biosintético ramificado de las porfirinas está regulado fundamentalmente en la primera etapa específica, o sea, a nivel de la ALA sintetasa. Esta regulación ha sido estudiada en algunas bacterias fotosintéticas del orden Athiorhodaceae, como Rhodopseudomonas spheroides, donde se sintetiza bacterioclorofila, hemo y vitamina B₁₂. En condiciones de anaerobiosis y luz, la biosíntesis de clorofila está muy favorecida, siendo la relación entre los tres productos del orden de 50:1:2. Al aerar el cultivo, la síntesis de bacterioclorofila cesa inmediatamente, manteniéndose a una velocidad normal la síntesis de hemo, que en estos organismos constituye el grupo prostético de los citocromos b y c. La inhibición brusca en la síntesis de bacterioclorofila no trae aparejada la aparición de intermediarios. Esto indica claramente la existencia de un mecanismo regulatorio que adecúa la producción de los primeros productos específicos de esta vía metabólica a la síntesis de productos finales. Una falla en este fino mecanismo de control da como resultado la acumulación de coproporfirina, y esto se induce por deficiencia de hierro y metionina.

Este último efecto, así como la potente inhibición que ejerce el hemo a bajas concentraciones sobre la ALA sintetasa purificada, señala un mecanismo de control del tipo de inhibición por retroalimentación del hemo sobre la primera enzima específica de este camino metabólico. In vivo se corroboró el papel regulatorio del hemo trabajando con mutantes en que la capacidad de síntesis de hemo estaba disminuida por bloqueos parciales de algunas enzimas del camino metabólico. La cantidad de intermediarios (PBG y coproporfirinógeno) formados se

correlacionaba perfectamente con la capacidad de formar hemo. Estos es tudios originaron la conclusión de que la ALA sintetasa es controlada por una concentración crítica de hemo. Por debajo de esa concentración, la enzima se descontrola y se acumulan precursores.

En el caso de la eliminación de la rama del magnesio producida por aereación de un cultivo de R. spheroides, se divertiría mayor cantidad de protoporfirina hacia la síntesis del hemo, lo cual provoca ría un aumento en la concentración de hemo, y éste a su vez inhibiría a la ALA sintetasa, de modo que la producción de ALA sería considerablemente menor. Medicines de síntesis de hemo y bacterioclorofila lle vadas a cabo en cultivos de tipo salvaje corroboran la hipótesis de la competencia por la protoporfirina ya que la velocidad de formación de hemo aumenta en presencia de inhibidores de la síntesis proteica, que frenan totalmente la síntesis de bacterioclorofila.

La ALA sintetasa es activada endógenamente por un trisulfuro de glutation o de cisteína, cuya concentración intracelular depende del estado redox de las células y de la presencia de una cadena de transporte de electrones. El efecto del O_2 ambiental, que inhibe a la ALA sintetasa, muy posiblemente esté mediado por el trisulfuro.

La luz es otro factor ambiental que regula a la ALA sintetasa, activándola.

Los estudios de regulación de caminos metabólicos ramificados han demostrado la importancia crítica del primer paso enzimático conducente a un producto final determinado. Además de la ALA sintetasa, serían de importancia las enzimas de los puntos de divergencia, como por ejemplo la magnesio protoporfirina quelatasa y

la ferroquelatasa. El sistema que introduce Mg en la protoporfirina es inhibido por presiones parciales de O_2 superiores al 15%. Tanto la Mg protoporfirina quelatasa como la magnesio protoporfirina metiltransferasa son reprimidas por el O_2 . Se postula que la formación de las enzimas de la vía del magnesio estarían controladas por un gen regulador, que a su vez es influido directa o indirectamente por el oxígeno.

La ALA sintetasa de hígado de mamíferos es inducible por drogas como la dihidrocolidina, y también por esteroides. Estudios en animales intactos y en cultivos de tejidos animales demostraron que el hemo reprime la síntesis de ALA sintetasa.

El oxígeno también cumple un rol regulatorio en la síntesis del hemo en animales.

La conversión de ALA a PBG catalizada por la ALA dehidrasa podría ser otro punto de control en la síntesis de porfirinas, en R. spheroides.

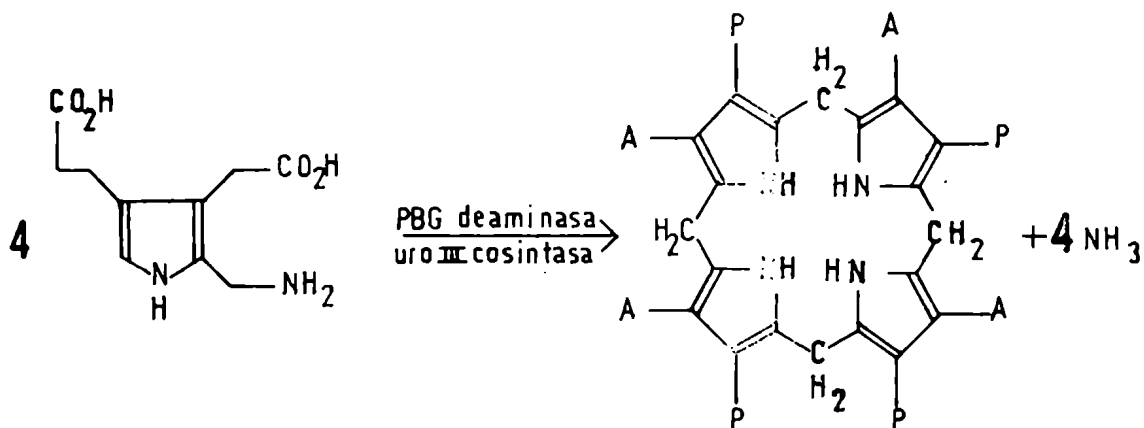
La ALA dehidrasa de esta bacteria es inhibida por hemina y protoporfirina y activada por ciertos iones metálicos y exhibe efectos cooperativos homotrópicos con el sustrato heterotrópicos con los cationes metálicos, (Nandi, Baker-Cohen y Shemin, 1968), lo cual sería un indicio de su posible rol regulatorio, aunque indudablemente la enzima velocidad limitante de este metabolismo es la ALA sintetasa.

MECANISMO DE LA BIOSÍNTESIS DEL UROPORFIRINOGENO

Uno de los problemas más interesantes dentro del panorama de la biosíntesis de las porfirinas es el mecanismo por el cual la

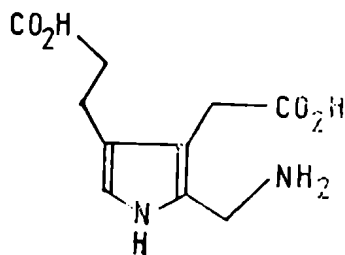
acción combinada de dos enzimas, la porfobilinógeno deaminasa y la cosintasa, transforman el porfobilinógeno en el asimétrico uroporfirinógeno III.

FIGURA 19



El uroporfirinógeno III es el precursor de todas las porfirinas naturales, excepto de las relativamente escasas uroporfirinas I ya mencionadas de moluscos y las coproporfirinas I de varios otros grupos de invertebrados.

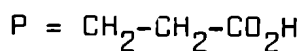
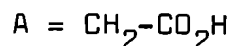
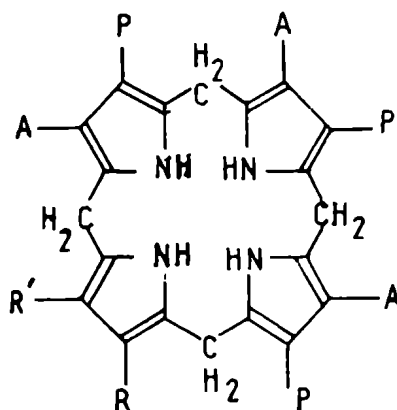
FIGURA 20



Puesto que el PBG es una base de Mannich, no es difícil visualizar una condensación secuencial cabeza-cola de cuatro unidades

del pirrol para dar lugar a un tetrámero cíclico con el orden de las cadenas laterales como en el uroporfirinógeno I. Durante el proceso, se liberan 4 moles de amoníaco. En la síntesis de uroporfirinógeno III, en cambio, hay una inversión en el orden de los sustituyentes del anillo D, y desde ese punto en adelante, el esqueleto de una porfirina de tipo III está formado y prevalece durante el resto de la biosíntesis.

FIGURA 21



uroporfirinógeno III

R = P ; R' = A

uroporfirinógeno I

R = A ; R' = P

Más de veinte hipótesis han sido propuestas para explicar esta reacción e hipótesis nuevas son planteadas continuamente. (Margoliash, 1961; Mathewson y Corwin, 1961; Cornford, 1964; Bullock, 1965; Dalton y Dougherty, 1969; Battersby, 1971; Llambías y Batlle, 1971; Bogorad y Radmer, 1972; Whitlock, Whitlock y Alles, 1974).

Ya que el PEG forma también uroporfirinógenos por polimerización química, el problema podría encararse postulando que la polimerización enzimática aprovecha esta propiedad química orientando la síntesis ya sea hacia el uroporfirinógeno III o hacia el uroporfirinógeno I. Si la autocondensación química del PBG tiene lugar por dos posibles esquemas de reacción, la formación enzimática también podría explicarse en términos de los dos esquemas de reacción. En la

Figura 22a se resumen los dos casos. En A, el PBG reacciona liberando amoníaco, dando origen a un ion carbonio (o el dieno equivalente) que inicia la polimerización por un ataque electrofílico sobre el C₂ ó C₅ de un segundo monómero del PBG. Las reacciones tienen lugar por formación de un derivado pirrolénico intermedio, puesto que las sustituciones electrofílicas sobre 2-aminometil pirroles y sus derivados producen α -pirroleninas (Frydman, Reil y Frydman, 1971; Chiang y Whipple, 1963).

Polimerización química del PBG

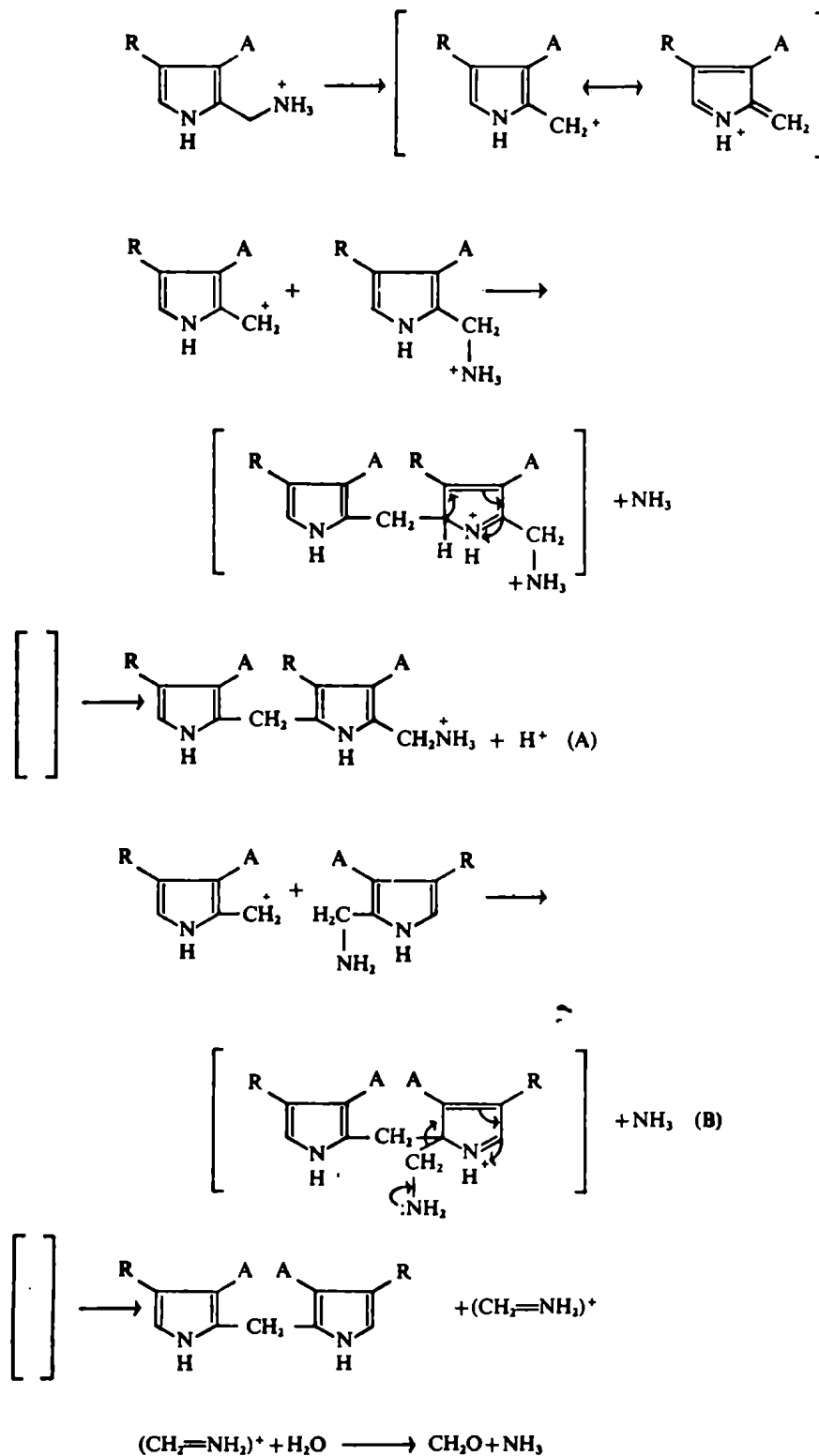
La reacción A, un ataque a la posición α -libre preomina a un pH bajo, ya que a ese pH los grupos 2-aminometilo estarán protonados y estará favorecida la liberación de amoníaco.

La reacción B, un ataque a la posición α -sustituída, estará favorecida a un pH neutro, donde sea posible la eliminación del residuo aminometílico como enamina en el paso intermedio de la α -pirrolenina.

El ion imonio liberado ($\text{CH}_2=\text{NH}_2^+$) o bien se recondensará con el dipirrilmetano α - α' libre formado en la reacción que da lugar a

FIGURA 22a

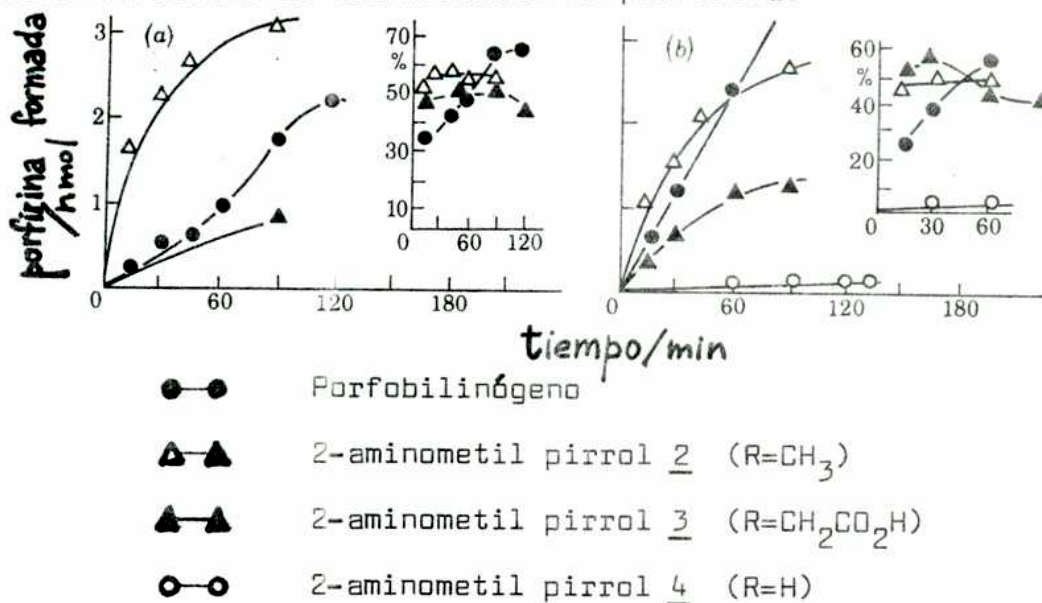
Reactividad del porfobilinógeno



un 2-aminometil dipirrilmetano, o bien se hidrolizará para dar formaldehído y amoníaco. El formaldehído formado se recondensará con el dipirrilmetano α - α' libre y propagará la reacción de polimerización. Los 2-aminometilpirrometanos se autocondensarán dando uroporfirinógenos.

Durante la polimerización química del porfobilinógeno se libera formaldehído, y éste luego se incorpora del medio de reacción a los uroporfirinógenos formados. (Mauzerall 1960; Frydman, Reil y Frydman, 1971). La dimedona, un agente atrapante de formaldehído, inhibe la formación de uroporfirinógenos cuando es agregada a la mezcla de reacción. Los rendimientos en uroporfirinógeno aumentan con el tiempo de reacción durante la polimerización química del PBG, indicando que se forman in-

FIGURA 22b
Velocidad de formación de porfirinas y rendimiento en porfirinas.
a) pH 3.5; b) pH 7.4. Se consideró un rendimiento del 100% cuando todo el pirrol consumido se transformaba en porfirina.



termediarios estables y discretos. Esto no coincide con lo observado durante la polimerización enzimática del PBG, pero contribuye a la mejor

comprensión de este último fenómeno.

Polimerización enzimática del PBG

En las primeras investigaciones sobre la formación de porfirinas a partir de PBG en preparaciones congeladas y descongeladas del alga verde *Chlorella* (Bogorad y Granick, 1953), se demostró que al precalentar a 55° durante 30 minutos no se alteraba la capacidad de estas preparaciones de catalizar el consumo de PBG. En cambio, era notable el efecto del precalentamiento sobre el tipo de porfirinas formadas. Los preparados calentados formaban solamente uroporfirina I, a diferencia de los preparados sin tratar, que formaban no solamente uroporfirina III, sino todas las porfirinas siguientes en la biosíntesis, inclusive la protoporfirina IX. La interpretación más simple de esta alteración por el calor de los preparados de *Chlorella* fue la siguiente:

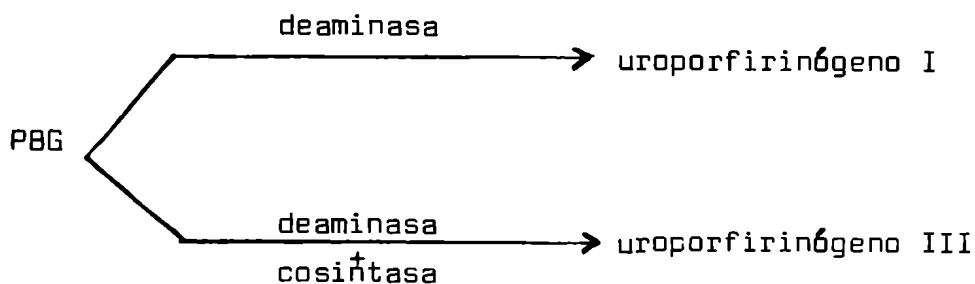
- 1) En la biosíntesis de uroporfirinógeno III a partir de PBG participan por lo menos dos enzimas, una termolábil que es indispensable para la formación del isómero III, y otra termoestable que controla la velocidad de consumo de PBG.
- 2) Esta última enzima (PBG deaminasa) cataliza la condensación lineal de cuatro moléculas de PBG, y en ausencia de la enzima termolábil, se forma uroporfirinógeno I.
- 3) La enzima termolábil interactúa de alguna manera con la deaminasa o con alguno de sus productos para formar uroporfirinógeno III.

A partir de esta interpretación, se inició la búsqueda de ambas enzimas en distintos tejidos.

Los extractos acuosos de polvos acetónicos de hoja de espinaca resultaron ser una excelente fuente de PBG deaminasa (Bogorac, 1955, 1958). De germen de trigo se pudo aislar la enzima, que, incubada con la PBG deaminasa y el PBG, da como resultado la formación del isómero III. Esta enzima termolábil se llamó uroporfirinógeno III isomerasa o cosintetasa, y no consumía PBG. Ambas enzimas fueron encontradas luego en diversos tejidos animales y vegetales, y en bacterias fotosintéticas.

El aislamiento de dos enzimas distintas que contribuyen a la biosíntesis del uroporfirinógeno III, si bien aclaró bastante el mecanismo, planteó varios nuevos interrogantes.

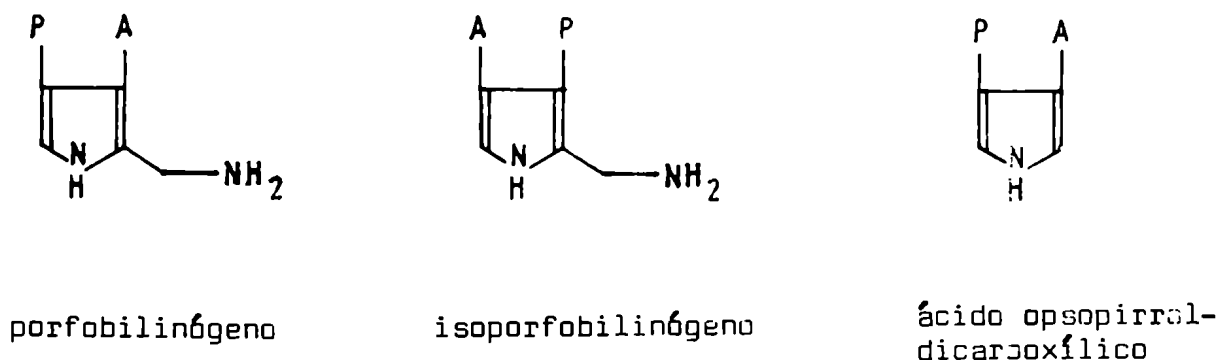
FIGURA 23



La uroporfirinógeno III cosintetasa aparecía como responsable de la síntesis del uroporfirinógeno III. ¿Cuál era el sustrato de esta enzima?. Muy pronto se comprobó que la cosintetasa no era una verdadera isomerasa, ya que incubándola con uroporfirinógeno I no se obtenía el uroporfirinógeno III (Bogorac, 1960). El uroporfirinógeno I no era, pues, sustrato de la cosintetasa; ésta no abre el macrociclo para invertirir el anillo D. La cosintetasa no consume PBG, ni lo transforma en

isoporfobilinógeno. El isoporfobilinógeno no se incorpora al uroporfirinógeno III (Carpenter y Scott, 1959).

FIGURA 24a



Fue imposible detectar una liberación enzimática de formaldehído proveniente del grupo 2-aminometilo del porfobilinógeno (Bogorad, 1960); o una incorporación enzimática de ^{14}C formaldehído o de ácido ^{14}C opsopirroldicarboxílico del medio de reacción al uroporfirinógeno III (Bogorad y Marks, 1960). Por lo tanto, la acción de la cosintetasa no involucra la liberación o recombinación de formaldehído libre con algún intermediario formado por la deaminasa.

Veinte hipótesis han sido propuestas y más de 200 trabajos publicados para aclarar el enigma del proceso de la inversión del anillo D en las porfirinas del tipo III. Las propuestas especulativas difieren entre sí fundamentalmente por la etapa de la polimerización del PBG en la que postulan ocurriría el reordenamiento de las cadenas laterales. La inversión podría tener lugar: a) durante la formación de compuestos dipirrólicos; b) en la formación de tripirranos; c) en la

formación del tetrapirrol lineal (bilano); o d) durante la ciclización final.

Tanto en la alternativa a como en la d, la cosintetasa cumpliría un rol de ~~efector~~ proteico de la deaminasa. En cambio, las alternativas b y c verían a la cosintetasa actuando sobre un sustrato dipirrólico o tripirrólico previamente sintetizado por la deaminasa, y condensándolo con PBG para dar el uroporfirinógeno III.

Al enfocar el problema del mecanismo, es necesario tener en cuenta que se trata de un reordenamiento intramolecular, pues nunca pudo detectarse intercambio de fragmentos de C-1 con el medio, a diferencia de lo que ocurría durante la polimerización química del PBG.

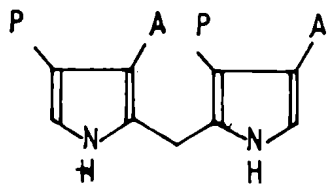
Los estudios hechos incubando posibles intermediarios del tipo 2-aminometilpirrilmetano con las enzimas deaminasa y cosintetasa aclararon en gran medida el mecanismo de acción del sistema deaminasa-cosintetasa. Los dipirrilmétanos 1,2,3, y 4 no fueron sustratos ni de la PBG deaminasa, ni de la uroporfirinógeno III cosintetasa, ni del sistema bienzimático. (Frydman, Reil, Valasinas, Frydman y Rapoport, 1971) (Frydman, Valasinas y Frydman 1973) y (Frydman, Valasinas, Rapoport y Frydman, 1972). De modo que ni la deaminasa ni la cosintetasa son dimerasas, o sea que no forman uroporfirinógenos por dimerización de dos unidades de dipirrilmetano. FIGURA 24 **b**

Al incubar los dipirrilmétanos con cosintetasa en presencia de PBG, no se detectó formación enzimática de uroporfirinógenos. Lo mismo ocurría al incubar tripirranos con cosintetasa y PBG. Esto descartaba la propuesta de que la cosintetasa actuara sobre intermediarios dipirróli

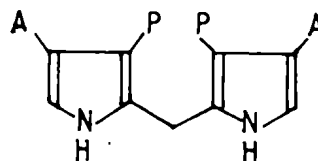
FIGURA 24b

Posibles intermediarios en la biosíntesis de uroporfirinógeno

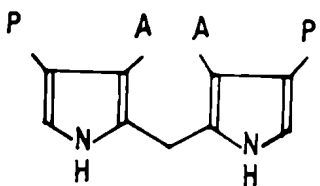
Dipirrilmetanos y tripirranos sintéticos



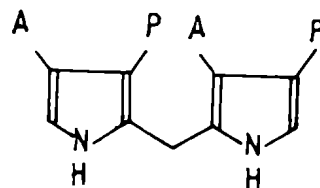
dipirrilmetano 1



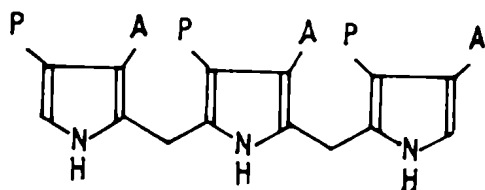
dipirrilmetano 2



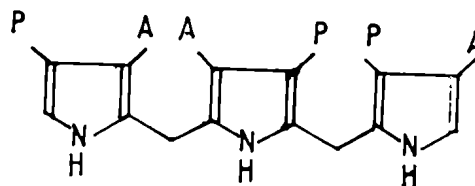
dipirrilmetano 3



dipirrilmetano 4



tripirrano 5



tripirrano 6

cos o tripirrólicos previamente sintetizados por la deaminasa. Se encontró que el dipirrilmetano denominado 1 en la figura 24^b se incorporaba en un 10% y únicamente en el uroporfirinógeno I por incubación con deaminasa o deaminasa-cosintasa y PBG. Este dipirrilmetano también ejerció un efecto inhibitorio sobre la formación enzimática de urógeno III, al mismo tiempo que aumentaba la formación enzimática del urógeno I.

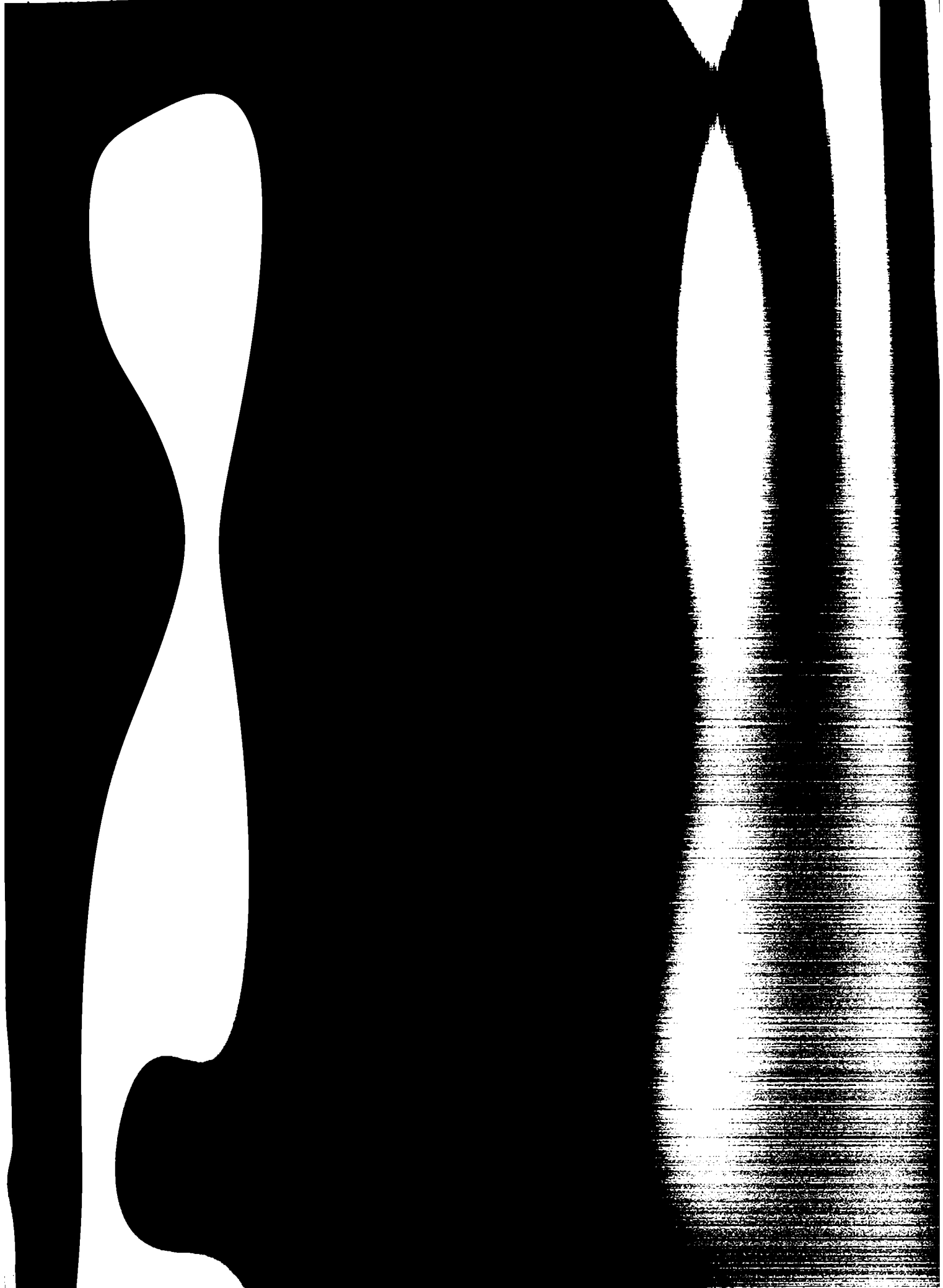
El dipirrilmetano 3, derivado formalmente de la condensación cabeza-cabeza de dos unidades de PBG, incubado con el sistema enzimático y PBG, se incorporó al uroporfirinógeno III y no al I. (Frydman, Valasinas, Rapoport y Frydman, 1972). Los valores de incorporación fueron bajos, del mismo orden que los de la incorporación del dipirrilmetano 1. Los dipirrilmetanos 2 y 4, "nonsense" desde el punto de vista biosintético, no se incorporaron en ninguno de los dos isómeros.

El tripirrano ⁵PAPAPA se incorporó en un 2-8% al uroporfirinógeno I únicamente, y ejerció un efecto inhibitorio sobre la formación del urógeno III. El tripirrano ⁶PAAPPA no se comportó como sustrato de la deaminasa ni de la cosintasa ni del sistema deaminasa-cosintasa. Este tripirrano no se incorporó a ninguno de los 2 uroporfirinógenos, e inhibió la formación de urógeno III. Los resultados obtenidos por incubación de estos intermediarios revelaron que durante la reacción no se liberaban intermediarios al medio que luego eran tomados en la etapa siguiente de la polimerización, sino que los intermediarios permanecían unidos al sistema enzimático, y la polimerización ocurriría sobre la superficie de la enzima. Además, no habría intermediarios pirrilmetanos comunes a los uroporfirinógenos I y III. De acuerdo a estos resultados, la cosintasa podría actuar modificando la acción

de la deaminasa, de modo que ésta catalice no ya la condensación secuencial cabeza-cola con eliminación de amoníaco, sino la condensación cabeza-cabeza de las cuatro unidades de PBG por desplazamiento de un grupo "metilo activo".

Teniendo en cuenta esta hipótesis de trabajo, se consideró necesario purificar a cada una de las dos enzimas, estudiar sus propiedades en general, e investigar la posible interacción de la cosintasa con el porfobilinógeno y con la deaminasa, para contribuir a esclarecer el mecanismo por el cual el sistema enzimático dual cataliza la inversión que da por resultado la síntesis del uroporfirinógeno III.

* Recientemente, se ha adoptado el nombre cosintasa en lugar de cosintetasa para esta enzima. Ambas denominaciones son equivalentes.



MATERIALES

El germen de trigo fue donado gentilmente por Molinos Río de la Plata (Buenos Aires).

Los eritrocitos humanos fueron obtenidos por el Servicio de Hemoterapia de la Academia Nacional de Medicina.

El porfobilinógeno, el porfobilinógeno ^{14}C (25000 cpr./nmol), el ácido 2-amino-metil-3-pirrolacético, el ácido 2-aminometil-4-etil-3-pirrolacético, el ácido 2-metil-opsopirroldicarboxílico, el éster dimetilico de este último, y el isoporfobilinógeno fueron obtenidos por síntesis de acuerdo a los métodos de Frydman y colab. (1969) y Frydman, Buldain y Repetto (1973).

La DEAE-celulosa fue obtenida de Eastman Kodak y usada luego de purificarla según el método de Peterson y Sober (1962).

Las Sephadex, la Sepharosa 4B y el azul dextrano 2000 se obtuvieron de Pharmacia (Suecia).

Los solventes para cromatografía se purificaron según se indica en el libro de Falk (1964).

MÉTODOS

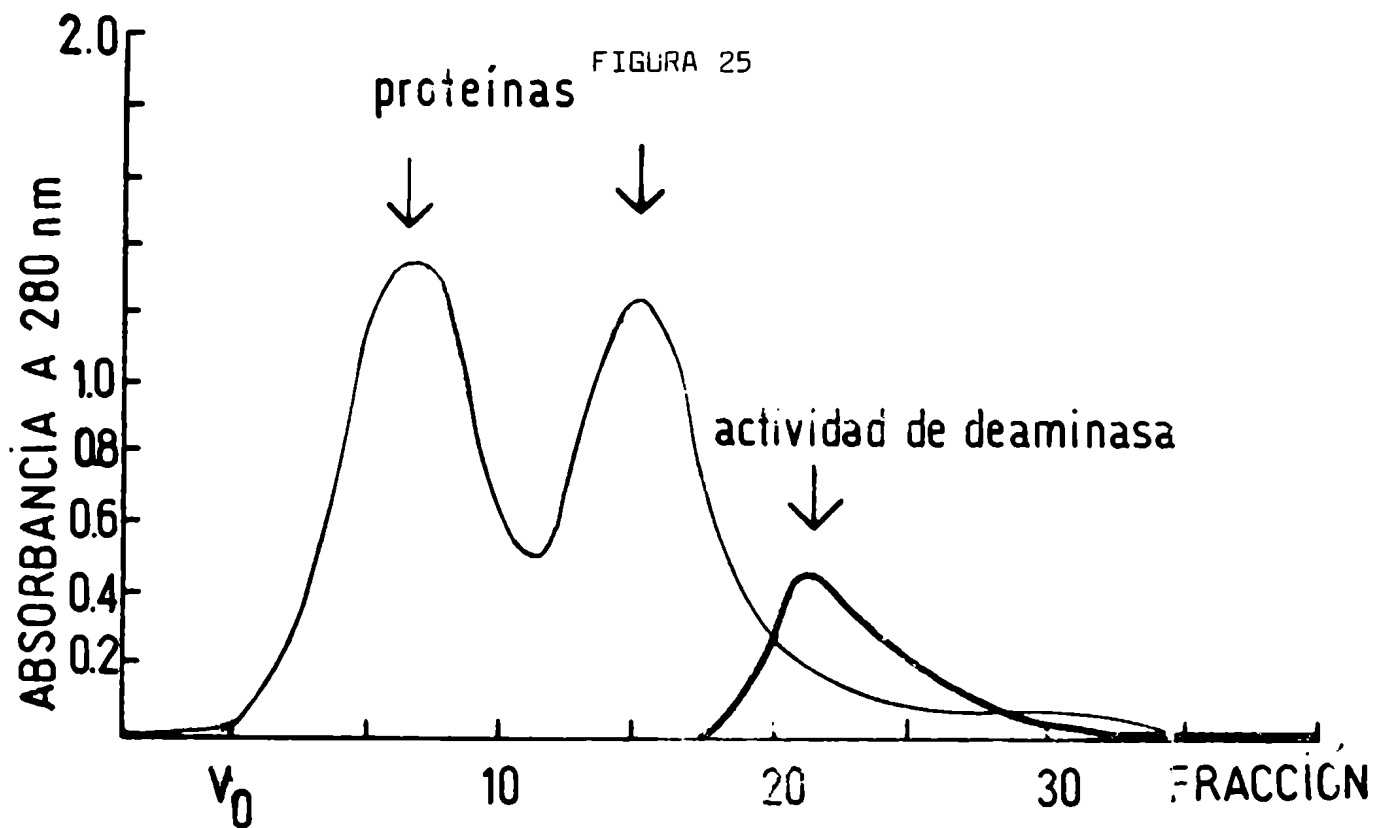
Preparación de las enzimas de germen de trigo

1) Extracción Se utilizó el método de Stevens y Frydman (1968), 100 g de germen de trigo fueron extraídos con 400 ml de agua,

con agitación mecánica. La suspensión obtenida se centrifugó a 15.000g durante 10 minutos y el sobrenadante se llevó a pH 5 con ácido acético 1M, dejándolo en reposo 30 minutos. Luego de una nueva centrifugación a 15.000g durante 10 minutos, el sobrenadante se fraccionó con sulfato de amonio sólido en tres fracciones: 0-30%, 30-50% y 50-70% de saturación. La primera de estas fracciones se descartó. Los precipitados de la segunda y tercera fracción se redisolviéron en buffer Tris-HCl pH 7.6 0.01M y se dializaron 1 noche contra 4 litros del mismo buffer. Fueron utilizadas estas dos fracciones como fuente de porfobilinógeno deaminasa y uroporfirinógeno III cosintasa respectivamente.

2) Preparación de porfobilinógeno deaminasa para dosaje de cosintasa. Fracciones de 30-50% SA correspondientes a dos preparaciones fueron cromatografiadas sobre una columna de DEAE-celulosa de 2,5x30 cm equilibrada con buffer Tris-HCl 0.01M (pH 7.6) y eluidas con este mismo buffer con el agregado de ClNa 0.05M, 0.1M y 0.2M, usando 420 ml de cada solvente. Se recogieron fracciones de 30 ml, utilizándose las fracciones de la última elución como fuente de deami nasa. Las fracciones activas se reunieron y concentraron con Carbowax 6000 (polietilenglicol) hasta una décima parte del volumen origi nal. Esta enzima fue la usada en los ensayos de actividad de cosinta sa en este trabajo, y se la denominará de ahora en adelante deamina sa de germen de trigo DEAE.

3) Preparación de porfobilinógeno deaminasa de germen de trigo purificada. Luego de obtener la PBG deaminasa de germen de trigo concentrada de la columna de DEAE-celulosa, se la purificó por una Sephadex G-100 (3x35)cm, con el siguiente patrón de elución:



La porfobilinógeno deaminasa purificada por Sephadex G-100 y concentrada fué dializada exhaustivamente contra 8 litros de agua durante 16 horas. Se adsorbió esta enzima en un gel de fosfato de calcio, según se describe en la purificación de Frydman y Frydman (1970). Se utilizó 5 mg de gel por cada mg de proteína, se dejó en reposo y se centrifugó durante 10 minutos a 15.000 g para separar el sobrenadante. El gel fue eluido dos veces con buffer de fosfatos 0.01 M a pH 7.4. Esta enzima es denominada deaminasa de germen de trigo purificada.

Preparación de las enzimas de eritrocitos humanos

Se diluyó 300ml de eritrocitos con 300ml de agua destilada, agitando durante 10 minutos para facilitar el hemolizado. Se conservó la suspensión de eritrocitos en agua durante por lo menos 48 hs a -15°C . Se descongeló y centrifugó a 20.000g durante 20 min., descartándose el precipitado y filtrándose el sobrenadante por tela de nylon. Parte del sobrenadante (150ml) se dializó contra buffer de fosfato 0.003M a pH 7.4 antes de usar. El resto se conservó a -15°C y era estable por lo menos durante tres meses.

Cromatografía por DEAE-Celulosa

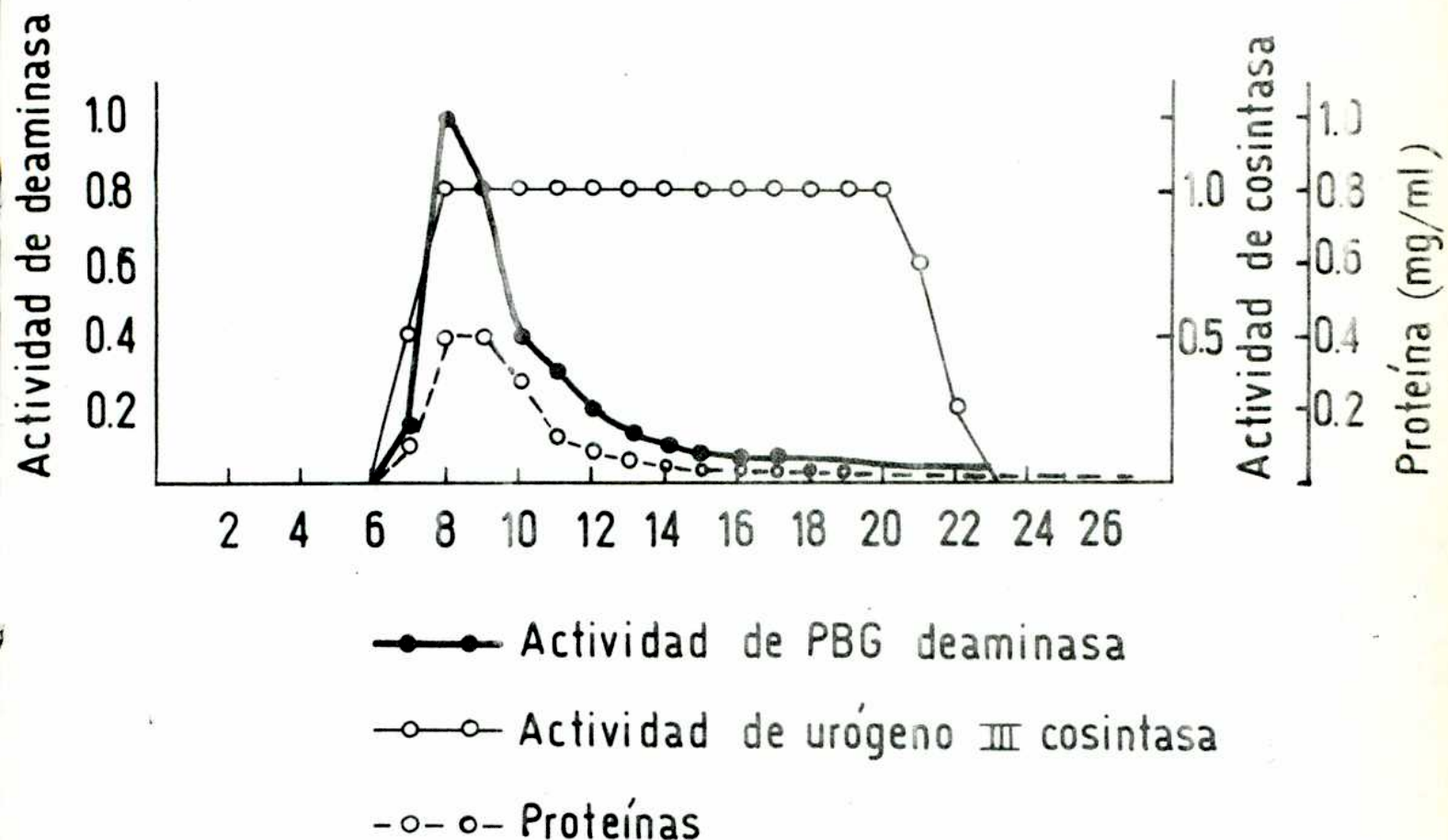
El sobrenadante dializado (150ml) se adsorbió sobre una columna de DEAE-celulosa (5x20) cm previamente equilibrada con buffer de fosfatos 0.003M (pH 7.4). Gran parte de la hemoglobina y otras proteínas se eluyeron lavando la columna con 8 litros del mismo buffer. La PBG deaminasa y la urógeno III cosintasa fueron eluidas con 800 ml de buffer de fosfatos 0.1M (pH 7.4), recogiendo fracciones de 40 ml. Un típico perfil de elución de esta columna puede verse en la figura 26.

Las fracciones correspondientes al máximo de actividad de deaminasa fueron reunidas y concentradas hasta una décima parte de su volumen original con Carbowax 6000. Esta enzima resultó estable hasta tres meses después, conservándola a 4°C . Una segunda columna de DEAE-celulosa se realizaba en los casos en que se consideraba necesario obtener una deaminasa libre de cosintasa.

Filtración por Sephadex G-100

La preparación de deaminasa obtenida de la primera columna de DEAE-celulosa (3ml) fue filtrada por una columna de Sephadex G-100 de 3x35 cm previamente equilibrada con buffer de fosfatos 0.05M

Cromatografía en DEAE-celulosa de las enzimas de eritrocitos humanos



(pH 7.4) y eluida con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 3ml, reuniéndose las fracciones de mayor actividad enzimática. Estas fueron concentradas hasta un décimo de su volumen. La enzima concentrada se conservaba ocho días a 4°C sin pérdida significativa de su actividad. Esta preparación se usó como fuente de PBG deaminasa de eritrocitos. Una mayor purificación se obtenía usando una columna Sephadex G-100 de 1 m de longitud. En la Tabla I puede observarse una secuencia de purificación de PBG deaminasa.

Preparación de urógeno III cosintetasa

Las fracciones de la columna de DEAE-celulosa con buena actividad de cosintasa pero sin actividad de deaminasa fueron reunidas y

TABLA 1

Fracción	Actividad recuperada %	Actividad específica unidades/ ^(a) mg proteína $\times 10^{-3}$	isómero de uroporfirinógeno obtenido
Hemolizado	100	0.1	III
Eluido de primera DEAE-celulosa	83	1.6	III
Eluido de Sephadex G-100 (concentrado)	33	15.2	I - III
Eluido de segunda DEAE-celulosa (b)	60	16	I

(a) unidad de enzima = la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 umol de uroporfirinógeno en las condiciones descritas en Métodos.

(b) La enzima fué previamente concentrada por precipitación con sulfato de amonio (entre 45 y 60% de saturación).

concentradas por precipitación con sulfato de amonio (0-80% de saturación). El precipitado se disolvió en un mínimo volumen de buffer de fosfato 0.003M (pH 7.4) y se dializó 16 hs contra el mismo buffer. Esta preparación es estable durante seis meses conservándola congelada a -15°C . La enzima (20 ml conteniendo 4 mg proteína/ml) formaba 05 nmoles de uroporfirinógeno III (medido como coproporfirina) en las condiciones de incubación standard, y fue usada como fuente de cosintasa de eritrocitos humanos en la mayoría de los casos, salvo donde se indica una mayor purificación.

Activación de Sepharosa 4B y unión a proteínas

La activación de Sepharosa 4B para luego poder unirla covalentemente a proteínas se realizó según la técnica de Cuatrecasas (1968). 5ml. de lecho de Sepharosa 4B se mezclaron con 5 ml de agua, agregándose con agitación 2g de BrCN; durante aproximadamente 15 minutos se mantuvo constante el pH en 11, por agregado de OHNa 6N, y la temperatura en 20°C . Cuando el pH se mantiene en 11 sin más agregado de álcali, se lava rápidamente (en menos de 1 min.) la Sepharosa activada con HCO_3Na 1N a pH 10 y se la coloca junto con 50 mg de la enzima a la cual se quiere unir covalentemente, disuelta ésta en HCO_3Na pH 10. Se agita suavemente de 16 a 20 hs en frío y luego se lava dos veces con ácido acético 0.1N y con buffer de fosfatos 0.003M (pH 7.4) otras dos veces, hasta que $A_{280\text{nm}}=0$ en el sobrenadante del último lavado.

Activación de Sepharosa 4B y unión a azul dextrano

La activación se lleva a cabo de idéntica forma que en el caso anterior. Una vez activados 50 ml de Sepharosa 4B con 15g BrCN, se

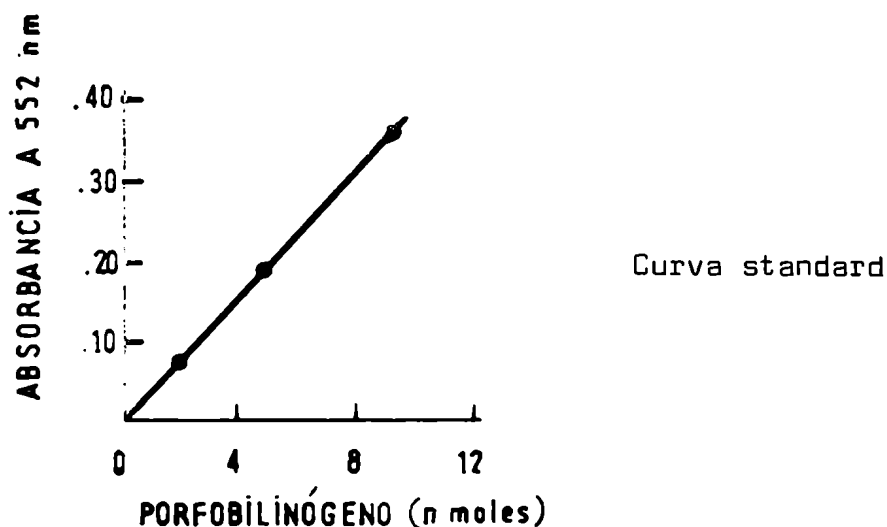
colocan junto con 1g de azul dextrano disueltos en 50 ml de HCO_3Na IN a pH 10 y se deja agitando a 4°C durante 16-20 hs. Se lava repetidas veces con ClK 1M hasta que no se libera más azul de la resina. El complejo Sepharosa 4B-azul dextrano es estable, aunque una pequeña parte del azul dextrano se va liberando con el tiempo. La nueva resina es la vada con ClNa 3.5M después de cada vez que es usada.

Ensayo de actividad enzimática

La mezcla de incubación tipo contenía 13 nmoles de PBG o de ^{14}C -PBG, 10 umoles de buffer de fosfatos, pH 7.4, y enzima en un volumen total de 100 ul. Salvo indicación contraria, las incubaciones fueron llevadas a cabo durante 60 minutos a 37°C . Para el ensayo de actividad de uroporfirina III cosintasa, se agregó a la mezcla de incubación porfobilinógeno deaminasa en cantidad suficiente como para formar 0.8-1.5 nmoles de uroporfirina en total.

Actividad de deaminasa

Consumo de F3G El PBG se usó según el método de Falk (1964). Se interrumpió la reacción con el agregado de 0.7 ml de agua destilada y 0.8 ml de una solución al 2% de p-dimetilaminobenzaldehído en ácido acético: ácido perclórico (84:16, v/v, Reactivo de Ehrlich). Se dejó en reposo durante 10 minutos, y se leyó la absorbancia a 552 nm. El blanco de reactivos se preparó agregando el PBG o la deaminasa al finalizar la incubación. La diferencia entre las dos lecturas permitió calcular la cantidad de PBG consumido.



Uroporfirinógeno total formado. Se midió directamente en el medio de incubación oxidando con 10 ul de iodo al 1%, decolorando con 10ml de tiosulfato de sodio al 2%, completando a 1.6 ml con una solución de HCl 2% y EDTA 4%, y leyendo las absorbancias a 380 nm, a 405 nm (banda de Soret) y a 430 nm. La cantidad total de uroporfirina se calculó con la fórmula mencionada por Falk (1964):

$$\text{nmoles de uroporfirina: } \frac{2A_{405} - (A_{380} + A_{430}) \cdot v \cdot 10^3}{k}$$

donde $mM = 541$

$k = 1844$

$v =$ volumen de lectura en ml

Actividad de cosintasa

La actividad de cosintasa se determinó evaluando la proporción de uroporfirinógeno III formado con respecto al total de uropor-

firinógenos formados. Esta evaluación se hizo en muchos casos utilizando el método de Cornford y Benson (1963) de análisis de uroporfirinas isómeras, que consiste en la separación cromatográfica en papel de los ésteres octametílicos de las porfirinas correspondientes. Este método sólo permite estimar la proporción de los isómeros I y III. El método consiste en la esterificación de las uroporfirinas formadas durante la incubación con una mezcla de metanol y ácido sulfúrico 19:1 en medio anhidro. Luego de una noche en que se mantiene en lugar oscuro, se extrae con éter y se lava con agua hasta eliminar toda acidez. Se seca, se disuelve en el mínimo volumen de cloroformo, y se cromatografía en forma ascendente en papel Whatman Nº 1, en dos sistemas de solventes (Cornford y Benson).

1ª corrida (separa impurezas y porfirinas no esterificadas que quedan cerca del origen): 6 ml de cloroformo/etanol 1% y 4 ml de kerosene (fracción que destila entre 160^o y 180^oC).

2ª corrida (en la misma dirección, después de cortar el papel por debajo de las manchas de porfirina): 4 ml de kerosene y 1 ml dioxano.

Ambas corridas se llevan a cabo entre 21^o y 22^oC. Las manchas correspondientes a uroporfirina I y III tienen una fluorescencia roja característica bajo luz ultravioleta. Ya que el método da resultados que deben ser tenidos en cuenta en forma cualitativa, la estimación de la proporción de isómeros una vez obtenidas las manchas se hizo observando éstas con luz ultravioleta. En los casos en que se consideró necesario se eluyeron con cloroformo las manchas y se hizo la correspondiente lectura de uroporfirinas de cada una.

El método de estimación de isómeros descrito fue usado en las secuencias de purificación de cosintasa. Un método más exacto de analizar la composición isomérica de mezclas de uroporfirinas es el de la decarboxilación química, según Edmondson y Schwartz (1953). Las mezclas de uroporfirinas isómeras fueron esterificadas, y los ésteres octametílicos de uroporfirinas decarboxilados a ésteres de coproporfirinas con HCl N a 180°C ns. Luego se extrajeron y separaron por cromatografía en placas de celulosa (E. Merck, DC-Fertigplatten, Schichtdicke 0.10mm) con 2,6-lutidina 0.7M-NH₄OH (40:28, v/v) como solvente. Los isómeros de coproporfirinas fueron ubicados por fluorescencia y eluidos con una solución de NH₄OH 0.7M. Los eluidos fueron plaqueados luego sobre planchuelas de aluminio y contados en un contador de flujo gaseoso. Este fue el método adoptado de rutina para el análisis de isómeros en el estudio de las propiedades de la cosintasa.

Determinaciones de peso molecular por Sephadex G-100

Se determinaron por el método de Andrews para lo cual se calibró una columna de (5.9 x 95) cm de Sephadex G-100 con los marcadores proteicos seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, hormona de crecimiento bovina y ribonucleasa. Esta columna, equilibrada con buffer de fosfato 0.05M pH 7.4, con flujo de 6ml/hora fue utilizada en la determinación de peso molecular de deaminasa de eritrocitos humanos.

En las demás determinaciones, se utilizaron como marcadores las siguientes proteínas: ovoalbúmina, lisozima, seroalbúmina bovina, y pepsina. La calibración se realizó graficando en forma semilogarítmica

Ve en función del peso molecular conocido de cada proteína. Se aplicó V_0 luego sobre la columna una solución de la proteína de peso molecular a determinar. Ensayando la actividad de la enzima de peso molecular desconocido en las distintas fracciones eluidas, se pudo calcular el Ve. Con la recta de calibración, y conociendo el Ve de la proteína problema, se determinó su peso molecular.

Succinilación de enzimas

La succinilación se llevó a cabo tratando la enzima con anhídrido succínico (0,5 mg por mg de enzima). El agregado de anhídrido succínico se hizo lentamente con agitación constante, manteniendo el pH en 8.0 por el agregado de una solución de OHNa 0.1M.

Determinaciones y preparados varios

Los análisis fluorométricos fueron realizados en un espectrofluorómetro Aminco Bowman. Las determinaciones espectrofotométricas fueron hechas en parte con un espectrofotómetro Beckman DU y en parte con un espectrofotómetro Perkin-Elmer 46.

Se utilizó un pH stato Radiometer para mantener el pH constante durante la reacción de activación de la Sepharosa.

Las determinaciones de proteína fueron hechas por el método de Lowry o alternativamente por su absorción a 260 y 280nm.

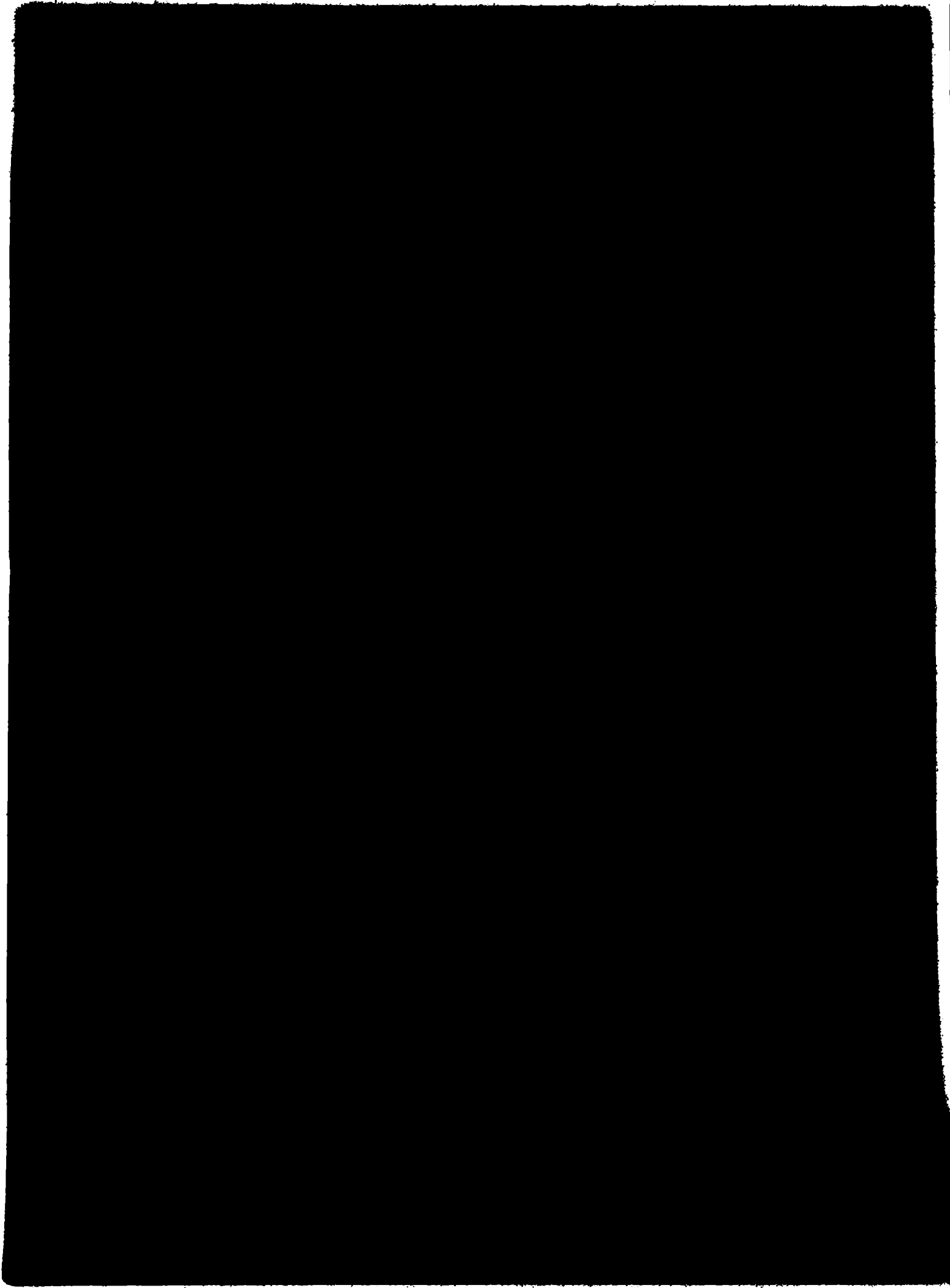
Medición de actividad de PBG deaminasa en discos de gel de poliacrilamida

La actividad de deaminasa se midió en dos formas distintas: en el gel entero o en el gel fraccionado en discos de aproximadamente

1,5 mm. En el primer caso, se incubaba durante 60 minutos a 37°C en forma horizontal el gel con 200 ul de agua, 100 ul de buffer de fosfato 100mM a pH 7.4 y 0.15 umoles de PBG. Se observa la banda de actividad por fluorescencia bajo una lámpara de luz ultravioleta. En el segundo caso, se corta el gel desde el frente de corrida hasta el origen en discos de igual espesor (1,5mm) y se ensaya la actividad en cada disco por separado con la mezcla de incubación standard pero sin deaminasa.

Fotooxidación

Las enzimas fueron fotooxidadas en presencia de buffer y de los colorantes indicados al 0.03% iluminando tubos pequeños dentro de un baño de hielo durante 5 minutos. Se utilizó como fuente luminosa una lámpara de tungsteno de 100 watts a una distancia de 20 cm de los tubos. Los controles no iluminados se mantuvieron en hielo durante el tiempo de iluminación de los demás. En los experimentos de fotooxidación de la cosintasa, se inició la incubación luego de agregar la deaminasa y el ^{14}C -porfobilinógeno (9nmoles, 2550 cpm/nmol).



PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA PORFOBILINOGENO DEAMINASA
DE ERITROCITOS HUMANOS

La porfobilinógeno deaminasa de eritrocitos humanos eluida de la columna preparativa de DEAE-celulosa, además de encontrarse junto con urogénico III cosintasa, se comportaba como una enzima sumamente lábil (Stevens y Frydman, 1968). Sin embargo, al concentrar las fracciones activas con Carbowax 6000 y conservarlas a 4°C se logró una enzima estable hasta los tres meses después de su elución. Esta estabilización probablemente se deba al efecto protector del fosfato en altas concentraciones.

Al ensayar la actividad de la enzima eluida de la DEAE-celulosa, se encontró que la relación entre el consumo de PBG y la formación de uroporfirinógeno era estequiométrica (cuatro moles de PBG consumidos por cada mol de porfirina formado). A partir de algunas muestras de eritrocitos, sin embargo, se obtenían preparaciones de deaminasa con rendimientos más bajos. Al filtrar por Sephadex G-100 esas preparaciones, se pudo correlacionar los rendimientos de porfirina con la inactivación a través del tiempo de las fracciones eluidas. (Tabla 2).

Las fracciones con menor rendimiento resultaron ser las más lábiles, perdiendo su actividad después de las 48 hs. Las fracciones que daban mayor rendimiento en porfirinas tenían una mayor concentración proteica (aunque no necesariamente eran las fracciones

TABLA 2

Fracción No	Actividad original			Actividad después de 48 hs.		
	PBG (nmoles)	Porfirina (nmoles)	Rendimiento (%)	PBG (nmoles)	Porfirina (nmoles)	Inactivación (%)
8	1.35	0.34	100	1.35	0.33	0
12	10.8	2.3	85	8.37	1.76	23
14	10.8	2.08	77	4.05	0.72	63
16	7.29	1.36	74	2.20	0.16	70
17	4.86	0.80	66	1.62	0.1	67
18	2.63	0.40	60	0	0	100
19	1.08	0.16	58	0	0	100

más activas) y eran más estables. Este hecho, también observado con la deaminasa de germen de trigo, podía deberse a un efecto estabilizador de las proteínas sobre el sitio de ciclación de uroporfirinógenos de la deaminasa.

Estabilidad

La enzima purificada por Sephadex G-100 y concentrada resultó estable a 4°C durante un mes. Cuando esta enzima se dializaba

contra fosfato 0.003M (pH 7.4), evidenciaba una pérdida del 50% de su actividad en 24 horas. Esto corroboró el efecto protector del anión fosfato en altas concentraciones. Este parece ser imprescindible para la estabilidad de la enzima.

Temperatura

A -15°C , la enzima se inactivaba rápidamente. Podía ser calentada, sin embargo, hasta los 65°C durante 15 minutos sin una pérdida significativa de su actividad. Un precalentamiento a 70°C durante 5 minutos daba como resultado una mayor actividad; sin embargo, luego de calentarla a 70°C durante 15 minutos, se observaba una pérdida del 20-30% de la actividad original. La enzima perdía totalmente su actividad por calentamiento a 100°C durante 1 minuto. La actividad enzimática aumentaba con la temperatura. (Figura 28).

A 19°C , la actividad es sólo un 20% de la actividad a 37°C , mientras que a 45°C es más de dos veces la actividad a 37°C . A 45°C no hay polimerización química del PBG en las condiciones descriptas para el ensayo de actividad.

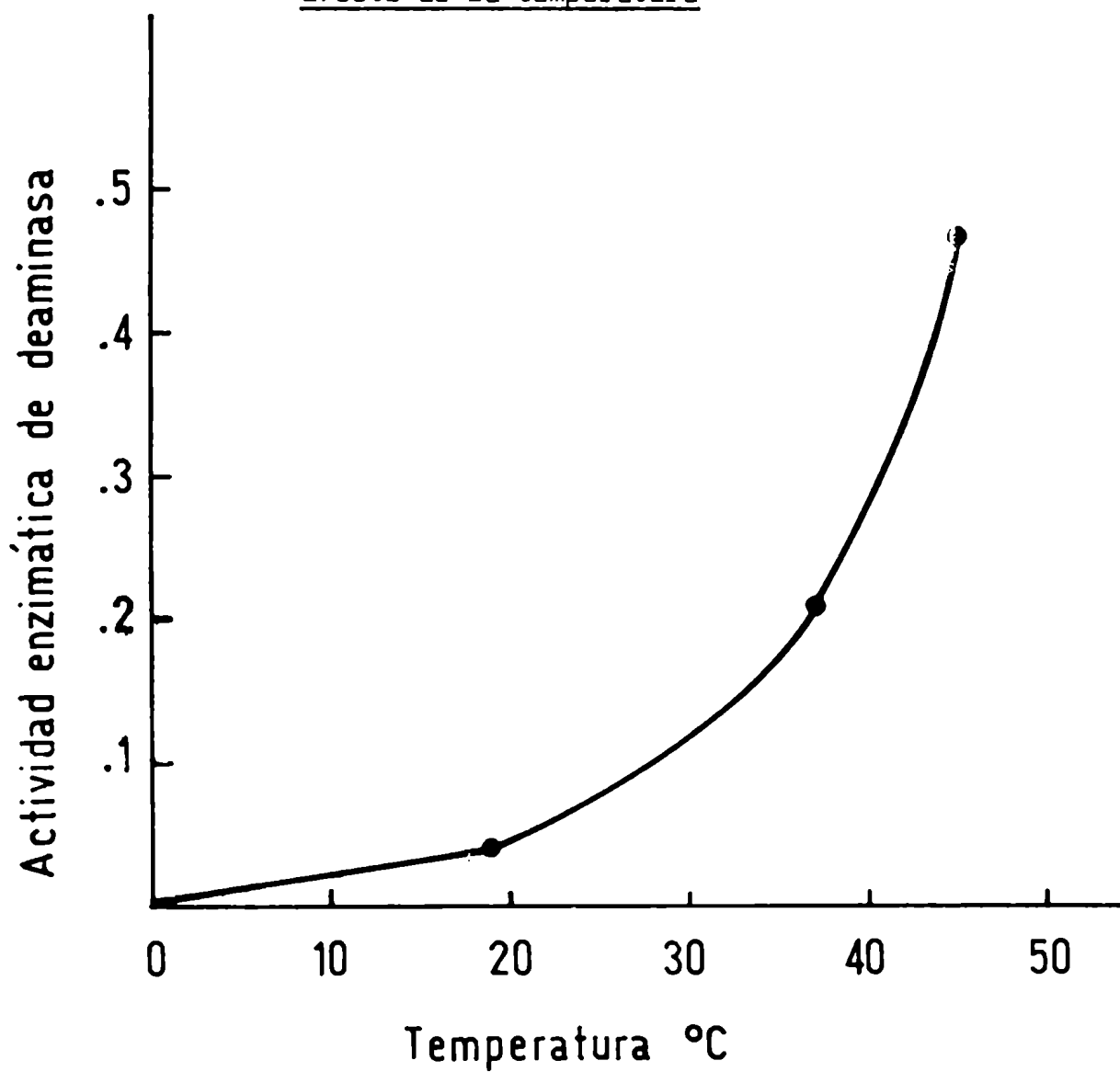
El agregado de glicerol 15% inhibió en un 40% la actividad de la deaminasa; este efecto es aumentado por precalentamiento de la enzima a 70°C .

pH óptimo

Se encontró un pH óptimo de 7.4 con buffer de fosfatos para la deaminasa purificada por Sephadex G-100, concentrada y dializada. Con buffer Tris-HCl, el pH óptimo es de 8.2. La enzima es estable

FIGURA 28

Efecto de la temperatura



por encima de 9, e inestable por debajo de 5. La actividad enzimática se pierde después de preincubar la enzima con buffer acetato (pH 3.9) durante 15 minutos seguidos de diálisis.

Efecto de agentes disociantes

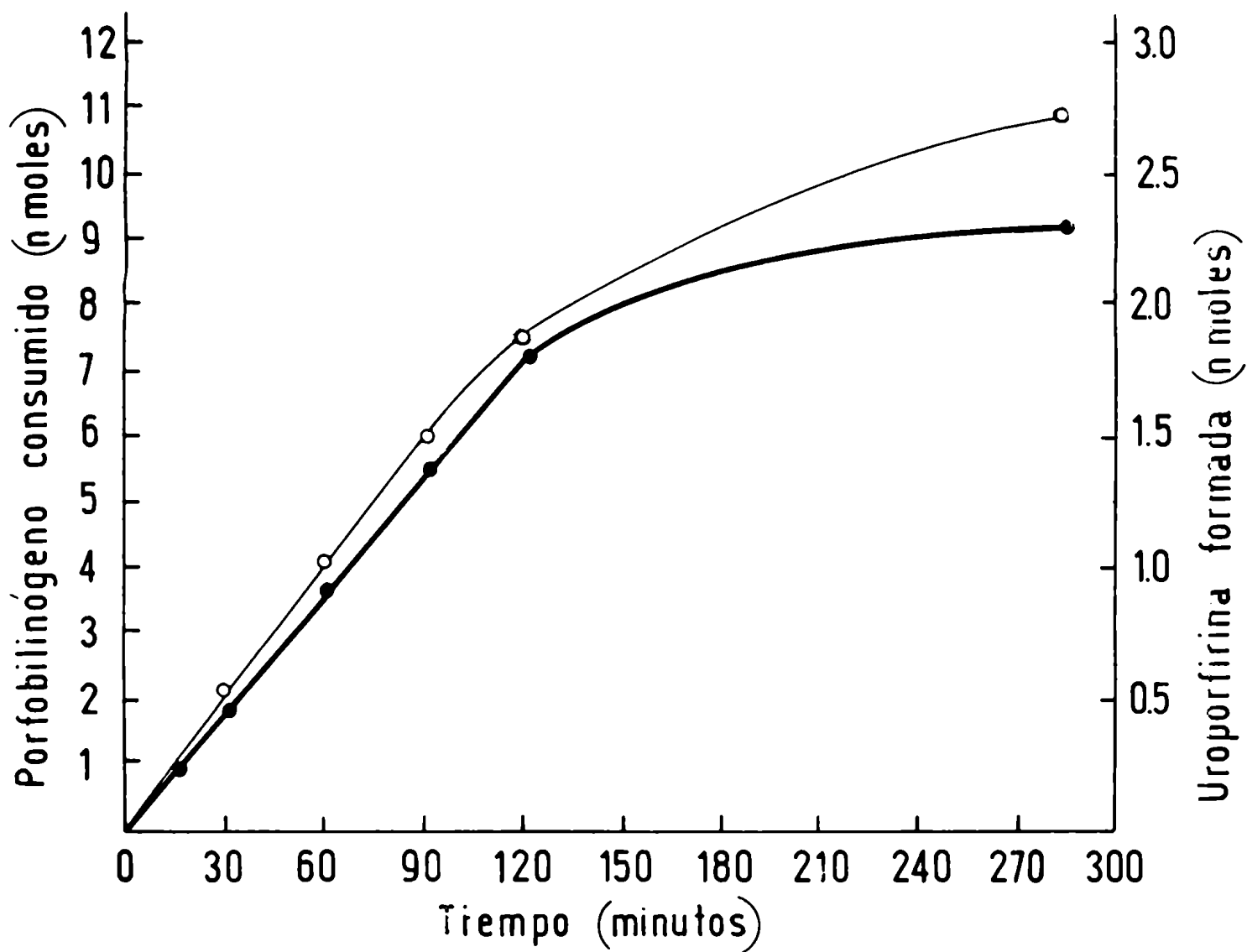
La urea 8M inhibió la actividad enzimática, pero esta inhibición fue totalmente revertida por dilución o diálisis. Una pérdida del 75% de la actividad de deaminasa tuvo lugar en presencia de dodecilsulfato de sodio 0.025%, y el 100% de la actividad se perdió con 0.03% de dodecilsulfato de sodio.

Peso molecular

Se determinó el peso molecular de la porfobilinógeno deaminasa de eritrocitos humanos por filtración por Sephadex G-100. En una columna de Sephadex G-100 (0,9x95) cm equilibrada con 0.05M de buffer de fosfato, pH 7.4, con un flujo de 6ml por hora se determinó el volumen muerto (V_0) usando azul dextrano y los volúmenes de elución (V_e) de los marcadores proteicos de peso molecular conocido (seroalbúmina bovina, ovoalbúmina, hormona de crecimiento bovina y ribonucleasa). Se calculó V_e/V_0 para cada proteína. La enzima fue filtrada a través de esta columna y la actividad en el eluido determinada por un ensayo de actividad. Para la PBG deaminasa de eritrocitos la relación $\frac{V_e}{V_0}$ fue de 1,8 correspondiente a un peso molecular de 25.000+5.000, considerando a la enzima como una proteína globular.

Cinética

La actividad de la PBG deaminasa se incrementa linealmente en función del tiempo durante 2 horas. Luego de este período, el incre

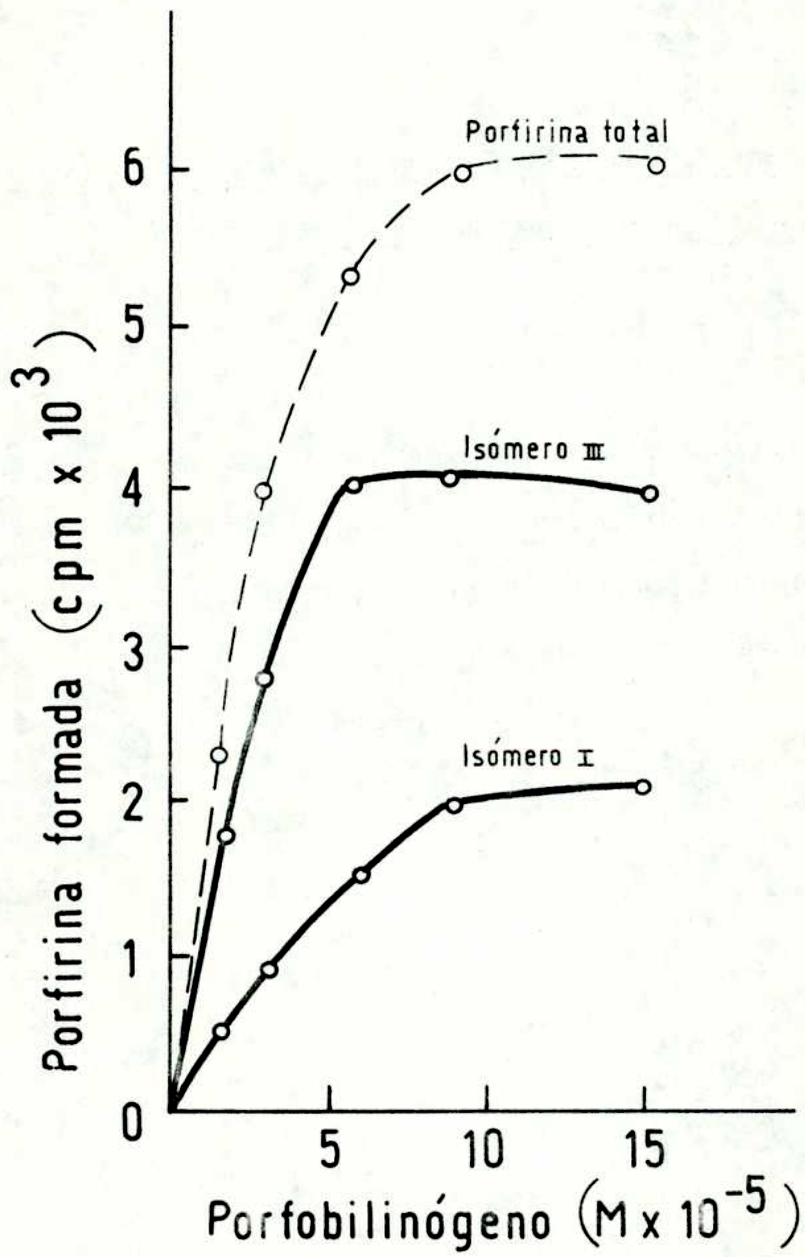


- Uroporfirina formada
- Porfobilinógeno consumido

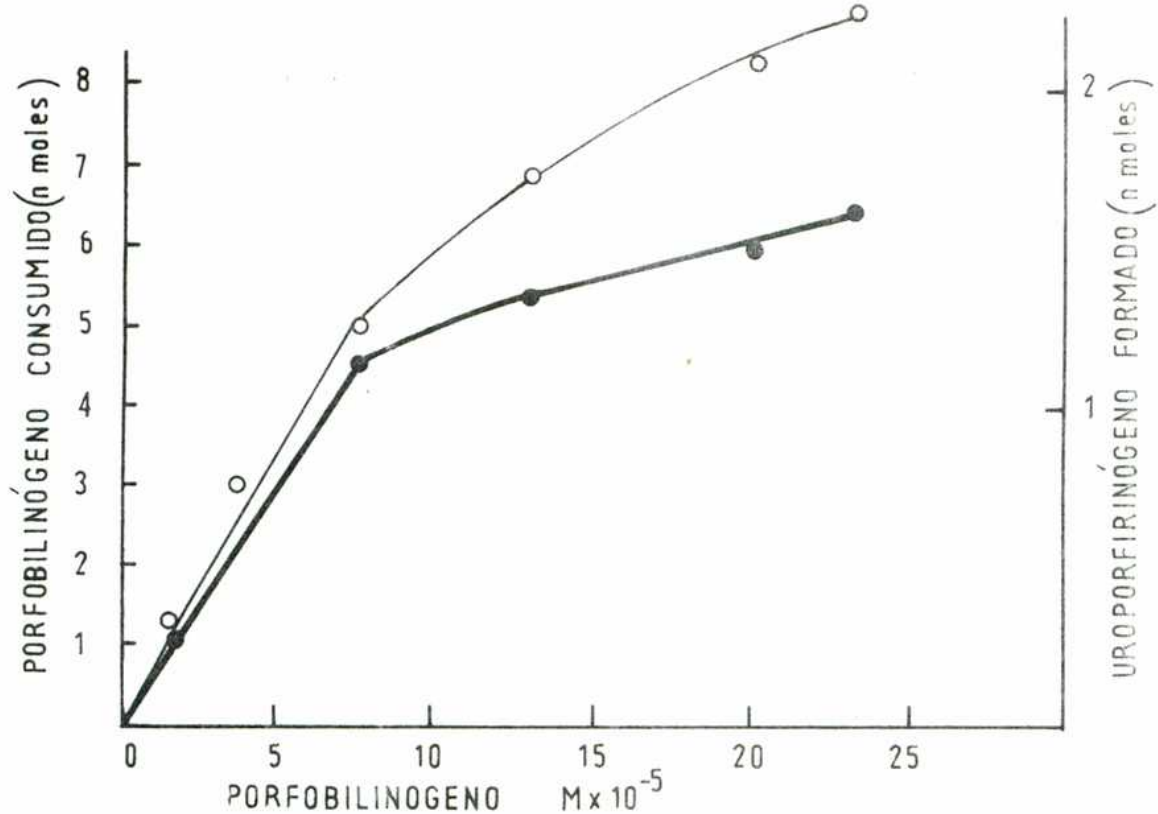
mento es menor. (Figura 29).

El efecto de la concentración de sustrato sobre el consumo de sustrato y la formación del producto (Figura 30) es el descrito por una clásica cinética de Michaelis-Menten.

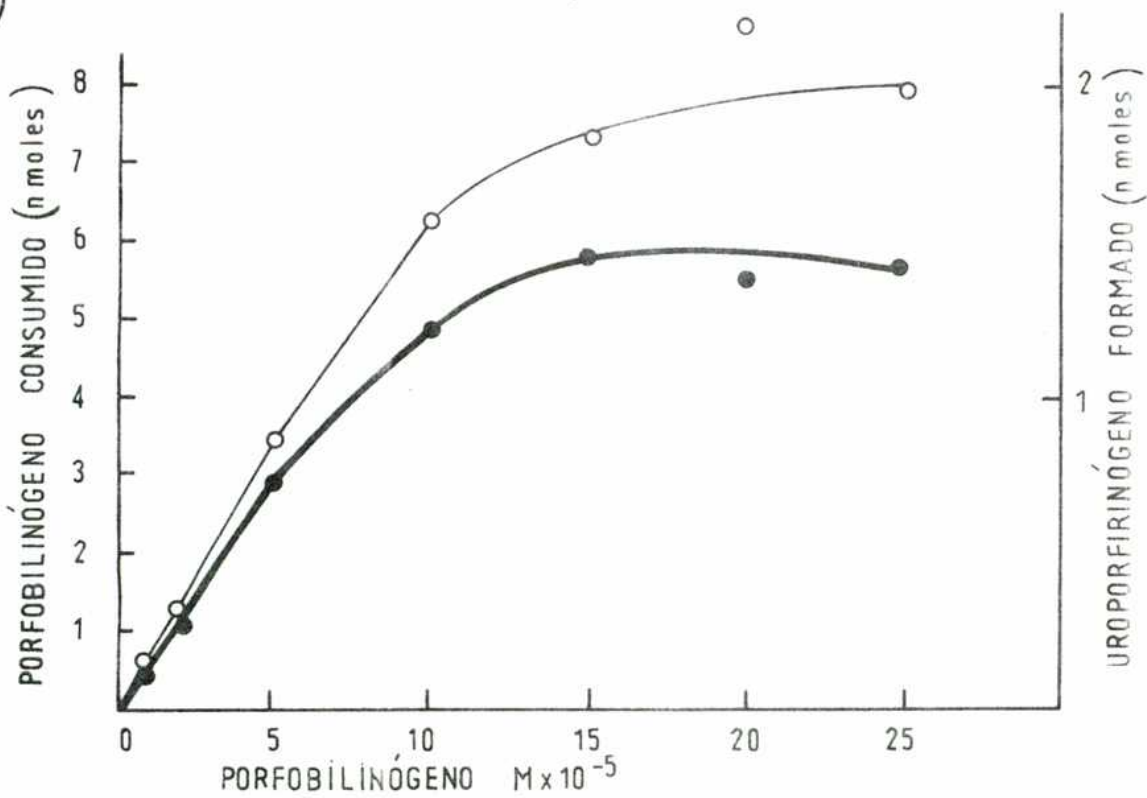
Se hizo el mismo estudio agregando cosintasa al sistema de manera que el producto formado fuera un 100% de uroporfirinógeno III, y también con un sistema completo deaminasa-cosintasa que formaba 80% de uroporfirinógeno III. En estos dos casos, se comprobó nuevamente que se cumplía una cinética de Michaelis-Menten. Es decir, que la actividad (formación total de uroporfirinógenos) en función de la concentración de sustrato seguía una cinética micaeliana en ambos casos, ya se tratara de deaminasa sólo o del sistema enzimático completo. No se observó, con este sistema de eritrocitos humanos, una cinética alostérica tal como fue descrita por Sancovich et al (1969) para el sistema aislado de hígado bovino. De los valores de consumo de PBG, se calculó para la PBG deaminasa sola una Km de $1,3 \times 10^{-4}$ M y de los valores de formación de porfirinas, una Km de $7,7 \times 10^{-5}$ M. Las velocidades máximas calculadas para la deaminasa fueron de 15,3 nmoles/hora y de 2,1 nmoles/hora para el consumo de PBG y para la formación de porfirinas, respectivamente. En el caso del sistema deaminasa-cosintasa, los valores de consumo de PBG permitieron calcular una Km de $4.6 \cdot 10^{-5}$ M, y los valores de formación de uroporfirina dieron una Km de $5.1 \cdot 10^{-5}$ M. $V=7.0$ nmoles/hora para el consumo de sustrato y $V=1,4$ nmoles/hora para la formación de porfirinas fueron los valores de velocidad máxima hallados usando una misma preparación de deaminasa en ambos casos. Estos resultados indicaron que la afinidad por el PBG es algo mayor y la velocidad de reacción algo menor en el sistema deaminasa-cosinta



a)



b)



●—● Uroporfirinógeno formado
○—○ Porfobilinógeno consumido

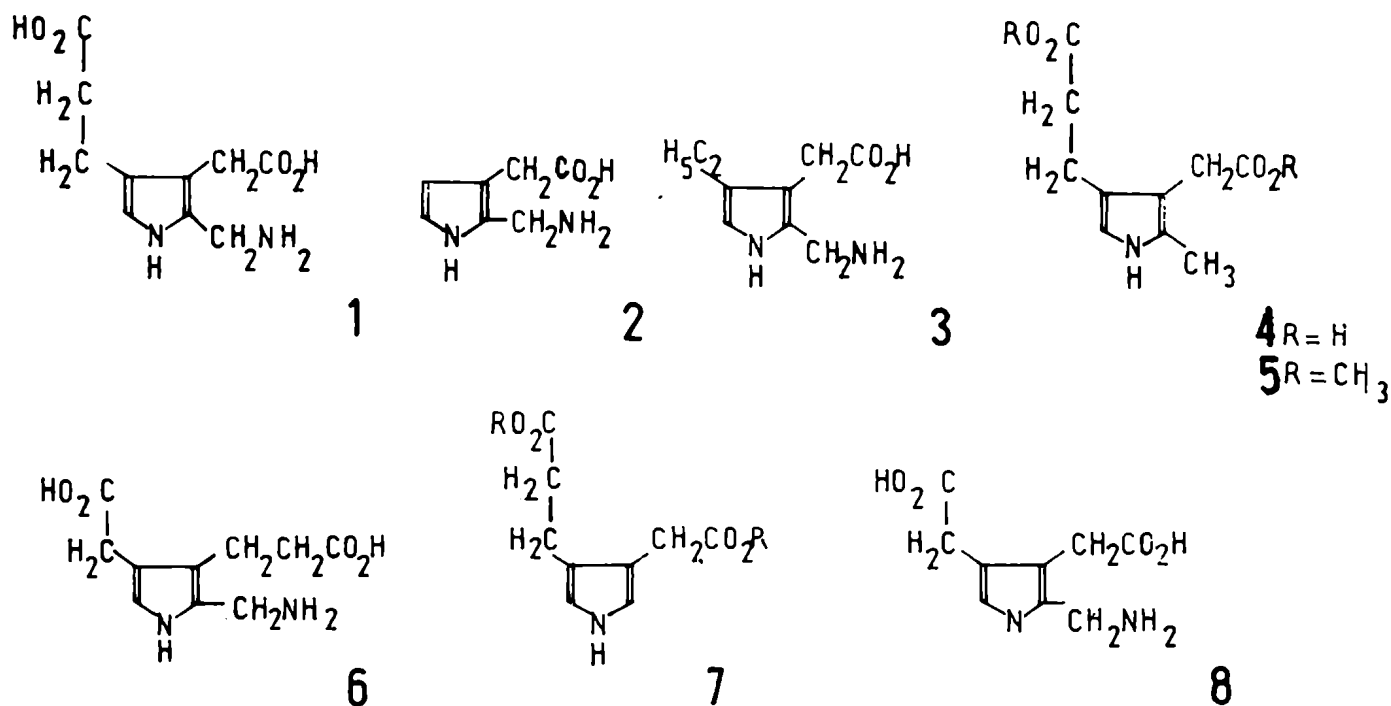
sa que cuando la deaminasa actúa sola.

Efectos de los análogos del porfobilinógeno sobre la deaminasa

Va que el porfobilinógeno no tiene análogos naturales, el problema de la especificidad de sustrato fue examinado con algunos pirroles sintéticos relacionados estructuralmente con el porfobili-

FIGURA 32

Pirroles sintéticos relacionados estructuralmente con el porfobilinógeno



nógeno (1). Estos fueron ensayados como sustratos de la enzima.

Ninguno de ellos actuó como sustrato ni siquiera con baja afinidad

por la enzima. Algunos actuaron inhibiendo la actividad enzimática.

TABLA 3a

Efecto de análogos sintéticos del porfobilinógeno sobre la actividad de deaminasa.

Pirrol	Preincubación	Inhibición de la formación de uroporfirinas
Acido 2-aminometil-3-pirrolacético (2)	-	8
Acido 2-aminometil-3-pirrolacético	+	50
Acido 2-aminometil-4-etil-3-pirrolacético (3)	-	17
Acido 2-aminometil-4-etil-pirrolacético	+	70
Isoporfobilinógeno (6)	-	50
Isoporfobilinógeno	+	50
Acido 2-metilopsopirroldicarboxílico (4)	-	50
Acido 2-metilopsopirroldicarboxílico	+	50
Metil 2-metilopsopirroldicarboxilato (5)	-	0
Metil 2-metilopsopirroldicarboxilato	+	0

El número entre paréntesis indica a qué estructura corresponde de cada compuesto en la Figura 32.

La mezcla de incubación contenía en un volumen final de 100 μ l: 10 μ moles de buffer de fosfatos (pH 7.4), porfobilinógeno (15 nmoles), deaminasa (purificada por Sephadex G-100) y el pirrol indicado en cada caso (40 nmoles en el caso del ácido 2-aminometil, 3 pirrolacético y 30 nmoles de los demás). Las incubaciones fueron de 60 minutos a 37°C. Las preincubaciones fueron de 30 minutos a 37°C, omitiendo en éstas el porfobilinógeno, que fué agregado al iniciarse la incubación.

Un marcado efecto inhibitorio se notó en todos los pirroles con un res-
to ácido propiónico libre (no esterificado) en C_4 . El ácido opsopirrol-
dicarboxílico (7) en la Figura 32, no es sustrato de la deaminasa e in
hibe competitivamente el consumo de porfobilinógeno (Bogorad, 1950).
El isoporfobilinógeno (6) y el ácido 2-metil opsopirroldicarboxílico
(4) inhibieron la actividad por agregado a la mezcla de incubación,
mientras que el ácido 2-aminometil 3-pirrolacético (3) ejerció su efecto
inhibitorio sólo por preincubación. Los requerimientos estructura-
les del sustrato de la deaminasa parecen corresponder exactamente a la
disposición de sustituyentes presentes en el porfobilinógeno, ya que
un análogo tan cercano como es el ácido 2-aminometil-3,4-pirroldiacé-
tico (8) tampoco fue sustrato de la enzima.

Al preincubar la deaminasa con el ácido 2-aminometil-3-pirrol
lacético, la enzima se inhibió. Si se dializaba luego la mezcla para
eliminar el pirrol, se observaba que la enzima permanecía parcialmente
inhibida (40%) tanto para el consumo de porfobilinógeno como para la
formación de uroporfirinas. La inhibición producida por este pirrol es,
pues, irreversible y no competitiva. La deaminasa parcialmente inhibi-
da por el análogo del sustrato natural es más resistente a la inhibición
por p-hidroximercuribenzoato (0.04mM) o a la fotooxidación con azul de
metileno, en concentraciones y condiciones no inhibitorias para la en-
zima sin tratar.

Efecto de inhibidores

Algunos cationes divalentes inhibieron la actividad de PBG
deaminasa. El Cd^{2+} (12mM) la inhibió totalmente, el Mg^{2+} (25mM) y el
 Ca^{2+} (25mM) en un 90%, y el Pb^{2+} (5mM) un 80%. En todos estos casos,

se midió la actividad como consumo de PBG y no formación de porfirinas, debido a la propiedad de éstas de quelatar algunos metales.

Los reactivos sulfhidrúlicos inhibieron a la deaminasa; el p-hidroximercuribenzoato 0,4mM inhibió un 90% su actividad, y la N-etil maleimida 0,02 M, un 30%.

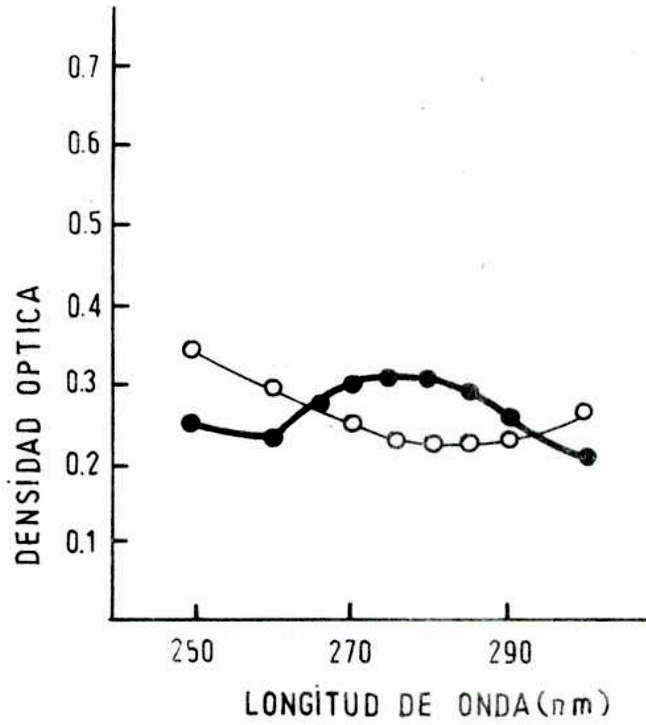
Modificaciones de la PBG deaminasa

1) Efecto de las oxidaciones sobre la actividad de PBG deaminasa de eritrocitos humanos y de germen de trigo

Los experimentos siguientes fueron realizados con enzima de eritrocitos y de germen de trigo.

a) Fotooxidación: En presencia de azul de metileno .03% y de buffer fosfato, se fotooxidó la deaminasa de eritrocitos humanos iluminando con una lámpara de 100W, colocada a unos 20 cm de los tubos conteniendo la enzima. Estos se mantuvieron a 0°C. En estas condiciones, la enzima se inactivó en un 90%. En idénticas condiciones, pero utilizando Rosa de Bengala en lugar de azul de metileno, la fotoinactivación sólo llegó a un 60%. Resultados similares habían sido obtenidos con la enzima de germen de trigo (Frydman y Frydman, 1970).

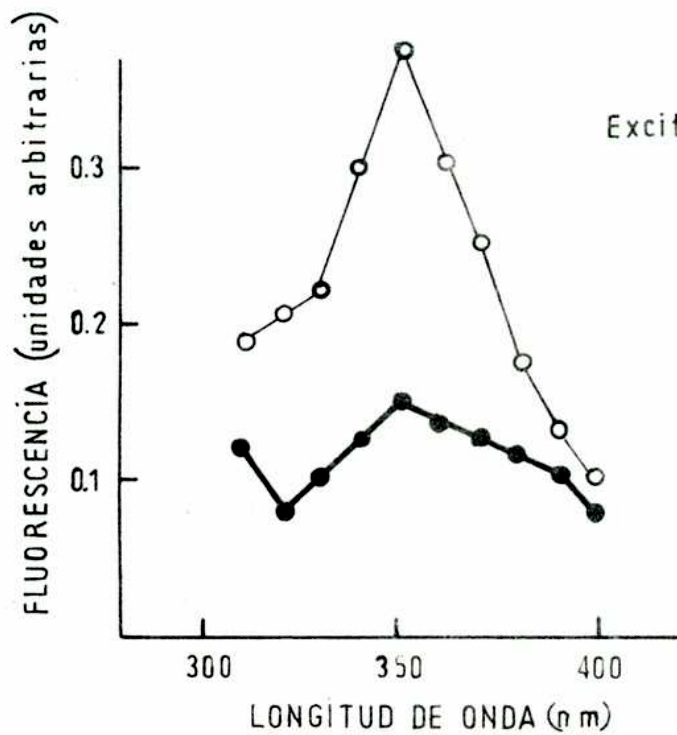
b) Oxidación con N-bromosuccinimida: La oxidación con N-bromosuccinimida en las condiciones en que se oxidan selectivamente restos triptofanilo (Witkop, B., 1961) es inactiva a la PBG deaminasa. La enzima se preincubó con N-bromosuccinimida (0.07mM), dializándose luego; la disminución en la actividad fue de un 70%. Concomitantemente, se observó una disminución en la absorción a 280nm en el espectro M.V. y la variación fluorométrica observada en la Figura 33.



Deaminasa sin tratamiento



Deaminasa oxidada con N-bromosuccinimida



Deaminasa sin tratamiento



Deaminasa oxidada con N bromosuccinimida

c) Oxidación enzimática con pirrolooxigenasa: Se probó el efecto de esta enzima sobre la actividad de la PBG deaminasa de eritrocitos humanos y de eritrocitos de pato, encontrándose en todos los casos una inhibición de la actividad de la PBG deaminasa. El mismo efecto se había encontrado en PBG deaminasa de germen de trigo (Frydman y Frydman, 1970).

TABLA 3b : Inactivación de PBG deaminasa por pirrolooxigenasa

SISTEMA PREINCUBADO	ACTIVIDAD (nmoles consumidos o formados)	
	PBG consumido	Porfirina formada
DEAMINASA	4.6	1.05
DEAMINASA + PIRROLOOXIGENASA	4.3	1.02
PIRROLOOXIGENASA	---	---
DEAMINASA + DITIONITO	4.6	0.90
DEAMINASA + PIRROLOOXIGENASA + DITIONITO	5.9	0.10
PIRROLOOXIGENASA + DITIONITO	6.7	0

Se corrió en una electroforesis en disco de gel de poliacrilamida una deaminasa pretratada a 37°C durante 30 minutos con pirrolooxigenasa y ditionito, y una deaminasa control sin tratar. Al finalizar la electroforesis, se pudo observar la separación de ambas proteínas. Mientras que la deaminasa control tenía actividad en el gel, la deaminasa pretratada con pirrolooxigenasa y ditionito había perdido irreversiblemente su actividad. Es decir, que aún después de haberse sepa-

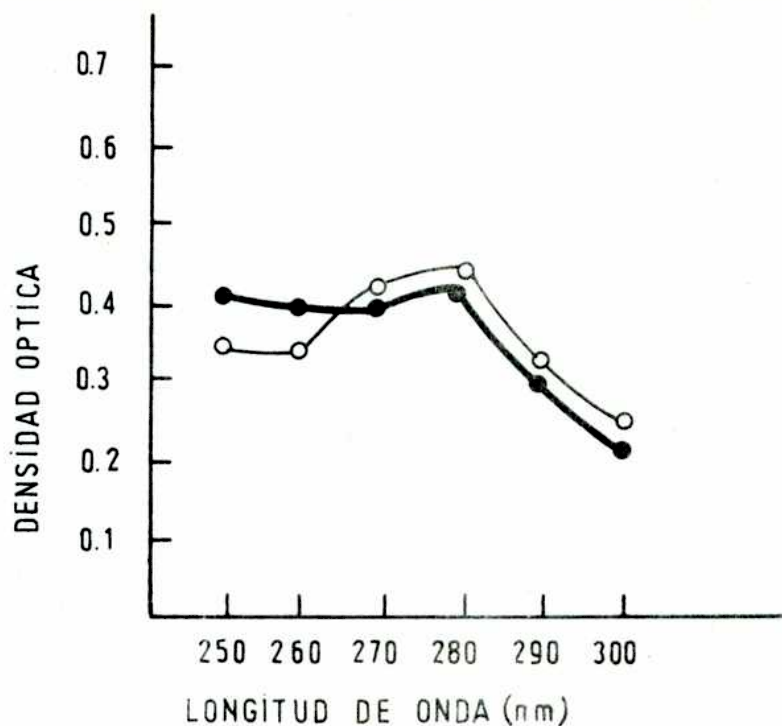
rado ambas enzimas por electroforesis, como se pudo comprobar haciendo una tinción de proteínas en el gel, la deaminasa no recuperó su actividad original.

El agregado de pirrolooxigenasa de germen de trigo y de ditionito de sodio a la PBG deaminasa purificada resultó en una pérdida considerable de la capacidad de la deaminasa de sintetizar uroporfirinas. Como se observa en la Tabla 3, la actividad de la deaminasa disminuía notablemente en el pretratamiento con pirrolooxigenasa siempre que estuviera el ditionito (agente reductor necesario para la actividad de pirrolooxigenasa) presente.

Los espectros ultravioleta y de emisión fluorométrica correspondientes a la oxidación enzimática de la deaminasa se observan en la Figura 34.

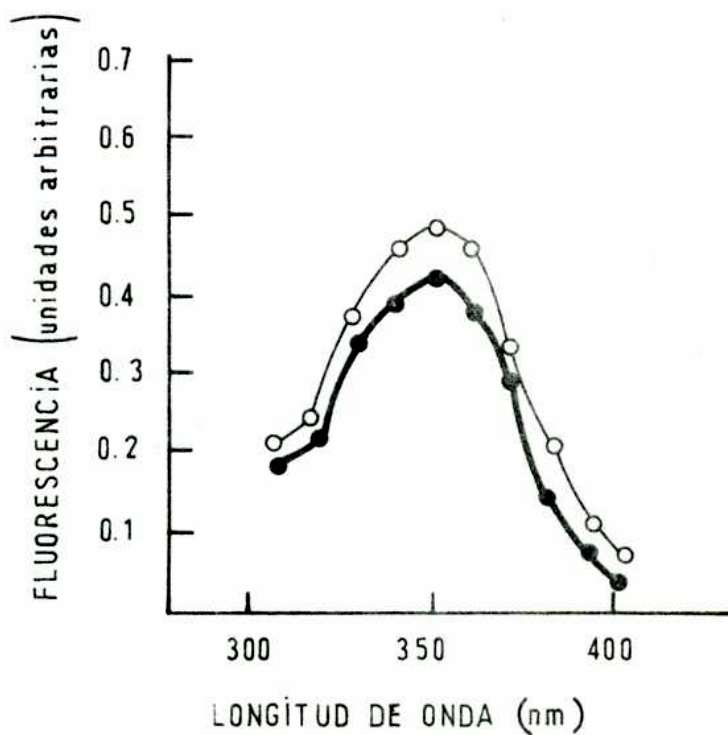
Se notó una disminución en la absorción a 280 nm (máximo correspondiente al triptofano) y una caída en la emisión fluorométrica a 350 nm, en coincidencia con los espectros obtenidos durante la oxidación de la deaminasa con N-bromosuccinimida. La inactivación por pirrolooxigenasa de enzimas que tienen triptofano en su centro activo, como la lisozima, la tripsina y la quimiotripsina ha sido descrita (Frydman, Tomaro y Frydman, 1972).

La deaminasa, por su capacidad de ser oxidada en forma muy similar por la triptofano pirrolooxigenasa, parece tener grupos triptofanilo en su centro activo, ya que estos son esenciales para su actividad.



○—○ Deaminasa purificada

●—● Deaminasa purificada pretratada con pirrolooxigenasa y ditionito oxidada



Excitación a 290 nm

○—○ Deaminasa purificada

●—● Deaminasa purificada pretratada con pirrolooxigenasa y ditionito oxidada

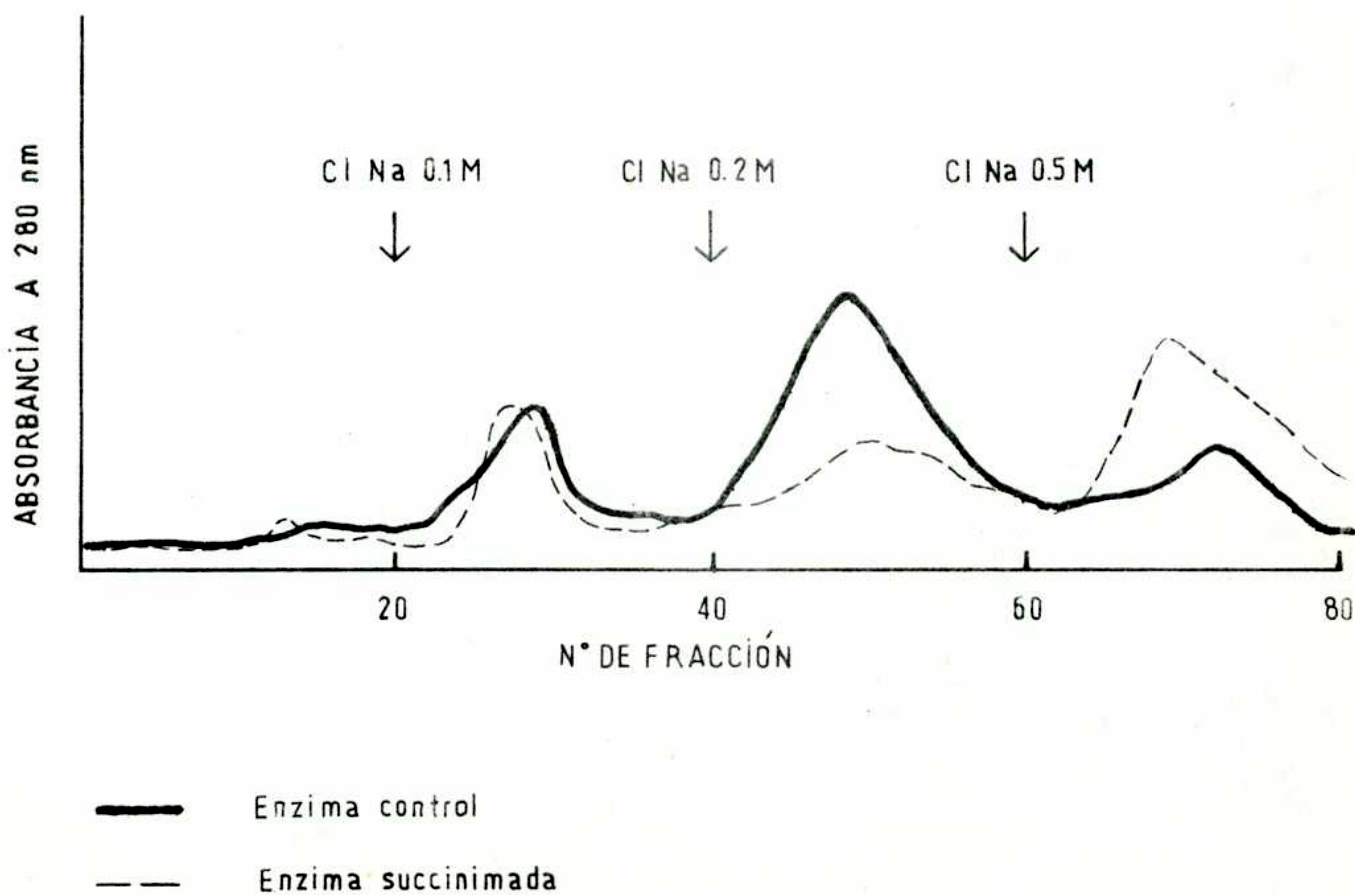
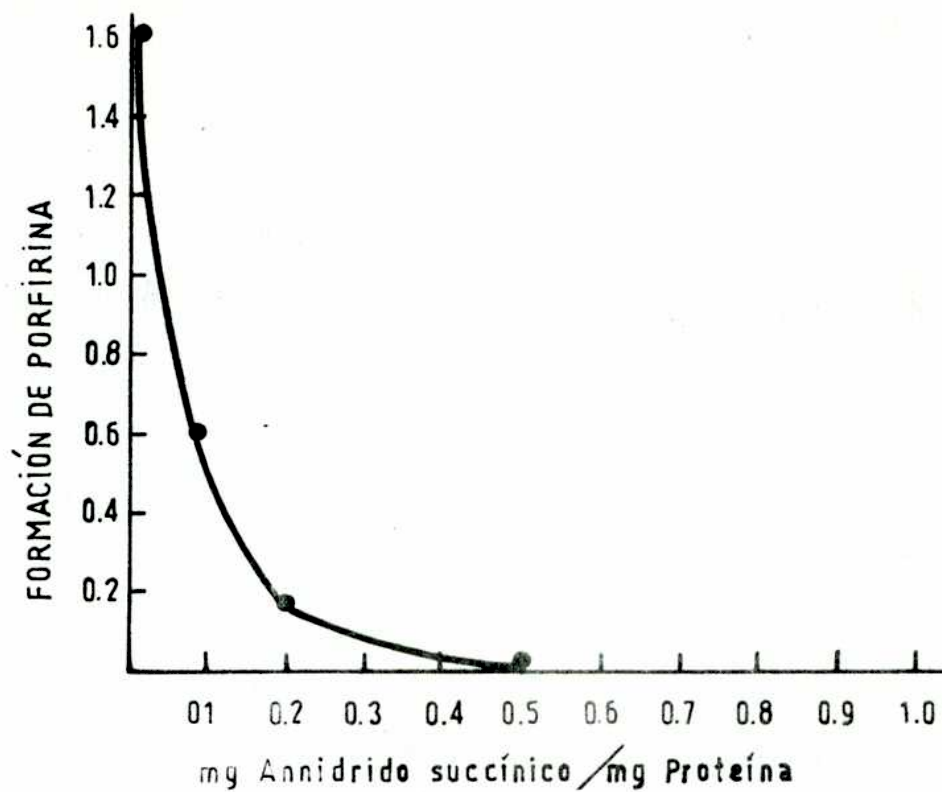
2) Succinilación de la PBG deaminasa: Otra modificación química efectuada sobre deaminasa de germen de trigo purificada por Sephadex G-100 fue la succinilación. Se succiniló esta deaminasa con 0,5 mg de anhídrido succínico por mg de proteína, inactivándose totalmente la enzima. (Figura 35)

La inactivación no es reversible por diálisis. Con 0.2 mg de anhídrido succínico, siendo todas las demás condiciones idénticas, la inactivación fue parcial.

Con PBG deaminasa de eritrocitos humanos purificada por DEAE-celulosa y Sephadex G-100 y concentrada por ultrafiltración se observó un efecto similar. Una concentración relativamente baja de anhídrido succínico (0.2 mg anhídrido succínico/mg de proteína) succinilaba a la enzima, inactivándola.

La deaminasa succinilada con 0.5 mg de anhídrido succínico/mg de proteína y la misma enzima sin succinilar fueron cromatografiadas sobre idénticas columnas de DEAE-celulosa, obteniéndose los perfiles de elución observados en la Figura 36.

Mientras que la actividad enzimática y el pico máximo de proteínas de la deaminasa sin modificar se encontraron en la fracción eluída con NaCl 0.2M, el pico máximo de proteínas en el caso de la enzima succinilada (inactiva) se halló en la fracción con NaCl 0.5M. Esto corrobora la idea de que la enzima se succiniló realmente, ya que una succinilación la haría más fuertemente aniónica y necesariamente se requeriría una mayor fuerza iónica (en este caso mayor

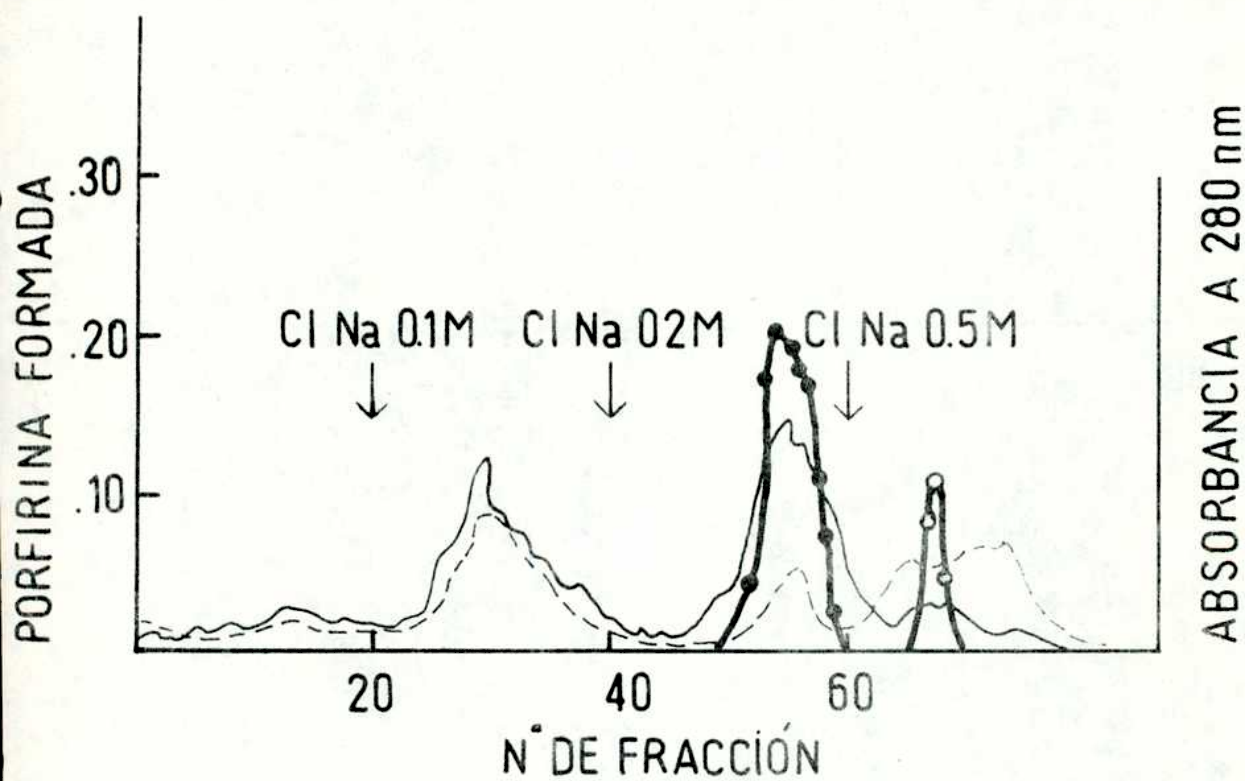


concentración del ^{cloruro} de ^{sodio}) para eluirla de la DEAE-celulosa.

En un nuevo experimento, se pasó por columna de DEAE-celulosa a la deaminasa parcialmente inactivada por succinilación (tratada con 0.2mg anhídrido succínico/mg proteína) y un control de la misma deaminasa sin modificar. (Figura 37).

Mientras que la deaminasa sin succinilar se eluye, como es habitual, con una concentración de NaCl de 0.2M, la actividad remanente de la deaminasa succinilada se eluye con NaCl 0.5M, exclusivamente. O sea que se habían succinilado parcialmente algunas moléculas de enzima y otras totalmente. Esto sugeriría la presencia de más de un grupo succinilable por mol de enzima. De los grupos succinilables algunos serían esenciales para la actividad enzimática y otros no. La posibilidad de que fueran tirosina, serina o treonina (OH-) los grupos succinilados fue descartada dializando la enzima succinilada contra NaHCO_3 10^{-4} a pH 9. La inactivación no fue revertida, o sea que no se hidrolizaron los succinilos, lo cual indica que estarían unidos a la proteína por uniones amida, más estables, provenientes de la acilación de grupos lisina, ya que a pH 9 se hubieran saponificado los ésteres provenientes de los OH⁻.

La posibilidad de que los nucleófilos succinilados en la proteína fueran -SH se ensayó observando el efecto del p-hidroximercuribenzoato sobre la succinilación. El pretratamiento de la deaminasa de germen de trigo, purificada por DEAE y Sephadex G-100 sin concentrar con p-hidroximercuribenzoato, seguido de una diálisis contra 2-mercaptoetanol 5mM y el agregado de ditiotreitól no prote-



- Actividad de deaminasa control sin succinilar
- Actividad de deaminasa parcialmente succinilada
- A 280 de deaminasa control
- - - A 280 de deaminasa succinilada

Enzima	Pretratamiento	Modificación	Actividad nmoles porfirina formada	Inhibición
deaminasa de germen de trigo purificada	---	---	1920	
deaminasa de germen de trigo purificada	---	succinilación	0.10	95%
deaminasa de germen de trigo purificada	a 37 ^o con áci do 2-metil opsopirroldi- carboxílico	---	680	
deaminasa de germen de trigo purificada	a 37 ^o con áci do 2-metil opsopirroldi- carboxílico	succinilación	232	67%
deaminasa de germen de trigo purificada	---	---	.992	
deaminasa de germen de trigo purificada	---	succinilación	0.032	97%
deaminasa de germen de trigo purificada	a 37 ^o con áci do 2-aminome- til 3-pirrola cético	---	.872	90%
deaminasa de germen de trigo purificada	a 37 ^o con áci do 2-aminome- til 3-pirrola cético	succinilación	0.080	

gió a la enzima de la succinilación. Un experimento idéntico se llevó a cabo con PBG deaminasa de eritrocitos humanos, con el mismo resultado. Esto señalaría de que no serían -SH los succinilados, sino muy posiblemente -NH₂.

Se ensayó el efecto de dos inhibidores competitivos de la deaminasa, análogos del porfobilinógeno durante la succinilación. El ácido 2-metil opsopirroldecarboxílico (4) (ver su estructura en la Figura 32) fue preincubado con deaminasa de germen purificada, que, luego de una diálisis contra Pi 0.003M (pH 7.4) fue succinilada. Se comprobó que, mientras que la enzima control se inactivaba un 95%, en presencia del análogo mencionado, la inactivación por succinilación es sólo del 67%.

Con el análogo (2) (Figura 32) ácido 2-aminometil-3-pirrolacético y una enzima similar a la anterior se obtuvo asimismo un efecto de protección frente a la succinilación, aunque menor.

Es de notar, que de los dos análogos del PBG ensayados, el que más protege a la enzima de la modificación es el que más eficientemente la inhibe. Esto fundamenta la idea de la esencialidad de grupos lisina para la actividad de la deaminasa.

PURIFICACION Y PROPIEDADES DE LA UROPORFIRINOGENO III COSINTASA DE ERITROCITOS HUMANOS

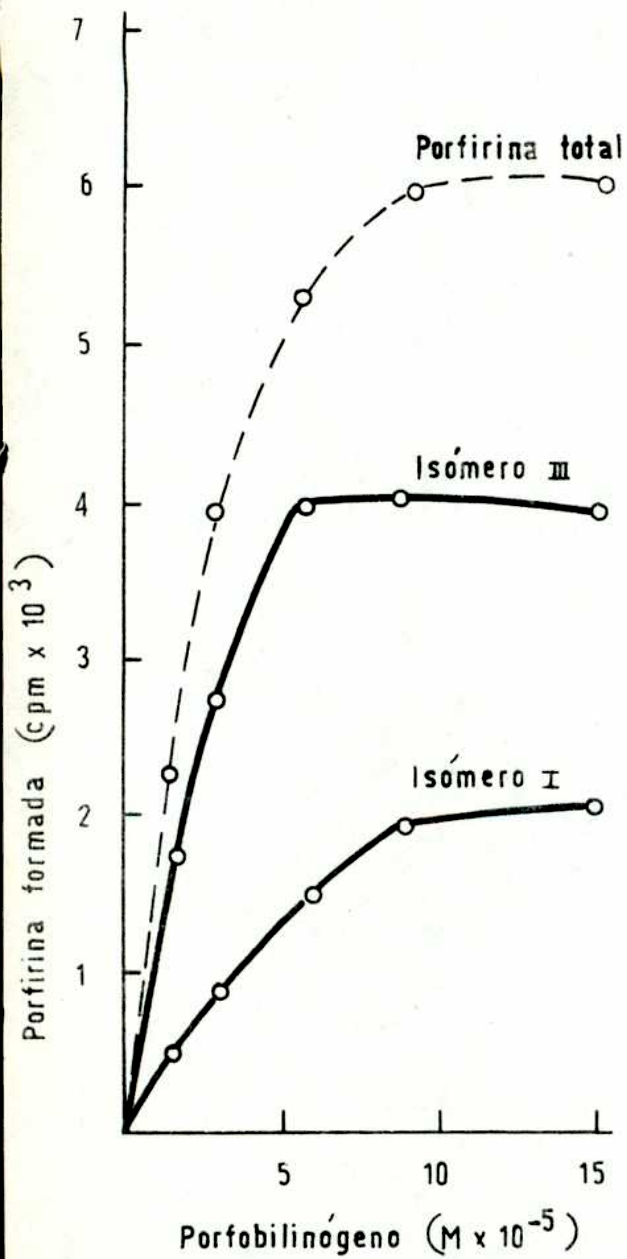
La purificación de la cosintasa presentó desde el comienzo varias dificultades. La primera dificultad estribó en la carencia de un ensayo de actividad sencillo, rápido y de resultados seguros. El método menos laborioso, la estimación de isómeros de uroporfirina según Falk y Benson fue, aunque algo inexacto, debido a la formación de

complejos intermoleculares entre los isómeros (Marks y Bogorad, 1960), el utilizado durante la purificación por su relativa rapidez. Otra dificultad fue la gran labilidad de la cosintasa. Aunque la cosintasa de eritrocitos luego de una purificación por DEAE-celulosa es mucho más estable que la cosintasa de germen de trigo, al separarla de la PBG deaminasa y de otras proteínas contaminantes, se inactivaba rápidamente. Cuanto mayor el grado de purificación, más rápidamente se inactivaba la enzima. Además, la cosintasa es sumamente termolábil y tiende a eluirse de columnas en forma poco definida, a veces coincidiendo con todas las fracciones que contienen proteínas.

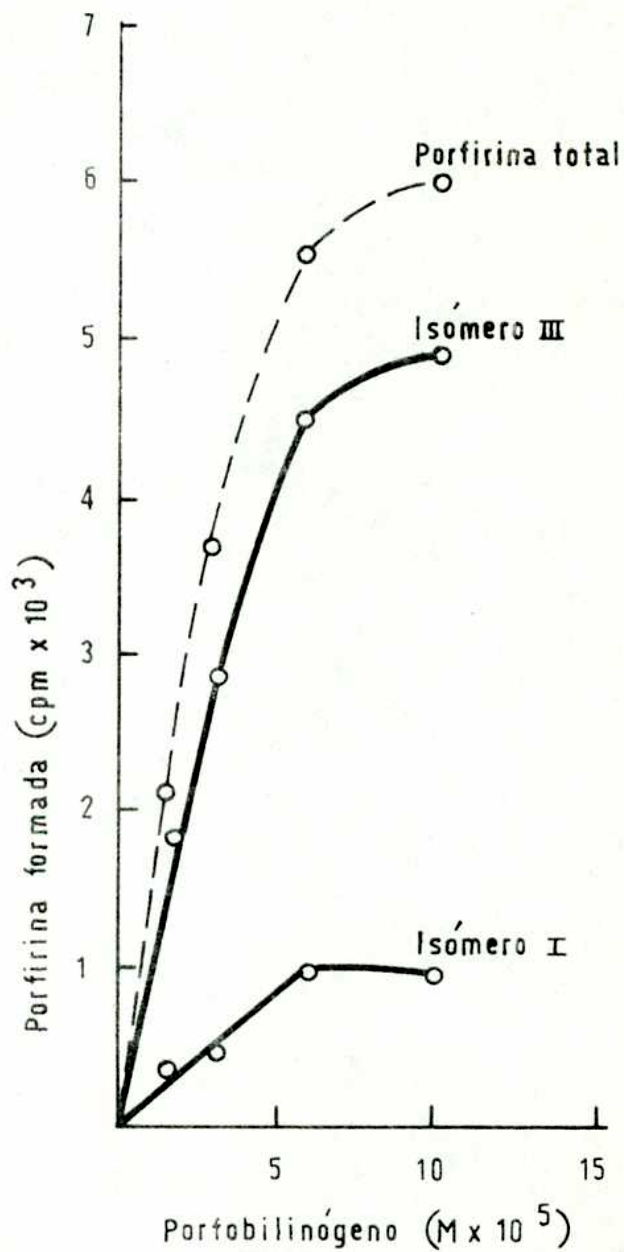
Al comparar curvas de concentración de sustrato con y sin ditiotreitól (Figura 36) se observó que este reactivo protector de -SH no afectaba la formación total de porfirinas durante la reacción pero sí provocaba un aumento en la concentración relativa de uroporfirinógeno III. La formación total de uroporfirinógenos en ausencia de ditiotreitól llega a un plateau con una cierta concentración de sustrato, pero la formación del isómero III llega a un plateau a una concentración de PBG inferior a la correspondiente para el isómero I. El agregado de ditiotreitól no afectaba la formación total de porfirinas, pero sí la distribución isomérica de los productos. La formación del uroporfirinógeno I llegó a un plateau con una menor concentración de PBG que la formación del isómero III (Fig 38 b). La influencia del ditiotreitól fue atribuida a su efecto estabilizador sobre la cosintetasa, ya que permitió una mayor formación de uroporfirinógeno III.

Este efecto estabilizador del ditiotreitól parecía indicar que la conocida labilidad de la cosintasa se debía a la presencia de

SIN AGREGADO



CON DITIO TREITOL



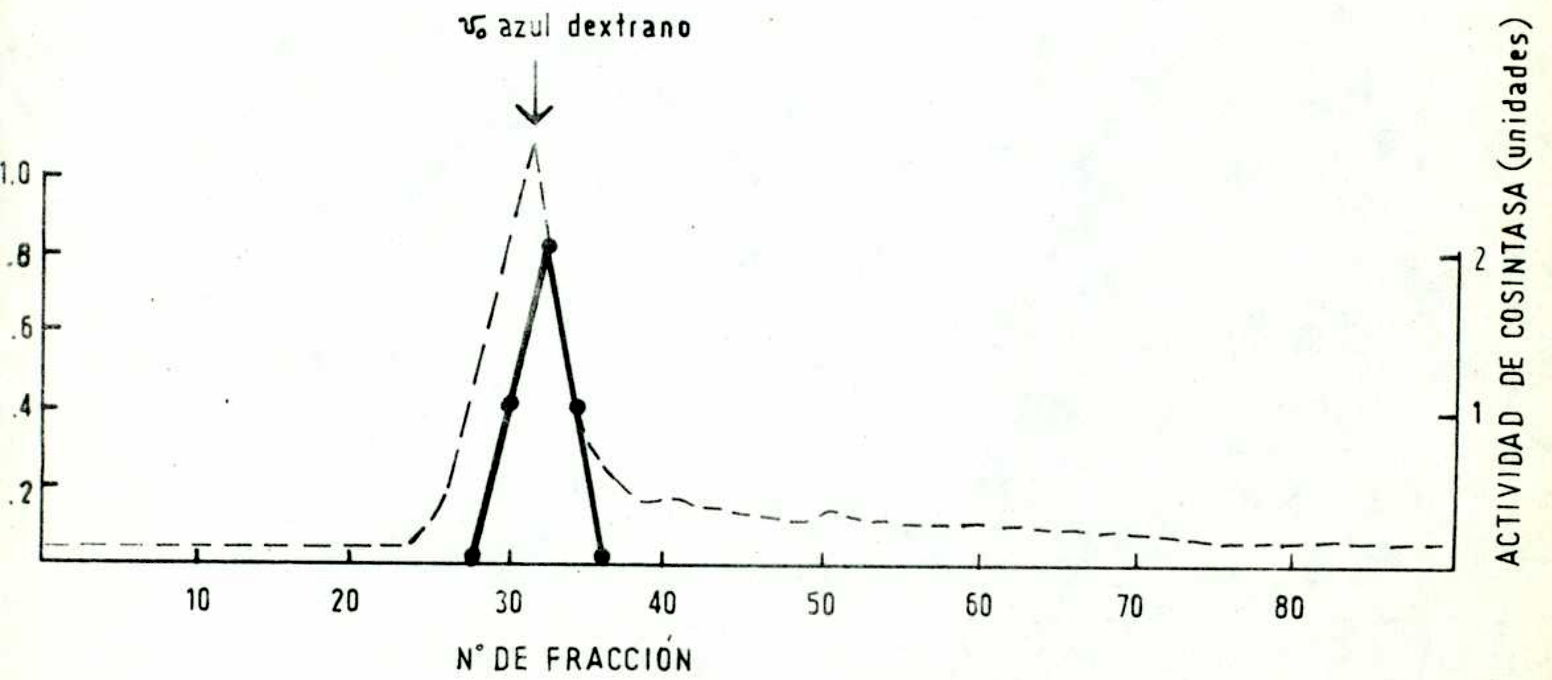
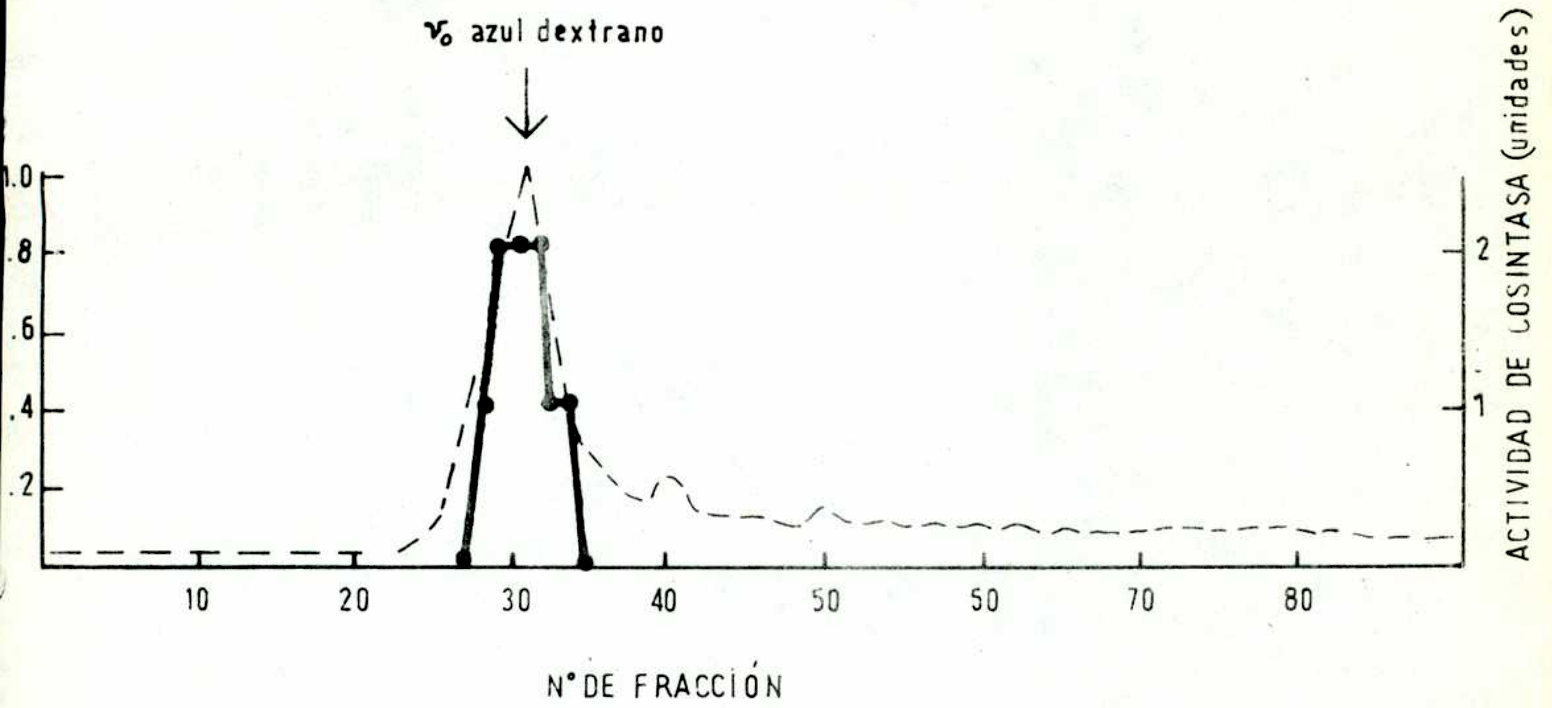
-SH lábiles esenciales para la actividad enzimática. La inclusión de mercaptoetanol 5mM en el buffer de fosfatos durante la purificación permitió obtener preparaciones más estables en distintas etapas.

Por otra parte, se encontró una propiedad de la cosintasa que resultó sumamente útil en la purificación. Se observó al filtrar por Sephadex G-100 preparaciones de cosintasa obtenidas de la 1^a DEAE-celulosa, y azul dextrano, que la actividad de cosintasa se eluía en gran parte en las fracciones que contenían el azul dextrano. (Figura 39).

Puesto que estimaciones previas del peso molecular de esta enzima la caracterizaban como una proteína de peso molecular inferior a 80.000, su exclusión de la columna junto con el azul dextrano indicaba o bien la formación de un complejo entre la enzima y el colorante o una agregación de subunidades de proteína.

Se estudió la posibilidad de una interacción entre el azul dextrano y la uroporfirinógeno III cosintasa de eritrocitos humanos. Incubando deaminasa y cosintasa purificadas por DEAE-celulosa y Sephadex G-100 junto con azul dextrano 0.005% y porfobilinógeno, no se pudo observar ningún efecto protector del azul dextrano sobre la cosintasa durante la incubación, ni tampoco por preincubación con la cosintasa. (Tabla 6)

Una nueva columna de Sephadex G-100 de la cosintasa de eritrocitos humanos, esta vez pretratada con p-hidroximercuribenzoato 2mM, sembrada junto con azul dextrano 0.005% dió como resultado (Figura 40) la elución de la cosintasa junto con el azul dextrano en las fracciones iniciales. Esto indica que si se forma un complejo entre la cosintasa y el azul dextrano, el bloqueo de los -SH no inter-



--- Absorbancia a 280nm
●—● Actividad de cosintasa

TABLA 6

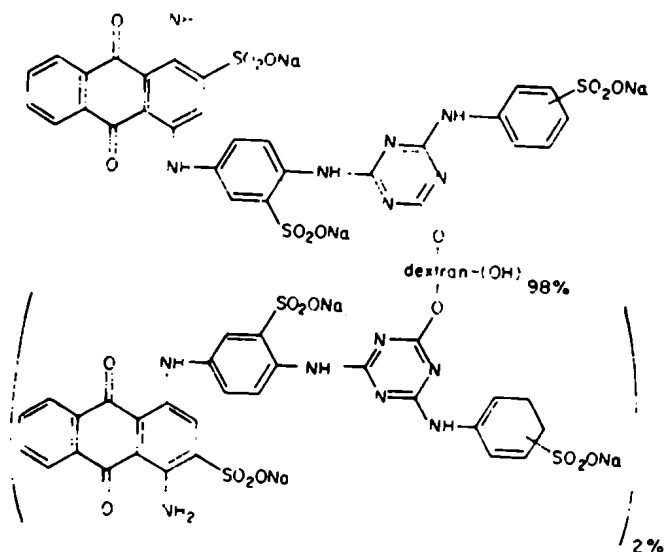
sistema enzimático	condiciones de incubación	azul dextrano agregado	% uroporfirinóge no III formado (estimado)
deaminasa	incubación a 37° 60'	---	0
deaminasa + cosintasa	incubación a 37° 60'	---	70
deaminasa + cosintasa	preincubación a 37° 15' incubación a 37° 60'	.005 %	60
deaminasa + cosintasa	incubación a 37° 60'	.005 %	70

fiere con la formación de ese complejo.

Se preparó Sepharosa 4B unida covalentemente a azul dextrano, y se filtró cosintasa por una columna de 0,6x4 cm de Sepharosa-azul dextrano, obteniendo el perfil de elución de la Figura 41. La cosintasa, a diferencia de otras proteínas contenidas en la solución sembrada, es retenida por la Sepharosa-azul dextrano, lo cual evidencia su afinidad por el azul dextrano. Es posible eluir la enzima con ClNa 1M.

Se sembró cosintasa junto con dextrano 250 (de P.M 250.000) en una columna de Sephadex G-100. El dextrano fue excluido, quedando la enzima incluida en la columna. La enzima se eluyó en un pico amplio dentro del rango de 40.000 a 60.000. De este experimento se puede concluir que la cosintasa no forma un complejo con el dextrano. La interacción de la enzima con el azul dextrano sería a través del cromóforo de éste, un compuesto policíclico con restos amino y ácido sulfónico.

FIGURA 41a
Molécula del azul dextrano



La propiedad de la cosintasa de formar un complejo con el azul dextrano permitió finalmente purificar a esta enzima.

Mediante una de las secuencias de purificación, se obtiene una enzima purificada aunque de gran labilidad. Esta secuencia incluye la filtración por Sephadex G-100 con la formación de un complejo de enzima azul dextrano reversible. Este complejo se eluye en el volumen muerto, separándose así de gran número de otras proteínas.

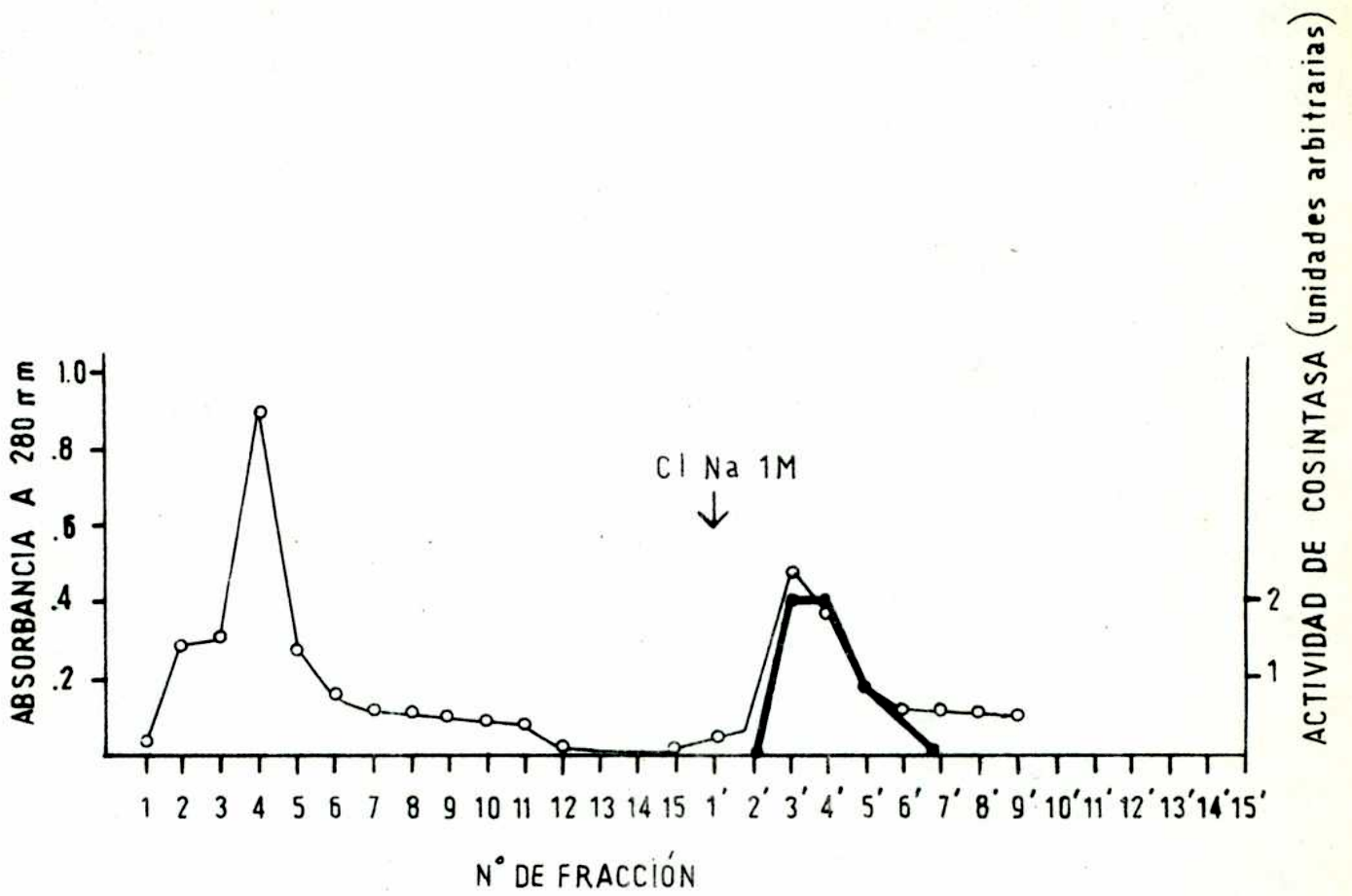
La enzima que forma un complejo con el azul dextrano está muy activa y se ha purificado considerablemente con respecto al punto de partida. El complejo cosintasa azul dextrano es luego dissociado y la cosintasa separada del azul dextrano en un nuevo paso de filtración, esta vez por una columna de Sephadex G-100 equilibrada con sulfato de amonio al 30%. (Alternativa A₂ en la Tabla de purificación). Este paso, si bien es efectivo para dissociar el complejo, inactiva parcialmente a la enzima, posiblemente por diálisis. Esta diálisis de las fracciones es necesaria.

PURIFICACION DE LA COSINTASA DE ERITROCITOS HUMANOS

Etapa de purificación	Volumen (ml)	Proteína (mg)	Proteína (mg/ml)	Unidades de actividad enzimática *	Actividad específica	Rendimiento %	
Hemolizado	150	37.800	252	no se pudo determinar			
DEAE-celulosa **	200	700	3,5	2.000	2,9	100	
SO ₄ (NH ₄) ₂ -90%	29	253,75	8,75	1.920	7,6	96	
Sephadex (A ₁) G-100 con azul dextrano	58	27,26	0,47	1.830	67	91	A ¹
Sephadex (A ₂) con (NH ₄) ₂ SO ₄ 30% pH 6.6	29	2,9	0,1	64	22,0	2,2	A ₂
Sepharosa 4B-azul dextrano (B ₁)	58	2,32	0,04	720	310	36	B ₁
Sephadex G-100 (B ₂)	29	0,87	0,03	480	551	24	B ₂

* Una unidad de actividad enzimática fué definida para la cosintasa como la cantidad de enzima que formaba 50% de uroporfirinógeno III al incubar la preparación en las condiciones standard, de modo que la uroporfirina total formada fuera 0.8 nmoles de uroporfirina.

** En esta etapa se descartaron varias fracciones con actividad de cosintasa por contener también deaminasa. Se tomaron sólo las fracciones con menor concentración de proteína, y sin actividad de deaminasa para continuar la purificación.



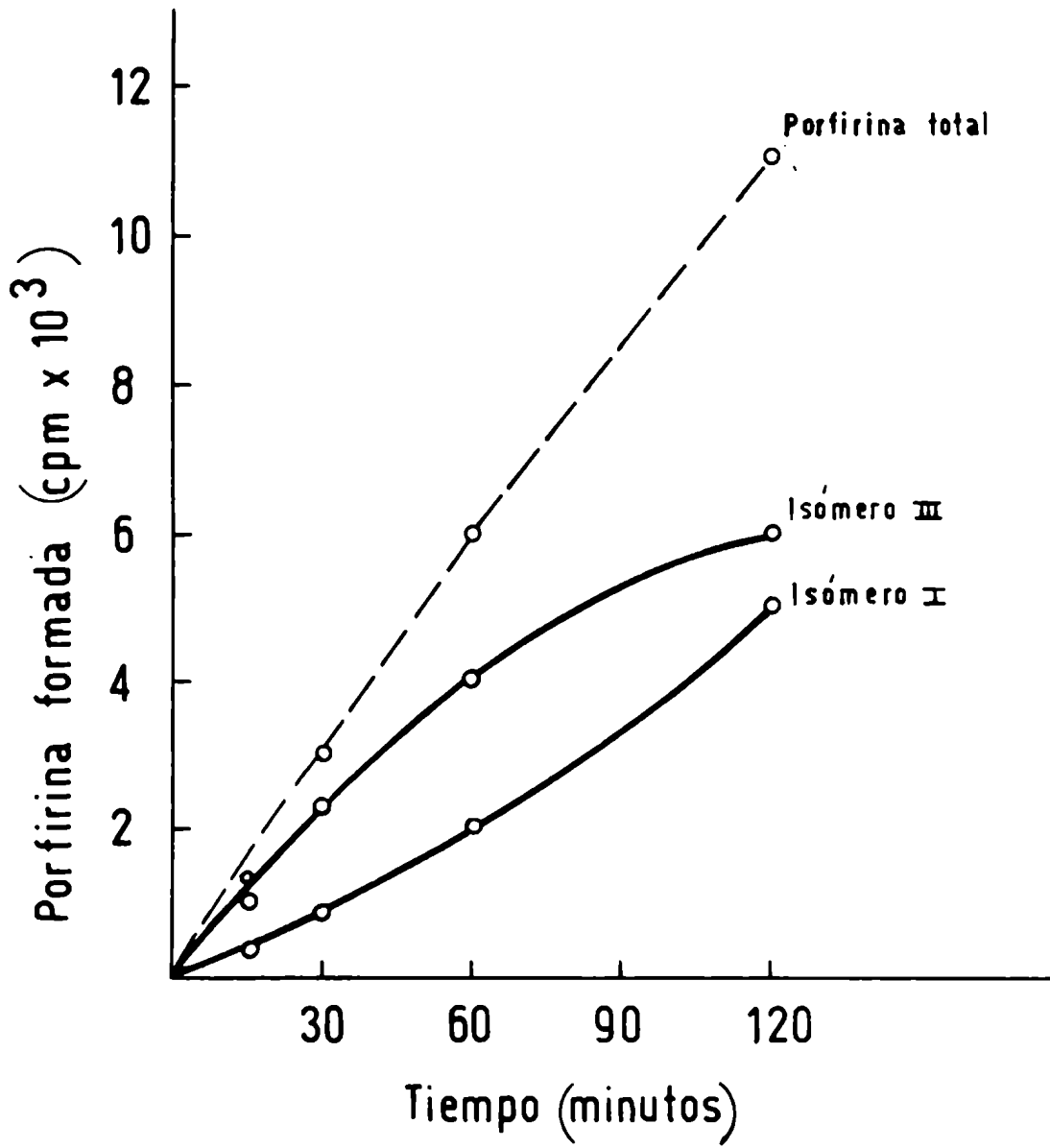
- A 280
- Actividad de cosintasa

para eliminar el efecto inhibitorio del sulfato de amonio. Se intentó la disociación con distintas concentraciones de sulfato de amonio y con ClNa , pero en todos los casos la disociación del complejo iba unida a una significativa pérdida de actividad de la enzima. La enzima purificada corrió como una única banda de proteína en gel de poliacrilamida. La confirmación de que realmente esta banda correspondía a la actividad enzimática no fue posible debido a interferencia de la poliacrilamida con el ensayo de actividad de la cosintasa. Una secuencia de purificación diferente (Alternativa B_1-B_2) permitió lograr una enzima parcialmente purificada y muy activa por cromatografía de afinidad, filtrando la preparación concentrada de DEAE-celulosa por la columna de Sepharosa 4B-azul dextrano (Figura 41). Esta enzima se filtró luego por Sephadex G-100. Esta fue la secuencia de purificación utilizada en los estudios en que se requirió una cosintasa purificada:

- I Hemolizado
- II DEAE-celulosa
- III Cromatografía de afinidad por azul dextrano-Sepharosa
- IV Sephadex G-100

Efecto de la concentración de porfobilinógeno sobre la formación del uroporfirinógeno III

El porfobilinógeno, aún a altas concentraciones, no inhibió la formación del uroporfirinógeno III en un sistema deaminasa-cosintasa, aunque (Figura 30) ciertamente la formación del isómero III llega a un plateau con una concentración de porfobilinógeno menor que la necesaria para que llegue a un plateau la formación del isómero I.



El agregado de ditiotreitól, aunque no afecta la formación total de uroporfirinas, tiene un notable efecto sobre la composición en isómeros I y III de los productos. En presencia de ditiotreitól, se satura el sistema que forma uroporfirinógeno I a una menor concentración de sustrato. La inversa ocurre con la formación de uroporfirinógeno III, pues el sistema enzimático en este caso se satura con una concentración mayor de sustrato (Figura 38b).

Velocidad de formación de uroporfirinógeno III

La formación del uroporfirinógeno III aumentó linealmente hasta los 30 minutos y luego comenzó a disminuir su velocidad (Figura 42 en la página 96). Esto pudo deberse a una inactivación parcial de la cosintasa después de ese período, mientras que la deaminasa mantuvo una velocidad de reacción constante aún a las dos horas de incubación. El agregado de ditiotreitól (3mM) tuvo un efecto protector sobre la cosintasa (Figura 38b); y luego de 60 minutos de incubación se obtuvo una relación de 5:1 en las concentraciones de uroporfirinógeno III a uroporfirinógeno I comparada con la relación de concentraciones de 2:1 obtenida en ausencia de ditiotreitól (Figura 42 en la pág. 96.) Cuando la velocidad de formación del uroporfirinógeno III fue comparada con la obtenida con el sistema de germen de trigo, se observó que la cosintasa de eritrocitos humanos era más estable que la enzima de germen de trigo, mientras que la deaminasa de eritrocitos humanos demostró ser más lábil que la enzima de germen de trigo.

Efecto del amonio y de la hidroxilamina sobre la interacción deaminasa-cosintasa

El agregado de amonio e hidroxilamina a un sistema deaminasa-cosintasa da como resultado una inhibición más pronunciada de la formación de uroporfirinógeno que del consumo de P₂G (Bogorad, 1963). Al examinar este efecto con las enzimas aisladas de eritrocitos, se observó que concentraciones altas (60 y 100mM) inhibían la formación total de porfirinas y también la formación de uroporfirinógeno III. (Tabla 8 a en la pág. 103'). A una concentración de 100mM de NH_4^+ ambos efectos de inhibición siguieron un curso paralelo y la formación de uroporfirinógeno I se inhibió menos.

La incubación sin buffer de fosfato dió como resultado una menor eficiencia en la actividad de todo el sistema deaminasa-cosintasa, especialmente de la cosintasa. Sin embargo, en este caso, la inhibición por NH_4^+ fué menos pronunciada.

En las enzimas aisladas de germen de trigo se observó un efecto más marcado de inhibición de la formación de uroporfirinógeno III. A una concentración de 30mM de NH_4^+ , la disminución en la formación de uroporfirinógeno III correspondió a un aumento en la formación de uroporfirinógeno I.

La inhibición de las enzimas por NH_4^+ dependió, por lo tanto, del material de origen y de su estabilidad.

El agregado de hidroxilamina (30mM) a una mezcla de incubación conteniendo deaminasa y cosintasa inhibió totalmente la formación de uroporfirinógeno III, habiéndose obtenido exclusivamente uroporfirinógeno I. Este efecto podía atribuirse o bien a una inhibición de la actividad de cosintasa o a una interferencia en la interacción deaminasa-cosintasa. Se estudió el efecto de otras aminos sobre el sistema deaminasa-cosintasa. Algunas aminos tuvieron un efecto pronunciado sobre el sistema enzimático (Tabla 8). La inhibición por piperi

Efecto de las aminos sobre la actividad y distribución isomérica de los productos de un sistema enzimático deaminasa-cosintasa purificado.

Agregado	Porfirina total formada cpm	Inhibición %	Isómeros formados		
			I cpm	III cpm	Inhibición del isómero III %
—	22.560	-	16.820	5.440	-
Cloruro de amonio (100mM)	15.720	29	11.915	3.810	30
Imidazol (100mM)	16.175	27	12.765	4.360	20
Piperidina (150mM)	13.850	44	9.450	4.400	25
Ciclohexilamina (100mM)	8.210	63	6.210	2.000	63

dina de la formación total de uroporfirinógenos fue más marcada que la inhibición de la formación de uroporfirinógeno III. Por ende, la piperidina (y en menor grado el imidazol) afectan más la actividad de la deaminasa que del sistema deaminasa-cosintasa. En presencia de ditiotreitól no se observó efecto inhibitorio de la piperidina sobre la formación del isómero III. Prácticamente los mismos resultados se obtuvieron con las enzimas de germen de trigo.

Efecto de los reactivos sulfhidrúlicos

La cosintasa y la deaminasa de eritrocitos humanos se vieron afectadas en forma desigual por los reactivos sulfhidrúlicos. La N-etil maleimida, por ejemplo, a una concentración en que se inhibía en un 50% la formación total de uroporfirinógenos, inhibió notablemente más la formación del isómero III (Tabla 9 en la pág. 101). El agregado de ditiotreitól revirtió la inhibición por N-etilmaleimida de la deaminasa, pero no afectó la inhibición de la cosintetasa. Resultados similares fueron obtenidos con las enzimas de germen de trigo. El p-hidroxi-mercuribenzoato inhibió a ambas enzimas y su efecto fue revertido por agregado de ditiotreitól.

Por otra parte, los reactivos reductores protectores de grupos -SH, como ya se observó anteriormente al describir la búsqueda de una secuencia de purificación adecuada para la cosintasa, estabilizan a la cosintasa. Se observó el efecto del agregado de ditiotreitól sobre la cosintasa en condiciones de temperatura y de tiempos largos de incubación en que normalmente se inactiva parcialmente la enzima. Se observó aún en esas condiciones que el ditiotreitól o el β -mercaptoetanol protegen a la cosintasa de la inactivación.

Sistema preincubado	Agregado	Uroporfirinógeno formado				
		Isóme ro I cpm	Isóme ro III cpm	Inhibi ción %	Porfi rina cpm	Tctal inhi- bición
Cosintasa	Deaminasa	1700	3300		5000	
Cosintasa + N-etilmaleimida	Deaminasa	2941	474	86	3415	32
Cosintasa + N-etilmaleimida	Deaminasa	3715	653	80	4370	12
Cosintasa	Deaminasa + N-etilmaleimida	1950	550	83	2500	50
Cosintasa	Deaminasa	2210	4300		6510	
Cosintasa + p-hi droximercuriben- zoato	Deaminasa	1000	500	88	1500	77
Cosintasa + p-hi droximercuriben- zoato	Deaminasa + ditiotreitól	2737	3005	30	5842	10
Cosintasa	Deaminasa + p-hi droximercuriben- zoato	1813	1550	64	3365	48
Deaminasa-cosin- tasa de eritro- citos *		3675	4450		8125	
Deaminasa-cosin- tasa de eritro- citos *	N-etilmaleimida	3550	426	90	3931	51
Deaminasa-cosin- tasa de eritro- citos *	p-hidroximercuri benzoato	2710	1600	64	4310	47
Deaminasa-cosin- tasa de germen de trigo *		3800	8600		12400	
Deaminasa-cosin- tasa de germen de trigo *	N-etilmaleimida	6880	720	91	7600	38.5
Deaminasa-cosin- tasa de germen de trigo *	p-hidroximercuri benzoato	4362	7925	7	12287	

(*) El sistema fue incubado directamente, sin preincubación

Efecto de las oxidaciones sobre la actividad de la cosintasa

La oxidación y fotooxidación de deaminasa de eritrocitos ya fue mencionada. Los efectos de la oxidación por N-bromosuccinimida sobre la cosintasa y el efecto de la luz en presencia de sensibilizadores se resume en la Tabla 9 a en la página 103. La oxidación con N-bromosuccinimida no tuvo efecto sobre la actividad de cosintasa. La enzima es también estable a la oxidación por pirrolooxigenasa, que oxida grupos triptofano en el sitio activo de varias enzimas, como ya se mencionó anteriormente.

El azul de metileno ejerció un efecto protector sobre la cosintasa. La cosintasa se fotooxidó en presencia de rosa de Bengala, inactivándose más en presencia de este colorante que del azul de metileno.

Peso Molecular

El peso molecular de la cosintasa de eritrocitos humanos fue determinado por filtración por gel de Sephadex G-100, en una columna de 0,9x95 cm, calibrada con marcadores proteicos de peso molecular conocido, como se describe en Métodos, obteniéndose un valor de $\frac{V_e}{V_o}$ de 1,33, correspondiente a un peso molecular aproximado de 45.000 ± 5.000 . El V_o fue calculado previamente, filtrando por la columna de Sephadex G-100 2 mg de azul dextrano.

Se comprobó, en otra columna de Sephadex G-100 por la que previamente se había filtrado ovoalbúmina (P.M. 45.000), que la cosintasa se eluía en las fracciones en las que se había encontrado la ovoalbúmina.

Interacción de la cosintasa con el PBG y con la deaminasa

Tal como se describió en la sección de cinética de la deaminasa, las determinaciones cinéticas efectuadas con la cosintasa reflejan la manera en que ésta afecta las constantes cinéticas de la porfobilinógeno deaminasa, la enzima que consume sustrato. Hemos descrito una cinética clásica de Michaelis-Menten tanto para la deaminasa sola como para el sistema deaminasa-cosintasa de eritrocitos humanos. La afinidad por el sustrato, sin embargo, es mayor mientras que es menor la velocidad máxima, con el sistema dienzimático. Bogorad (1958) ya había informado una variación en los valores de K_m y V_m al agregar cosintasa de germen de trigo a una preparación de deaminasa de hojas de espinaca precalentadas. Estas variaciones en la afinidad por el sustrato del sistema dienzimático sugieren una interacción de la cosintasa con el PBG, o, bien una modificación de la conformación de la deaminasa por la cosintasa durante la reacción de polimerización. En el curso de este trabajo, se investigaron ambas posibilidades.

Si interactuara con el porfobilinógeno, a pesar de no consumirlo en ausencia de deaminasa, la cosintasa podría tener un sitio de reconocimiento para él. Se hicieron múltiples experimentos de diálisis de equilibrio donde la cosintasa se ubicó en el compartimiento interno y el porfobilinógeno en el externo. En todos los casos el PBG difundía hacia el compartimiento interno hasta igualar la concentración interna a la externa, pero en ningún caso se acumulaba en el interior. Es decir, no se unía el porfobilinógeno a la cosintasa.

Ya que fue imposible comprobar una interacción entre la cosintasa y el PBG, por lo menos a nivel de un sitio de unión para el

TABLA 8 A

Experimento N°	Sistema enzimático	Amonio Hidroxil-amina (mM)	Uroporfirinógeno formado					
			Isómero I (cpm) Inhibición (%)	Isómero III (cpm) Inhibición (%)	Porfirina Total (cpm) Inhibición (%)			
1	Deaminasa-cosintasa de eritrocitos humanos	—	2000	4160		6160		
		30	2000	3850	7	5850	5	
		60	1600	3000	20	4600	25	
		100	1485	2510	40	3995	35	
2	Deaminasa-cosintasa de eritrocitos humanos	—	3675	4450		8125		
		100	2600	2420	45	5020	38	
		—	30	4800	130	4930	39	
		100	30	4214	1512	5726		
3	Deaminasa-cosintasa de germen de Trigo	—	2550	1200	20	3750	35	
		30	2100	135	100	2235	69	
		60	3810	Activación	8600	12410		
		100	4500	18	1970	42	9470	24
		—	4220	11	4290	50	8510	31
		20	3900	2	2970	65	6870	45
		30	4870	28	200	100	5070	60
	30	3555	135	100	3690	70		

TABLA 9 A

Cosintasa Tratada con	Uroporfirinógeno formado			
	Isómero I (cpm)	Isómero III (cpm) Inhibición (%)	Porfirina Total (cpm)	
—	4875	3935	8810	
h _v	4870	3940	8810	
Rosa de bengala	4830	4055	8885	
Rosa de bengala + h _v	5680	2950	27	8630
Azul de metileno	3000	5335	-	8335
Azul de metileno + h _v	4540	4076	14	8616
sin N-bromosuccinimida	6230	1916		8146
N-bromosuccinimida	6250	1800		8050

PBG sobre la cosintasa, la posibilidad de una asociación de ambas enzimas durante la reacción debió ser explorada. Esta asociación modificaría a la deaminasa aumentando su afinidad por el sustrato y orientando la síntesis del producto hacia el isómero III. Por otra parte, la existencia de una asociación de este tipo podía inferirse al examinar las velocidades de formación del uroporfirinógeno I y del uroporfirinógeno III (Figura 29). Ambos isómeros parecen compartir un intermediario común, ya que mientras la síntesis total de uroporfirinógenos mantiene una velocidad constante, la disminución en la velocidad de formación del isómero III después de los 60 minutos se correlaciona perfectamente con un aumento en la velocidad de formación del isómero I. Se pensó que el intermediario común no sería un compuesto pirrilmetano, puesto que se había descubierto en nuestro laboratorio que ya desde la etapa de la dimerización, las dos reacciones tienen lugar por mecanismos diferentes con intermediarios diferentes. Podría ser, entonces, que lo común a ambas reacciones fuera una asociación deaminasa-cosintasa. In vitro, la cosintasa se iría inactivando progresivamente durante el curso de una incubación a 37°C, debido a su termolabilidad.

Un complejo conteniendo una molécula de PBG deaminasa y una molécula de urógeno III cosintasa tendría un peso molecular de 70.000; otras combinaciones serían aún más pesadas. Si se formara un complejo de las dos enzimas, debería esperarse, en una Sephadex G-100, un pico correspondiente a 70.000. Al filtrar por Sephadex G-100 una fracción concentrada de la 1ª DEAE celulosa, y calcular su P.M. por el método de Andrews como se explica en Métodos, se obtuvo un Peso Molecular de 70.000 \pm 5.000. En el pico se encontró actividad de cosintasa. Sin embargo, en otros experimentos donde se reconstituyó el sistema deaminasa-

cosintasa, filtrándose luego por Sephadex G-100 no se encontró este pico pesado, encontrándose actividad de deaminasa en un pico correspondiente a 25.000 ± 5.000 y cosintasa en un pico correspondiente a 45.000 ± 5.000 .

Se inmovilizó a la PBG deaminasa de germen de trigo sobre un soporte sólido de Sepharosa 4B. La deaminasa unida a la Sepharosa, aunque menos activa que en su forma soluble, formaba, por incubación con el PBG, exclusivamente uroporfirinógeno I.

Al cromatografiar cosintasa de eritrocitos humanos sobre una columna de Sepharosa 4B-deaminasa, se observó que no se recuperaba la actividad de cosintasa sembrada, y que había una marcada retención de proteína en la columna, comparando con el pasaje de la misma enzima por una Sepharosa 4B-albúmina como control. Fué ensayada la actividad del lecho de Sepharosa 4B-deaminasa, luego de haber hecho pasar por él la cosintasa, sin ningún agregado de enzima, comprobándose se la formación de uroporfirinógeno del tipo III. Esto evidenció la unión de la cosintasa a la deaminasa inmovilizada. Se intentó eluir la cosintasa unida con $\text{ClNa}2\text{M}$, sin resultado. El agregado de PBG en esta cromatografía de afinidad no varía los resultados. Es decir que, esté o no presente el PBG, ambas enzimas interactúan asociándose sobre el soporte de Sepharosa. La fijación de la deaminasa sobre este soporte inerte no impide su interacción normal con la cosintasa para dar el uroporfirinógeno III, ya que al incubar deaminasa-Sepharosa junto con cosintasa y PBG, se comprobó la formación de este isómero.

Se estudió la posibilidad de que la clásica inhibición por hidroxilamina de la formación del uroporfirinógeno III se debiera a una

TABLA 10

Tipo de columna	buffer	actividad de cosintasa en los eluidos	actividad de cosintasa retenida por el lecho
Sepharosa tratada previamente con BrCN	Pi .05M pH 7.4 NH ₂ OH .03M	+	-
Sepharosa-deaminasa	Pi .05M pH 7.4	-	+ (100%)
Sepharosa-deaminasa	Pi .05M NH ₂ OH .03M	-	+ (80 %)

La hidroxilamina no interfiere en la asociación de deaminasa y cosintasa. La diferencia entre un 100% de formación de isómero III en el blanco y un 80% en el tratado no es significativa, está dentro de los límites del error en el método de dosaje de isómeros usado (Falk y Benson).

interferencia en la asociación deaminasa-cosintasa. Con ese fin, se filtró nuevamente cosintasa a través de una columna de deaminasa-Sepharosa 4B, esta vez con buffer de fosfatos .05M a pH 7.4 con el agregado de hidroxilamina (clorhidrato) .03M. La actividad de cosintasa recuperada en los eluidos fué nula. Al ensayar la actividad del lecho de Sepharosa-deaminasa por el cual se había pasado a la cosintasa, se comprobó la formación de aproximadamente un 80% de uroporfirinógeno III. Se hicieron dos controles de este experimento. El primero consistió en pasar la misma cosintasa por una columna de Sepharosa previamente sometida a la reacción de activación con BrCN pero sin unir a deaminasa, con el mismo buffer conteniendo NH_2OH .03M. En este caso se recuperó la actividad de la cosintasa en tres fracciones eluidas. La cosintasa no es retenida por la Sepharosa cuando ésta no está unida a deaminasa. Un segundo control lo constituyó una columna de Sepharosa-deaminasa sin hidroxilamina, por la cual se hizo pasar a la cosintasa. Esta no fue recuperada en los eluidos, sino que fue retenida por la Sepharosa-deaminasa. El ensayo de actividad del lecho dió como resultado la formación de 100% uroporfirinógeno III. El resultado neto de esta experiencia fue que la hidroxilamina no interfiere en la asociación de deaminasa y cosintasa para formar el uroporfirinógeno III. La reacción debe bloquearse a nivel de alguno de los pirrimetanos intermediarios.

RESUMEN

La purificación de cada una de las enzimas que componen el sistema deaminasa-cosintasa, que cataliza la biosíntesis del uroporfirínógeno III, constituyó el paso inicial para el mejor estudio de las propiedades de ambas enzimas. La PBG deaminasa de eritrocitos humanos hasta el momento había sido caracterizada como una enzima de gran labilidad (Stevens y Frydman, 1968). En el curso de este trabajo, se logró una enzima parcialmente purificada de mayor estabilidad. Se observó que una alta concentración de buffer de fosfato favorecía la estabilidad de la enzima.

La purificación de la uroporfirínógeno III cosintasa de eritrocitos lograda en el presente trabajo dió como resultado una enzima purificada que hasta el momento no se había logrado (Bogorad, 1975). La estabilización de la enzima durante las diversas etapas de purificación se logró protegiendo los grupos sulfhidrilo. La gran labilidad de la enzima a medida que se va purificando, e incluso durante la incubación, que hace algún tiempo motivó la hipótesis de que se estuviera consumiendo estequiométricamente y no catalíticamente (Levin, 1968) se debería, en realidad, a la labilidad de grupos sulfhidrilo libres. La propiedad de esta enzima de unirse al azul dextrano nos permitió lograr una purificación satisfactoria. Quedaría por investigar la naturaleza de esta asociación de la cosintasa con el cromóforo del azul dextrano. La purificación sobre una columna de afinidad de azul dextrano inmovilizado sobre Sepharosa es un método simple y muy efectivo de purificar a la cosintasa, sin que ésta se inactive, como suele suceder en otros métodos de purificación.

La facilidad con que es oxidada la PBG deaminasa, probablemente por oxidación de grupos triptofanilo y la resistencia de la uroporfirinógeno III cosintasa a las oxidaciones indicaría un posible mecanismo de control de la primera enzima por la triptofanopirrolooxigenasa.

La PBG deaminasa de eritrocitos humanos es una proteína monomérica de bajo peso molecular. La cosintasa de eritrocitos humanos también es monomérica, siendo su peso molecular de 45.000 ± 5.000 . La cromatografía de afinidad deaminasa inmovilizada-cosintasa evidenció, por retención de la cosintasa, la asociación de ambas proteínas entre sí. Esta asociación es independiente de la presencia de porfobilinógeno. El complejo formado por la deaminasa inmovilizada y la cosintasa retenida cataliza la síntesis del uroporfirinógeno III. Esta sería una de las primeras evidencias que confirman la hipótesis de que la cosintasa actúa como proteína modificadora, tal como fue planteada por Bullock (1965) y luego por Frycman y colab. (1969). De acuerdo a esta hipótesis, la cosintasa actuaría cambiando de algún modo la conformación de la PBG deaminasa de modo que la primera etapa en la polimerización que conduce a la formación del uroporfirinógeno III sea una condensación cabeza-cabeza de dos unidades de PBG (Figura 22a).

El estudio de las propiedades de las enzimas en especial de la afinidad de la deaminasa y la cosintasa entre sí, además de experimentos de incorporación de intermediarios sintéticos efectuados en nuestro laboratorio y ya citados en la Introducción permiten formular un mecanismo para la biosíntesis de uroporfirinógeno III a partir de PBG. La reacción tiene lugar en forma continua sobre la superficie

del complejo enzimático, sin liberación de intermediarios al medio. La uroporfirinógeno III cosintasa actuaría como proteína especificadora de la deaminasa variando el modo de condensación del porfobilinógeno desde el comienzo de la reacción guiándola hacia la formación del isómero III. No habría pues, intermediarios pirrilmétanos comunes al uroporfirinógeno I y III, y esto fue confirmado por la incorporación de dos dipirrimetanos distintos (figura 24) en los uroporfirinógenos I y III respectivamente. La formación de ambos isómeros por dos sistemas enzimáticos diferentes (deaminasa y deaminasa-cosintasa) representa los dos modos en que se inicia la autocondensación química del PBG (figura 22): una condensación cabeza-cola con eliminación de amoníaco, o una condensación cabeza-cabeza por desplazamiento de un grupo metilo activado.

Este grupo "metilo activo" que en la polimerización química del porfobilinógeno se libera como formaldehído debe ser constantemente transferido a través de la cadena de pirrilmetano a medida que esta crece y hasta llegar finalmente a completar el macrociclo.

De modo que mientras que la porfobilinógeno deaminasa funciona sólo como enzima deaminante, el complejo deaminasa-cosintasa debe cumplir también con un rol de metiltransferasa.

Es útil comparar nuestro sistema enzimático deaminasa-cosintasa con el bien conocido sistema enzimático dual que cataliza la síntesis de lactosa. En ese caso la α -lactalbúmina modifica a la enzima galactosiltransferasa para que ésta utilice glucosa en lugar de N-acetil glucosamina como aceptor del UDP-galactosa. Es decir, que la enzima galactosiltransferasa modificada por la α -lactalbumina cambia su afinidad por uno de los sustratos de la reacción, actuando sobre un sustrato diferen-

te (Shanbacher y Ebner, 1971).

En el caso de la deaminasa-cosintasa, sistema enzimático que cataliza la formación del uroporfirinógeno III, no variaría el sustrato sino la forma en que se condensan los cuatro moles de sustrato; la proteína modificadora estaría orientando la reacción hacia la formación de un determinado producto y no de otro, pero a partir de un mismo sustrato, el porfobilinógeno.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "R. G. E. S. T. I.", written in a cursive style.A handwritten signature in black ink, appearing to read "P. M. S.", written in a cursive style with a long horizontal stroke extending to the right.

COMMENTARY

BY JAMES H. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

AND JOHN W. HARRIS

- Andrews, P. (1964) Biochem. J. 91 222-233
- Battersby, A. R. (1971) Researches on the biosynthesis of porphyrins,
23rd Int. Congress of Pure and Applied Chem., Special Lect.
5, 1-18
- Beale, S. I. y Castelfranco, P. A. (1974) Plant Physiol. 53, 291-297
- Bogorad, L. y Granick, S. (1953) J. Biol. Chem. 202, 793
- Bogorad, L. (1955) Science 121, 878
- Bogorad, L. (1958) J. Biol. Chem. 233, 501
- Bogorad, L. (1963) Ann. N. Y. Acad. Sci. 104, 676-688
- Bogorad, L. y Radmer, R. (1972) A tetrapyrroilmethane intermediate in
the enzymatic synthesis of uroporphyrinogen Biochemistry 11,
904-910
- Bullock, E., Johnson, A. W., Markan E. y Shaw, K. B. (1958) J. Chem.
Soc. 1430,
- Bullock, E. (1965) Origin of type III porphyrins in nature, London, Nature
205, 70-71
- Burnham, B. F. (1969) in Metabolic Pathways Vol. III, Greenberg D. M.
Ed, New York, Academic Press, Capitulo 18
- Burnham, B. F. y Plane, R. A. (1966) Biochem. J. 98, 13c.
- Cavaleiro, J. A. S., Kenner, G. W., y Smith, K. M. (1974) J. Chem.
Soc., Perkin I, 1188 y referencias
- Carpenter, A. T., y Scott, J. J. (1959), Biochem. J. 71, 325
- Chiang, Y. y Whipple, E. B. (1963) J. Am. Chem. Soc. 85, 2763-2767
- Cornford, P. (1964) - Transformation of porphobilinogen into
porphyrins by preparations from human erythrocytes. Biochem. J.
91,64
- Cornford, P. y Benson, A. (1963) J. Chromatog. 10, 141
- Bogorad, L. y Marks, C. S., Biochim. Biophys. Acta 41, 356, (1960)

- Cuatrecasas, P., Wilchek, M, Anfinsen, C. B. (1968) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 61, 636
- Dalton, J. y Dougherty, R. C. (1969). Formation of the macrocyclic ring in tetrapyrrole biosynthesis. Nature, 223, 1151-1153
- Davies, R. C., Gorchein, A., Neuberger, A., Sandy, J. D., y Tait, G. H. (1973) Nature, 245
- De Matteis, F., (1970) FEBS Lett. 6, 343
- Elder, G. H. 1972 Biochem. J. 126, 877
- Edmondson, P. R. y Schwartz, S. (1953). J. Biol. Chem. 205, 605-608
- Falk, J. E. (1964) Porphyrins and Metalloporphyrins, Elsevier, Amsterdam
- Falk, J. E. y Benson, A. (1953) Biochem. J. 55, 101
- Fischer, H. y E. Haarer. (1931) - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem., 204, 101
- Fischer, H. y Hoffman - (1937) - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 246, 15
- Fischer, H. y Jordan, K. (1930) - Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 190, 75
- Frydman, B, Reil S., Despuy, M. E. y Rapoport, H. (1969) J. Amer. Chem. Soc. 91, 2738
- Frydman, R. B., Reil, S. y Frydman, B. (1971) Biochemistry 10, 1154-1160
- Frydman, B., Buldain, G. y Repetto, J. C. (1973) J. Org. Chem., 38, 1824-1831
- Gibson, J., Laver, W. y Neuberger, A., (1958) Biochem. J. 70, 71
- Gorchein, A. Biochem. J. (1972), 127, 96
- Granick, S. J. Biol. Chem. (1948a) 172, 717

- Granick, S. J. Biol. Chem. (1948b) 175, 333
- Harel, E. y Klein, S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Comm., 49, 364
- Jackson, A. H., Sancovich, H. A., de Sancovich, A. M. F., Evans, N.,
Games, D. E., Mattin, S. A., Elder, G. H., y Smith, S. G.
(1976) Phil. Trans. R. Soc. London B, 191
- Jackson, A. H. y Games, D. E. (1975) Annals N. Y. Acad. Sci., 244
- Kennedy, G. Y. (1975) Porphyrins in Invertebrates, Annals N. Y. Acad. Sci. 244
- Kennedy, G. Y., Jackson, A. H., Kenner, G. W. y Suckling, C. J. (1970)
FEBS Lett. 6, 9; 7, 205
- Kennedy, G. Y. y Vevers H. G. (1954) J. Mar. Biol. Ass. UK 33: 663
- Lascelles, J. (1964) "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation",
Benjamin, New York
- Lascelles, J. (1960) - J. Gen. Micros., 23, 487
- Lascelles, J. (1975) Annals NY Acad. Sci. 244, 334
- Lemberg, M. R. Fortschr. Chem. Org. Naturst (1954) 11, 200
- Llambias, E. B. C. y Batlle, A. M. del C. (1971) Biochem. J., 121, 327
- Mangum, C. P. y Dales, R. P., (1965) Comp. Biochem. Physiol. 15, 237
- Margoliash, E. (1961) - Porphyrins and Hemoproteins. Ann. Rev. Biochem.
30, 549
- Marriot, J. A., Neuberger, A. y Tait, G. H. (1969) Biochem. J. 111, 385
- Marriot, J. A., Neuberger, A., y Tait, G. H. (1970) Biochem. J. 117, 609
- Mathewson, J. H. y Corwin, A. H. (1961) Biosynthesis of pyrrole pigments:
A mechanism for porphobilinogen polymerization J. Amer. Chem. Soc., 83, 135
- Mauzerall, D. (1960) J. Amer. Chem. Soc., 82, 2605.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J., J. Biol. Chem. 193, 265, 1951

- Mauzerall, D. y Granick, S. (1958a) J. Biol. Chem. 228, 41
- Mauzerall, D. y Granick, S. (1958b) J. Biol. Chem. 232, 1141
- Nandi, D. L. y Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem., 243, 1224
- Nandi, D. L., Baker-Cohen, K. F. y Shemin, D. (1968) J. Biol. Chem. 243,
1224
- Nandi, D. L. y Shemin, D. (1973) Arch. Biochem Biophys., 158, 305
- Padmanasan, G., Satzanarayana Rao, M. y Malathi, K (1973), Biochem. J.
134, 847
- Peterson, E. A., Sober, H. A. (1962) en Methods in Enzymology 5, 6
- Porra, R. J. y Falk J. E. (1964) Biochem J., 90, 69
- Poulson, R. y Polglase, W. J. (1974), FEBS Lett. 40, 258
- Rimington, C. y Booij., H. L. (1957) Biochem. J. 65, 39
- Sancovich, H. A., Batlle A. M. C. y Grinstein, M. (1969) Biochim.
Biophys. Acta 191, 130
- San Martín de Viale, L. C. y Grinstein, M. (1968) Biochim. Biophys.
Acta 158, 79
- Sano, S. y Granick, S. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1173
- Scott, A. I. (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci. 244, 356
- Scott, A. I. Townsend, C. A., Okada, K. Kajiwara, M, (1972) J. Am.
Chem. Soc. 94, 23
- Shemin, W. (1972) The Enzymes 3rd Ed. P. D. Boyer, Ed. 7, 323-357-
Academic Press. New York
- Spande, T. F., Witkop, B. Methods in Enzymology (1967) 11, 498, 506,
522, 528
- Stellwagen, (1977) Accounts of Chemical Research, 10 (3), 92
- Stevens, E. (1971) Tesis de Doctorado. Universidad de Buenos Aires.

- Schanbacher, F. L. y Ebner, K. E., (1971) Biochim. Biophys. Acta 229,
266
- Stevens, E. y Frydman, B. (1968) Biochim. Biophys. Acta, 151, 429
- Stevens, E. Frydman, R. B. y Frydman, B. (1968) Biochim. Biophys Acta
158, 496
- Tait, G. H. y Gibson, K. D. Biochim. Biophys. Acta (1961) 52, 614
- Tomio, J. M., García, R. C., San Martín de Viale, L. C. y Grinstein,
M. (1970), Biochim. Biophys. Acta, 198, 353
- Tuboi, S. y Hagazaka, S. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 690
- Warburg, O. (1932) Z. Angew. Chem., 45, 1
- Whitlock, B. J., Whitlock, H. W. y Alles, H. (1974) J. Am. Chem. Soc.
96, 3960-3965
- Wilson, E. L., Burger, P. E. y Dowdle, E. B. (1972) Eur J. Biochem.
29, 563
- Witkop, B. (1961) Advanc. Protein Chem. 16, 221
- Wu, W. H., Shemin, W., Richards, K. E. y Williams, R. C. (1974)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 1767

- Barreiro, O. (1967) Biochim. Biophys. Acta, 139, 479
- Batlle, A.M. del C., Ferramola, A.M. y Grinstein, M. (1967)
Biochem. J. 104, 244
- Bogorad, L. (1960) en "Comparative Biochemistry of Photoreactive Systems" (ed. M.B.Allen) Academic Press, New York, 227
- Bogorad, L. (1966) en "The Chlorophylls" (ed. Vernon y Seely), 481
- Bogorad, L. (1975) Annals N. Y. Acad. Sci. 244, 401
- * Calissano, P., Carta Segna, C. y Martlin, D. (1966) Ital. J. Biochem
15, 18
- Frydman, R.B. y Frydman, B. (1970) Arch. Biochem. Biophys. 136, 193
- Frydman, R.B. y Frydman, B. (1975) FEBS Lett. 52, 317
- Frydman, B. Reil, S., Valasinas, A. y Frydman, R.B. y Rapoport H.,
(1971) J. Am. Chem. Soc. 93, 2738
- Frydman, R.B. Tomaro, M. L., Frydman, B. (1972) Biochim. Biophys. Acta
284, 80
- Frydman, R.B., Valasinas, A. Rapoport, H. y Frydman, B. (1972) FEBS
Lett. 25, 309
- Granick, S. (1966) J. Biol. Chem. 241, 1359
- ** Granick, S. y Kappas, A. J. Biol. Chem. 242, 4587 (1967)
- Krugelis-Macrae, E. (1956) Biol. Bull. 110, 69
- Levin, E. Y. (1968) Biochemistry 7, 3781
- Marks, S. y Bogorad, L. Ver en la bibliografía general bajo Bogorad, I
y Marks, S. (1960)
- Nandi, D. L. y Waygood, E. (1967) Can. J. Biochem. 45, 327
- Nishimura, N. Chance, B. (1963) Biochim. Biophys. Acta 66, 1
- Shemin, D., y Russell, C.S. (1953) J. Am. Chem. Soc. 75, 4873
- Stoll, M.S., Elder, G.H., Games, D.E., O'Hanlon, Millington, D.S.,
y Jackson, A.H. (1973) Biochem. J. 131, 429
- Tigier, H., Batlle, A.M. del C., Lopascio, G. (1970) Biochim. Biophys
Acta 151, 300
- Tuboi, S., Kim, H.J. y Kikuchi, G. Arch. Biochem. Biophys. 138, 147
(1970)
- * Burnham, B. y Lascelles, J. (1963) Biochem. J. 70, 71
- ** Granick, S. (1967) en "Biochemistry of Chloroplasts" Vol. II
(ed. T.W. Goodwin), Academic Press, Londres y New York