

## Tesis de Posgrado

# Biosíntesis de uroporfirinógenos naturales : interacciones enzimáticas en la formación del macrociclo

Kotler, Mónica Lidia

1988

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

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Kotler, Mónica Lidia. (1988). Biosíntesis de uroporfirinógenos naturales : interacciones enzimáticas en la formación del macrociclo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2158\\_Kotler.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2158_Kotler.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Kotler, Mónica Lidia. "Biosíntesis de uroporfirinógenos naturales : interacciones enzimáticas en la formación del macrociclo". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2158\\_Kotler.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2158_Kotler.pdf)

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE UROPORFIRINOGENOS NATURALES.  
INTERACCIONES ENZIMATICAS EN LA FORMACION DEL MACROCICLO

por:

MONICA LIDIA KOTLER

DIRECTOR: Dra. Alcira M. del C. Batlle  
CONSEJERO: Dra. Alcira M. del C. Batlle

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias  
(CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad de  
Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. .  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas .  
(CONICET)

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 8 8

2158  
Ej. 2.

*A mis padres*

*A Horacio*

*A mi abuela y hermanos*

*A mis amigos*

## AGRADECIMIENTOS

- Deseo expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Alcira M. del C. Batlle quien me brindó la posibilidad de iniciarme en el campo de la investigación y porque con el aporte de sus conocimientos, su guía y constante afecto hizo posible la concreción de esta Tesis.
- A Silvia y Ana Adela, muy especialmente, porque al brindarme su amistad y ayuda permanente hicieron felices y amenos estos años de trabajo.
- A María Victoria y Ana Adela con quienes tuve la fortuna de iniciarme en la investigación como estudiante de Química Biológica II. Su capacidad docente, sus conocimientos sumados a su calidad humana, fueron mi estímulo.
- A Silvia, por los excelentes y personales gráficos y esquemas que ilustran parte de esta Tesis.
- A Ana María Buzaleh por su especial dedicación y esmero en la transcripción del manuscrito.
- A la Sra. Beatriz Ricillo de Aprea y a la Srta. Hilda Gasparoli por la eficiente asistencia técnica.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Universidad de Buenos Aires por las becas otorgadas.
- Al CONICET, SUBCYT y Banco de la Nación Argentina por los subsidios concedidos a la Dra. Alcira Batlle, con los cuales se ha financiado este trabajo.
- A mis compañeros del CIPYP, mi especial y sincero reconocimiento por todos los momentos compartidos.

## INDICE GENERAL

---

Página

ABREVIATURAS

OBJETIVOS

INTRODUCCION	1
- PARTE A : BIOSINTESIS DE PORFIRINAS	1
CAPITULO I: ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS TETRAPIRROLES	1
I.1.    Introducción	1
I.2.    Nomenclatura y estructura	1
I.3.    Propiedades de los tetrapirroles	24
I.4.    Referencias	34
CAPITULO II: BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES	36
II.1.   Introducción	36
II.2.   Precursores e intermediarios en la bio- síntesis de tetrapirroles	38
II.3.   Enzimas del camino de los tetrapirroles	41
II.4.   Referencias	72
CAPITULO III: PORFOBILINOGENASA	80
III.1.  Introducción	80
III.2.  Propiedades generales de las enzimas	81
III.3.  Estudios cinéticos	93
III.4.  Estudios sobre el mecanismo de polimeriza- ción enzimática del PBG	95
III.5.  Referencias	125
CAPITULO IV: PORFIRIAS	130
IV.1.  Introducción	130
IV.2.  Clasificación de las porfirias	131
IV.3.  Anormalidades enzimáticas en las porfirias	134
IV.4.  Referencias	150

	Página
CAPITULO V: REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES	154
V.1.    Introducción	154
V.2.    Mecanismos de control	154
V.3.    Referencias	166
- PARTE B: ENZIMAS INMOVILIZADAS	167
CAPITULO I: ASPECTOS GENERALES	167
I.1.    Introducción	167
I.2.    Estabilidad de las enzimas inmovilizadas	169
I.3.    Comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas	173
I.4.    Referencias	176
CAPITULO II: TECNICAS PARA LA INMOVILIZACION DE PROTEINAS	177
II.1.   Clasificación	177
II.2.   Técnicas de adsorción	177
II.3.   Técnicas de atrapamiento de enzimas en geles	188
II.4.   Técnicas de acople covalente	196
II.5.   Referencias	208
CAPITULO III: CARACTERISTICAS DE LOS SOPORTES	210
III.1.  Generalidades	210
III.2.  Geles de agar y agarosa	211
III.3.  Referencias	216
CAPITULO IV: METODOS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS A SOPORTES DE SEPHADEX, AGAR Y AGAROSA	217
IV.1.   Clasificación	217
IV.2.   Unión covalente	217
IV.3.   Métodos de adsorción	229
IV.4.   Referencias	231
CAPITULO V: INMOVILIZACION DE SUBUNIDADES	232
V.1.    Consideraciones generales	232

	Página
V.2. Selección de las condiciones experimentales	232
V.3. Criterios para determinar la presencia de subunidades inmovilizadas	234
V.4. Alcances y limitaciones de los procedimientos	239
V.5. Referencias	245
- PARTE C: BACTERIAS FOTOSINTETICAS	246
CAPITULO I: BACTERIAS FOTOSINTETICAS	246
I.1. Aspectos generales	246
I.2. Taxonomía	247
I.3. Bacterioclorofila	252
I.4. Referencias	255
MATERIALES Y METODOS	257
- A: MATERIALES	257
- B: METODOS	259
I. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	259
I.1. Fuente enzimática	259
I.2. Cultivo y crecimiento	259
I.3. Determinación de la relación entre el peso seco y la absorbancia	260
I.4. Extracción de la proteína enzimática	261
I.5. Sistema standard de incubación	262
I.6. Separación de la proteína y productos de reacción	262
I.7. Unidad enzimática	263
II. HIGADO BOVINO	264
II.1. Fuente enzimática	264
II.2. Obtención de las enzimas purificadas	264
II.3. Sistema standard de incubación	266
II.4. Separación de la proteína y productos de la reacción	267
II.5. Unidad enzimática	267

	Página
III. ACTIVIDAD ENZIMATICA, PORFIRINAS Y TIPOS ISOMERICOS, PESOS MOLECULARES, INMOVILIZACION DE ENZIMAS	268
III.1. Determinación de la actividad enzimática	268
III.2. Determinación del tipo isomérico y de las porfirinas formadas	271
III.3. Determinación del peso molecular (PM)	272
III.4. Técnicas para la inmovilización de enzimas	274
- C: REFERENCIAS	277
RESULTADOS Y DISCUSION	278
CAPITULO I: AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA DEAMINASA DE <i>Rp. palustris</i>	278
I.1. Aspectos generales	278
I.2. Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento y medición de la actividad	279
I.3. Purificación de la enzima y determinación de su peso molecular	293
I.4. Propiedades de la enzima	296
I.5. Referencias	325
CAPITULO II: INMOVILIZACION DE LA DEAMINASA	329
II.1. <i>Rp. palustris</i>	329
II.2. Hígado bovino	347
II.3. Referencias	356
CAPITULO III: ESTRUCTURA CUATERNARIA	357
III.1. Efecto de la urea sobre el equilibrio de asociación-disociación	357
III.2. Efecto de la urea sobre la Deaminasa de <i>Rp. palustris</i>	358
III.3. Efecto de la urea sobre la Deaminasa de hígado bovino	363
III.4. Referencias	367



	Página
CAPITULO IV: FORMACION DE INTERMEDIARIOS	368
IV.1. Formación de intermediarios a partir de la Deaminasa inmovilizada de hígado bovino	368
IV.2. Obtención de intermediarios a partir de Deaminasa inmovilizada de <i>Rp. palustris</i>	376
IV.3. Acción de la Isomerasa sobre el intermedia <u>r</u> rio tetrapirrilmetano y sobre la Deaminasa	378
IV.4. Referencias	390
 CAPITULO V: MECANISMO DE ACCION PARA LA FORMACION ENZIMATICA DE LOS UROPORFIRINOGENOS I Y III	 391
V.1. Mecanismo de acción	391
V.2. Referencias	396
 CAPITULO VI: MODELO PARA LA PBG-asa	 397
VI.1. Acerca de la importancia de la formación de un complejo Deaminasa-Isomerasa en la efectiva canalización del intermediario tetrapirrólico. Modelo	397
VI.2. Referencias	403
 CAPITULO VII: CONCLUSIONES	 404
VII.1. Aislamiento y propiedades de la Deaminasa de <i>Rp. palustris</i>	404
VII.2. Inmovilización de la Deaminasa	406
VII.3. Estructura cuaternaria	407
VII.4. Formación de intermediarios	408
VII.5. Mecanismo de acción	408
VII.6. Modelo para la PBG-asa	409
 ADDENDUM	 410

## ABREVIATURAS

Rp.	<i>Rhodopseudomonas</i>
Bcl	Bacterioclorofila
Cl	Clorofila
Succ.CoA	Succinil Coenzima A
Gli	Glicina
ALA	Acido $\delta$ -aminolevúlico
PBG	Porfobilinógeno
HMB	Hidroximetilbilano
Urogen	Uroporfirinógeno
URO	Uroporfirina
Copro	Coproporfirina
Coprogen	Coproporfirinógeno
PAI	Porfiria Aguda Intermitente
Succ.CoA-S	Succinil CoA sintetasa
ALA-S	ALA-Sintetasa
ALA-D	ALA-Dehidrasa
PBG-asa	Porfobilinogenasa
D	Deaminasa
I	Isomerasa
URO-Dcasa	Uroporfirinógeno Decarboxilasa
CPG-asa	Coprogenasa
Protogen-ox	Protogen oxidasa
PDAMB	p-Dimetilaminobenzaldehído
PM	Peso molecular
TCA	Acido tricloroacético
TRIS	Tri (hidroximetil)aminometano

## OBJETIVOS

La Porfobilinogenasa (PBG-asa) es un complejo enzimático que cataliza la ciclotetramerización del monopirrol Porfobilinógeno (PBG) en el Uroporfirinógeno III (Urogen III), intermedio fisiológico en la síntesis de hemos, clorofilas y corrinas.

Este complejo está constituido por dos enzimas, la Deaminasa o Urogen-I-Sintetasa y la Isomerasa o Urogen III Cosintetasa. En ausencia o deficiencia de la segunda, la Deaminasa forma el Urogen I, que sólo se detecta naturalmente en condiciones anormales.

Los datos existentes sobre las enzimas involucradas en la síntesis de porfirinas en la bacteria fotosintética *Rhodospseudomonas palustris* (*Rp. palustris*) provienen de estudios de nuestro laboratorio sobre el ALA-Sintetasa, la Urogen-decarboxilasa y la PBG-asa. De manera que con el objeto de ampliar los conocimientos acerca del sistema de la PBG-asa de esta fuente, se decidió investigar en detalle al componente Deaminasa del complejo en *Rp. palustris*.

En la etapa inicial de este trabajo se planeaba determinar las condiciones óptimas para la detección, extracción y medición de la actividad enzimática. Se desarrollaría luego un método para la purificación de la enzima; con la fracción purificada se efectuarían estudios de caracterización y cinética.

Una vez obtenida la Deaminasa de *Rp. palustris* purificada se proyectaba insolubilizar a la misma con el fin de efectuar estudios sobre la disociación-reasociación tanto de la preparación soluble como la insolubilizada, con el objeto de obtener información acerca de la estructura cuaternaria de la proteína.

Por otra parte, se efectuarían además estudios comparativos con la misma enzima proveniente de hígado bovino.

Para llevar a cabo las experiencias antes mencionadas, era necesario determinar las condiciones óptimas de acople a un soporte de Sepharosa, de la enzima de ambas fuentes, así como también el sistema de incubación a emplear. Con ambas enzimas inmovilizadas se procedería al estudio de algunas de sus propiedades características.

Otro objetivo de este trabajo era la búsqueda de intermediarios polipirrólicos naturales, obtenidos bajo distintas condiciones experimentales, empleando las enzimas insolubilizadas;

de lograr este fin se estudiaría el comportamiento de esos intermediarios intentándose además su caracterización.

De una revisión cuidadosa acerca de las evidencias experimentales existentes hasta el momento y con el aporte de los resultados obtenidos de estos estudios, se esperaba llegar a proponer un esquema más actual acerca del mecanismo de acción de la PBG-asa.

Entre nuestros propósitos se hallaba asimismo lograr alguna información sobre la posible interacción y/o asociación de las enzimas que conforman el complejo de la PBG-asa, con el fin de postular un modelo para explicar la acción cooperativa de ambas enzimas en la formación del intermediario fisiológico Urogen III.

# **INTRODUCCION**

A

# CAPITULO I

## ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS TETRAPIRROLES

---

	Página
I.1. Introducción	1
I.2. Nomenclatura y estructura	1
I.2.1. Porfirinas	3
I.2.2. Porfirinógenos e hidroporfirinas relacio <u>nadas</u>	4
I.2.2.1. Porfirinógenos	4
I.2.2.2. Tetrahidroporfirinas	7
I.2.2.3. Dihidroporfirinas (florinas)	8
I.2.3. Porfirinas sintéticas y compuestos macro <u>cíclicos análogos</u>	9
I.2.4. Metaloporfirinas	14
I.2.4.1. Hierroporfirinas	16
I.2.4.2. Hemoproteínas	17
I.2.4.21. Hemoglobina y mioglobina	17
I.2.4.22. Citocromos	18
I.2.4.23. Otras hemoproteínas	19
I.2.4.3. Clorofilas y Bacterioclorofilas	20
I.2.4.4. Vitamina B12	23
I.3. Propiedades de los tetrapirroles	24
I.3.1. Propiedades físicas	24
I.3.1.1. Solubilidad	24
I.3.1.2. Espectros de absorción	25
I.3.1.3. Fluorescencia	27
I.3.2. Propiedades químicas	29
I.4. Referencias	34

## I. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LOS TETRAPIRROLES

### I.1. Introducción

Las porfirinas y sus derivados, así como las metaloporfirinas y las hemoproteínas que provienen de ellas, son compuestos tetrapirrólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y cumplen funciones fisiológicas fundamentales en todas las células vivas.

El color verde de las plantas es consecuencia de la presencia de las clorofilas que son magnesio-dihidroporfirinas (clorinas). Estos pigmentos son primordiales para el desarrollo de la vida en nuestro planeta ya que intervienen, conjuntamente con los citocromos (hierro-porfirinas unidas a proteínas) en la fotosíntesis, proceso mediante el cual la energía solar es almacenada y convertida en energía química.

Las porfirinas son también responsables del color rojo de la hemoglobina, una proteína tetramérica cuyo grupo prostético es una hierro-porfirina (el hemo) y que participa, en tejidos animales, en el transporte de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ , etc.).

La descomposición y activación del peróxido de hidrógeno están mediadas por las hemoproteínas catalasa y peroxidasa. Las hemoproteínas funcionan además como monooxigenasas y dioxigenasas. El citocromo P-450, que combina las propiedades de unirse al oxígeno y transportar electrones, desempeña un papel significativo en las hidroxilaciones biológicas. El sirohemo que es una metalo-tetrahidroporfirina es el grupo prostético de las nitrito-reductasas y sulfito-reductasas, enzimas involucradas en la asimilación del nitrógeno y del azufre.

Estos ejemplos demuestran claramente que las porfirinas constituyen una parte funcionalmente esencial de ciertas macromoléculas indispensables para la vida.

### I.2. Nomenclatura y estructura

Los estudios acerca de los compuestos tetrapirrólicos comenzaron con los trabajos realizados por Hoppe-Seyler (1880); Willstätter y Stoll (1928) y Fischer (1937).

Varios años después, las escuelas de Lemberg y Legge (1949) y Mc Donald y Mc Donald (1955) establecieron la estructura química



de varias porfirinas, sintetizando la mayoría de las que se encuentran en la naturaleza.

Así, el conocimiento creciente acerca de la química de las porfirinas fue adquirido durante los primeros cincuenta años de este siglo y culminó con la elucidación de las estructuras del hemo y la clorofila, siendo la piedra fundamental sobre la cual se ha edificado el estudio de la biosíntesis de estos pigmentos.

Los tetrapirroles naturales o sintéticos derivan de dos núcleos básicos : porfina y clorina (Figura I.1.). Estos núcleos están constituidos por cuatro anillos pirrólicos (A, B, C y D), unidos entre sí por medio de cuatro puentes meteno ( $\alpha, \beta, \gamma$  y  $\delta$ ); los carbonos externos  $\beta$  y  $\beta'$  de los anillos pirrólicos se identifican con los números 1 al 8, comenzando por el núcleo A. La diferencia entre la estructura de la porfina y la clorina consiste simplemente en que, en esta última, el anillo D se encuentra reducido.

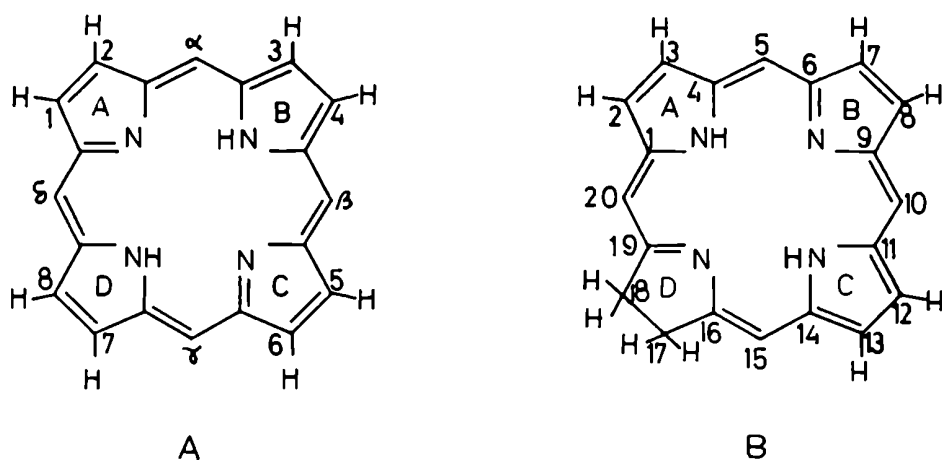


FIGURA I.1.: Representación de las estructuras de la porfina (A) y de la clorina (B). Nomenclatura del núcleo según Fischer (A) e IUPAC (B).

La presencia de un sistema de dobles ligaduras alternadas en este compuesto cíclico de 16 átomos internos, da como consecuencia una estructura resonante, muy estable y planar.

Las distintas estructuras de los tetrapirroles presentes en la naturaleza derivan de estos dos esqueletos básicos que han sufrido ciertas modificaciones:

i) sustitución parcial o total de los átomos de carbono externos (1 al 8) por restos alquilos.

ii) sustitución o reemplazo sobre los puentes meténicos; los sustituyentes pueden ser átomos de hidrógeno, como aparecen en los porfirinógenos, o un anillo de ciclopentanona como en las clorofilas, o un reemplazo como ocurre en el anillo porfirínico de la corrina, típico de los derivados de la vitamina B12, en el cual se ha perdido el puente meténico  $\delta$ .

iii) inserción de un metal, conduciendo a la formación de las metaloporfirinas.

### I.2.1. Porfirinas

Las porfirinas son derivados de los tetrapirroles libres de metales, que se diferencian estructuralmente por la naturaleza y ordenamiento de las cadenas laterales que han sustituido las posiciones 1 a 8 de los anillos pirrólicos.

Normalmente es conveniente referirse a las diferentes porfirinas empleando sus nombres triviales. La Tabla I.1. muestra las distintas cadenas laterales presentes en los compuestos más comunes. Por ejemplo, la uroporfirina tiene cuatro restos acético y cuatro restos propiónico, es decir sólo dos tipos diferentes de sustituyentes.

Empleando el sistema propuesto por Fischer (1937) para identificar a los distintos átomos de carbono del núcleo de la porfina, ilustrada en la Figura I.1., se observa fácilmente que las uroporfirinas así como las coproporfirinas y etioporfirinas, son derivados de la porfina en la cual cada uno de los cuatro anillos pirrólicos lleva dos sustituyentes diferentes que podemos llamar A y B; en estos casos es posible la existencia de cuatro ordenamientos distintos de estos dos grupos, que dan lugar a cuatro isómeros de posición denominados tipos I, II, III y IV (Figura I.2.).

En el caso de las proto y mesoporfirinas la situación es mucho más complicada ya que se presentan tres sustituyentes distintos, dos grupos A y B en los anillos A y B y dos grupos A y C en los anillos C y D. Este ordenamiento de los sustituyentes

yentes da lugar a la posible existencia de 15 isómeros de posición. Fischer (1937) logró sintetizar químicamente los 15 isómeros de la protoporfirina; sin embargo, hasta el momento sólo se ha encontrado en la naturaleza al isómero denominado protoporfirina IX (Tabla I.1.) el cual proviene de porfirinas pertenecientes al tipo isomérico III.

Es importante mencionar que todos los tetrapirroles fisiológicamente activos pertenecen a la serie isomérica III, aunque debe agregarse que naturalmente se han encontrado también derivados de la serie I que no cumplen rol fisiológico alguno y son el resultado de alteraciones en el camino metabólico normal de los tetrapirroles. Hasta ahora, nunca se han aislado de fuentes naturales derivados de los tipos II y IV.

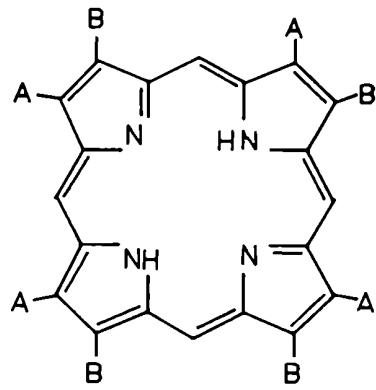
## I.2.2. Porfirinógenos e hidroporfirinas relacionadas

### I.2.2.1. Porfirinógenos

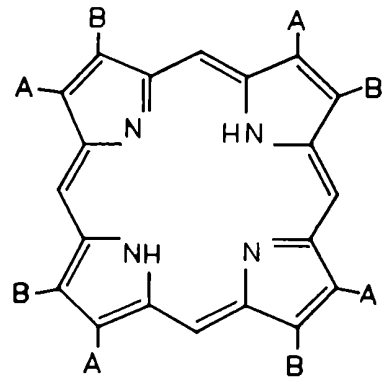
El tratamiento de las porfirinas con agentes reductores tales como amalgama de sodio o borhidruro de sodio, da lugar a la adición de seis átomos de hidrógeno sobre el anillo de la porfirina, dos de ellos en los nitrógenos pirrólicos y cuatro en los átomos de carbono de los puentes meténicos. Se obtienen así hexahidroporfirinas conocidas con el nombre de porfirinógenos (Figura I.3.) los cuales son de gran importancia biológica pues constituyen los verdaderos intermediarios en la biosíntesis normal de hemo y clorofila.

Debido a que la conjugación del macrociclo porfirínico se destruye como consecuencia de la reducción, los porfirinógenos ya no poseen la planaridad, color y propiedades fluorescentes que caracterizan a las porfirinas.

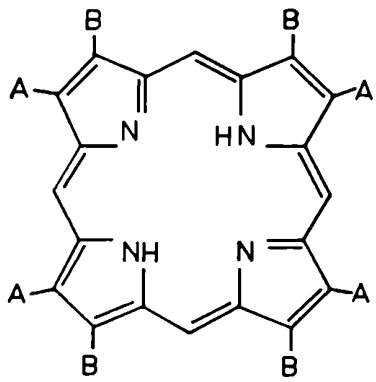
Los porfirinógenos se reoxidan a porfirinas vía tetra y dihidrointermediarios. Estos últimos pueden también formarse por reducción química o fotorreducción bajo ciertas condiciones y, a diferencia de las hexahidroporfirinas, presentan absorción en la región visible.



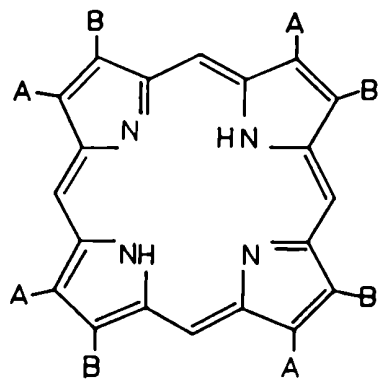
III



I



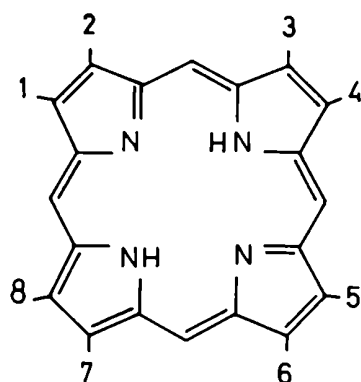
II



IV

**Figura I.2.:** Representación esquemática de los isómeros de las uro, copro y etioporfirinas.  
 Etioporfirina= A:  $-\text{CH}_3$ ; B:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$   
 Coproporfirina= A:  $-\text{CH}_3$ ; B:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$   
 Uroporfirina= A:  $-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ; B:  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$

Tabla I.1.: Nombres y estructuras de las porfirinas



PORFIRINAS	SUSTITUYENTES EN POSICION							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Etioporfirina I	M	E	M	E	M	E	M	E
Deuteroporfirina IX	M	H	M	H	M	P	P	M
Mesoporfirina IX	M	E	M	E	M	P	P	M
Hematoporfirina IX	M	B	M	B	M	P	P	M
Protoporfirina IX	M	V	M	V	M	P	P	M
Coproporfirina III	M	P	M	P	M	P	P	M
Uroporfirina III	A	P	A	P	A	P	P	A
Clorocruoroporfirina	M	F	M	V	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX- 2,4-ácido diacrílico	M	Acr	M	Acr	M	P	P	M
Deuteroporfirina IX- 2,4-ácido disulfónico	M	SO <sub>3</sub> H	M	SO <sub>3</sub> H	M	P	P	M
4-Formildeuteroporfirina IX	M	H	M	F	M	P	P	M
2,4-Diformildeuteroporfirina IX	M	F	M	F	M	P	P	M
4-Acetildeuteroporfirina IX	M	H	M	Ac	M	P	P	M
2,4-Diacetildeuteroporfirina IX	M	Ac	M	Ac	M	P	P	M
Pirroporfirina XV	M	E	M	E	M	H	P	M
Rodoporfirina XV	M	E	M	E	M	COOH	P	M
Acetil-("oxo")rodoporfirina XV	M	Ac	M	E	M	COOH	P	M

A: -CH<sub>2</sub>COOH, Ac: -COCH<sub>3</sub>, Acr: -CH=CHCOOH, B: -CHOHCH<sub>3</sub>,  
E: -CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, F: -CHO, M: -CH<sub>3</sub>, P: -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH

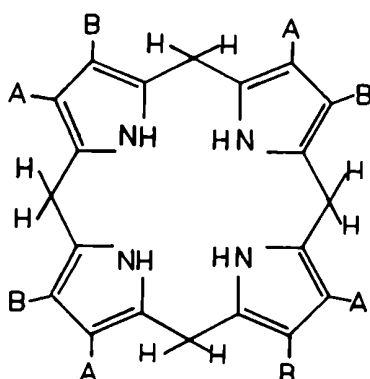


FIGURA I.3.: Representación esquemática de la estructura de un porfirinógeno

#### I.2.2.2. Tetrahidroporfirinas

Existen evidencias que indican que una tetrahidroporfirina denominada porfometeno (Figura I.4.) la cual absorbe a 500  $m\mu$ , sería un intermediario en la oxidación biológica de porfirinógenos a porfirinas (Bogorad, 1955, 1958; Granick, 1955a y b; Mauzerall y Granick, 1958), pero no del camino biosintético principal (Mauzerall y Granick, 1958).

Este compuesto se encuentra presente durante la autooxidación, fotooxidación y oxidación mediada por  $I_2$  del uroporfirinógeno y a diferencia de las porfirinas, puede reducirse a un compuesto menos coloreado por acción del ditionito. Se lo ha obtenido además por fotorreducción de porfirinas (Mauzerall, 1960, 1962).

Se ha logrado reducir específicamente uro y coproporfirina a los tetrahidroderivados correspondientes por iluminación en condiciones anaeróbicas y en presencia de reactivos tales como ácido etilendiaminotetraacético a  $pH < 8$  (pero no a  $pH = 0$  o  $pH > 8$ ),  $N,N,N',N'$ -tetrametiletildiamina a  $pH = 6$ , ácido  $\delta$ -amino levúlico a  $pH > 7$  y otros, recuperándose las porfirinas con alto rendimiento, en una oxidación posterior.

Mauzerall (1962) observó también que en oscuridad, los cloruros de titanio y cromo en medio ácido, reducen específicamente las porfirinas a sus tetrahidroderivados.

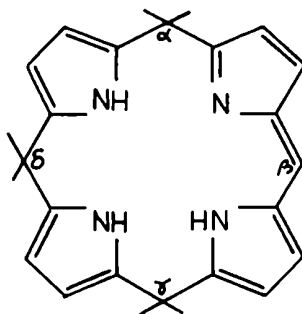


FIGURA I.4.: Tetrahidroporfina (porfometeno).

#### I.2.2.3. Dihidroporfirinas (florinas)

Mauzerall (1962) halló otro intermediario en la reacción de reducción de uroporfirina; el compuesto presentaba un máximo de absorción a 440m $\mu$  con un pico menor y más ancho a 737m $\mu$  y se le asignó la estructura que se muestra en la Figura I.5. Esta dihidroporfirina se obtuvo sometiendo una solución acuosa de uroporfirina a una corta exposición de luz blanca intensa, en presencia de EDTA 0,1M a pH=6; en estas condiciones las preparaciones se encontraban considerablemente contaminadas con un tetrahidrointermediario.

Mauzerall observó que los análogos de la florina provenientes de la reducción de coproporfirina absorbían con máximos a 436 y 772m $\mu$ . Orlando (1958), estudiando la incorporación no enzimática de hierro en coproporfirina y sus productos de reducción, encontró que la forma activa en la incorporación era una porfirina parcialmente reducida, no fluorescente. Las propiedades espectroscópicas descritas por Orlando son concordantes con el espectro de la coproflorina de Mauzerall y este ha-

llazgo resulta importante ya que los compuestos sintetizados por Orlando aparentemente estaban libres de otros productos de reducción.

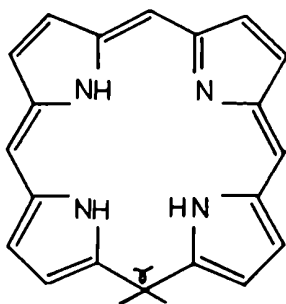


FIGURA 1.5.: Dihidroporfirina (florina)

Durante la síntesis de clorofila a, Woodward (1961) obtuvo en forma cristalina la sal de una florina conteniendo cadenas laterales metilo, etilo, ácido propiónico, carbometoxi y  $\beta$ -aminoetilo. Observó que en solventes neutros las florinas dan soluciones de color azul brillante mientras que sus sales dan soluciones verdes. Las sales son estables en ácido sulfúrico concentrado y frente al calentamiento en solventes neutros o ácidos; sin embargo, se oxidan fácilmente a porfirinas.

Mauzerall y Granick (1958) y Woodward (1961) han sugerido otras estructuras posibles para los intermediarios en la reacción de reducción de porfirinas.

### 1.2.3. Porfirinas sintéticas y compuestos macrocíclicos análogos

La  $\alpha, \beta, \gamma, \delta$  tetrafenilporfina y la tetrabenzoporfina (Figuras 1.6. y 1.7.) son compuestos sintéticos que contienen el núcleo porfina. En la ftalocianina (Figura 1.8.) los carbonos de los puentes meténicos de la tetrabenzoporfina están reemplazados por átomos de nitrógeno; este compuesto puede considerarse como un derivado de la tetraazoporfina.



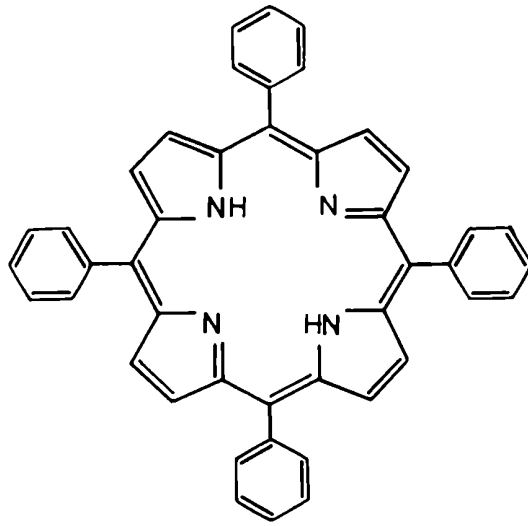


Figura 1.6.:  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -Tetrafenilporfina.

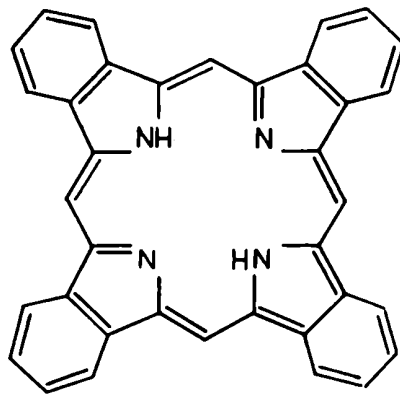


Figura 1.7.: Tetrabenzoporfina

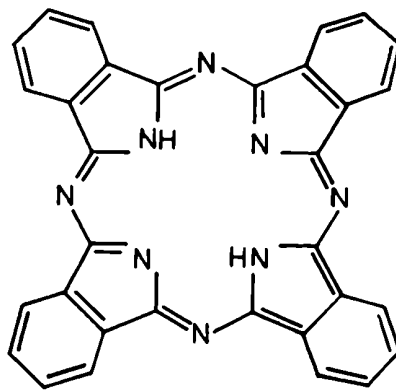


Figura 1.8.: Ftalocianina

La vitamina B12 (Figura I.9.) posee un núcleo tetrapirrólico poco común en el cual dos de los anillos pirrólicos están unidos en forma directa. La naturaleza y posiciones relativas de las cadenas laterales de este núcleo son similares a las correspondientes a la uroporfirina III (Tabla I.1.) incluyéndose así en el modelo de cadenas laterales de todos los pigmentos tetrapirrólicos metabólicamente importantes. No obstante, los grupos metilo adicionales son exclusivos de la vitamina B12 y compuestos relacionados. La ruta biosintética de esta vitamina ha sido elucidada (Corcoran y Shemin, 1957; Schwartz y col., 1959) y cabe mencionar que posee algunos pasos en común con la de las porfirinas.

La prodigiosina (Figura I.10.) de *Serratia marcescens* (o *Bacillus prodigiosus*) es otro pigmento pirrólico natural que presenta dos anillos unidos en forma directa. Aparentemente, este compuesto no cumple ninguna función biológica y su camino biosintético es bastante diferente del correspondiente a las porfirinas (Bray y Shemin, 1963; Marks y col., 1959 y Shrimpton y col., 1963) a pesar de que sus precursores originales son glicina y acetato (Hubbard y Rimington, 1950).

Los pigmentos biliares son tetrapirroles de cadena abierta, altamente coloreados, que se producen en la naturaleza por degradación de la hemoglobina o bien constituyen los grupos prostéticos de las ficobilinas en las algas rojas y azul verdosas.

El primer paso en el proceso degradativo del hemo es la oxidación del carbono del puente meténico  $\alpha$  por acción de una  $\alpha$ -metenil oxidasa, con liberación de monóxido de carbono. El producto de esta oxidación se convierte rápidamente en el tetrapirrol de cadena abierta, conocido como biliverdina IX $\alpha$  (Figura I.11A) que luego sufre una reducción enzimática a bilirrubina IX  $\alpha$  (Figura I.11B). La bilirrubina es transportada al hígado donde se convierte en un diglucurónido soluble en agua y luego se excreta en el duodeno por la bilis.

Las ficobilinas de las algas rojas y azul verdosas son en realidad cromoproteínas solubles en agua. Hay dos tipos de ficobilinas, la ficocianina (azul) y la ficoeritrina (roja), para las cuales se han sugerido las estructuras que se ilustran en la Figura I.12A y B.

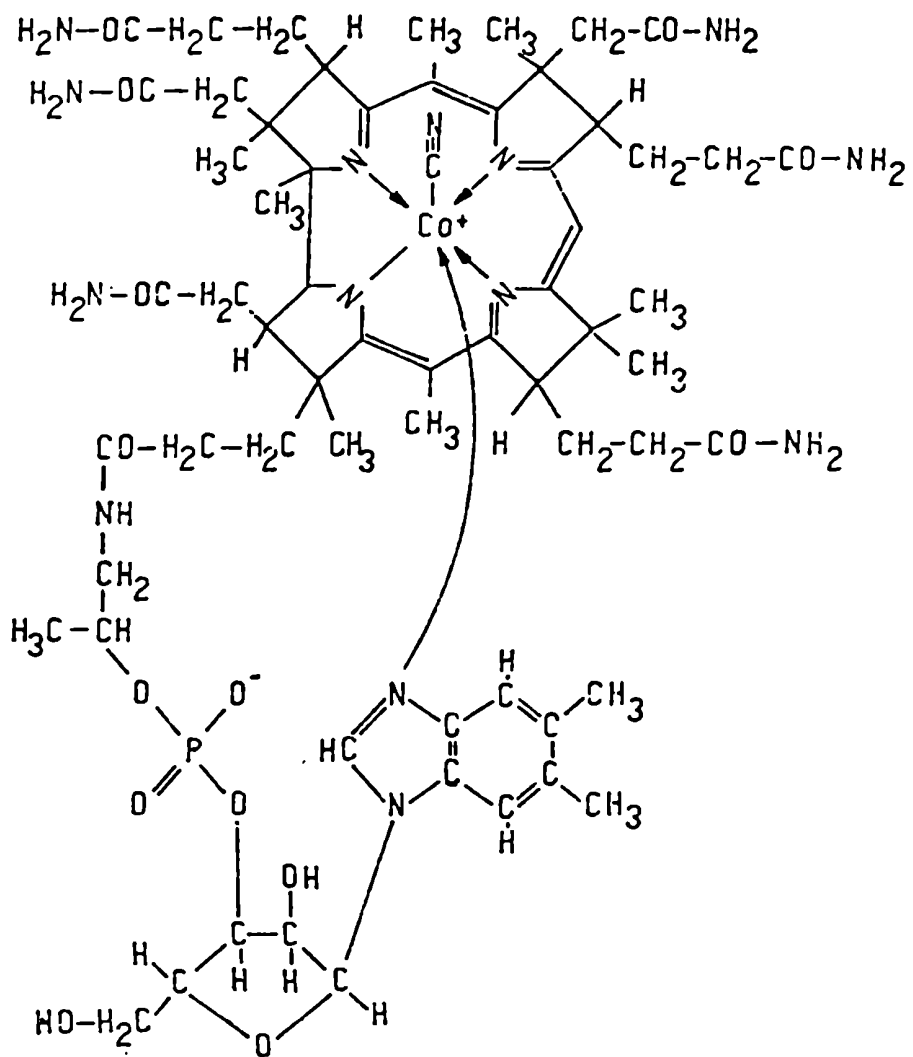


Figura I.9.: Cianocobalamina

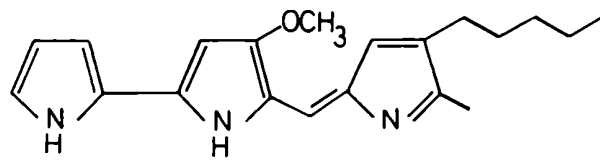


Figura I.10.: Prodigiosina

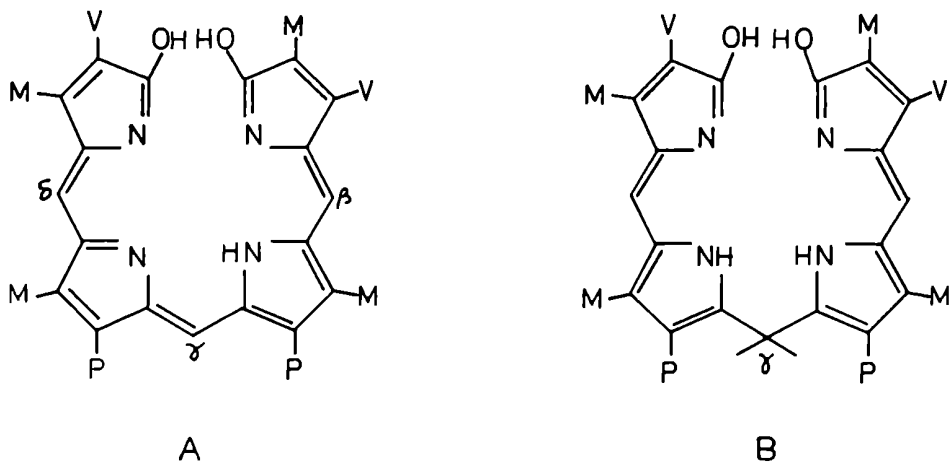


Figura I.11.: A: Biliverdina; B: Bilirrubina.

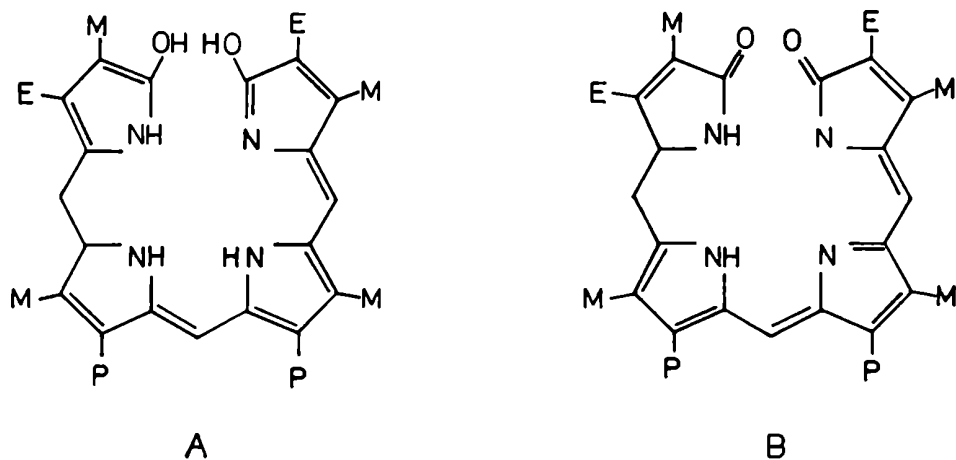


FIGURA I.12.: Estructuras probables de la ficocianobilina (cromóforo de la ficocianina)(A) y de la ficoeritrobilina (cromóforo de la ficoeritrina)(B).

#### I.2.4. Metaloporfirinas

Las porfirinas cumplen sus actividades biológicas más importantes actuando en forma de complejos metálicos tales como los de Fe, Mg y Co en hemoproteínas, clorofilas y vitamina B12 respectivamente. Se han estudiado exhaustivamente los complejos que muchos metales forman con distintas porfirinas con el fin de conocer la actividad biológica de los compuestos naturales (Williams, 1953, 1956; Falk y Nyholm, 1958, Mason, 1958; Phillips, 1960, 1963; Falk y Perrin, 1961; Lowe y Phillips, 1962; Falk y Phillips, 1964).

El núcleo porfirínico es un ligando tetradentado en el cual el espacio disponible para la coordinación de un metal tiene un diámetro máximo de aproximadamente 3,7Å. Por lo general el ión metálico se coordina con los pares de electrones de los nitrógenos pirrolenínicos de los anillos B y D de la porfina reemplazando además a los dos átomos de hidrógeno de los nitrógenos de los pirroles (los de los anillos A y C de la porfina). Así, el ión metálico M ocupa el centro de la cavidad del anillo (Figura I.13.). La formación de la metaloporfirina ocu-

re entonces por combinación de un anión dinegativo de porfina con un metal dipositivo y el complejo adopta una geometría plana cuadrada o tetragonal.

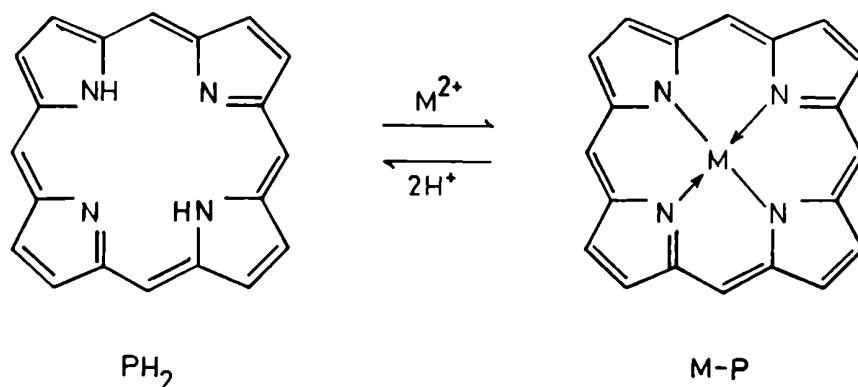


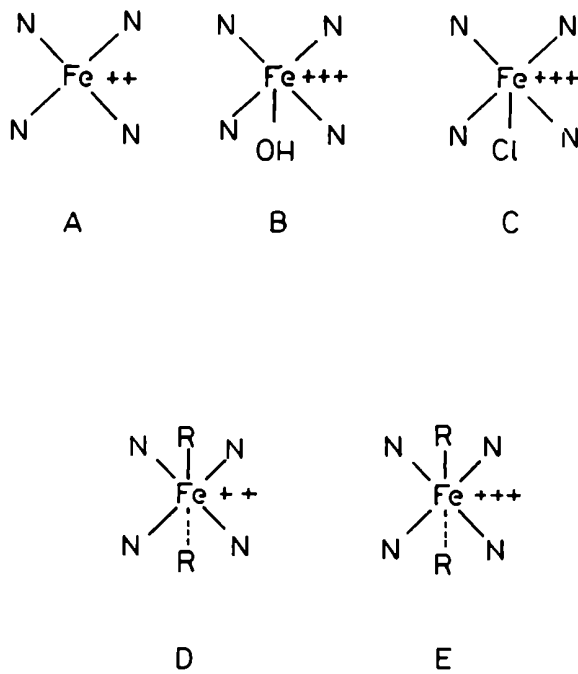
FIGURA I.13.: Formación de una metaloporfirina (M-P) a partir de la porfina ( $\text{PH}_2$ ) y un metal dipositivo ( $\text{M}^{2+}$ ).

El proceso de coordinación del metal es reversible lográndose la desmetalización bajo determinadas condiciones en medio ácido. El anión (porfina)<sup>=</sup> es un ligando quelante dinegativo tetradentado macrocíclico, cerrado y rígido y las cargas se distribuyen igualmente en el interior del anillo. No obstante este tipo de geometría se obtiene sólo con pocos metales (Ni, Pd y Pt) en tanto que aquellos de importancia biológica como Fe, Mg y Co poseen números de coordinación 5 ó 6 y dan lugar a geometrías más complejas. Cuando los iones metálicos unidos a porfirinas se oxidan al estado trivalente ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ ,  $\text{Mn}^{\text{III}}$  y  $\text{Co}^{\text{III}}$ ) se obtienen complejos con una carga positiva que pueden asociarse con aniones; tal es el caso de la hematina y la hemina que involucran en su estructura iones hidroxilo y cloruro, como veremos más adelante.

Se conoce además la existencia de complejos con cationes monovalentes como por ejemplo  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Li}^+$ . En estos casos uno de los cationes se sitúa ligeramente por arriba y el otro por debajo del plano del núcleo.

### I.2.4.1. Hierroporfirinas

Los complejos de los tetrapirroles con el hierro se denominan genéricamente hemos o hierroporfirinas. El más conocido es el protohemo o hierroprotoporfirina en el cual el metal puede encontrarse en forma reducida como en el hemo o ferroprotoporfirina o al estado oxidado como en la hemina o la hematina o ferriprotoporfirina (Figura I.14.).



R : O<sub>2</sub> , CO , CN<sup>-</sup> , NH<sub>4</sub><sup>+</sup> , etc.

Figura I.14.: Representación esquemática de Hemo (A); Hematina (B); Hemina (C); Hemocromo (D) y Hemicromo (E).

El hemo, que constituye el grupo prostético de la hemoglobina, se oxida fácilmente en contacto con el aire a hematina o a hemina si en el medio hay presentes iones cloruro. Este cloro derivado, muy estable, es la forma usual bajo la cual se aísla el grupo prostético de la hemoglobina, método frecuentemente empleado en los estudios bioquímicos.

El hemo posee una estructura en la cual los cuatro anillos pirrólicos y el Fe están ubicados en un plano, pero el metal posee aún capacidad para unirse por medio de enlaces coordinados con dos moléculas que se ubican abajo y arriba del plano que contiene al anillo porfirínico; estos derivados se conocen como hemocromos o hemocromógenos. Entre los compuestos que pueden formarlos encontramos al peróxido de hidrógeno, oxígeno, monóxido de carbono, iones cianuro y una gran variedad de bases nitrogenadas como la piridina y el amonio.

La hematina también origina complejos similares conocidos como hemicromos o hemicromógenos.

#### I.2.4.2. Hemoproteínas

El término hemoproteína se emplea para denominar aquellas proteínas cuyo grupo prostético es una hierroporfirina. El protohemo o sus derivados muy relacionados actúan como grupo prostético de la hemoglobina, mioglobina, citocromos, catalasa, algunas peroxidasa y triptofano pirrolasa. En muchas hemoproteínas, el hemo se une a la proteína específica por coordinación entre el átomo de hierro y átomos de nitrógeno de las cadenas laterales básicas de la proteína. Estas uniones se rompen por ejemplo, por tratamiento de la hemoproteína con acetona a pH 2. También pueden existir uniones covalentes adicionales entre las cadenas laterales de la porfirina y los residuos aminoacídicos, como en el citocromo c; en este caso se requieren tratamientos más drásticos para separar la mitad hémica de la hemoproteína (Marks, 1969).

#### I.2.4.21. Hemoglobina y mioglobina

La hemoglobina es un componente de los glóbulos rojos, responsable del transporte de gases ( $O_2$ ,  $CO_2$ ) en la sangre.



La molécula de hemoglobina está constituida por 4 subunidades (dos cadenas  $\alpha$  y dos cadenas  $\beta$ ), cada una de las cuales lleva un hemo en una cavidad hidrofóbica de la globina, quedando los restos ácido propiónico expuestos al medio circundante. Cada uno de los 4 átomos de hierro de la hemoglobina puede tomar un mol de oxígeno formando así la oxihemoglobina. La unión al oxígeno está modulada por las interacciones cooperativas de las cuatro subunidades, o sea, la conocida interacción hemo-hemo. Tanto en la hemoglobina como en la oxihemoglobina el hierro se encuentra al estado ferroso.

La mioglobina es una hemoproteína semejante a la hemoglobina en cuanto a su capacidad para unirse reversiblemente al oxígeno; contribuye a la difusión del mismo en los tejidos así como a su almacenamiento en el músculo.

La estructura de la mioglobina es más simple que la de la hemoglobina; consta de una sola cadena proteica unida a un hemo. Como era de esperar, la unión del oxígeno no presenta ningún efecto cooperativo. En este caso el hemo también está ubicado en una cavidad hidrofóbica, en una región rica en aminoácidos aromáticos, rodeado por sus cadenas laterales hidrofóbicas. Los grupos propiónico polares se encuentran en la parte externa de la cadena, mientras que los grupos vinilo están sumergidos en la región interna no polar de la molécula (Marks, 1969).

#### I.2.4.22. Citocromos

Los citocromos se definen como hemoproteínas cuya principal función biológica consiste en el transporte de electrones y/o hidrógenos, en virtud de un cambio reversible de valencia de su hierro hémico (Keilin, 1930).

Los citocromos se clasifican en a, b, c y d de acuerdo con la naturaleza y modo de unión de sus mitades hémicas a la proteína y se identifican individualmente con subíndices luego de la letra de clase, por ejemplo "citocromo  $b_2$ ".

Citocromo a: el grupo prostético hemo contiene una cadena lateral formilo.

Citocromo b: contienen protohemo como grupo prostético.

Citocromo c: son citocromos con uniones covalentes entre las cadenas laterales del hemo y la proteína.

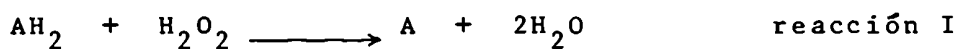
Citocromo d: el grupo prostético es una hierro-dihidroporfirina.

Algunos citocromos se encuentran en la membrana mitocondrial interna, donde actúan secuencialmente transportando los electrones originados en varios sistemas de deshidrogenasas, hasta el oxígeno molecular. Otros, se hallan localizados en el retículo endoplasmático donde desempeñan funciones en las reacciones de hidroxilación especializadas.

Si bien en un principio se creía que los citocromos estaban asociados solamente con el transporte de electrones al oxígeno, se demostró posteriormente la existencia de citocromos funcionalmente activos en algunas bacterias estrictamente anaeróbicas. Así, en la bacteria anaeróbica obligada *Desulfovibrio desulfuricans* hay evidencias de que los citocromos están involucrados en el transporte de electrones para la reducción del sulfato (aceptor terminal) a sulfuro (Postgate, 1959). También se ha encontrado que los citocromos participan en el transporte de electrones en organismos que usan nitrato como aceptor final de los mismos (Newton y Kamen, 1961). Se ha demostrado además la presencia de citocromos en cloroplastos de hojas (Lascelles, 1964) y en cromatóforos de bacterias fotosintéticas (Vernon y Kamen, 1954), donde se piensa que están vinculados al transporte de electrones asociado con la fotosíntesis (Rabinowitch y Govindjee, 1965).

#### I.2.4.23. Otras hemoproteínas

Existen en el metabolismo numerosas hemoproteínas que cumplen importantes funciones redox y cuya química y estructura son aún desconocidas. Entre ellas podemos mencionar a las peroxidases que catalizan la oxidación de distintos compuestos orgánicos por peróxido de hidrógeno (reacción I):

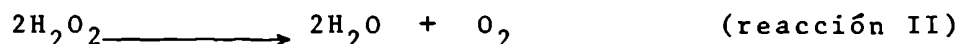


donde el dador de hidrógenos ( $\text{AH}_2$ ) puede ser un fenol, una amina primaria, secundaria o terciaria, ácido ascórbico o un indol. Además ciertos iones inorgánicos, particularmente el yoduro,

son oxidados por peroxidasas.

La peroxidasa más conocida es la del rábano silvestre (o rústicano) cuyo hemo puede separarse de la apoproteína y volver a combinarse con ella. El hemo reacciona con gases y aniones para originar distintos ligandos. La cloroperoxidasa es una glicohemoproteína aislada del hongo *Caldariomyces fumago*; oxida cloruros, yoduros y bromuros, catalizando así reacciones de halogenación. La lactoperoxidasa fue aislada de la leche de vaca y parece estar involucrada en la yodación de la tirosina. La mieloperoxidasa se aisló de leucocitos de sangre y de células de médula ósea de cobayo; en este caso el hemo parece estar unido a la proteína por una unión amida.

Las catalasas descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de acuerdo con la siguiente reacción:



A diferencia de las peroxidasas son altamente específicas y emplean al peróxido de hidrógeno como oxidante y reductor. La función fisiológica de la catalasa está aún en discusión; algunos autores opinan que cumple una acción protectora, destruyendo el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que es tóxica para los organismos vivos (Lemberg y Legge, 1949) mientras que otros consideran su función como peroxidativa (Keilin y Hartree, 1945).

#### I.2.4.3. Clorofilas y Bacterioclorofilas

Las clorofilas son tetrapirroles derivados de la clorina que difieren estructuralmente del hemo en cuatro aspectos importantes:

- i) son complejos de magnesio;
- ii) el anillo D, en las clorofilas de las plantas y los anillos B y D en la clorofila de las bacterias, se encuentran al estado reducido;
- iii) tienen un anillo adicional (E) de ciclopentanona, formado por ciclización de la cadena lateral de ácido propiónico sobre el carbono 6, con el carbono del puente meténico  $\gamma$ ;

iv) la cadena lateral propiónica sobre el carbono 7 del anillo D, está esterificada con un alcohol isoprenoide de cadena larga, que generalmente es el fitol.

En las plantas superiores y en las algas verdes, organismos fotosintéticos que generan oxígeno, existen dos tipos de clorofilas, clorofila a y clorofila b (Figura I.15.), cada una de las cuales cumple un papel específico en el mecanismo fotosintético.

La clorofila a pura disuelta en acetona, presenta máximos de absorción a 663 y 420nm. Sin embargo, en células enteras muestra diferentes picos de absorción: 660, 670, 680, 685, 690, 700 y 720nm. Estos no se deben a la existencia de distintas moléculas de clorofila a, sino que reflejan diferentes estados de agregación con proteínas específicas.

Las células fotosintéticas productoras de oxígeno contienen dos clases de clorofilas; una de ellas es siempre la clorofila a. Mientras que en las plantas verdes, el segundo tipo es la clorofila b, en las algas pardas, diatomeas y dinoflagelados, es la clorofila c y en las algas rojas es la clorofila d. Las algas azul-verdes sólo contienen clorofila a.

Las células fotosintéticas procariotas no productoras de oxígeno, no poseen clorofila a; contienen bacterioclorofila a o bacterioclorofila b. La bacterioclorofila a (Bcl a) difiere de la clorofila a de las plantas superiores en la presencia de un grupo acetilo en el anillo A (Figura I.15.).

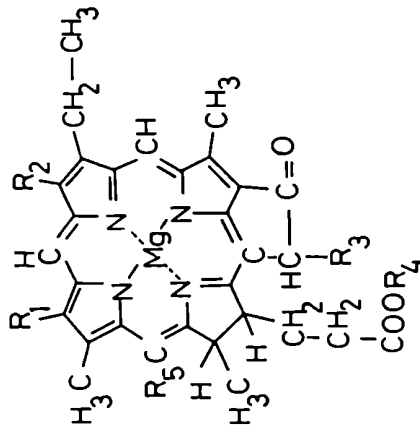
La Bcl a, pigmento característico de las bacterias púrpuras, se encuentra también presente, en pequeñas cantidades, en las bacterias verdes sulfúreas (Jensen y col., 1964).

La Bcl b reemplaza a la Bcl a en sólo dos especies de *Rhodospseudomonas* (*Rp. viridis* y *Rp. sulfoviridis*) y en una especie de la familia Chromatiaceae (*Thiocapsa pfennigii*).

Las especies verdes de la familia Chlorobiaceae contienen Bcl c y d mientras que las marrones poseen Bcl e (Figura I.15.).

Además de los distintos tipos de clorofilas y bacterioclorofilas que se encuentran en la naturaleza existen también derivados de las mismas. La nomenclatura empleada para designar a los derivados de las clorofilas tiene en cuenta la presencia o ausencia del magnesio y del grupo fitol (Tabla I.2.).

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	3,4	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Clorofila a	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH <sub>3</sub>		-COOCH <sub>3</sub>	Fitilo	-H
Clorofila b	-CH=CH <sub>2</sub>	-CHO		-COOCH <sub>3</sub>	Fitilo	-H
Bacterioclorofila a	-CO-CH <sub>3</sub>	-CH dihidro		-COOCH <sub>3</sub>	Fitilo	-H
Bacterioclorofila b			Estructura desconocida			
Bacterioclorofila c	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		-H	Farnesilo	-CH <sub>3</sub>
Bacterioclorofila d	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub>		-H	Farnesilo	-CH <sub>3</sub>
Bacterioclorofila e	-CHOH-CH <sub>3</sub>	-CHO		-H	Farnesilo	-CH <sub>3</sub>



**Figura I.15.:** (adaptado de Pfennig, 1967). Hay otros sustituyentes posibles para las posiciones 4 y 5 y  $\delta$ -meso de la Bcl c (Purdie y Holt, 1965; Holt y col., 1966), 4 y 5 de la Bcl d (Holt, 1965; Purdie y Holt, 1965) y 4 de la Bcl e (Brockman, 1976).

Tabla I.2.: Derivados de la cloro  
fila a

NOMBRE	MAGNESIO	FITOL
Clorofila a	+	+
Clorofilida a	+	-
Feofitina a	-	+
Feoforbida a		-

#### I.2.4.4. Vitamina B12

La vitamina B12 (Figura I.9.) conocida también como cianocobalamina posee dos componentes característicos. El mayor es el sistema de anillos de la corrina que es similar al sistema porfirina de la hemoglobina dado que contiene cuatro anillos pirrólicos; sin embargo, en este caso, dos de esos anillos (A y D) se hallan unidos en forma directa a través de sus posiciones  $\alpha$ , estando ausente entonces el puente meténico  $\gamma$ . Coordinado con los cuatro átomos de nitrógeno internos del sistema anular de la corrina hay un átomo de cobalto que es conocido desde hace tiempo por su importancia esencial en el crecimiento. El segundo componente principal de la vitamina B12 es un ribonucleótido, el cual es excepcional por su contenido como base del 5,6-dimetilbencimidazol, unido por un enlace  $\alpha$ -N-glucosídico con la D-ribosa en lugar del enlace  $\beta$  presente en la mayor parte de los demás nucleótidos. El ribonucleótido se halla unido a la corrina por un enlace de coordinación entre el átomo de nitrógeno del nucleótido y el átomo de cobalto y por un enlace éster entre el grupo 3'-fosfato del ribonucleótido y una cadena lateral del anillo corrina. El cianuro ocupa una de las posiciones de coordinación del átomo de Co; de ahí el nombre de cianocobalamina. Sin embargo, es interesante señalar que el cianuro está presente como artefacto de aislamiento; se conocen complejos semejantes con los iones nitrito, sulfito e hidroxilo. En la coenzima-B12 el cianuro está sustituido por el grupo 5-desoxiadenosilo (Figura I.9.).

La vitamina B12 es esencial para la maduración normal y el desarrollo de los eritrocitos. Su carencia en la dieta, así como la incapacidad para absorberla de los alimentos ingeridos, producen trastornos tales como la anemia perniciosa. La coenzima-B12 es necesaria para la actividad de diversas enzimas.

En algunas reacciones enzimáticas, la vitamina B12 funciona como coenzima con la sexta posición de coordinación del átomo de Co ocupada por un grupo metilo en lugar del grupo 5'-adenosilo; el compuesto resultante es la metilcobalamina. En estas reacciones, la metilcobalamina funciona como un transportador de un grupo metilo procedente del N<sup>5</sup>-metiltetrahidrofolato a ciertas moléculas de aceptor, particularmente la homocisteína, que se metila para transformarse en metionina.

Los anillos pirrólicos de la corrina derivan de los mismos precursores que las porfirinas, separándose los caminos a nivel del uroporfirinógeno III.

Las diferencias existentes entre las corrinas y la uroporfirina III son las siguientes:

i) La primera se halla más reducida que las porfirinas y contiene anillos pirrolina y pirrolidina, más que anillos pirrólicos.

ii) La unión entre los anillos A y D se hace por medio de una unión covalente directa y no por un puente meteno, y en este lugar hay un grupo metilo adicional.

iii) La cadena lateral de ácido acético en posición 5 de la uroporfirina III está reemplazada por un grupo metilo y el resto de los grupos acético y propiónico están convertidos en sustituyentes acetamida y propionamida.

### I.3. Propiedades de los tetrapirroles

#### I.3.1. Propiedades físicas

##### I.3.1.1. Solubilidad

La estructura relativamente grande, planar y aromática del núcleo tetrapirrólico le confiere a estos compuestos propiedades predominantemente hidrofóbicas. Sin embargo, esta característica está modificada por la presencia de sustituyentes laterales alifáticos, portadores de grupos hidrofílicos, alcohólicos y carboxílicos. Debido a ello estas sustancias son solu-

bles en medios acuosos ácidos y básicos.

La solubilidad de los tetrapirroles en ácidos y álcalis diluïdos depende del número de sustituyentes ácido carboxílico libres; así, la uroporfirina que posee 8 restos carboxilo es la más soluble en tanto que la protoporfirina, con 2 restos carboxilo, es la menos soluble.

Los solventes orgánicos más comunmente empleados para la extracción de tetrapirroles son éter y dioxano, aunque las clorofilas, en virtud de la presencia de un grupo fitol de cadena larga, son solubles además en éter de petróleo.

Tanto las porfirinas como sus complejos metálicos son fácilmente solubles en solventes orgánicos acidificados, como ser: acetona-HCl; éter-HCl; acetato de etilo-HCl; etc. En la práctica, las porfirinas libres se extraen utilizando el método de partición entre éter y HCl, procedimiento empleado para la separación, identificación y determinación cuantitativa de los distintos tetrapirroles y derivados. Básicamente el procedimiento consiste en ir extrayendo sucesiva y selectivamente las distintas porfirinas presentes en la fase etérea, con soluciones acuosas de HCl de concentraciones crecientes. Este método fue desarrollado originalmente por Willstätter y Mieggen en 1913, quienes definieron el "número de HCl", constante física característica para cada porfirina, como el porcentaje de HCl capaz de extraer las 2/3 partes de una dada porfirina de una capa de éter saturada de agua, a un volumen igual de capa ácido-acuosa.

#### 1.3.1.2. Espectros de absorción

Los espectros de absorción de las porfirinas, metaloporfirinas y sus derivados son de fundamental importancia para su identificación y cuantificación.

La presencia de un sistema conjugado de dobles ligaduras en el núcleo de las porfirinas, es el cromóforo responsable de la existencia de fuertes bandas características de absorción en las regiones visible y ultravioleta cercano del espectro. Los factores que aumentan la densidad de electrones  $\pi$  en la periferia del núcleo porfirínico, producen un desplazamiento de las bandas de absorción de porfirinas, metaloporfirinas y derivados, hacia longitudes de onda mayores; lo mismo ocurre con



las bandas de emisión de fluorescencia, si éstas están presentes. Este tipo de desplazamientos se observan a medida que se incrementa la atracción de electrones por parte de las cadenas laterales (o sea, cuando disminuye la basicidad de la porfirina) y cuando la estabilidad de la porfirina quelada con diferentes iones metálicos decae (o sea, cuando disminuye la componente covalente de la unión).

Todas las porfirinas exhiben un máximo de absorción en la región entre los 350 y 450nm, conocida como la banda de Soret, que es la que se emplea generalmente para la cuantificación de estos pigmentos. El número y patrón de bandas que se pueda observar en la zona del visible, varía con el tipo de tetrapirroles, con el solvente y con el pH, pero es absolutamente característico para cada uno de ellos, en un solvente y pH dados.

Las porfirinas en solventes orgánicos o en soluciones alcalinas débiles presentan un espectro típico de 4 bandas en la región visible, además de la banda de Soret (Figura I.16). En estas condiciones las soluciones de porfirinas exhiben un hermoso color rojo o rojo amarronado, según la concentración. Las cadenas laterales sustituyentes en los anillos pirrólicos no influyen en el patrón ni en la intensidad relativa de las bandas, pero modifican la posición y la intensidad absoluta; en consecuencia, constituyen un buen criterio para la identificación de la porfirinas.

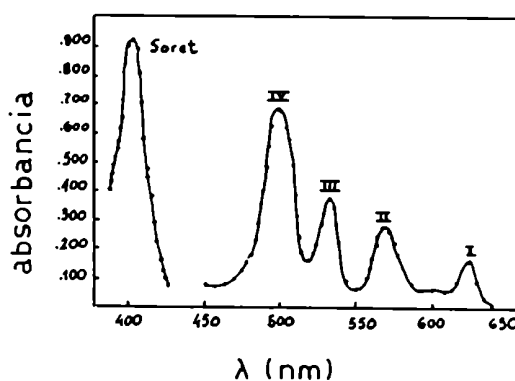


Figura I.16.: Espectro de absorción en cloroformo del éster metálico de una porfirina.

En soluciones ácidas, las porfirinas muestran un color rojo púrpura y el espectro de 4 bandas es reemplazado por uno de 2 bandas, mucho más agudas, intensas y bien definidas, con una tercera banda débil, situada entre ambas (Figura I.17.). La banda de Soret también es más intensa.

Los complejos de las porfirinas con metales divalentes exhiben un espectro visible constituido por dos bandas  $\alpha$  y  $\beta$ , además de la de Soret, con un máximo muy agudo entre 550 y 560 nm (banda  $\alpha$ ) (Figura I.18.).

Los tetrapirroles de cadena abierta presentan espectros variables y característicos en la región del visible, con una absorción máxima entre 400 y 650 nm, según el compuesto. La gran diferencia con los ciclotetrapirroles, es que no poseen la banda de Soret.

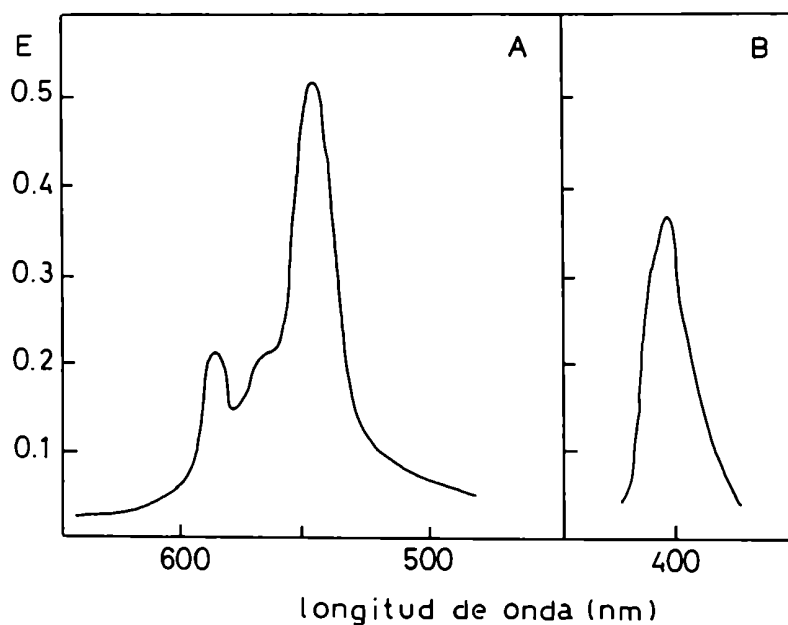
Las porfirinas constituyentes de las clorofilas se caracterizan por poseer un espectro de absorción típico a mayores longitudes de onda, siendo la más intensa la banda alrededor de los 660 nm para los dihidro-sistemas. Para el caso de la estructura tetrahidro de la bacterioclorofila, la banda  $\alpha$  se encuentra desplazada hacia los 770 nm, en solventes orgánicos.

El espectro de absorción permite, entonces, caracterizar y dosar las distintas porfirinas pero no diferenciar los isómeros. Tanto en el visible como en el ultravioleta cercano, los espectros de absorción de los isómeros son similares en un determinado solvente (Schwartz y col., 1960).

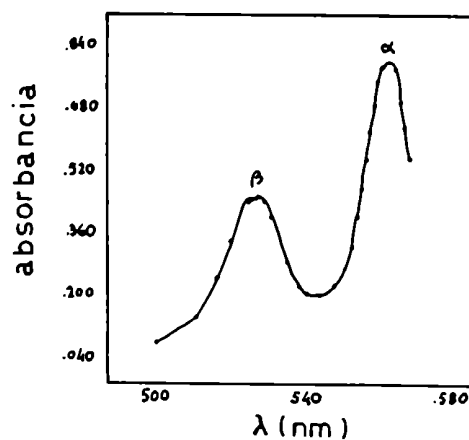
#### I.3.1.3. Fluorescencia

Una propiedad característica de las porfirinas libres y sus ésteres es la intensa fluorescencia roja que emiten cuando se las expone a radiación ultravioleta de longitud de onda de alrededor de 400 nm. Esta propiedad permite detectar porfirinas en concentraciones del orden de  $10^{-10}$  M; así, los métodos fluorimétricos son hoy los más frecuentemente empleados para la cuantificación de porfirinas siendo además los más sensibles.

La intensidad de la fluorescencia depende del solvente y del pH, es mínima en el punto isoeléctrico y máxima en ácidos minerales, como el HCl a pH 1,0. Las porfirinas no fluorescen cuando se las dispersa coloidalmente en un medio acuoso y generalmente tampoco lo hacen cuando se hallan en estado sólido.



**Figura I.17.:** Espectro de absorción de una solución de coproporfirina III libre en HCl 0,15 M. En la región visible (A), la concentración fue de 30  $\mu\text{M}$ , mientras que para la zona de Soret (B) se usó una concentración de 1,8  $\mu\text{M}$ .



**Figura I.18.:** Espectro de absorción del complejo metálico ( $\text{Cu}^{++}$ ) de una porfirina.

No obstante, puede observarse fluorescencia cuando las porfirinas son adsorbidas sobre talco, alúmina o celulosa, o cuando se encuentran en los huesos y células de la médula ósea de sujetos porfíricos y en cortes de nódulos de raíces de leguminosas.

Los complejos de Zn de los pigmentos biliares fluorescen, siendo el color mucho más anaranjado que el correspondiente a las porfirinas. Los pigmentos biliares libres no fluorescen pero se ha encontrado que sí lo hacen las cromoproteínas, ficocianinas y ficoeritrinas de las algas en las cuales los grupos prostéticos de los pigmentos biliares están unidos covalentemente a la proteína.

Las metaloporfirinas, salvo pocas excepciones, no fluorescen o lo hacen con intensidades mucho menores que las porfirinas libres. Así, las Fe y Cu-porfirinas no fluorescen mientras que las Zn-porfirinas fluorescen con coloración amarillo-anaranjada (Schwartz y col., 1960).

Los porfirinógenos, derivados reducidos de las porfirinas, son incoloros y no fluorescen.

### I.3.2. Propiedades químicas

La presencia de un sistema altamente conjugado en el anillo tetrapirrólico, da lugar a la existencia de varias formas de resonancia. Este anillo posee 22 electrones  $\pi$ , pero sólo 18 de ellos quedan incluidos en la delocalización, según el principio de aromaticidad de Hückel ( $4n + 2$ ). Los estudios efectuados con rayos X demostraron la planaridad del núcleo, requisito indispensable para el carácter aromático. Las mediciones por resonancia magnética nuclear indicaron que los protones de los grupos NH penden sobre una cavidad a través de la cual circula un poderoso campo magnético el cual es inducido por la corriente de electrones  $\gamma$  que fluye por el macrociclo. Por otra parte, se encontró que el ión molecular es muy estable frente a la fragmentación en los espectros de masa de las porfirinas y sus derivados; esto se debe también a la elevada aromaticidad del núcleo.

Las especulaciones teóricas y los estudios de rayos X sugieren para el núcleo de la porfina, una estructura A (Figura I.19.) de 18 electrones  $\pi$  delocalizados entre los 16 átomos

del macrociclo. No obstante, mediciones más recientes con rayos X indicaron que la estructura más probable es aquella donde los átomos de hidrógeno unidos a los nitrógenos ocupan posiciones opuestas en la cavidad del anillo (estructuras B o D). Así, se evita la repulsión de las fuerzas de Van der Waals que tendría lugar si ocuparan las posiciones de dos anillos contiguos (estructura C). La interconversión entre las estructuras B y D es un proceso que tiene lugar en dos etapas pasando por el intermediario con estructura C (Figura I.19).

El núcleo porfirínico puede considerarse como un anfolito con dos nitrógenos pirrolenínicos básicos (=N-) capaces de aceptar protones y dos grupos NH capaces de perder o aceptar protones actuando así como centros ácidos o básicos. De este modo se pueden postular 7 especies posibles (Figura I.20). Sin embargo, sólo 4 de éstas han sido observadas espectroscópicamente: el dianión  $P^{2-}$ ; la porfirina neutra  $PH_2$ ; el monocatión  $PH_3^+$  y el dicatión  $PH_4^{2+}$ . La porfirina neutra y las sales dianiónica y dicatiónica han sido aisladas químicamente.

Para asignar los valores de pK al núcleo de las porfirinas se pueden usar las siguientes formas de la ecuación de Henderson y Hasselbalch:

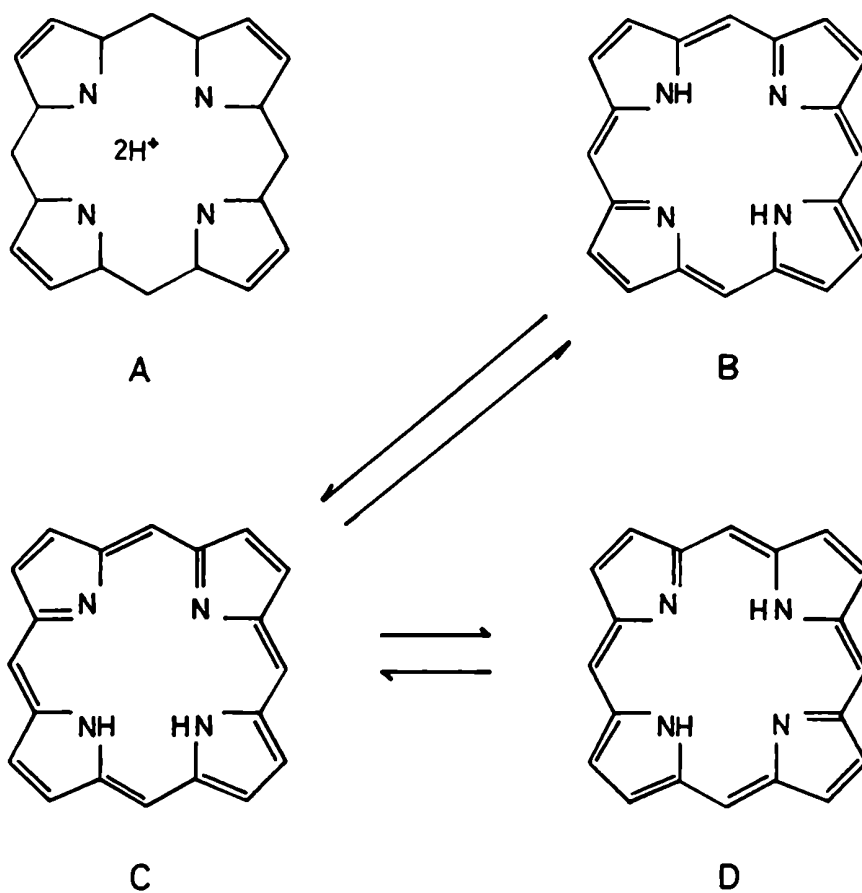
$$pK_1 = pH - \log(P^{2-}) / (PH^-)$$

$$pK_2 = pH - \log(PH^-) / (PH_2)$$

$$pK_3 = pH - \log(PH_2) / (PH_3^+)$$

$$pK_4 = pH - \log(PH_3^+) / (PH_4^{2+})$$

Las porfirinas son ácidos muy débiles y para obtener  $P^{2-}$  son necesarias bases fuertes (alcoóxidos). Tanto  $pK_1$  como  $pK_2$  son del orden de +16. Por otra parte, las porfirinas son bastante básicas disolviéndose en ácidos minerales diluidos. Los valores de  $pK_3$  y  $pK_4$  de las porfirinas naturales dependen de los sustituyentes periféricos, ya que éstos poseen cadenas laterales de ácidos carboxílicos (acético y propiónico) que se ionizan simultáneamente con los átomos de nitrógeno del núcleo. Estos grupos carboxílicos ionizados crean un campo electrostático que produce un aumento aparente en la basicidad de las porfirinas.



**Figura I.19.:** Estructuras más probables del núcleo porfirínico.

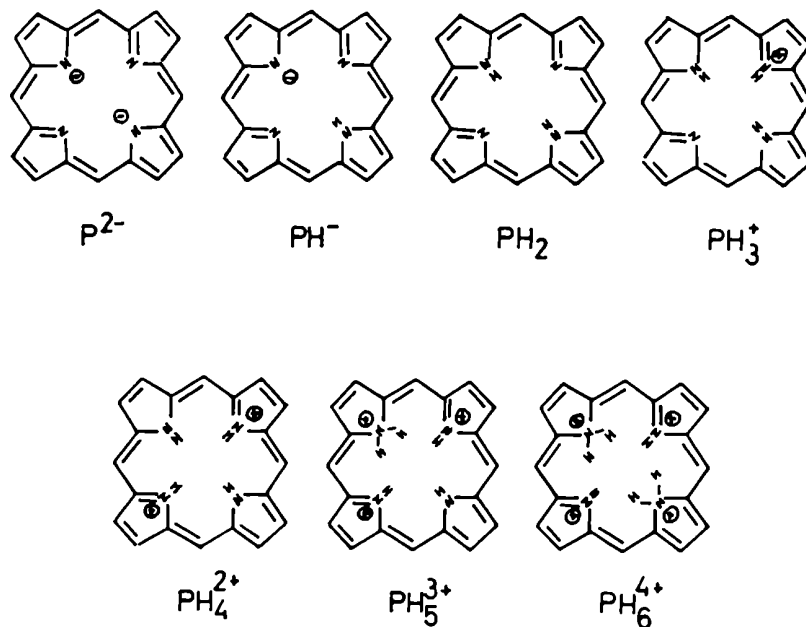


FIGURA I.20.: Formas neutra, aniónicas y catiónicas de la porfina.

Cuando se mide el  $pK_3$ , o sea, la formación del monocatión de los ésteres de las porfirinas naturales (para eliminar la contribución de las cadenas acídicas) se obtienen valores que oscilan entre 4,8 y 5,8. Los valores de  $pK_4$  son similares; esto dificulta la obtención del monocatión y favorece la del dicatión. La situación es diferente en el caso de las porfirinas naturales no esterificadas debido a las causas ya mencionadas. El  $pK_3$  de la coproporfirina en solución acuosa es 7,2. Por lo tanto, en el medio biológico, un 50% de esta porfirina está como monocatión.

La presencia de un número variable de grupos carboxilos en las porfirinas es la responsable de las diferencias existentes en la solubilidad y en el comportamiento cromatográfico. Estos grupos carboxilos pueden esterificarse, los ésteres metílicos son los más empleados (Schwartz y col., 1960).

Empleando columnas de  $CO_3Ca$  y  $OMg$  (Nicholas, 1951) es posible separar y purificar las porfirinas esterificadas que se cristalizan de metanol-cloroformo. Los ésteres metílicos obte-

nidos presentan puntos de fusión característicos que permiten su identificación.

En los tejidos y líquidos biológicos, las porfirinas se encuentran en su mayor parte, como porfirinógenos (Watson, 1951).



#### I.4. Referencias

- Bogorad, L. (1955), *Federation Proc.* 14, 184.
- Bogorad, L. (1958), *J. Biol. Chem.* 233, 501, 510, 516.
- Bray, R.C. & Shemin, D. (1963), *J. Biol. Chem.* 238, 1501.
- Brockman, H., Jr. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London B.* 273, 277.
- Corcoran, J.W. & Shemin, D. (1957), *Biochim. Biophys. Acta* 25, 661.
- Falk, J.E. & Nyholm, R.S. (1958), "Current Trends in Heterocyclic Chemistry", (Albert, A.; Badger, G.M. & Shoppe, C.W., eds) Butterworths, London, p. 130.
- Falk, J.E. & Perrin, D.D. (1961), "Haematin Enzymes", (Falk, J.E.; Lemberg, R. & Morton, R.K., eds.) Pergamon, London, p. 56.
- Falk, J.E. & Phillips, J.N. (1964), "Chelating Agents and Chelate Compounds", (Mellor, D.P. & Dwyer, F.P., eds.). Academic Press, New York.
- Fischer, H. (1937), "Die Chemie des Pyrrols", Leipzig, Band II, p. 480.
- Granick, S. (1955a), *Am. Chem. Soc. Abstr.* 128th meeting 69c.
- Granick, S. (1955b), "Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" Churchill, London, p. 143.
- Holt, A.S. (1965), "The Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments" (T.W. Goodwin, ed.), p.3, Academic Press, New York.
- Holt, A.S.; Purdie, J.W. & Wasley, J.W.F. (1966), *Can. J. Chem.* 40, 171.
- Hoppe-Seyler, F. (1880), *Z. Physiol. Chem.* 4, 193.
- Hubbard, R. & Rimington, C. (1950), *Biochem. J.* 46, 220.
- Jensen, A.; Aasmundrud, O. & Eimhjellen, K.E. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 88, 466.
- Keilin, D. (1930), *Proc. R. Soc. B.* 106, 418.
- Keilin, D. & Hartree, E.F. (1945), *Biochem. J.* 39, 293.
- Lascelles, J. (1964), "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation", Benjamin, New York.
- Lemberg, R. & Legge, J.W. (1949), "Haematin Compounds and Bile Pigments", Interscience Publishers Inc., New York.
- Lowe, M.B. & Phillips, J.N. (1962), *Nature* 194, 1058.
- Marks, G.S. (1969), "Heme and Chlorophyll", D. Van Nostrand Company, London.
- Marks, G.S.; Dougall, D.K.; Bullock, E. & Mac Donald, S.F. (1959), *J. Am. Chem. Soc.* 81, 250.

- Mason, S.F. (1958), J. Am. Chem. Soc. 976
- Mauzerall, D. (1960), J. Am. Chem. Soc. 82, 1832.
- Mauzerall, D. (1962) J. Am. Chem. Soc. 84, 2437.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958), J. Biol. Chem. 232, 1141.
- Mc Donald, D.M. & Mc Donald, S.F. (1955), Can. J. Chem. 33, 573.
- Newton, J.W. & Kamen, M.D. (1961), "The Bacteria", (Gunsalus, I.C. & Stanier, R.Y., eds.) Academic Press, New York, p. 397.
- Nicholas, R.E.H. (1951), Biochem. J. 48, 309.
- Orlando, J.A. (1958), Ph. D. Thesis, Univ. of California.
- Pfennig, N. (1967), Ann. Rev. Microbiol. 21, 285.
- Phillips, J.N. (1960), Rev. Pure Appl. Chem. 10, 35.
- Phillips, J.N. (1963), "Comprehensive Biochemistry" (Florkin, M. & Stotz, E.H., eds.) Elsevier, Amsterdam, vol. 9, p. 34.
- Postgate, J.R. (1959), A. Rev. Microbiol. 13, 505.
- Purdie, J.W. & Holt, A.S. (1965), Can J. Chem. 43, 3347.
- Rabinowitch, E.I. & Govindjee, R. (1965), Scient. Am. 213, 74.
- Schwartz, S.; Ikeda, K.; Miller, I.M. & Watson, C.J. (1959), Science, 129, 40.
- Schwartz, S.; Berg, M.H.; Bossenmaier, I. & Dinsmore, H. (1960), "Methods of Biochemical Analysis", (D. Glick, ed.), Interscience, New York, vol. 8, p. 221.
- Shrimpton, D.M.; Marks, G.S. & Bogorad, L. (1963), Biochim. Biophys. Acta 71, 408.
- Vernon, L.P. & Kamen, M.D. (1954), J. Biol. Chem. 211, 643.
- Watson, C.J. (1951), The Lancet 1, 539.
- Williams, R.J.P. (1953), Chem. Rev. 28, 381.
- Williams, R.J.P. (1956), Chem. Rev. 56, 299.
- Willstätter, R. & Mieg, W. (1913), Ann. Chem. 400, 147, citado en Willstätter, R. "Investigations in Chlorophyll", Science Press Lancaster Pa (1928).
- Willstätter, R. & Stoll, A. (1928), "Investigations on Chlorophyll", Science Press, Lancaster.
- Woodward, R.B. (1961), Pure Appl. Chem. 2, 383.

## CAPITULO II

### BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

---

	Página
II.1. Introducción	36
II.2. Precursores e intermediarios en la biosíntesis de tetrapirroles	38
II.2.1. Glicina y succínico:precursores del hemo	38
II.2.2. PBG: precursor del hemo	39
II.2.3. ALA: precursor del PBG	40
II.2.4. Ciclo del succínico-glicina	41
II.3. Enzimas del camino de los tetrapirroles	41
II.3.1. Succinil CoA-sintetasa	41
II.3.2. Acido $\delta$ -Aminolevúlico Sintetasa	43
II.3.3. Dova-Transaminasa	48
II.3.4. ALA-Dehidrasa	49
II.3.5. Porfobilinogenasa	55
II.3.6. Uroporfirinógeno Decarboxilasa	55
II.3.7. Coproporfirinogenasa	60
II.3.8. Protoporfirinógeno IX $\alpha$ -oxidasa	65
II.3.9. Ferroquelatasa	66
II.4. Referencias	72

## II. BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

### II.1. Introducción

La compleja estructura tetrapirrónica es difícil de obtener en el laboratorio; sin embargo, la mayoría de los seres vivientes pueden sintetizarla a partir de precursores muy simples. En las últimas décadas, ha tenido lugar un considerable progreso acerca de nuestros conocimientos sobre el camino biosintético de las porfirinas, demostrándose que la misma secuencia opera en todas las formas de vida.

La elucidación de las primeras etapas del camino de biosíntesis del hemo fueron el resultado de una serie de brillantes trabajos con compuestos radioactivos efectuados en los laboratorios de Shemin, Rimington, Neuberger y Granick. Estos estudios establecieron las bases para los posteriores avances en este campo y demostraron que en todos los tejidos estudiados, ya sean vegetales, animales o bacterianos, la formación de protoporfirina IX seguía una secuencia metabólica común.

La biosíntesis de porfirinas se ilustra esquemáticamente en la Figura II.1. Como ocurre con otras moléculas complejas de estructura muy diversa (alcaloides, esteroides, etc.), las porfirinas se originan a partir de compuestos muy simples, de modo que los tetrapirroles se obtienen por autopolimerización de los dos primeros precursores específicos, lo que da lugar a moléculas que van aumentando en tamaño y complejidad. Una vez formados los macrociclos ocurren una serie de reacciones secundarias que modifican ligeramente las estructuras para adaptarlas a las distintas funciones metabólicas.

Así, la condensación de glicina y succinil-CoA da lugar a la formación del ácido  $\delta$ -aminolevúlico (ALA). La autocondensación de dos moléculas de ALA forma el monopirrol porfobilinógeno (PBG) y la de 4 moléculas de PBG origina el uroporfirinógeno III (urogen III). El urogen III es un macrociclo tetrapirrónico octacarboxílico que se descarboxila a coproporfirinógeno III (coprogen III). Este último se descarboxila y oxida a protoporfirina IX. El urogen III también sufre una metilación reductiva para transformarse primero en sirohidroclorina y luego en ácido cobirínico; por inserción del cobalto en los derivados de este último, se produce la coenzima cobamida, la forma biológicamente activa de la vitamina B12. La protoporfirina

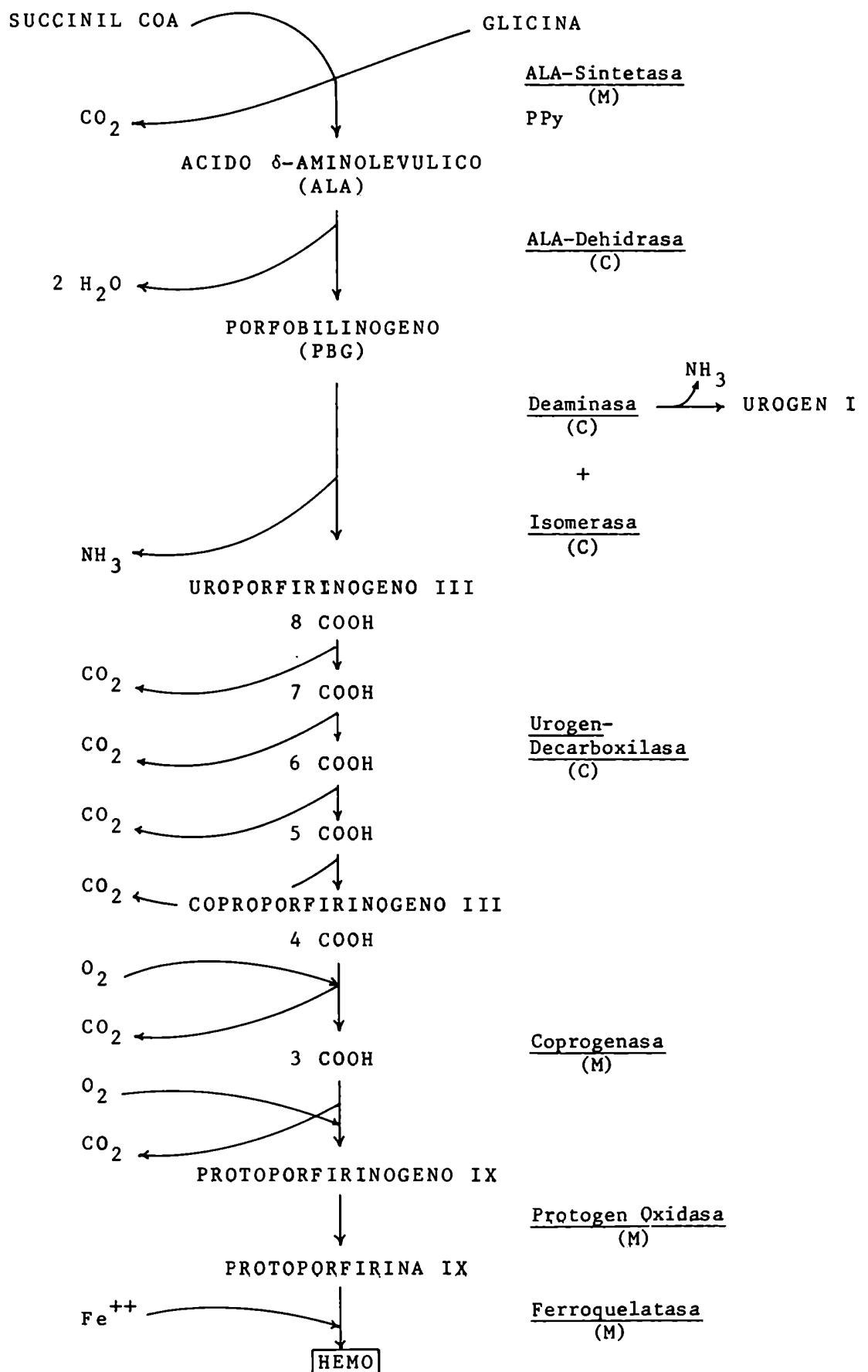


Figura II.1.: Esquema de la biosíntesis de tetrapirroles

IX es a su vez, el precursor del hemo y las clorofilas según se coordina con  $\text{Fe}^{2+}$  o con  $\text{Mg}^{2+}$  respectivamente.

## II.2. Precursores e intermediarios en la biosíntesis de tetrapirroles

### II.2.1. Glicina y succínico: precursores del hemo

Como ya se mencionó, la mayoría de las células vivas son capaces de sintetizar eficientemente la compleja estructura tetrapirrólica, a partir de constituyentes simples de la dieta. La introducción de técnicas isotópicas permitió comprobarlo.

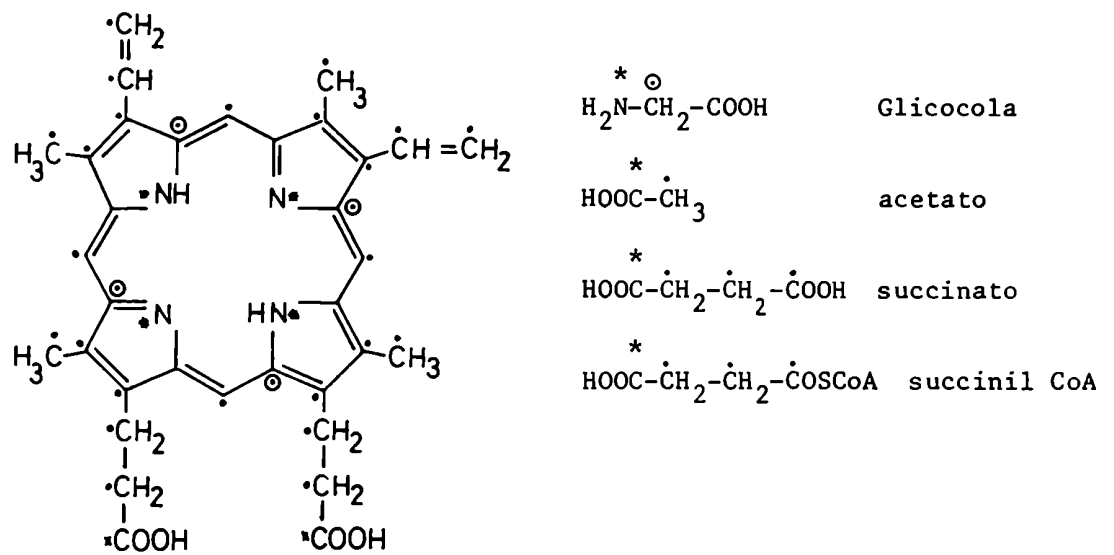
Shemin y Rittenberg (1945) empleando  $^{15}\text{N}$ -glicina encontraron que la marca se incorporaba en el hemo. Poco después, Shemin y col., (1948) demostraron que sistemas de glóbulos rojos de pato o eritrocitos inmaduros de mamíferos eran capaces de sintetizar hemo *in vitro* a partir de glicina marcada con  $^{15}\text{N}$ ; el hecho de que el hemo pudiera formarse enzimáticamente *in vitro* fue un hallazgo importantísimo que estimuló notablemente la investigación de la biosíntesis de este compuesto.

Mediante un procedimiento ideado por Shemin y Rittenberg (1945) que consiste en una degradación paso a paso del hemo, utilizando precursores marcados, se logró determinar el origen de cada átomo del núcleo de la protoporfirina. Estos autores demostraron que los cuatro nitrógenos del anillo porfirínico provienen del nitrógeno amínico de la glicina (Figura II.2.).

Experiencias posteriores con  $^{14}\text{C}$ -glicina, llevadas a cabo por varios grupos de investigadores (Muir y Neuberger, 1949; Wittenberg y Shemin, 1949; Grinstein y col., 1950) demostraron que sólo el carbono metilénico de la glicina se incorporaba en el hemo.

Paralelamente a estos hallazgos, Block y Rittenberg (1945) encontraron que empleando acetato deuterado, se obtenía hemo marcado *in vitro*. Rodin y col. (1950) utilizando 1- $^{14}\text{C}$ -acetato o 2- $^{14}\text{C}$ -acetato demostraron *in vitro* que los 26 átomos de C remanentes de la molécula de protoporfirina provenían de este compuesto (Figura II.2.). A esta altura de los estudios se postuló entonces que la glicina y algún metabolito derivado del acetato eran precursores del hemo.

Shemin y Kumin (1952) empleando ácido succínico marcado



**FIGURA II.2.:** Origen de los átomos de carbono y de nitrógeno de la molécula de protoporfina IX

con  $^{14}\text{C}$  comprobaron que éste se incorporaba en los anillos pirrólicos y además que la reacción era estimulada por CoA. Los trabajos de Rubinstein y Densted (1953) aportaron evidencias en favor de la participación del ciclo del ácido cítrico en la biosíntesis del hemo y del hecho de que el succinil-CoA formado, ya sea a través de otro metabolito del ciclo de Krebs, o bien del succinato, por medio de una succinil-CoA sintetasa, era el precursor del ALA.

#### II.2.2. PBG: precursor del hemo

Ya en 1931, Sachs demostró que la orina de pacientes con porfiria aguda intermitente contenía altas concentraciones de un compuesto que daba reacción de Ehrlich positiva. En base a sus propiedades se le dió el nombre de porfobilinógeno (Waldenström y Wahlquist, 1939). Después de varios intentos pa-

ra aislarlo, recién en 1953, Cookson y Rimington consiguieron separarlo y determinar su estructura la cual fue confirmada por síntesis (Rimington y Krol, 1955).

Se ha identificado PBG en varios medios y en base a consideraciones generales de las propiedades y estructura del mismo, se postuló que este compuesto era un precursor en la síntesis de las porfirinas, lo cual fue demostrado empleándolo directamente como sustrato, marcado o no con  $^{14}\text{C}$ , con extractos enzimáticos crudos o parcialmente purificados procedentes de animales, plantas y bacterias. Asimismo, aplicando la técnica de dilución isotópica se corroboró el hecho de que el PBG es un intermediario normal en la biosíntesis del hemo.

Es importante destacar que todos estos hallazgos referentes a la utilización del PBG en la biosíntesis de porfirinas fueron previos al descubrimiento del rol del ALA (Shemin y Russell, 1953) en dicha secuencia metabólica.

### II.2.3. ALA: precursor del PBG

A esta altura de los conocimientos surgen una serie de especulaciones tendientes a explicar cuáles son las etapas existentes entre succínico-glicina y PBG.

En Londres, Neuberger y Scott (1953) prepararon un número de posibles intermediarios que podrían derivar de succínico y glicina, entre ellos, ALA. Shemin y Russell (1953) en los Estados Unidos demostraron que el ALA podía reemplazar al succinato activo y a la glicina en la síntesis de porfirinas. La actividad de este intermediario en la producción del hemo y compuestos tetrapirrólicos fue confirmada entre otros por Neuberger y Scott (1953) y Dresel y Falk (1953), quienes comprobaron su conversión en PBG y porfirinas.

Asimismo, empleando  $^{14}\text{C}$ -ALA o  $^{15}\text{N}$ -ALA *in vivo* e *in vitro* se demostró su incorporación en hemo, en animales, plantas y microorganismos, quedando así definitivamente aceptado que el ALA es un intermediario en la síntesis de tetrapirroles.



#### II.2.4. Ciclo del succínico-glicina

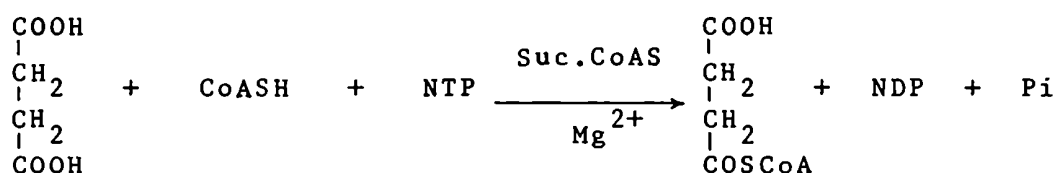
Shemin y Russell (1953) observaron que si se suministraba  $^{14}\text{C}$ -ALA a ratas, había incorporación de  $^{14}\text{C}$  en el grupo ureído de las purinas, eliminándose además ácido fórmico marcado por orina y  $\text{CO}_2$  por las vías respiratorias. Se postuló entonces que el ALA no sólo intervendría en la biosíntesis de porfirinas sino que podría ser transformado nuevamente en ácido succínico y constituir de esa forma otra vía para la oxidación de glicina, la cual se utiliza en numerosas síntesis específicas, además de la de porfirinas. Shemin y col. (1955) interpretaron estos fenómenos introduciendo el concepto de Ciclo del succínico-glicina que se ilustra en la Figura II.3.

Este ciclo, a su vez, está relacionado con el de los ácidos tricarbónicos, a través del ácido succínico; numerosas evidencias experimentales confirman estas hipótesis.

#### II.3. Enzimas del camino de los tetrapirroles

##### II.3.1. Succinil CoA-sintetasa

La Succinil CoA-sintetasa (Suc.CoA-S), también conocida como Succinil CoA tíoquinasa, cataliza reversiblemente la activación de un grupo carboxilo del ácido succínico, con la CoASH, en presencia de un nucleósido trifosfato (NTP) conduciendo a la formación de succinil CoA:



reacción I

Esta enzima fue descubierta por Kaufman en 1951 y aislada por primera vez en 1953 (Kaufman y col., Hift y col.). Desde entonces y hasta el momento ha sido obtenida y purificada a partir de diversos tejidos animales, vegetales y bacterianos tales como corazón de cerdo, riñón, hojas de espinaca, legumi-

nosas, trigo y tabaco, mitocondrias de alcaucil, callos de soya y *E. coli* (Wider de Xifra y Tigier, 1971; Nishimura y Grinnel, 1972).

En la mayoría de los tejidos estudiados se ha encontrado que es una enzima particulada, mitocondrial o cloroplástica. En todos los casos existe una alta especificidad por el succinato y la CoASH. Se han ensayado 11 ácidos orgánicos de los cuales sólo el ácido málico (además del succinato) fue efectivo como sustrato (Robinson y col., 1969); sin embargo, la actividad de la enzima en presencia de muy altas concentraciones de este ácido, resultó ser un 3% de la actividad medida cuando se empleó ácido succínico como sustrato. Por otra parte, en lo que se refiere al nucleósido trifosfato, la especificidad varía con la fuente estudiada. En forma general, la Suc.CoA-S de mamíferos es dependiente de GTP (Hager, 1962) el cual sólo puede ser reemplazado por ITP. La enzima aislada de espinaca actúa con ATP pero no con GTP o ITP en tanto que la proveniente de *Rhodospseudomonas spheroides* y de *E. coli* utiliza ATP, GTP e ITP como sustratos (Burnham, 1963; Murakami y col., 1972).

La enzima requiere la presencia de un catión divalente para manifestar su actividad máxima (Wider de Xifra y Tigier, 1971) pudiendo ser  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  indistintamente, ya que ambos se comportan de manera semejante. En mitocondrias de alcaucil la especificidad por el catión es menor y en este caso el metal puede ser reemplazado por Co (Palmer y Weddin, 1966).

La Suc.CoA-S presenta frecuentemente las características de una enzima sulfhidrídica; es inhibida por p-cloromercuribenzoato, iodobenzoato, iodoacetamida, glutatión oxidado y N-etilmaleimida. En algunos tejidos es necesaria la presencia de glutatión reducido (GSH) para la activación de la enzima; sin embargo, otros tioles como cisteína, tioglicolato y ditiotreitól producen inactivación.

El peso molecular de esta enzima varía según la fuente de obtención oscilando los valores entre 70.000 y 140.000 daltons. El uso de agentes disociantes permitió determinar que esta proteína está compuesta por cuatro subunidades, siendo del tipo  $\alpha_2\beta_2$ ; los pesos moleculares de  $\alpha$  y  $\beta$  resultaron 29.000 y 41.000 daltons respectivamente (Teherani y Nishimura, 1975). Estos últimos autores, fosforilando la Suc.CoA-S con  $\gamma$ - $^{32}P$ -ATP y  $\gamma$ - $^{32}P$ -GTP, demostraron que la radiactividad se asociaba a la subunidad  $\alpha$ , hallándose en la misma un resto histidina fosfori

lable que parece estar involucrado en este proceso (Browimie y Bridger, 1972).

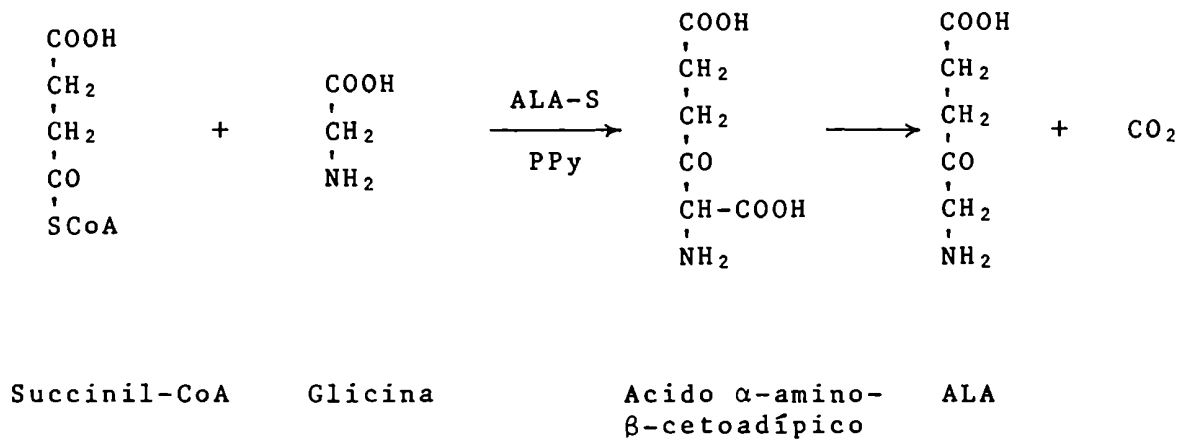
El mecanismo de acción de la Suc.CoA-S ha sido estudiado y discutido detenidamente durante más de dos décadas. La principal dificultad para entender el proceso se debe a que la enzima cataliza varias reacciones simultáneamente: i) la formación e hidrólisis de una unión tioéster, ii) la fosforilación y fosforólisis de un nucleósido trifosfato y iii) el intercambio entre succinato $\rightleftharpoons$ succinil-CoA, NTP $\rightleftharpoons$ Pi, NTP $\rightleftharpoons$ NDP, enzima fosforilada $\rightleftharpoons$ Pi y enzima fosforilada $\rightleftharpoons$ NTP. Las hipótesis más avanzadas que tratan de explicar estas reacciones proponen diferentes secuencias consecutivas de eventos, pero ninguna se ajusta totalmente a los datos experimentales. Existe un acuerdo general en que la primera etapa del mecanismo consiste en la fosforilación de la proteína enzimática por medio del nucleósido trifosfato, rico en energía; esta propuesta se ajusta perfectamente al criterio cinético ya que en este caso la enzima fosforilada es un intermediario en la catálisis.

En la Figura II.4. se ilustra uno de los esquemas de reacción más recientes, propuesto por Wider de Xifra y Batlle, (1976). Este mecanismo tiene en cuenta todas las evidencias experimentales obtenidas hasta el presente y considera la posible existencia de caminos alternativos. El diagrama explica también la formación y detección de otros complejos, cuya existencia ha sido muy discutida, pero que podrían ser el resultado de una alteración de los equilibrios del camino normal con la consecuente desviación por esas vías laterales.

Existen evidencias experimentales que indican que la Suc.CoA-S desempeña un importante rol en el mecanismo de control de la biosíntesis de tetrapirroles en mitocondrias de ratón (Labbe y col., 1965), hojas de leguminosa (Steer y Gibbs, 1969a y b), semillas etioladas de cebada (Stobart y Pinfield, 1970) y callos de soya (Batlley col., 1975).

### II.3.2. Acido $\delta$ -Aminolevúlico Sintetasa

La primera etapa que conduce específicamente a la biosíntesis de porfirinas es la formación de ALA a partir de glicina y succinil-CoA, catalizada por la enzima  $\delta$ -aminolevúlico sintetasa (ALA-S) de acuerdo con la siguiente reacción:



(reacción II)

Estudiando los requerimientos de esta enzima se encontró que el fosfato de piridoxal (PPy) es indispensable para el funcionamiento de la misma. En cuanto a la especificidad por sustrato, el ALA-S es altamente específica por el succinil-CoA. Se han calculado además los valores de Km para los diferentes sustratos resultando mayor el correspondiente a la glicina y sugiriéndose que éste sería el sustrato limitante (Granick y Sassa, 1971).

Por tratarse de una enzima poco estable y de corta vida media, la medición de la actividad de ALA-S es dificultosa. No obstante, se la ha detectado y estudiado en una amplia variedad de sistemas. Kikuchi y col. (1958) y Gibson y col. (1958) fueron los primeros en demostrar la presencia de esta enzima en extractos de bacterias fotosintéticas y de eritrocitos de aves. A partir de ese momento, se ha logrado medir actividad de ALA-S en diversas fuentes tales como extractos libres de células de *Rp. spheroides*, *Rs. rubrum*, *Rp. palustris* y otras bacterias; en *Saccharomyces cerevisiae*; en mitocondrias de hígado de cobayo y de glándulas de Harder de ratas; en hígado, eritrocitos, fibroblastos y plasma humanos; en espinaca, extractos de callos de soya y otros. Sin embargo, no ha podido detectarse en proplástidos y cloroplastos, como tampoco en la fracción mitocondrial de plantas superiores aunque existen evidencias de actividad de ALA-S en tejidos de origen vegetal (Wider de Xifra y col., 1971; Ramaswamy y Nair, 1973).

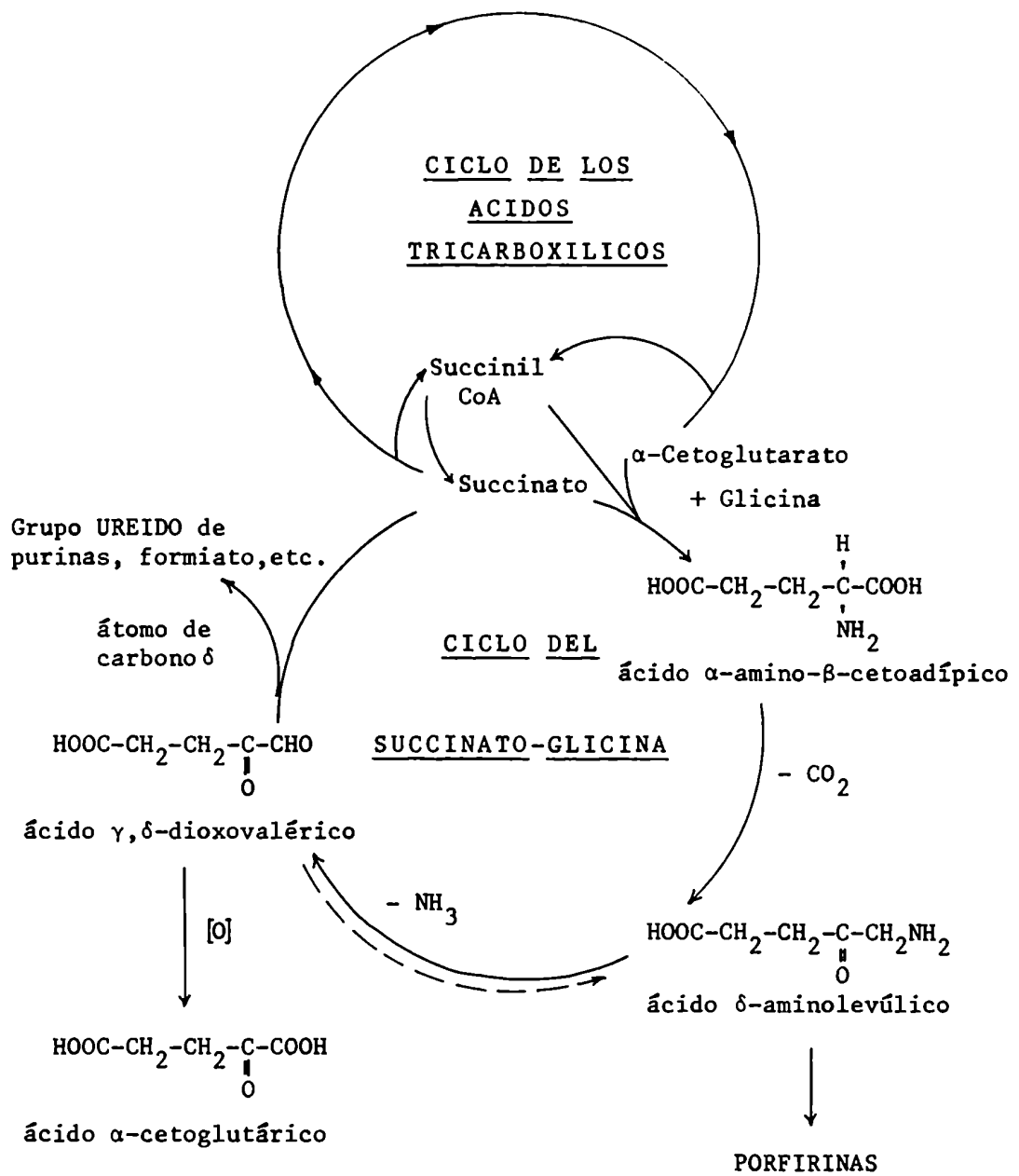


Figura II.3.: Ciclo succínico-glicina

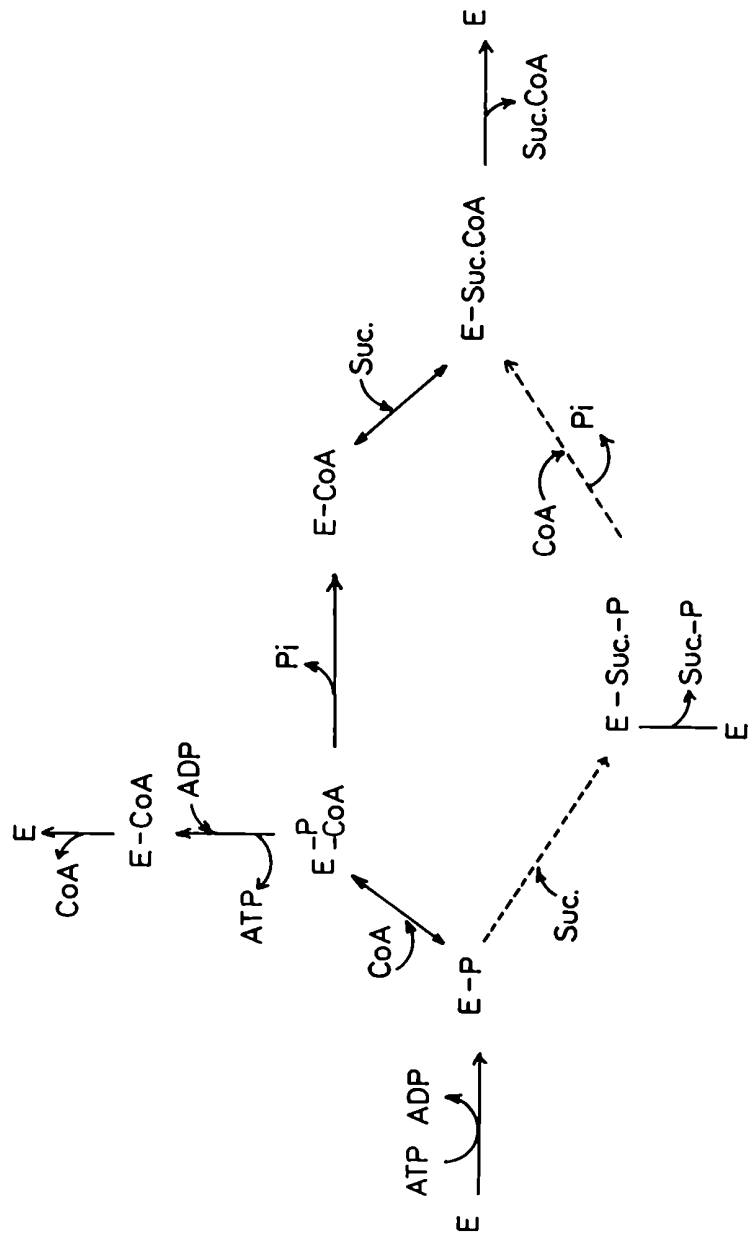


Figura II.4.: Mecanismo de acción de la Succinil-CoA-Sintetasa.

En la mayoría de los tejidos estudiados, el ALA-S se encuentra asociada a la fracción particulada; no obstante, en ratas tratadas con alilisopropilacetamida, un potente inductor de la síntesis de porfirinas en hígado, se detectó un significativo aumento de la actividad del ALA-S citoplasmática (Hayashi y col., 1969; Whiting y Elliott, 1972; Patton y Beattie, 1973). Se ha sugerido que tanto la enzima mitocondrial como la citosólica se sintetizan sobre los polirribosomas citoplasmáticos y que el ALA-S citosólico representa una forma de la enzima en tránsito hacia la mitocondria; esta hipótesis está sostenida por numerosas evidencias experimentales (Hayashi y col., 1969; Granick y Sassa, 1971; Whiting y Elliott, 1972).

Teniendo en cuenta que el ALA-S es una enzima particulada y dada su gran labilidad una vez extraída de la célula, podrían explicarse muchas de sus propiedades postulando que, dentro de la célula se encuentra asociada a las mitocondrias de manera tal que este ensamble le proporciona una estructura óptima para su actividad. Cuando se separa la enzima de esa arquitectura celular natural, la proteína pierde estabilidad y se inactiva más rápidamente. Esta hipótesis ha sido apoyada experimentalmente mediante los estudios de Wider de Xifra y col., (1978) quienes demostraron que proporcionándole a la enzima un soporte sólido y reconstituyendo artificialmente el ensamblamiento enzima-partícula que se supone existe *in vivo*, el ALA-S insolubilizada retenía su actividad por largo tiempo, a diferencia de lo que sucedía con la enzima soluble.

El ALA-S presenta las características de una enzima sulfhidrúlica. Los reactivos de grupos -SH, tales como p-cloromercuribenzoato (PCMB),  $\text{HgCl}_2$  y N-etilmaleimida (NEMI) y algunos iones metálicos como  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , inhiben a la enzima purificada de *Rp. spheroides*. Estas inhibiciones son parcialmente revertidas incubando la enzima inhibida con 2-mercaptoetanol. Dichos hallazgos sugieren la existencia de grupos sulfhidrilos en el ALA-S, que son esenciales para su actividad.

Se han encontrado diferentes valores de PM para el ALA-S dependiendo del tejido en estudio, de la especie de la cual proviene y de las condiciones de purificación. La fuerza iónica del buffer empleado durante el proceso de purificación, es uno de los factores que afectan la determinación del PM; así, con buffers de baja fuerza iónica se producen agregados de mayor peso molecular, principalmente cuando se trabaja con la enzima

citoplasmática (Whiting y Elliott, 1972).

En la Figura II.5. se ilustra el mecanismo de acción propuesto para el ALA-S. La glicina se condensa con el complejo enzima fosfato de piridoxal formando un carbanión estable. Este reacciona con el carbonilo electrofílico del succinil-CoA para producir un intermediario sumamente inestable, el ácido  $\alpha$ -amino- $\beta$ -cetoacético. El intermediario unido a la enzima se descarboxila espontáneamente originando el ALA.

### II.3.3. Dova-Transaminasa

Como ya se mencionara, Shemin y col.(1955) observaron radioactividad en el  $\text{CO}_2$  respiratorio, el formiato urinario y el grupo ureído del ácido úrico, experimentando con ratas a las que se les había administrado con  $5\text{-}^{14}\text{C}$ -ALA. Esos productos fueron el resultado de una serie de reacciones que dieron lugar al Ciclo del succinato-glicina o Ciclo de Russell y Shemin, que se ilustrara en el Figura II.3. Se supuso que el ALA, formado por condensación de la glicina con el succinato, podía ser deaminado dando  $\gamma,\delta$ -dioxovalerato (DOVA), el cual al perder el grupo carbonilo terminal regeneraría el succinato y un fragmento de un átomo de carbono (proveniente del C-2 de la glicina) capaz de participar luego en las reacciones del camino biosintético de las purinas.

Nemethy col. (1957) administraron  $5\text{-}^{14}\text{C}$ -DOVA a patos y palomas detectando radioactividad en formiato, el grupo ureído de la guanina y en menor grado, en el hemo. Años después, la existencia del ciclo fue definitivamente confirmada en *Rhodospirillum rubrum* (Shigesada, 1972).

En lo que se refiere a la deaminación del ALA, Kowalski y col.(1957) y Bagdasarian (1958) detectaron en homogenato de hígado de mamíferos y en extractos crudos de *Corynebacterium diphtheriae* una enzima capaz de catalizar la transaminación del ALA en presencia de piruvato o  $\alpha$ -cetoglutarato como aceptores, produciendo alanina y glutamato, respectivamente.

En el año 1961, Gibson y col. demostraron que el equilibrio en la reacción de transaminación está desplazado en favor de la formación de ALA a partir de DOVA en extractos enzimáticos de *Rp. spheroides*. Posteriormente, Neuberger y Turner (1963) aislaron, purificaron y caracterizaron la  $\gamma,\delta$ -dioxovalera



to transaminasa (DOVA-T) de esta misma funete.

Beale (1971), Harel y Klein (1972) y Richard y Nigon (1972) trabajando con *Chlorella vulgaris*, hojas etioladas de plantas superiores y *Euglena gracilis* respectivamente, demostraron que en estos tejidos hay síntesis de ALA y que éste se un precursor en la formación de clorofila. Por último, los hallazgos de Beale y Castelfranco (1973, 1974) confirmaron la existencia, en plantas superiores, de una ruta alternativa de síntesis de ALA.

En la Figura II.6. se esquematizan las dos vías de síntesis de ALA, que partiendo del ácido glutámico, operarían en bacterias y tejidos animales (Kikuchi y col., 1958) y en plantas superiores (Beale y col., 1975).

En base a los trabajos de Beale (1978), Klein y Senger (1978 a y b) y Klein y col. (1980) se sugirió que en vegetales predominaría la vía de la glicina-succinil-CoA sobre la del glutamato, conduciendo ambas a la síntesis de clorofila.

Con respecto al mecanismo de acción de la DOVA-T, hay autores que le adjudican un clásico mecanismo ping-pong, el cual es típico de las transaminasas (Noguchi y Mori, 1981) mientras que otros postulan un mecanismo ping-pong con ciertas características particulares (Varticovski y col., 1980). No obstante, todos coinciden en que las dos formas enzimáticas estables corresponden a los complejos enzima-fosfato de piridoxal y enzima-fosfato de piridoxamina. El aminoácido se uniría a la primera de estas formas y el DOVA a la segunda.

#### II.3.4. ALA-Dehidrasa

La  $\delta$ -aminolevúlico-Dehidrasa (ALA-D), conocida también como PBG-sintetasa, cataliza la ciclación de dos moléculas de ALA para dar el primer derivado cíclico del camino biosintético de las porfirinas, el monopirrol PBG.

El ALA-D se encuentra ampliamente distribuída en la naturaleza: en células parenquimales y sanguíneas de las más di-

versas especies animales y en el hombre; en células de trigo, tabaco y otras plantas; en levaduras; en hongos y bacterias. En aquellos tejidos en los cuales también se ha detectado actividad de ALA-S, la actividad de ALA-D es generalmente mucho mayor.

El ALA-D es una enzima citoplasmática, o sea que no está unida a mitocondrias u otras organelas (Granick y Mauzerall, 1958 a). Por lo tanto para que el ALA pueda ser convertido en PBG, debe salir de la mitocondria y pasar al citoplasma.

La actividad de ALA-D puede verse modificada por cambios en el pH, temperatura, presencia de ciertos metales o sustancias orgánicas, concentraciones de sustrato y producto de la reacción. Así, por ejemplo, el pH óptimo varía de acuerdo con la fuente de enzima dentro de un amplio rango, entre 6,3 (Granick y Mauzerall, 1958 a) y 9,5 (Barreiro, 1967) en tanto que la máxima actividad enzimática se presenta, *in vitro*, a temperaturas de 55 °C (Tigier y col., 1968, 1970) y 65 °C (Batlle y col., 1967). Además, se ha comprobado que en muchos tejidos la enzima se activa como consecuencia de la presencia de ciertos cationes tales como  $Zn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  y  $Mn^{2+}$ ; incluso se ha llegado a postular que, por ejemplo, el cinc o el cobre forman parte de la estructura misma de la proteína enzimática, tratándose entonces de una metalo-enzima.

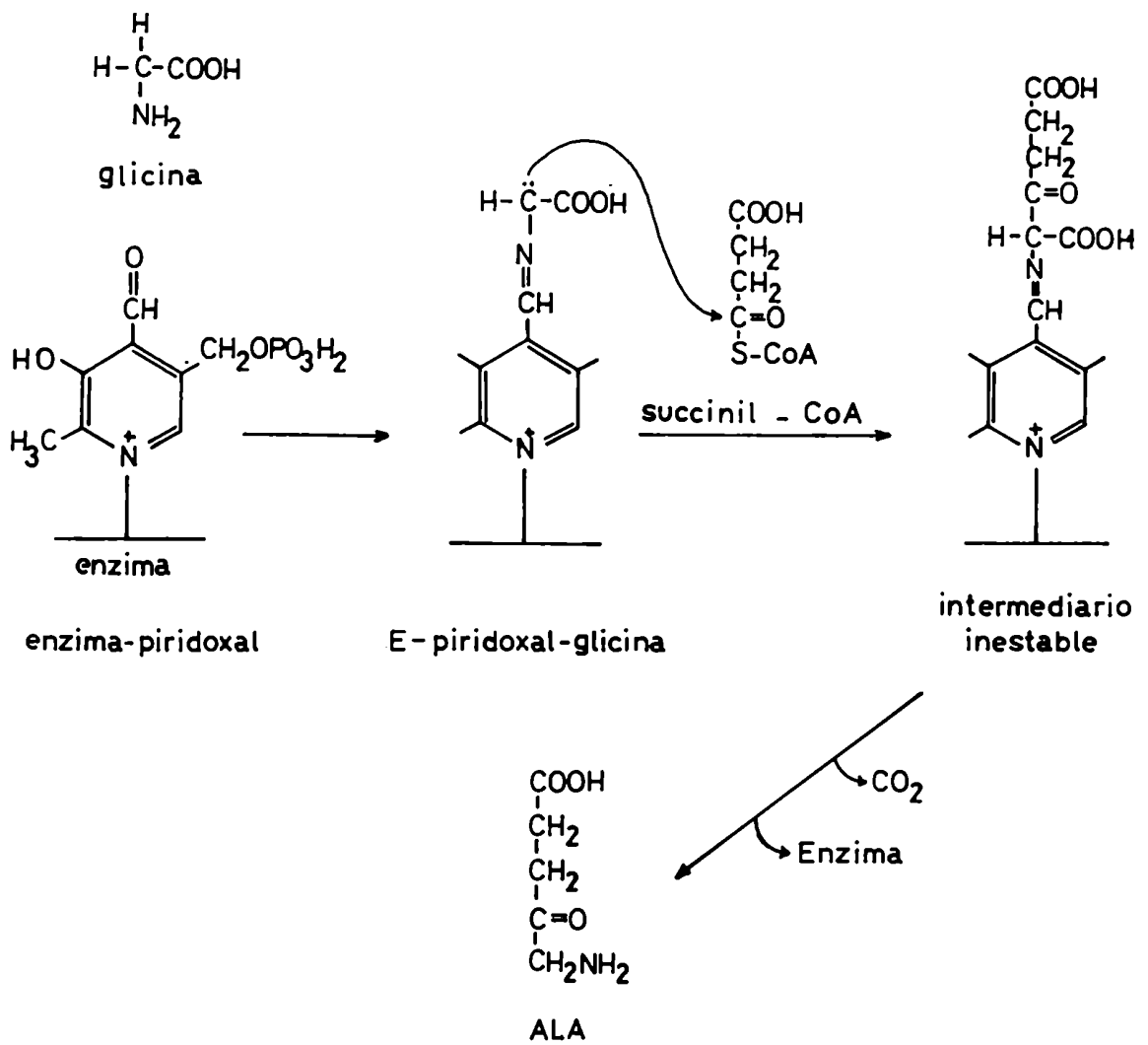
El ALA-D se comporta como una típica enzima sulfhidrídica que, en la mayoría de los casos requiere activadores tiólicos para alcanzar su máxima actividad. Estos activadores pueden ser GSH, cisteína, mercaptoetanol, tioglicolato y ditioneitol. Lógicamente, existe una concentración óptima para que el efecto activante de estos compuestos se manifieste y en algunos casos, concentraciones mayores pueden llegar a inhibir completamente a la enzima. El bloqueo de los grupos sulfhidrídicos del ALA-D se logra por reacción irreversible con iodoacetamida o iodoacetato, por formación de mercaptidas con compuestos orgánicos mercuriales, como p-mercuribenzoato, o por oxidación de grupos -SH vecinales a disulfuros con iodobenzoato, cisteína o glutatión oxidado.

El peso molecular de esta enzima, determinado por distintos métodos, resultó ser del orden de 280.000 para la mayoría de las fuentes y se ha postulado que una proteína de PM 35.000 sería la subunidad mínima que compone el octámero de 280.000 D. Esta conclusión es consistente con los estudios combinados de

microscopía electrónica y determinaciones de pesos moleculares efectuados por Wu y col. (1974). Muy recientemente, mediante el empleo de técnicas de inmovilización de proteínas, se han obtenido resultados que indican que la estructura mínima necesaria para la actividad catalítica estaría constituida por un dímero funcional formado por dos subunidades similares que cumplirían un rol diferente en la síntesis de PBG (Batlle y col., 1978) (Figura II.7.).

En cuanto al mecanismo de acción, Nandi y Shemin (1968) y Batlle y Stella (1978) han propuesto esquemas que se ajustan a los datos experimentales obtenidos hasta el momento. En la Figura II.7. se ilustra el mecanismo propuesto por Batlle y Stella (1978). Más recientemente, Jordan y Seehra (1980) empleando la técnica de espectroscopía RMN con  $^{13}\text{C}$ , propusieron un mecanismo de acción en el cual la primera molécula de ALA que se une a la enzima es la que va a dar lugar al ácido propiónico del PBG, con una afinidad al menos un orden de magnitud mayor que la correspondiente a la molécula que dará lugar al sitio del ácido acético del PBG (Figura II.8.). En este caso la molécula de ALA forma una base de Schiff con la enzima (etapa 2) y seguidamente la segunda molécula de sustrato da lugar a otra base de Schiff intermedia (etapa 3). El PBG se formaría siguiendo la secuencia indicada.

El ALA-D, en general, no es una enzima limitante de la síntesis del hemo. En las células de casi todos los organismos la actividad de ALA-S es considerablemente menor que la del ALA-D. Sin embargo, esta relación es inversa en células de *S. intersonii* (Ho y Lascelles, 1971), aún bajo las más diversas condiciones de crecimiento. No obstante, parece ser que aún en este organismo la dehidrasa estaría presente en cantidades no limitantes y no cumpliría un papel regulatorio. Los organismos que poseen la menor actividad de ALA-D son las levaduras y *Neurospora crassa* (Barreiro, 1967; Muthukrishnan y col., 1972). Esto indicaría que *in vivo* y dependiendo del organismo, la enzima podría tener ocasionalmente una función regulatoria; en el caso de *Neurospora crassa*, esta hipótesis está apoyada por su vida media, relativamente corta *in vivo* (Muthukrishnan y col., 1969). También en *Euglena gracilis*, el ALA-D parece desempeñar un rol regulatorio, ya que tanto Copro III, como Proto IX y hemina la inhiben. Los porfirinógenos correspondientes se comportaron de manera análoga respondiendo su efecto a una inhibición del tipo feed-back.



**Figura II.5.:** Mecanismo propuesto para la formación enzimática de ALA.

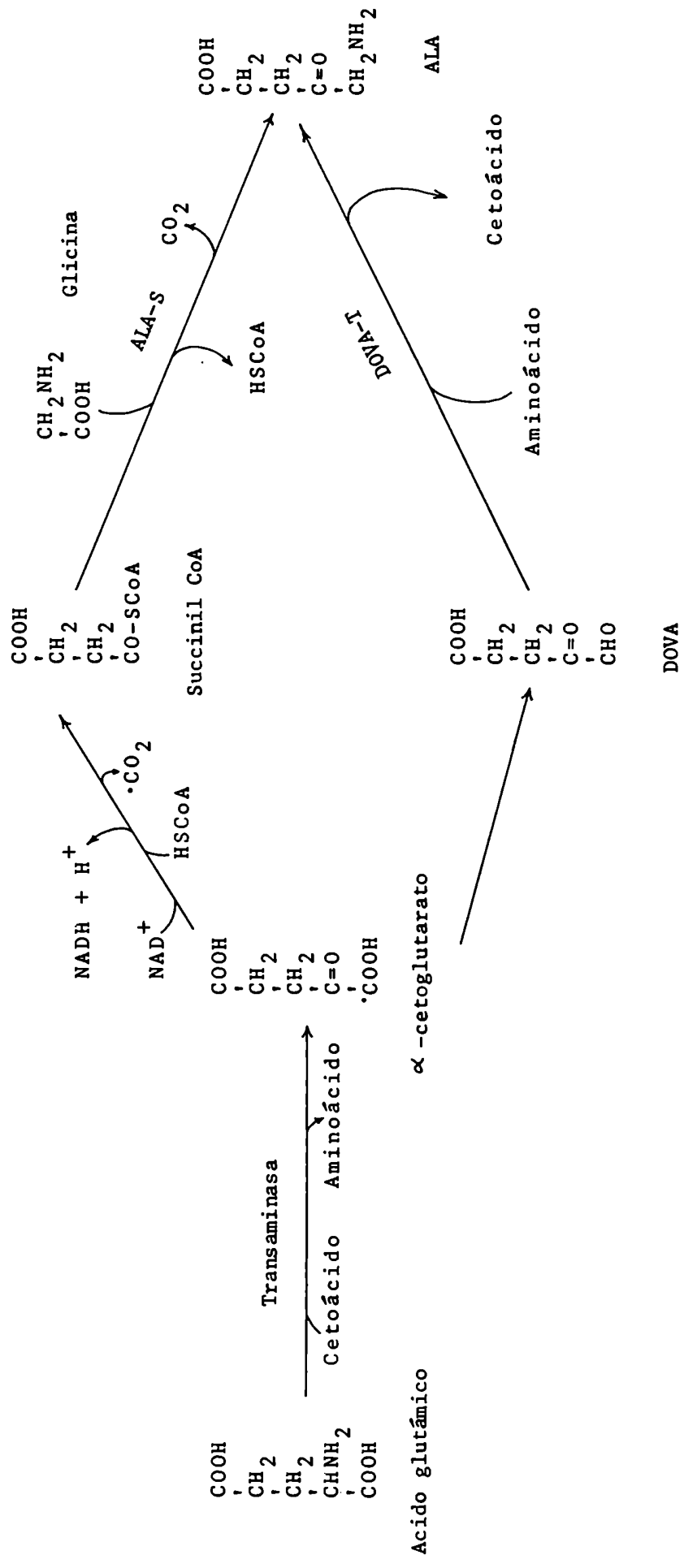


Figura II.6.: Caminos biosintéticos para la formación del ALA partiendo de un mismo sustrato, el ácido glutámico.

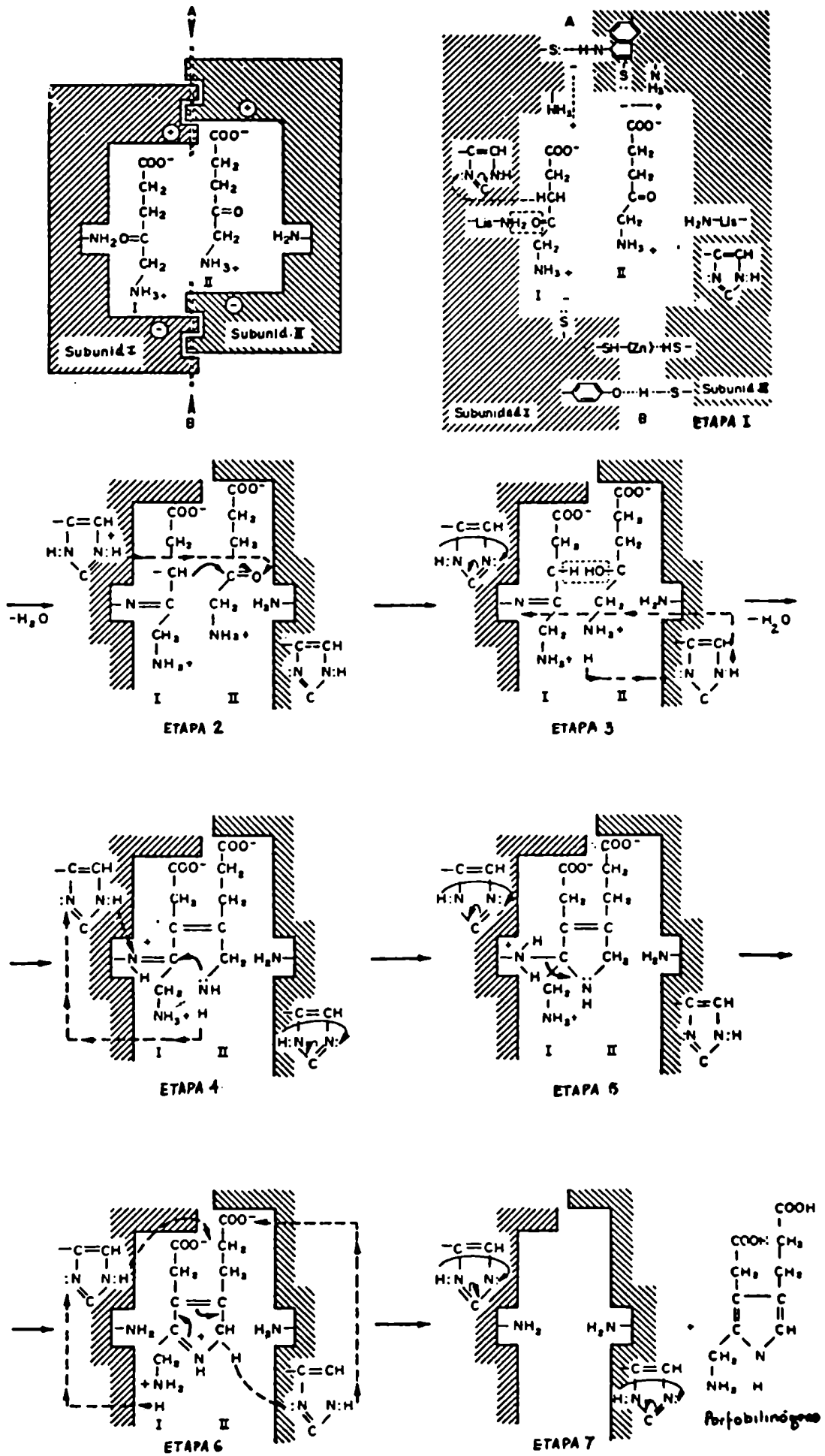
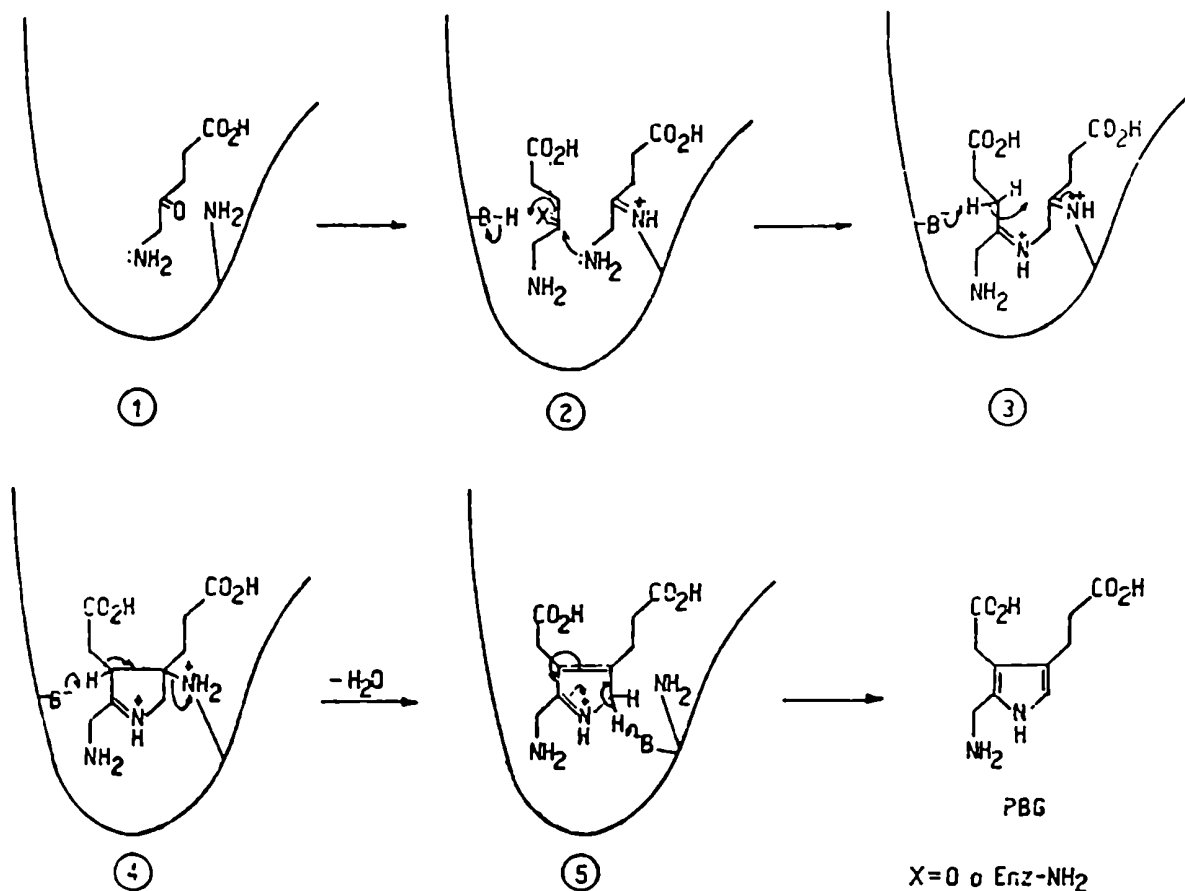


Figura II.7.: Mecanismo de acción propuesto para el ALA-D.



**Figura II.8.:** Mecanismo de acción del ALA-Dehidrasa propuesto por Jordan y Seehra (1980).

### II.3.5. Porfobilinogenasa

Por cuanto esta enzima constituye el tema de estudio de esta Tesis, será tratada con mayor extensión en el próximo capítulo.

### II.3.6. Uroporfirinógeno Decarboxilasa

La uroporfirinógeno decarboxilasa (Uro-Dcasa), también denominada uroporfirinógeno carboxilasa o decarboxilasa, cataliza la conversión de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III (Figura II.1.); en esta reacción tiene lugar la decarboxilación secuencial de las cuatro cadenas laterales de ácido acético del sustrato a cuatro restos metilo, con la consiguiente liberación de cuatro moles de CO<sub>2</sub>.

Esta enzima ha sido estudiada en una amplia variedad de fuentes tales como *Chlorella vulgaris* (Bogorad, 1955, 1958), *Rhodopseudomonas spheroides* (Hoare y Heath, 1958 a), *Rp. palustris* (Koopmann y col., 1986; Koopmann y Battle, 1987), hígado de vaca (Straka y Kushner, 1983), bazo de ratón (Romeo y Levin, 1971), eritrocitos de aves (Falk y col., 1956; Hoare y Heath, 1958 b; Tomio y col., 1970; Kawanishi y col., 1983) y humanos (Elder, 1982; Elder y col., 1983; Verneuil y col., 1983), glándula de Harder (Tomio y Grinstein, 1968), hígado de rata (Aragonés y col., 1972; Smith y Francis, 1981), hígado de cerdo (Kushner y col., 1975) y reticulocitos de conejo (Mauzerall y Granick, 1958). En la mayoría de los tejidos investigados, la decarboxilasa resultó ser una enzima citoplasmática.

La Uro-Dcasa es una enzima preferentemente anaeróbica; el oxígeno inhibe su actividad en forma significativa, probablemente debido a la oxidación de sus sustratos, los porfirinógenos, aunque no puede descartarse la posibilidad de una acción directa del oxígeno sobre la enzima. No obstante, se ha detectado actividad de Decarboxilasa tanto en anaerobiosis (Bogorad, 1958; Hoare y Heath, 1958 a; Mauzerall y Granick, 1958; Tomio y col., 1970) como en aerobiosis (Battle y Grinstein, 1964; San Martín de Viale y Grinstein, 1968; Tomio y col., 1970).

La Decarboxilasa es termosensible (Tomio y col., 1970; Romeo y Levin, 1971) y sulfhidrúlica. Bajo las mismas condiciones, el glutatión y el mercaptoetanol estimulan y la cisteína disminuye la actividad enzimática; en tanto que, como era de esperar, los metales pesados, la iodoacetamida, el PCMB y el DTNB son inhibidores (Hoare y Heath, 1958 b; Tomio y col., 1970; Romeo y Levin, 1971). La Uro-Dcasa proveniente de eritrocitos humanos y de aves, también se ve inhibida por efecto de cationes univalentes (Cornford, 1964; Battle, 1973).

Si bien la Decarboxilasa actúa en forma muy específica sobre los restos acético, no ocurre lo mismo si se tiene en cuenta el tipo isomérico. Mauzerall y Granick (1958) trabajando con la enzima aislada de reticulocitos de conejo, demostraron que ésta era capaz de decarboxilar los 4 isómeros del uroporfirinógeno en el orden de velocidades III > IV > II > I. El isómero III reaccionaba a una velocidad igual al doble de la correspondiente al isómero I. Sin embargo, existen evidencias que indican que el uroporfirinógeno IV puede ser mejor sustrato que el uroporfirinógeno III (San Martín de Viale y col., 1976).

La detección de intermediarios de 7, 6 y 5 grupos carbonilos en la formación enzimática de coprogen III, los cuales



se convertían rápidamente en coproporfirinógenos, ha permitido sugerir que el proceso ocurre en etapas. En base a estudios acerca del comportamiento electroforético de la enzima aislada de hemolizados de eritrocitos, Mauzerall y Granick (1958) concluyeron que existiría sólo una proteína enzimática involucrada en esta reacción; Batlle (1973) obtuvo resultados similares. Sin embargo, este aspecto aún no está totalmente dilucidado. Estos resultados son concordantes con los encontrados para la Decarboxilasa parcialmente purificada de eritrocitos de ave (Tomio y col., 1970) y humanos (Elder y Tovey, 1977).

En 1956, Falk y col. aislaron de orina de pacientes con Porfiria Cutánea Tarda una porfirina heptacarboxílica tipo III. Años más tarde, Batlle y Grinstein (1964), incubando hemolizados de eritrocitos con ALA o PBG lograron aislar esa misma porfirina. Battersby y col. (1974) también encontraron una porfirina heptacarboxílica tipo III en una mezcla de incubación conteniendo PBG y un sistema entero de eritrocitos de ave. Además, cuando la Decarboxilasa parcialmente purificada de eritrocitos de pollo o humanos fue incubada con uroporfirinógeno III, el principal producto obtenido fue una porfirina conteniendo 7 grupos carboxilos (Tomio y col., 1970; Stevens, 1971). La existencia de esta porfirina, para la cual se ha propuesto el nombre de firiaporfirina, sugiere la formación de un porfirinógeno heptacarboxílico como intermediario en la decarboxilación enzimática de uroporfirinógeno III a coproporfirinógeno III.

En los desórdenes del metabolismo del hemo, conocidos como porfirias, se excretan grandes cantidades de porfirinas con 7, 6 y 5 grupos carboxilos. En la Porfiria Cutánea Tardía la principal porfirina excretada es una heptacarboxílica de tipo III y pequeñas cantidades de hexa y pentaporfirinas. También, en orina y heces de ratas intoxicadas con hexaclorobenceno, pueden medirse cantidades relativamente importantes de uro, copro, hepta, hexa y pentaporfirinas tipo III (San Martín de Viale y Grinstein, 1968; Elder, 1972).

El grupo de Jackson, aisló e identificó las porfirinas de 7, 6 y 5 grupos carboxilos, excretadas en las heces de ratas tratadas con hexaclorobenceno; y de ese modo logró establecer la ruta natural de decarboxilación del urogen III a coprogen III. En forma teórica se puede especular que serían 24 las secuencias a través de 14 intermediarios posibles (4 porfirinas heptacarboxílicas, 6 hexacarboxílicas y 4 pentacarboxílicas) que podrían formarse por sucesivas decarboxilaciones de las cua

tro cadenas acetato a los correspondientes restos metilo. Jackson y col. (1976) resolvieron este problema llevando a cabo la síntesis química de los 14 derivados probables, procediendo luego a su decarboxilación enzimática *in vitro* y analizando los productos obtenidos. En base a estos resultados propusieron que el proceso de decarboxilación enzimática del urogen III ocurriría de modo tal que el sustrato, ubicado en el sitio activo de la enzima, se movería sobre la superficie de la misma siguiendo el sentido de las agujas del reloj. La reacción se iniciaría en el anillo D y continuaría luego con los anillos A, B y C hasta formar el coprogen III (Figura II.9.). No obstante, debe mencionarse que existen evidencias experimentales que sugieren que este estricto proceso de decarboxilación no es indispensable para la formación de coproporfirinógenos (Jackson y col., 1976; Eriksen y Eriksen, 1977).

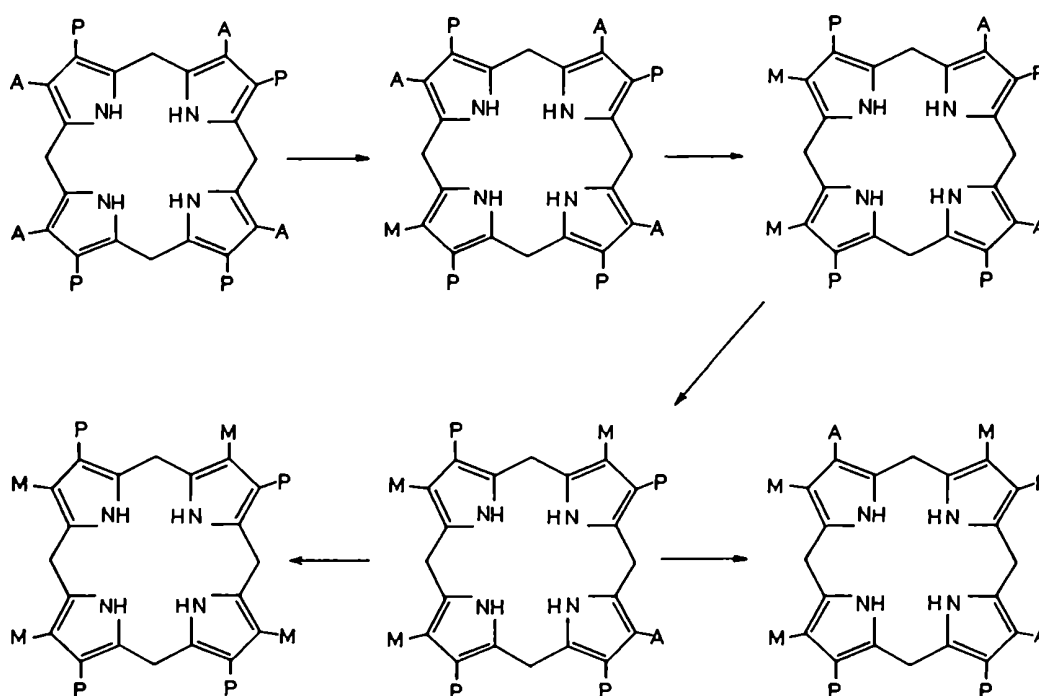


Figura II.9.: Decarboxilación enzimática del uroporfirinógeno III.

En contraste con esta ruta ordenada para el caso de la serie isomérica III, cuando la Uro-Dcasa actúa sobre el uroporfirinógeno I para transformarlo en coprogen I, el proceso ocu-

rre por cualquiera de las dos rutas posibles de modo que el camino es ahora inespecífico (Figura II.10.).

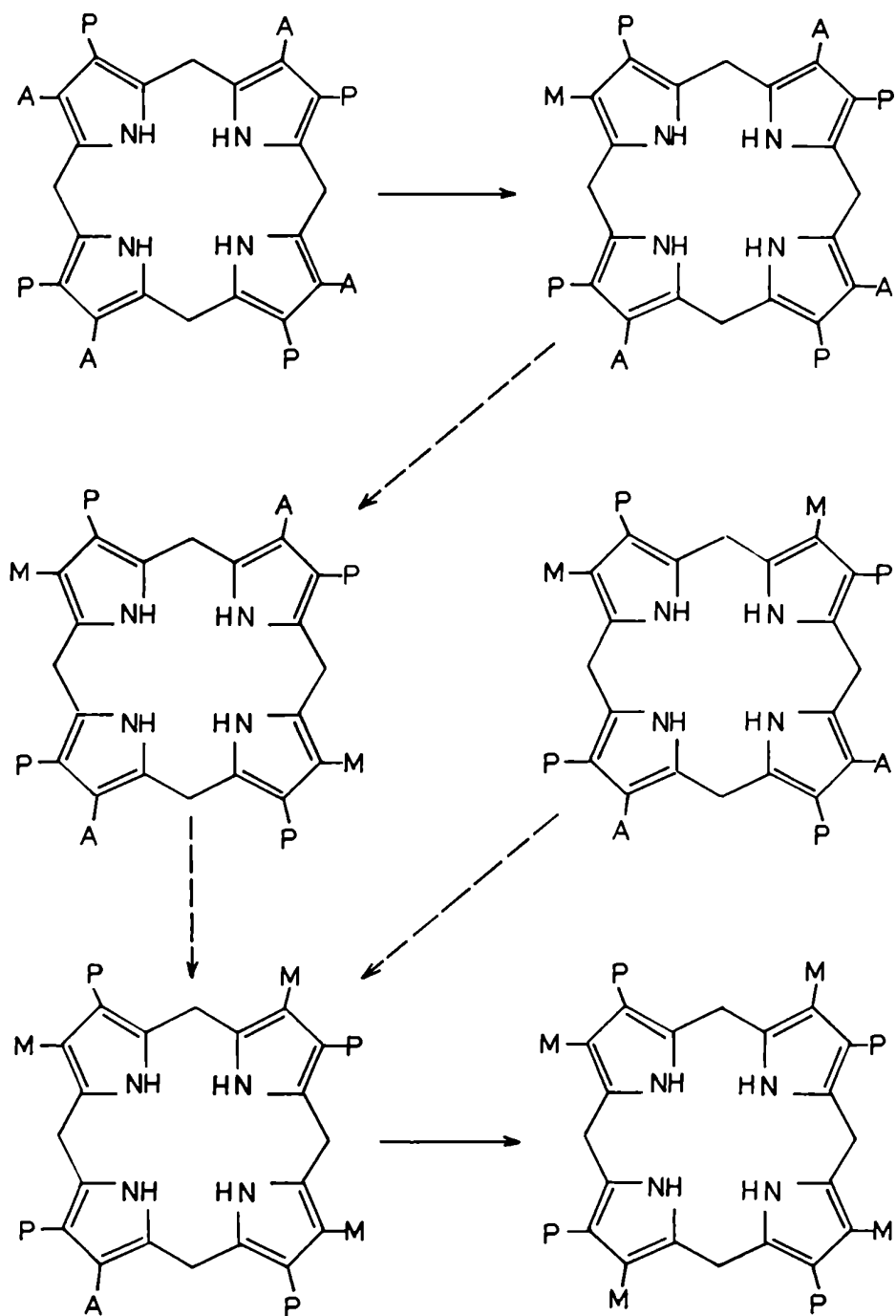


Figura II.10.: Decarboxilación enzimática del uroporfirinógeno I en coproporfirinógeno I.

El empleo de sustratos marcados ha contribuido al estu-

dio del mecanismo de decarboxilación enzimática de uroporfirinógenos. Por incubación de (R)- 2-<sup>3</sup>H,2-<sup>2</sup>H ácido succínico con un hemolizado de sangre, aislamiento del hemo tritiado y deutera-do, oxidación del hemo a ácido hematinico y posterior degrada-ción de este último a (S)- 2-<sup>3</sup>H,2-<sup>2</sup>H ácido acético, se ha podi-do demostrar que la decarboxilación tiene lugar con una comple-ta retención de la configuración de los grupos β-metilo (Bar-nard y Akhtar, 1975) (Figura II.11.). Estos resultados indican que la reacción de decarboxilación y la protonación son estereo-específicas y además enzimáticas. En la Figura II.12. se ilus-tra un mecanismo posible para la decarboxilación de uroporfiri-nógeno.

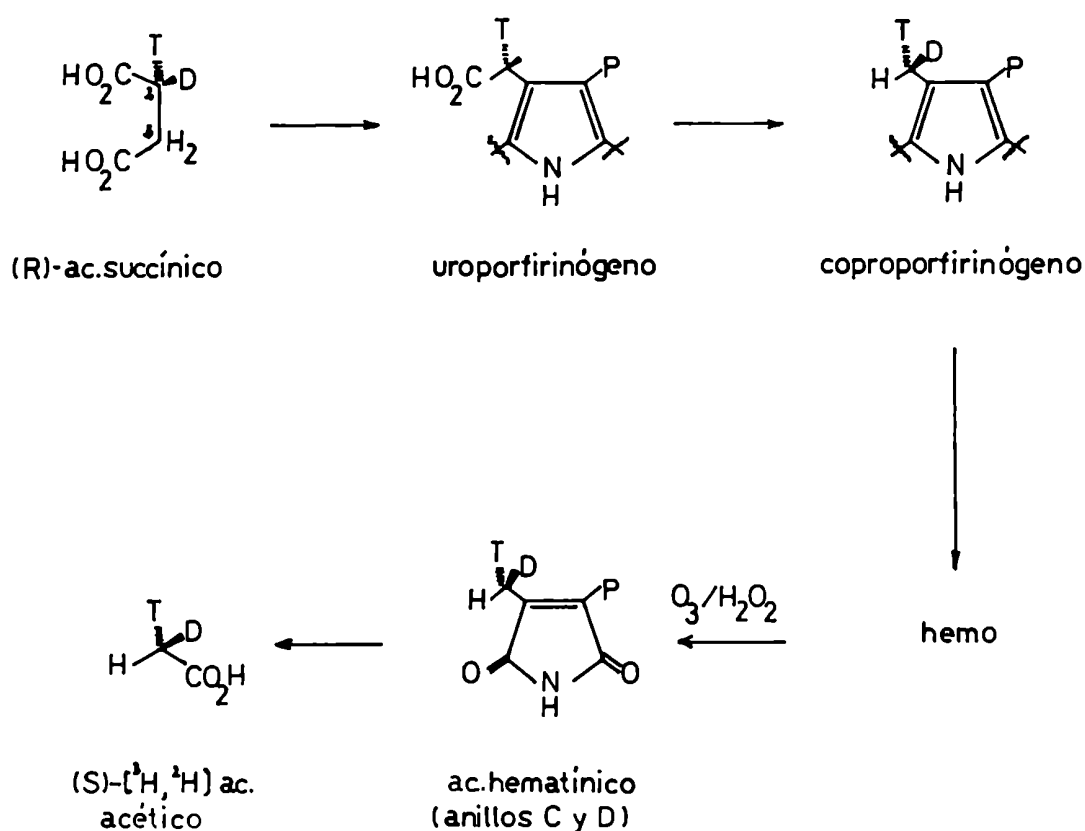


Figura II.11.: Retención de la configuración durante la decarboxilación de uroporfirinógenos

### II.3.7. Coproporphirinogenasa

La siguiente etapa en el camino biosintético del hemo, o sea, la formación de protoporfirinógeno IX a partir de copro

gen III, está catalizada por la enzima Coproporfirinogenasa (CPG-asa), Coproporfirinógeno oxidasa o coprogenasa (Batlle y col., 1965). En esta reacción tiene lugar la decarboxilación oxidativa de los dos restos de ácido propiónico ubicados en las posiciones 2 y 4 de los anillos A y B del coproporfirinógeno, a dos restos vinilo (Figura II.13.).

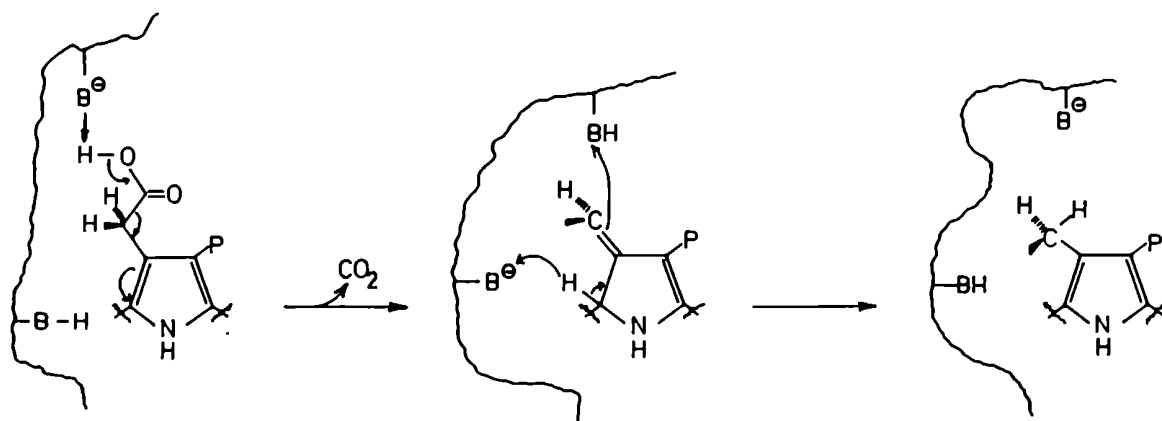


Figura II.12.: Mecanismo de decarboxilación del uroporfirinógeno.

La Coprogenasa ha sido estudiada en fuentes muy diversas, tales como *Chlorella vulgaris* (Granick, 1955), hemolizados de eritrocitos de aves (Dresel y Falk, 1956), *Euglena gracilis* (Granick y Mauzerall, 1958 b), hígado vacuno (Sano, 1958; Sano y Granick, 1961; Porra y Falk, 1964), hígado de rata (Batlle y col., 1965; Elder y col., 1978; Grandchamp y col., 1978), *Rhodopseudomonas spheroides* y otras bacterias (Mori y Sano, 1968; Jacobs y col., 1970; Tait, 1972), hojas de tabaco (Hsu y Miller, 1970), *Saccharomyces cerevisiae* (Miyake y Sugimura, 1968; Poulson y Polglase, 1974 a), linfocitos humanos (Grandchamp y Nordmann, 1977) y bazo de rata (Kardish y Woods, 1980), siendo en todos estos casos una enzima particulada.

Poco se conoce acerca de las propiedades moleculares de la CPG-asa. Batlle y col. (1965) encontraron que la enzima mitocondrial de hígado de rata, purificada 60 veces, se comportaba electroforéticamente como una preparación homogénea con un PM de alrededor de 80.000 daltons. En este caso se observó inhibición de la actividad enzimática en presencia de o-fenantrolina y  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo, efecto revertido por diálisis. En cambio, la actividad de la CPG-asa de hígado vacuno no disminuyó signi

ficativamente por acción del  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo (Sano y Granick, 1961). La enzima proveniente de bacterias (Tait, 1972) se presentó como una proteína única de PM 44.000 y su actividad no se vió afectada aún a concentraciones altas de o-fenantrolina y  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo.

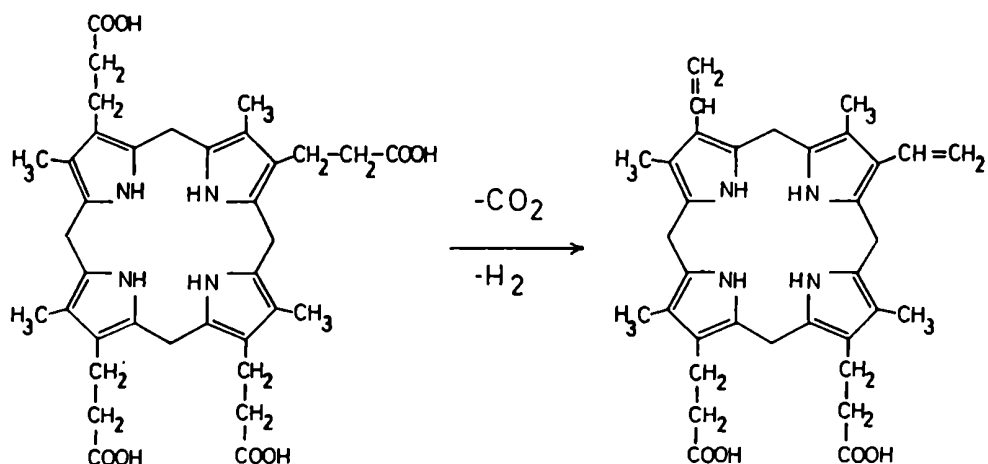


Figura II.13.: Formación de protoporfirinógeno IX a partir de coprogen III.

Esta enzima tiene, en general, un requerimiento absoluto por oxígeno molecular el cual actúa como aceptor terminal de electrones (o aceptor de hidruros) durante la decarboxilación oxidativa de las cadenas laterales de ácido propiónico. Sin embargo, en *Chromatium* cepa D y *Rp. spheroides* se detectó actividad de Coprogenasa en ausencia de oxígeno. Para que dicha actividad se manifestara era necesaria la presencia de dos proteínas (una de ellas en el sobrenadante de 105.000 x g y la otra en el pellet), de los nucleótidos de nicotinamida, de ATP, Mg<sup>2+</sup> y metionina o 5-adenosil-metionina. También en este caso, o-fenantrolina y  $\alpha, \alpha'$ -dipiridilo se comportaron como inhibidores actuando a nivel de la cadena de transporte de electrones y no sobre la enzima misma. La CPG-asa aislada de cultivos aeróbicos de *Saccharomyces cerevisiae* exhibió actividad cuando se la incubó en anaerobiosis con coprogen III, en presencia de sulfato ferroso, L-metionina, ATP y NADP (Poulson y Polglase, 1974 b). Así, aún cuando bajo condiciones aeróbicas, la enzima

empleaba al oxígeno como aceptor de hidruros, en anaerobiosis, un nucleótido (NADP) era capaz de reemplazarlo cuando los cofactores necesarios estaban presentes en el sistema.

La Coproporfirinogenasa es altamente específica para el coprogen III y no decarboxila al isómero I, razón por la cual en la naturaleza sólo se ha encontrado a la protoporfirina IX. No obstante, esta enzima presenta un amplio espectro de sustratos cuando se la analiza *in vitro*. Si bien el coprogen II no es sustrato de la oxidasa, existen evidencias que indican que el coprogen IV es un sustrato más eficiente que el correspondiente isómero III (Frydman y Frydman, 1975). Trabajando con un extracto crudo de eritrocitos de pato, se observó que el coprogen IV era decarboxilado con un rendimiento del 52% en tanto que para el coprogen III, éste fue del 45%. Al-Hazimi y col. (1976) y Elder y Evans (1978) obtuvieron resultados similares para la enzima de hemolizados de pollo y mitocondrias de hígado de rata, respectivamente.

Otros porfirinógenos naturales y sintéticos tales como el correspondiente a la porfirina pentacarboxílica (Figura II.9.), el harderoporfirinógeno, isoharderoporfirinógeno, deuteroporfirinógeno IX-4-ácido propiónico, mesoporfirinógeno VI y un porfirinógeno tricarbóxico (e) (Buldain y col., 1977) también actúan como sustratos de la enzima. Aún el 2,4-bis( $\beta$ -ácido hidroxipropiónico) deuteroporfirinógeno IX, en el cual las cadenas laterales reactivas de ácido propiónico están reemplazadas por  $\beta$ -hidroxipropionatos, es sustrato de la oxidasa (Sano, 1966) (Figura II.14.).

El trans-2,4 diacrilato deuteroporfirinógeno, mesoporfirinógeno IX, hematoporfirinógeno IX, isocoproporfirinógeno y como ya mencionamos el coprogen I y II no se comportaron como sustratos de la CPG-asa (Figura II.14.). Resulta evidente entonces que es muy difícil imponer restricciones estrictas acerca de la naturaleza y arreglo específico de los sustituyentes que van a ser reconocidos por la oxidasa. Jackson y col. (1976) han propuesto que "el grupo propionato del coprogen III sólo será decarboxilado por la Coprogen oxidasa si se encuentra rodeado por dos grupos metilo tales que, a su vez, uno de ellos tenga como vecino otro grupo metilo, un grupo vinilo, una posición no sustituida o, posiblemente, un grupo etilo".

A partir de diversas fuentes naturales y biosintéticas se ha logrado aislar una porfirina tricarbóxico, detectada

por primera vez en glándula de Harder (Kennedy, 1954; Tomio y Grinstein, 1968), razón por la cual se la denominó harderoporfirina; su estructura se confirmó mediante síntesis química (Kennedy y col., 1970). Este intermediario es un derivado de la coproporfirina en el cual el resto propiónico de la posición 2 del anillo A está sustituido por un vinilo; esta estructura es idéntica, por otra parte, a la porfirina tricarbóxica aislada de eritrocitos humanos (Eriksen, 1955). Utilizando extractos de *Euglena gracilis* (Cavaleiro y col., 1973, 1974) o hemolizados de eritrocitos de aves (Games y col., 1976) con hardero o isoharderoporfirinógenos sintéticos se observó incorporación de ambos en la protoporfirina, aunque con mayor eficiencia para el primero de ellos. Estos resultados han sugerido que la decarboxilación oxidativa de los restos propionato ocurre en etapas, comenzando por el sustituyente en posición 2 del anillo A y siguiendo luego por el del anillo B. De esta manera, análogamente a lo postulado para la Decarboxilasa, la Coprogenasa actuaría siguiendo el sentido de las agujas del reloj (Figura II.15.).

Por otra parte, cuando los hidrógenos de los restos propiónico del coprogen III se marcaron con tritio, se observó la pérdida de sólo un tritio durante la conversión a protoporfirina. Además, el hecho de que sólo el pro-S-hidrógeno del propiónico del C<sub>2</sub> del coprogen estuviese comprometido, demostró la naturaleza estereoespecífica del proceso (Zaman y col., 1972) (Figura II.16.). Battersby y col. (1972) obtuvieron resultados similares marcando los hidrógenos de los grupos propionato del coprogen III con deuterio. En este caso, el deuterio fue retenido en los grupos metileno adyacentes a los grupos carboxilos, después de la decarboxilación a vinilos. Estos resultados son consistentes con una propuesta anterior de Sano (1966) la cual sugería que la hidroxilación de las cadenas laterales de ácido propiónico, debía preceder a la deshidratación decarboxilativa (Figura II.17.; X = OH). Los resultados enzimáticos obtenidos empleando 2,4-bis(β-hidroxi propiónico)deuteroporfirinógeno IX revelaron que un ácido del tipo hidroxipropiónico podría ser un intermediario de la reacción. Sin embargo, este supuesto intermediario no pudo aislarse a partir de mezclas de incubación. Además, el hecho de que la reacción pueda ocurrir también en anaerobiosis indica que la existencia de un derivado β-hidroxiácido es muy improbable. Por lo tanto, parece razonable aceptar



que el hidrógeno  $\beta$  (Figura II.17.; X = H) se pierde durante el proceso de oxidación, sin formación de un  $\beta$ -hidroxiácido. En base a este mecanismo y contrariamente a lo que se había sugerido, el porfirinógeno S-411 (precursor de la porfirina S-411 aislada de Meconium, Figura II.18.) no sería un intermediario normal en el metabolismo de la protoporfirina IX. De ser así, el porfirinógeno S-411 provendría de la oxidación de la cadena de ácido propiónico del C-2 del coprogen III en aquellos casos en que la decarboxilación simultánea está bloqueada, originándose así una rama lateral del camino metabólico principal.

#### II.3.8. Protoporfirinógeno IX $\alpha$ -oxidasa

Uno de los últimos pasos en la biosíntesis del hemo consiste en la eliminación de seis átomos de hidrógeno del protoporfirinógeno IX, con la consecuente formación de protoporfirina IX. Si bien esta reacción puede ocurrir no-enzimáticamente, Poulson y Polglase (1975) y Poulson (1976) confirmaron su naturaleza enzimática aislando la proteína responsable de este proceso: la Protoporfirinógeno IX oxidasa (Protogen-ox) a partir de mitocondrias de hígado y levadura.

La enzima de mamíferos tiene un peso molecular de 180.000 y presenta un requerimiento absoluto por oxígeno, el cual no puede ser reemplazado por otros aceptores de electrones. Jacobs y Jacobs (1975, 1976) midieron actividad de Protogen-ox en condiciones aeróbicas y demostraron que la reacción podía ocurrir también anaeróbicamente empleando fumarato como aceptor alternativo de electrones. En este caso, la oxidación anaeróbica del protoporfirinógeno está acoplada a la reducción del fumarato a través de intermediarios de la cadena de transporte de electrones, específicamente quinonas (Jacobs y Jacobs, 1977 a y b, 1978). Teniendo en cuenta estos hallazgos, Jacobs y Jacobs (1979) han juzgado poco probable un mecanismo de acción enzimático que requiera oxígeno molecular postulando, en cambio, que la cadena de transporte de electrones debe desempeñar un rol importante en esta oxidación.

En 1973, Poulson y Polglase detectaron en *Saccharomyces cerevisiae* un pigmento que presentaba una banda típica de absorción a 503 nm por lo cual lo llamaron P<sub>503</sub> y sugirieron que se trataba de un posible intermediario en la biosíntesis de proto

porfirina IX. Ya en 1967, Labbe y col. habían reportado en esta misma levadura, la presencia de un pigmento que por su espectro de absorción y reacciones químicas se comportaba como una tetra hidroporfirina la cual podría provenir de la reducción de la protoporfirina IX o auto-oxidación de protoporfirinógeno IX. El pigmento P<sub>503</sub> también ha sido encontrado en *E. coli* (Oelden y Hempling, 1973) y paralelamente, Kamitakahara y col. (1973) lo identificaron como una prototetrahidroporfirina IX. De acuerdo con estos hallazgos, resulta probable que la reacción ocurra en dos etapas. En la primera de ellas se formaría el intermediario prototetrahidroporfirina IX por autooxidación del protogen IX y en la segunda, donde se requiere la remoción de 4 H, interveniría la Protogen oxidasa (Figura II.19.).

La Protogen-ox es una enzima mitocondrial. Experiencias realizadas en levaduras indican que esta enzima se forma en las mitocondrias y no en el citoplasma ya que si las células se hacen crecer en presencia de cicloheximida, hay actividad enzimática en la fracción mitocondrial y no ocurre lo mismo cuando las células crecen en cloramfenicol (Poulson y Polglase, 1974). Es una proteína de naturaleza sulfhidrúlica que no utiliza al co-progen I ni al III ni tampoco al urogen I o III como sustratos.

### II.3.9. Ferroquelatasa

La enzima Ferroquelatasa (Rimington, 1958) también denominada Protohemo-ferroliasa o Hemo-sintetasa, cataliza la incorporación de Fe<sup>2+</sup> en la protoporfirina IX y otras porfirinas dicarboxílicas (Labbe y col., 1963; Porra y Jones, 1963 a, b y c). Se completa así la biosíntesis del hemo, el cual pasa luego a formar parte de las diversas hemoproteínas del organismo.

Se trata de una enzima particulada que se encuentra en las mitocondrias de células animales, en los cloroplastos de vegetales y en los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas. Mc Kay y col. (1969) la hallaron fuertemente asociada a la membrana interna de la mitocondria de hígado de rata. La presencia de Ferroquelatasa ha sido demostrada directamente en preparaciones libres de células de una gran variedad de fuentes, tales como eritrocitos de aves (Krueger y col., 1956), médula ósea (Kasuga y col., 1954), reticulocitos (Clark y Walsh, 1959), hígado, riñón y bazo de mamíferos (Lockhead y Goldberg, 1961), en las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (Porra y Jones, 1963 b

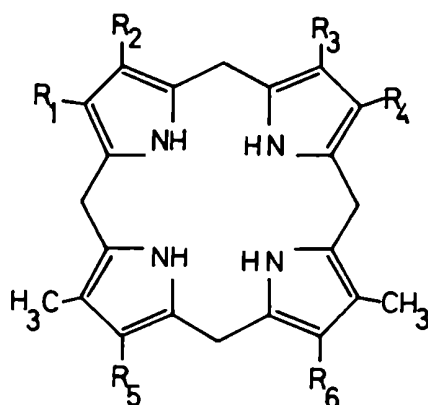
y c) y *Torulopsis utilis* (Porra y Ross, 1965), en una gran variedad de bacterias (Porra y Jones, 1963 b y c) y en las bacterias fotosintéticas *Chromatium* (Porra y Jones, 1963 b y c) y *Rp. spheroides* (Porra y Lascelles, 1965). Se ha detectado además, actividad de esta enzima en glóbulos rojos humanos: anemias hemolíticas (Grinstein y col., 1959), anemia perniciosa (Lockhead y Goldberg, 1961), en varios otros desórdenes metabólicos (Vavra y col., 1964) y también en sangre humana normal (Langelaan y col., 1969).

Como ya se mencionó, el Fe (II) es el sustrato para la enzima *in vivo* pero, según parece, el cinc y el cobalto se insertan en la protoporfirina por acción de la Ferroquelatasa, en animales tratados con Pb y Co (Lamolla y Yamame, 1974; Sinclair y col., 1979). Estudios previos han demostrado que metales tales como Zn, Co, Cu, Mn y también el Fe, pueden ser utilizados como sustratos para la enzima cruda (Labbe y Hubbard, 1961; Jones y Jones, 1969, 1970). Sin embargo, no existen en este caso evidencias directas de que la Ferroquelatasa sintetice *in vivo* estas metaloporfirinas. Taketani y Tokunaga (1981, 1982) trabajando con las enzimas purificadas de hígado bovino y de rata encontraron que no sólo el Fe sino también el Zn, Co y Ni actuaban como sustratos de las mismas. Así, los datos provenientes de diversas fuentes (Porra y Ross, 1965; Goldin y Little, 1969; Jones y Jones, 1970) indican que la Ferroquelatasa reacciona con una amplia gama de metales aunque pueden existir diferentes afinidades.

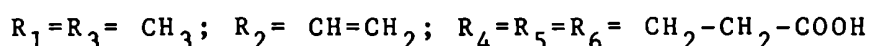
En cuanto a la especificidad por la porfirina, se observa que no son esenciales los grupos vinilo ubicados en la posición 2 y 4 de la protoporfirina, ya que las meso y deuteroporfirinas en las cuales los vinilos están sustituidos por etilos e hidrógenos respectivamente, también son buenos sustratos. En cambio, los grupos carboxilo libres del ácido propiónico parecen ser indispensables, pues cuando están bloqueados, los derivados no son tan efectivos como sustratos (Heikel y col., 1958); tampoco lo son los porfirinógenos ni las porfirinas parcialmente reducidas.

Labbe y col. (1968) y Porra y Jones (1963 a) han sugerido para esta enzima la existencia de dos sitios activos, uno para el metal y otro para la porfirina. Si bien todavía no se ha demostrado la participación de cofactores en esta reacción, Labbe (1976) propuso que la Ferroquelatasa requeriría fosfato de

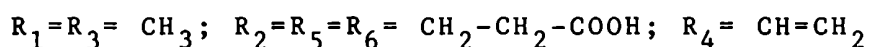
piridoxal para manifestar su actividad aunque se desconoce aún el mecanismo involucrado.



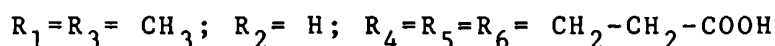
a) harderoporfirinógeno:



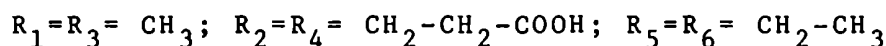
b) isoharderoporfirinógeno:



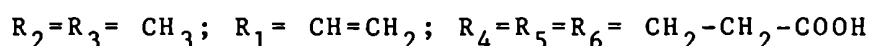
c) deuteroporfirinógeno IX-4-ácido propiónico:



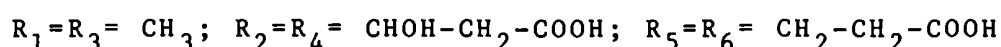
d) mesoporfirinógeno VI:



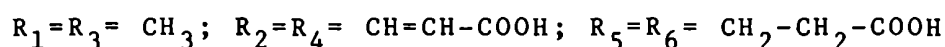
e) porfirinógeno tricarbóxico:



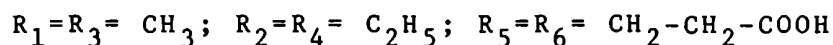
f) 2,4-bis( $\beta$ -ácido hidroxipropiónico)deuteroporfirinógeno IX:



g) trans-2,4-diacrilato deuteroporfirinógeno:



h) mesoporfirinógeno IX:



i) hematoporfirinógeno IX:

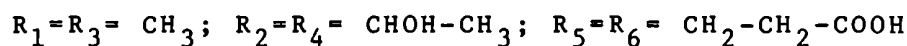


Figura II.14.: Porfirinógenos naturales y sintéticos ensayados como sustratos de la Coprogenasa

Figura II.15.: Decarboxilación oxidativa secuencial del coproporfirinógeno III

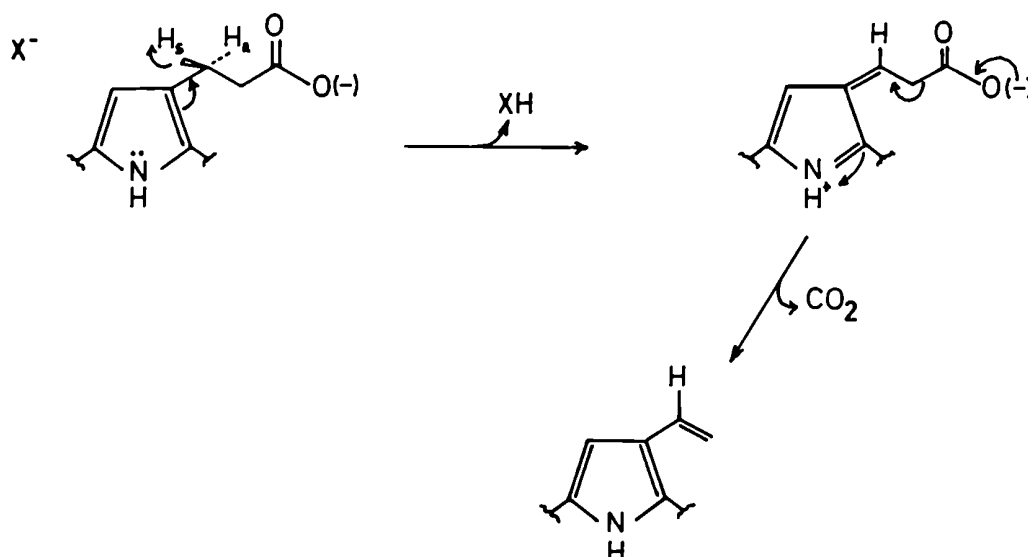


Figura II.16.: Estereoespecificidad de la decarboxilación enzimática del coproporfirinógeno III.

En la mayoría de los tejidos estudiados, la reacción enzimática tiene lugar en anaerobiosis o en presencia de agentes reductores tales como ácido ascórbico, GSH o CiSH (Nishida y Labbe, 1959; Labbe y Hubbard, 1961 b; Porra y Jones, 1963 b). Estos resultados sugieren la presencia de grupos -SH esenciales para la catálisis.

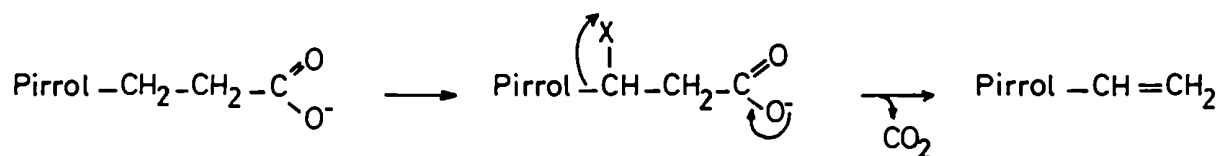


Figura II.17.: Mecanismo de decarboxilación enzimática de co-proporfirinógenos

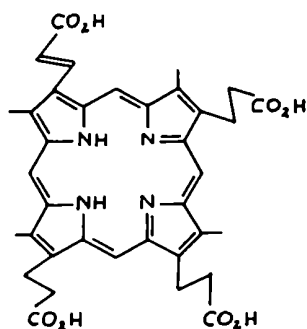


Figura II.18.: Estructu  
ra del  
porfiri-  
nógeno  
S-411

La Ferroquelatasa presenta, en algunos casos, las características de una lipoproteína (Mazanowska y col., 1969). Se ha encontrado que el agregado de solventes orgánicos aumenta su actividad (Mazanowska y col., 1966) posiblemente facilitando el acceso del sustrato al sitio activo. Takeshita y col. (1970) postularon que un fosfolípido cargado participaría en la activación de la enzima y Taketani y Tokunaga (1981, 1982) comprobaron que la enzima purificada de hígado de rata contenía una cantidad considerable de ácidos grasos en tanto que la de hígado bovino, no. Estos últimos autores observaron que el agregado de lípidos producía un aumento de la actividad de ambas enzimas siendo menor el efecto sobre la bovina.

Mediante la aplicación de técnicas convencionales, Taketani y Tokunaga (1981, 1982) determinaron el PM de las enzimas de hígado bovino y de rata; así, los valores obtenidos empleando la técnica de filtración en geles (Sepharosa 6B) fueron

200.000 y 240.000 daltons en tanto que por electroforesis con dodecilsulfato de sodio, los pesos moleculares resultaron ser 42.500 y 42.000. En base a estos hallazgos, los autores postularon que la Ferroquelatasa sería un oligómero constituido por 4 ó 5 subunidades. Por otra parte, los PM's calculados para las enzimas de bacterias (*Spirillum itersonii*) y de plantas (cebada) fueron de 48.000 y 55.000-65.000 lo cual sugiere que la Ferroquelatasa proveniente de estas fuentes, es una enzima monomérica (Goldin y Little, 1969; Dailey, 1977).

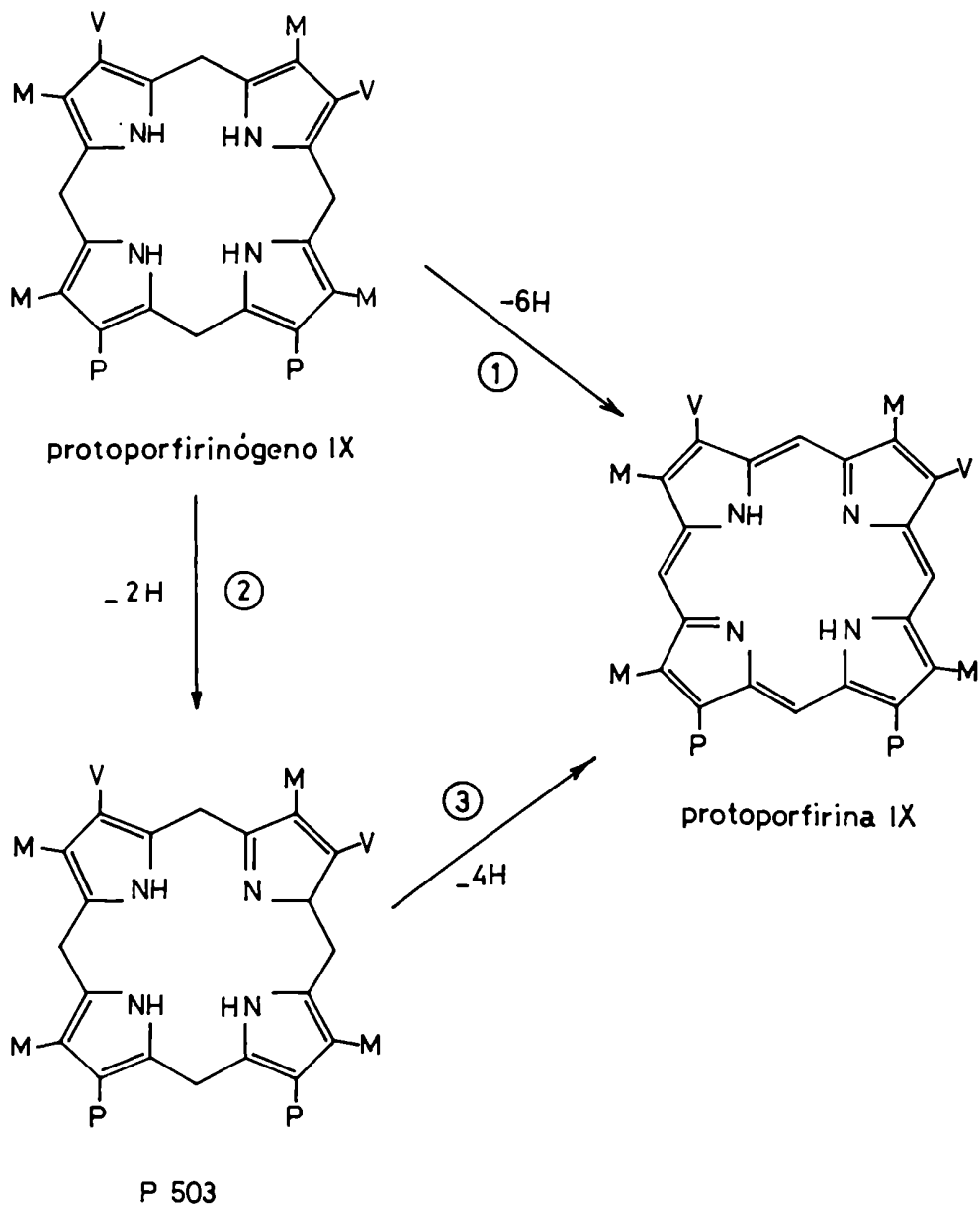


Figura II.19.: Esquema para la formación de protoporfirina IX a partir de protoporfirinógeno IX

#### II.4. Referencias

- Al-Hazimi, H.M.G.; Jackson, A.H.; Ryder, D.J.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976), J.Chem. Soc. Chem. Commun., 188.
- Aragonés, A.; García, R.; San Martín de Viale, L.C.; Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1972), An. Asoc. Qca. Arg. 60, 239.
- Bagdasarian, M. (1958), Nature 181, 1399.
- Barnard, G.F. & Akhtar, M. (1975), J. Chem. Soc. Chem. Commun. 994.
- Barreiro, O.L.C. de (1967), Biochim. Biophys. Acta 139, 479.
- Batlle, A.M. del C. (1973), Bioquímica Clínica 7, 309.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964), Biochim. Biophys. Acta 82, 13.
- Batlle, A.M. del C. & Stella, A.M. (1978), Int. J. Biochem. 9, 861.
- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965), Biochem. J. 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Ferramola, A.M. & Grinstein, M. (1967), Biochem. J. 64, 80.
- Batlle, A.M. del C.; Llambías, E.; Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H. (1975), Int. J. Biochem. 38, 591.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978), Int. J. Biochem. 9, 401.
- Battersby, A.R.; Baldas, J.; Collins, J.; Grayson, D.H.; James, K.J. & Mc Donald, E. (1972), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1265.
- Battersby, A.R.; Hunt, E.; Ihara, M.; Mc Donald, E.; Paine III, J.B.; Satoh, F. & Saunders, J. (1974), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 994.
- Beale, S.I. (1971), Plant Physiol. 48, 316.
- Beale, S.I. (1978), Ann. Rev. Plant Physiol. 29, 95.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1973), Biochem. Biophys. Res. Commun. 52, 143.
- Beale, S.I. & Castelfranco, P.A. (1974), Plant Physiol. 53, 297.
- Beale, S.I.; Gough, S.P. & Granick, S. (1975), Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2714.
- Block, K. & Rittenberg, D. (1945), J. Biol. Chem. 159, 45.
- Bogorad, L. (1955), Science, 121, 878.
- Bogorad, L. (1958), J. Biol. Chem. 233, 516.



- Browimie, E. & Bridger, W.A. (1972) *Can. J. Biochem.* 7, 720.
- Buldain, G.; Hurst, J.; Frydman, R.B. & Frydman, B. (1977), *J. Org. Chem.* 42, 2953.
- Burnham, B.F. (1963), *Acta Chem. Scand.* 17, 123.
- Cavaleiro, J.; Kenner, G. & Smith, K. (1973), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 183.
- Cavaleiro, J.; Kenner, G. & Smith, K. (1974), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1188.
- Clark, R. & Walsh, R.J. (1959), *Nature, Lond.* 184, 1730.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1953), *Chemical Constitution Nature* 171, 875.
- Cornford, P. (1964), *Biochem. J.* 91, 64.
- Dailey, H.A. (1977), *J. Bacteriol.* 132, 302.
- Dresel, E.I.B. & Falk, J.E. (1953), *Nature* 172, 1185.
- Dresel, E. & Falk, J. (1956), *Biochem. J.* 63, 80.
- Elder, G.H. (1972), *Biochem. J.* 126, 877.
- Elder, G.H. (1982) Abstracts-VIII th Tetrapyrrole Meeting-Southampton.
- Elder, G.H. & Evans, J.O. (1978), *Biochem. J.* 169, 205.
- Elder, G.H. & Tovey, J.A. (1977), *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1470.
- Elder, G.H.; Evans, J.O.; Jackson, J.R. & Jackson, A.H. (1978), *Biochem. J.* 169, 215.
- Elder, G.H.; Tovey, J.A. & Sheppard, D.M. (1983), *Biochem. J.* 215, 45.
- Eriksen, L. (1955), "CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" (Westenholme, G. & Miller, E., eds.) Churchill, London, p. 154.
- Eriksen, L. & Eriksen, N. (1977), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 37, 357.
- Falk, J.E.; Dresel, E.I.B.; Benson, A. & Knight, B. (1956), *Biochem. J.* 63, 87.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1975), *FEBS Lett.* 52, 317.
- Games, D.; Jackson, A.H.; & Jackson, J.R. (1976), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 187.
- Gibson, K.D.; Laver, W.G. & Neuberger, A. (1958), *Biochem. J.* 70, 71.
- Gibson, K.D.; Mattew, M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1961), *Nature* 192, 204.
- Goldin, B.R. & Little, H.N. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 171, 321.

- Grandchamp, B. & Nordmann, Y. (1977), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 74, 1089.
- Grandchamp, B.; Phung, N. & Nordmann, Y. (1978), *Biochem. J.* 176, 97.
- Granick, S. (1955), "CIBA Foundation Symposium on Porphyrin Biosynthesis and Metabolism" (Wolstenholme, G. y Miller, E.C. P., eds.) London, p. 143.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 a), *J. Biol. Chem.* 232, 1119.
- Granick, S. & Mauzerall, D. (1958 b), *Fed. Proc.* 17, 233.
- Granick, S. & Sassa, S. (1971), "Metabolic Regulation" (Vogel, H.J., ed.) *Metabolic Pathways*, Academic Press, New York 5, p. 77.
- Grinstein, M.; Bannerman, R.M. & Moore, C.V. (1959) *Blood* 14, 476.
- Grinstein, M.; Kamen, M.D.; Wikoff, H.M. & Moore, C.V. (1950), *J. Biol. Chem.* 174, 767.
- Hager, L.P. (1962), "The Enzymes" (Boyer, P.D.; Lardy, H. y Myrback, K. eds.) 2nd rev. ed., Academic Press, New York, vol. 6, p. 387.
- Harel, E. & Klein, S. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49, 364.
- Hayashi, N.; Yoda, B. & Kikuchi, G. (1969), *Arch. Biochem. Biophys.* 131, 83.
- Heikel, T.; Lockwood, W. & Rimington, C. (1958), *Nature*, London 182, 313.
- Hift, H.; Onellet, L.; Littlefield, J.W. & Sanadi, D.R. (1953), *J. Biol. Chem.* 204, 565.
- Ho, Y.K. & Lascelles, J. (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 734.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 a), *Nature* 181, 1592.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1958 b) *Biochem. J.* 69, 518.
- Hsu, W. & Miller, G. (1970), *Biochem. J.* 117, 215.
- Jackson, A.H.; Jones, D.M.; Smith, S.G. & Elder, G.H. (1976), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 322.
- Jackson, A.H.; Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Evans, N.; Games, D.E.; Matlin, S.A.; Elder, G.H. & Smith, S.G. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London*, 273, 191.
- Jacobs, N.Y. & Jacobs, J.M. (1975), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 435.

- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1976), *Biochim. Biophys. Acta* 449, 1.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 a) *Biochim. Biophys. Acta* 459, 141.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1977 b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 78, 429.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 544, 540.
- Jacobs, N.J. & Jacobs, J.M. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.* 197, 396.
- Jacobs, N.J., Jacobs, J.M. & Brent, P. (1970) *J. Bacteriol.* 102, 398.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1969) *Biochem. J.* 113, 507.
- Jones, M.S. & Jones, O.T.G. (1970) *Biochem. J.* 119, 453.
- Jordan, P. & Seehra, J. (1980), *FEBS Lett.* 114, 283.
- Kamitakahara, R.; Pearlstone, J.; Poulson, R. & Polglase, W. (1973), *Can. J. Microbiol.* 19, 1239.
- Kardish, R.M. & Woods, J.S. (1980) *J. Appl. Biochem.* 2, 168.
- Kasuga, S.; Konno, K. & Sakai, Y. (1954) *J. Jap. Biochem. Soc.* 26, 282.
- Kaufman, S. (1951), "Phosphorus metabolism" (Mc Elvery, ed.) W. Grass Baltimore, U.S.A. vol. 1, p. 370.
- Kaufman, S.; Gelbarg, G.; Cori, O. & Ochoa, S. (1953), *J. Biol. Chem.* 203, 869.
- Kawanishi, S.; Seki, Y. & Sano, S. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 4285.
- Kennedy, G.Y. (1954), Ph.D Thesis, citada por C. Rimington, y G.Y. Kennedy en: "Comparative Biochemistry" (Florkin, M. y Mason, H.A., eds) Academic Press, Lond. (1962), vol 4, p. 557.
- Kennedy, G.Y.; Jackson, A.H.; Kenner, G.W. & Suckling, C.J. (1970), *FEBS Lett.* 6, 9.
- Kikuchi, G.; Kumar, A.; Talmage, P. & Shemin, D. (1958), *J. Biol. Chem.* 233, 1214.
- Kikuchi, G.; Shemin, D. & Bachman, B.J. (1958), *Biochem. Biophys. Acta* 28, 219.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 a) *Photochem. Photobiol.* 27, 203.
- Klein, O. & Senger, H. (1978 b) *Plant Physiol.* 62, 10.
- Klein, O.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 725.

- Koopmann, G.E. & Batlle, A.M. del C. (1987), *Int.J.Biochem.* 4, 373.
- Koopmann, G.E.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1986), *Int. J. Biochem.* 18, 935.
- Kowalski, E.; Dancewicz, A.M. & Szot, Z. (1957), *Bull. Acad. Polon. Sci. II* 5, 223.
- Krueger, R.G.; Melnick, I. & Klein, J.R. (1956), *Arch. Biochem. Biophys.* 64, 302.
- Kushner, J.P.; Steinmuller, D.P. & Lee, G.R. (1975), *J. Clin. Invest.* 56, 661.
- Labbe, R.F. (1976), "Porphyrins in Human Diseases" (M. Doss, ed.) Karger, Basel.
- Labbe, R.F. & Hubbard, N. (1961 a) *Biochim. Biophys. Acta* 52, 130.
- Labbe, R. & Hubbard, N. (1961 b) *Fed. Proc.* 20, 376.
- Labbe, R.F.; Hubbard, N. & Caughey, W.S. (1963), *Biochemistry* 2, 372.
- Labbe, H.; Kurumada, T. & Onisawa, J. (1965), *Biochem. Biophys. Acta* 111, 403.
- Labbe, P.; Volland, C. & Chaix, P. (1967), *Biochim. Biophys. Acta* 143, 70.
- Labbe, P.; Volland, C. & Chaix, P. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 159, 527.
- Lamolla, A.A. & Yamame, T. (1974), *Science (Wash. DC)* 186, 936.
- Langelaan, D.E.; Losowsky, M.S. & Toothill, C. (1969), *Biochem. J.* 101, 17 P.
- Lockhead, A.C. & Goldberg, A. (1961), *Biochem. J.* 78, 146.
- Mauzerall, D. & Granick, S. (1958), *J. Biol. Chem.* 232, 1141.
- Mazanowska, A.M.; Neuberger, A. & Tait, G.H. (1966), *Biochem. J.* 98, 117.
- Mazanowska, A.M.; Dancewicz, A.M.; Malinowska, T. & Kowalski, E. (1969), *Eur. J. Biochem.* 7, 585.
- Mc Kay, R.; Druyan, R.; Getz, G.S. & Rabinowitz, M. (1969), *Biochem. J.* 114, 455.
- Miyake, S. & Sugimura, T. (1968), *J. Bact.* 96, 1997.
- Mori, M. & Sano, S. (1968), *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 32, 610.
- Muir, H.M. & Neuberger, A. (1949) *Biochem. J.* 45, 163.
- Murakami, K.; Mitchell, T. & Nishimura, J.S. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 6247.
- Muthukrishnan, S.; Malathi, K. & Padmanaban, G. (1972), *Biochem. J.* 129, 31.

- Muthukrishnan, S.; Padmanaban, G. & Sarma, P.S. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4241.
- Nandi, D. & Shemin, D. (1968), J. Biol. Chem. 243, 1236.
- Nemeth, A.M.; Russell, C.S. & Shemin, D. (1957), J. Biol. Chem. 229, 415.
- Neuberger, A. & Scott, J.J. (1953), Nature 172, 1093.
- Neuberger, A. & Turner, J.M. (1963), Biochim. Biophys. Acta 67, 342.
- Nishida, G. & Labbe, R. (1959), Biochim. Biophys. Acta 31, 511.
- Nishimura, J.S. & Grinnel, F. (1972), "Advances in Enzymology" (Meister, ed.) Wiley and Son. Chicester, vol. 36, 183.
- Noguchi, T. & Mori, R. (1981), J. Biol. Chem. 10, 335.
- Oelden, M. & Hempfling, L. (1973), J. Bacteriol. 113, 914.
- Palmer, J. & Weddin, R.T. (1966), Biochem. Biophys. Acta 113, 167.
- Patton, G.M. & Beattie, D.S. (1973), J. Biol. Chem. 248, 4467.
- Porra, R.J. & Falk, J. (1964), Biochem. J. 90, 69.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 a), Biochem. J. 87, 181.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 b) Biochem. J. 87, 186.
- Porra, R.J. & Jones, O.T.G. (1963 c) Proc. 8th. Congr. Europ. Soc. Haemat. Lisboa (Lüdin, H., ed.) Basel, N. Y; rk, S. Karger, vol. 2, p. 611.
- Porra, R.J. & Lascelles, J. (1965), Biochem. J. 94, 120.
- Poulson, R. (1976), J. Biol. Chem. 251, 3730.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1973), Biochim. Biophys. Acta 329, 256.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974 a), J. Biol. Chem. 249, 6367.
- Poulson, R. & Polglase, W.J. (1974 b), FEBS. Lett. 40, 258.
- Poulson, R. & Polglase, J. (1975), J. Biol. Chem. 250, 1269.
- Radin, N.S.; Rittenberg, D. & Shemin, D. (1950), J. Biol. Chem. 184, 745.
- Ramaswamy, N.K. & Nair, P.M. (1973), Biochim. Biophys. Acta 293, 269.
- Richard, F. & Nigon, V. (1972), C.R. Acad. Sci. 274, 1307.
- Rimington, C. (1958), Royal Australian Chem. Inv. 8, 129.
- Rimington, C. & Krol, C. (1955), Nature 175, 629.
- Robinson, J.L.; Benson, R.W. & Boyer, P.D. (1969), Biochemistry 8, 2503.
- Romeo, G. & Levin, E. (1971), Biochim. Biophys. Acta 230, 330.

- Rubinstein, D. & Densted, D.F. (1953), J. Biol. Chem. 204, 623.
- Sachs, D. (1931), Klin. Wochenschr 10, 1123.
- San Martín de Viale, L.C. & Grinstein, M. (1968), Biochim. Biophys. Acta 158, 79.
- San Martín de Viale, L.C.; Aragonés, A. & Tomio, J.M. (1976), Acta Physiol. Latinoamericana 26, 403.
- Sano, S. (1958), Acta Haematol. Japan 21, 237.
- Sano, S. (1966), J. Biol. Chem. 241, 5276.
- Sano, S. & Granick, S. (1961), J. Biol. Chem. 236, 1173.
- Shemin, D. & Kumin, S. (1952), J. Biol. Chem. 198, 827.
- Shemin, D. & Rittenberg, D. (1945), J. Biol. Chem. 159, 567.
- Shemin, D. & Russell, C.S. (1953), J. Am. Chem. Soc. 75, 4873.
- Shemin, D.; London, I.M. & Rittenberg, D. (1948), J. Biol. Chem. 173, 799.
- Shemin, D.; Russel, C.S. & Abramsky, T. (1955), J. Biol. Chem. 215, 612.
- Shigesada, K. (1972), J. Biochem., Tokyo 71, 961.
- Sinclair, P.; Gibbs, A.H.; Sinclair, J.F. & De Matteis, F. (1979), Biochem. J. 178, 529.
- Smith, A.G. & Francis, J.E. (1981), Biochem. J. 195, 241.
- Steer, B. & Gibbs, M. (1969 a), Plant Physiol. 44, 775.
- Steer, B. & Gibbs, M. (1969 b), Plant Physiol. 44, 781.
- Stevens, E.V. (1971), Ph. D. Thesis University of Buenos Aires.
- Stobart, A. & Pinfield, N. (1970), New Phytol. 69, 31.
- Straka, J.G. & Kushner, J.P. (1983), Biochemistry 22, 4664.
- Tait, G. (1972), Biochem. J. 128, 1159.
- Takeshita, M.; Sugita, Y. & Yoneyama, Y. (1970), Biochim. Biophys. Acta 202, 544.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981), J. Biol. Chem. 256, 12748.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1982), Eur. J. Biochem. 127, 443.
- Teherani, J. & Nishimura, J. (1975), J. Biol. Chem. 250, 3883.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1968), Biochim. Biophys. Acta 151, 300.
- Tigier, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Locascio, G. (1970), Enzymologia 38, 43.
- Tomio, J.M. & Grinstein, M. (1968), Eur. J. Biochem. 6, 80.

- Tomio, J.M.; García, R.C.; San Martín de Viale, L.C. & Grins tein, M. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 198, 353.
- Varticovski, L.; Kushner, J.P. & Burnham, B.F. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 739.
- Vavra, J.D.; Mayer, V.K. & Moore, C.V. (1964), *J. Lab. Clin. Med.* 63, 736.
- Verneuil de, H.; Sassa, S. & Kappas, A. (1983), *J. Biol. Chem.* 258, 2454.
- Waldenström, J. & Wahlquist, B.C. (1939), *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 260, 189.
- Whiting, M.J. & Elliott, W.H. (1972), *J. Biol. Chem.* 247, 6818.
- Wider de Xifra, E.A. & Tigier, H.A. (1971), *Enzymologia* 41, 217.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1976), "Porphyrin in Human Diseases" (Doss, M., ed.) Karger, Basel.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 717.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C. & Tigier, H.A. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 235, 511.
- Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1978), *Plant Sciences Letters* 11, 93.
- Wittenberg, S. & Shemin, D. (1949), *J. Biol. Chem.* 178, 47.
- Wu, W.H.; Shemin, D.; Richards, K.E. & Williams, R.C. (1974), *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1767.
- Zaman, Z.; Abboud, M.M. & Akhtar, M. (1972), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* , 1263.

PORFOBILINOGENASA

	Página
III.1. Introducción	80
III.2. Propiedades generales de las enzimas	81
III.2.1. Localización	82
III.2.2. Purificación	82
III.2.3. Peso molecular	83
III.2.4. pH óptimo	84
III.2.5. Efecto de la atmósfera de incubación	85
III.2.6. Efecto de la temperatura	85
III.2.7. Comportamiento de las enzimas frente a diferentes iones y compuestos	86
III.2.8. Otras propiedades	89
III.2.9. Algo más acerca de la Isomerasa	90
III.3. Estudios cinéticos	93
III.4. Estudios sobre el mecanismo de polimerización enzimática del PBG	95
III.4.1. Existencia de intermediarios polipi- rrólicos	95
III.4.2. Intermediarios tetrapirrólicos y mecanismo de acción	106
III.5. Referencias	125



### III. PORFOBILINOGENASA

#### III.1. Introducción

De todas las enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo, la Porfobilinogenasa (PBG-asa), así denominada por Lockwood y Rimington (1957), es la más particular ya que cataliza una reacción única de reordenamiento, originando el uroporfirinógeno III o urogen III (Figura III.1.).

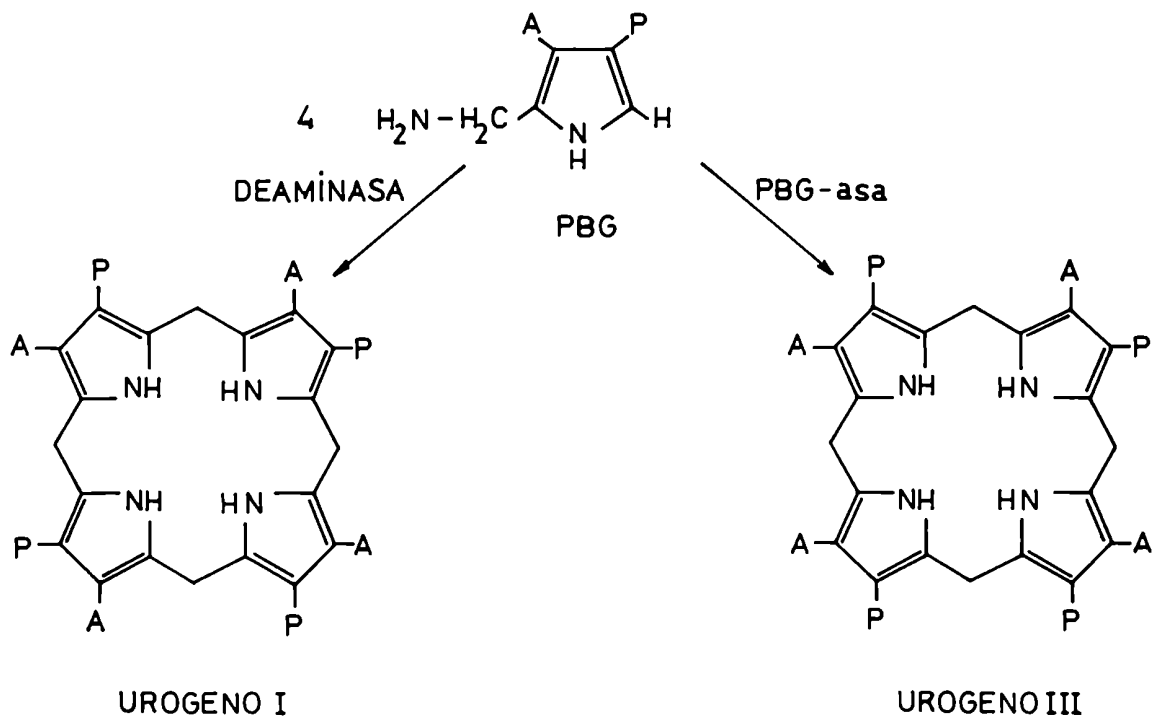


Figura III.1.: Enzimas involucradas en la formación de uroporfirinógenos III y I.

La PBG-asa es en realidad un complejo enzimático constituido por dos proteínas distintas, la Uroporfirinógeno I sintetasa (Uro-S), PBG-deaminasa, Hidroximetilbilano sintetasa o simplemente Deaminasa y la Uroporfirinógeno III cosintetasa (Uro-CoS) o Isomerasa. La acción conjunta de ambas enzimas es imprescindible para la formación del isómero III del uroporfirinógeno.

En ausencia de Isomerasa, la Deaminasa cataliza la conversión de PBG en urogen I (el isómero simétrico no fisiológico).

co), reacción que consiste en una condensación repetida cabeza a cola de 4 moléculas de PBG, con eliminación de amoníaco.

Aún no está totalmente elucidado el mecanismo de acción de la Isomerasa aunque se sabe que no puede utilizar al PBG como sustrato ni catalizar la conversión del urogen I en urogen III. Sin embargo, como resultado de la acción conjunta de Deaminasa e Isomerasa, se produce una modificación en la orientación de uno de los núcleos pirrólicos del anillo macrocíclico, sintetizándose el urogen III. Aparentemente, la Isomerasa no afecta la velocidad ni la estequiometría de la reacción pero su concentración determina la relación urogen III: urogen I; cuando se encuentra en exceso, se forma exclusivamente el isómero III mientras que el urogen I se biosintetiza en ausencia de esta proteína; a concentraciones intermedias de Isomerasa se obtienen mezclas de ambos isómeros siendo el porcentaje de urogen III proporcional a la cantidad de Isomerasa presente.

Se han propuesto numerosos esquemas para explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa y la mayoría de estas hipótesis se basan en la suposición de que durante la reacción se deberían formar intermediarios polipirrólicos tales como di, tri y tetrapirrilmetanos de cadena abierta. Más adelante nos ocuparemos en forma más detallada de este tema. Por el momento, es importante resaltar que la búsqueda y el estudio de estos intermediarios no sólo es necesario porque permite un mayor conocimiento del mecanismo de acción de las enzimas, sino por su directa vinculación con las porfirias. Es indudable que cuanto más conozcamos acerca del funcionamiento normal de este sistema enzimático, estaremos en mejores condiciones de explicar la naturaleza de los defectos enzimáticos primarios causantes de estas enfermedades.

### III.2. Propiedades generales de las enzimas

Tanto la PBG-asa como sus componentes, Isomerasa y Deaminasa han sido aisladas y purificadas a partir de fuentes animales, vegetales y bacterianas y en un gran número de casos, se han estudiado extensivamente sus propiedades. Es así que se cuenta con abundante información acerca de estas enzimas, la cual trataremos de recapitular brevemente.

### III.2.1. Localización

En la mayoría de las células, la PBG-asa parece ser una enzima citoplasmática. Sin embargo, Bogorad (1955) detectó actividad de Deaminasa en cloroplastos de espinaca en tanto que Falk y Dresel (1960) hallaron evidencias de que la PBG-asa podría estar asociada a la membrana externa de eritrocitos de aves. En el año 1964, Carell y Kahn, demostraron que cloroplastos purificados y rotos de *Euglenagracilis* eran capaces de sintetizar porfirinas a partir de ALA y PBG proponiendo que los cloroplastos poseen autonomía genética y contienen sus propios sistemas enzimáticos para la biosíntesis de porfirinas y clorofilas.

En nuestro laboratorio se han confirmado las observaciones de estos últimos autores detectándose actividad de PBG-asa tanto en fracciones particuladas como en sobrenadantes de *E. gracilis*, crecida bajo diferentes condiciones (Rossetti y col, 1986).

### III.2.2. Purificación

Los métodos empleados para la purificación de PBG-asa, Deaminasa e Isomerasa varían dependiendo del tejido que se somete a estudio pero normalmente incluyen una serie de combinaciones más o menos complejas, de procedimientos físico-químicos utilizados en la purificación de proteínas.

Teniendo en cuenta que la Isomerasa, a diferencia de la Deaminasa, es una proteína termolábil, se ha purificado frecuentemente esta última por calentamiento del complejo enzimático utilizando temperaturas y tiempos variables, dependiendo del tejido estudiado (Llambías y Batlle, 1971 a y referencias allí mencionadas; Rossetti, 1978).

Sin embargo, se han logrado separar ambos componentes de la PBG-asa sin destrucción o inactivación de los mismos, mediante el empleo de técnicas tales como diálisis contra agua destilada, fraccionamiento con resinas de intercambio iónico, o tratamientos con altas fuerzas iónicas (Levin y Coleman, 1967; Stevens y col., 1968; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a y b; Rossetti, 1978).

En algunos casos, las preparaciones purificadas de es-

tas enzimas son electroforéticamente homogéneas a diferentes pH's aunque este comportamiento depende de la fuente empleada.

### III.2.3. Peso molecular

Los pesos moleculares del complejo enzimático y sus componentes se han determinado mediante el empleo de técnicas convencionales tales como filtración en geles, electroforesis en geles de poliacrilamida y centrifugación en gradiente de sacarosa.

En este sentido se ha observado que la fuerza iónica y la presencia de ciertos compuestos ejerce una influencia significativa sobre el comportamiento de la Isomerasa en columnas de geles de dextrano y agarosa (Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Rossetti y col., 1980), sugiriendo que según las condiciones experimentales usadas, puede tener lugar la asociación de varias unidades de Isomerasa, originando diferentes agregados moleculares, lo cual explicaría el hecho de que se encuentren en la literatura, valores de pesos moleculares distintos.

Por el contrario, parece existir acuerdo en cuanto al PM de la Deaminasa; esta enzima obtenida de varias fuentes se presenta como una proteína de PM  $40.000 \pm 4.000$  (Llambías y Batlle, 1971 a y b; Jordan y Shemin, 1973; Higuchi y Bogorad, 1975; Sancovich y col., 1976; Miyagi y col., 1979; Rossetti y col., 1980; Williams y col., 1981; Williams, 1984; Fumagalli y col., 1985). No obstante, Frydman y Feinstein (1974) reportaron un PM de  $25.000 \pm 5.000$  y además, como se verá más adelante, en el presente trabajo se determinó un valor de  $74.000 \pm 7.400$  para la enzima de *Rp. palustris* (Kotler y col., 1987a).

En base a lo expuesto puede explicarse el hecho de que los PM's calculados para la PBG-asa sean distintos y se ha sugerido la existencia de fenómenos de asociación-disociación entre un número variable de unidades de los componentes individuales del complejo enzimático (Llambías y Batlle, 1971 b; Rossetti y col., 1980; Fumagalli y col., 1982). En base a evidencias experimentales, nuestro laboratorio postuló que la estructura funcional mínima de la PBG-asa en *Euglena gracilis* y en hígado de cerdo sería un dímero de PM 50.000 cuyos protómeros de PM 25.000 estarían formados por dos unidades proteicas dife-

rentes, en la relación de 1 mol de Deaminasa (PM 20.000) a 1 mol de Isomerasa (PM 5.000) (Rossetti y col., 1980, 1986; Fumagalli y col., 1982).

#### III.2.4. pH óptimo

En general, se han observado actividades máximas de PBG-asa en un rango de pH's entre 7,2 y 8,2 según la fuente en zimática estudiada. Ambas enzimas presentaron curvas de forma semejante tanto para la actividad expresada en función de las porfirinas formadas como del sustrato consumido. En cambio, en callos de soya (Llambías y Batlle, 1971b) y en *E. gracilis* (Rossetti 1978), dicho comportamiento fue diferente; si bien se observó un único pico para PBG-asa y Deaminasa cuando la actividad se midió en función de la cantidad de uroporfirinógenos formados, al considerarse la misma respecto al PBG consumido aparecieron dos picos bien definidos a distintos pH's. Resultados similares se obtuvieron cuando se estudió el pH óptimo de la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat de Geralnik, 1983). Estos hallazgos han sido interpretados postulando 2 etapas para el consumo de sustrato, cada una con un pH óptimo diferente (Llambías y Batlle, 1971b; Rossetti y col., 1987) o considerando una unión inespecífica de PBG (Juknat de Geralnik, 1983).

Es interesante recordar aquí las observaciones de Cornford (1964) quien trabajando con un sistema más o menos crudo, capaz de producir una mezcla de porfirinas de tipo I y III, encontró que las cantidades y concentraciones relativas de estos isómeros estaban influenciados significativamente por cambios de pH y composición salina. Resultados en cierto modo análogos se obtuvieron empleando preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa de hígado bovino (Sancovich, Ferramola y Batlle, resultados no publicados). En consecuencia estos datos estarían indicando que tanto el pH como la fuerza iónica del medio son factores muy importantes en lo que se refiere al modo de acción de la PBG-asa y que podrían afectar, muy probablemente, la formación de un complejo activo Deaminasa-Isomerasa (Sancovich y col., 1969a).

Por otra parte, Williams y col. (1981) empleando la Deaminasa de *Euglena gracilis*, estudiaron la dependencia de  $V_{max}$  y  $V_{max}/K_m$  con el pH. La  $V_{max}$  exhibió una típica curva con forma de campana indicando que dos grupos ionizables cuyos pK's

resultaron 6,1 y 8,9 eran importantes para la catálisis. El gráfico de  $V_{max}/K_m$  vs. pH mostró que una única ionización ( $pK = 8,2$ ) influía en la unión del sustrato a la enzima. Williams (1984) obtuvo resultados similares estudiando la forma termoes table de la enzima de bazo de rata.

### III.2.5. Efecto de la atmósfera de incubación

En muchos casos se ha demostrado que tanto la PBG-asa como la Deaminasa pueden ser igualmente activas tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (Bogorad, 1958 a y b; Lockwood y Benson, 1960; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a; Fumagalli y col., 1982; Juknat de Geralnik, 1983). Sin embargo, se ha encontrado que en callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a; Stella y col., 1971) y en *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978; Rossetti y Batlle, 1977), la actividad de estas enzimas se afecta significativamente en presencia de oxígeno. En estos tejidos, la formación de uroporfirinógenos es máxima en condiciones anaeróbicas aunque el consumo de sustrato no se modifica sensiblemente en atmósfera aeróbica. Estos resultados llevaron a postular que la presencia de aire no prevendría la síntesis de intermediarios, pero que el oxígeno podría oxidarlos impidiendo que puedan ser ya utilizados por las enzimas.

Aunque aparentemente el consumo de PBG no parecería modificarse por la presencia de aire, es factible que bajo condiciones aeróbicas, el PBG fuera consumido por otra vía que no condujera a la formación de porfirinas, como por ejemplo a través de una pirrol-oxigenasa (Frydman y col., 1972 a).

Por otra parte, Fumagalli y col. (1985) trabajando con la Deaminasa aislada de eritrocitos humanos, encontraron que esta enzima era estrictamente aeróbica siendo su actividad nula en anaerobiosis.

### III.2.6. Efecto de la temperatura

Es bien conocida la estabilidad frente al calentamiento de la Deaminasa. En la mayoría de los casos, en las primeras etapas de purificación, esta enzima puede incubarse por espa-

cio de 15 a 30 minutos a 65 °C sin que ocurra pérdida de actividad. A temperaturas más elevadas, la inactivación es considerablemente rápida. También las preparaciones más purificadas de la enzima, son mucho más susceptibles a tratamientos a temperaturas elevadas.

Por otra parte, cuando preparaciones de PBG-asa parcialmente purificadas se someten a un precalentamiento a 60 °C durante 30 minutos, no sólo tiene lugar la inactivación de la Isomerasa sino que paralelamente se observa un aumento en la biosíntesis total de porfirinas (Cornford, 1964; Sancovich y col., 1969 a; Llambías y Batlle, 1971 a y b; Rossetti, 1978).

La Isomerasa, en cambio, es una proteína termolábil y pierde el 80% de su actividad cuando se preincuba durante 20-30 minutos a 65-70 °C, en presencia de Deaminasa. Cuando esta proteína se calienta sola, la inactivación por calor es mucho más significativa y ocurre a menores intervalos de tiempo; esto sugiere que en el complejo de la PBG-asa, la Isomerasa debe estar asociada a la Deaminasa de forma tal que esta última le confiere cierta protección al componente termolábil. También el agregado de sulfato de amonio (0,01 M) ó PBG (0,04 mM) protege en un 80-100% a la Isomerasa de la inactivación térmica (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Sancovich y col., 1976).

### III.2.7. Comportamiento de las enzimas frente a diferentes iones y compuestos

En todos los sistemas estudiados hasta el momento la PBG-asa y la Deaminasa se han comportado como enzimas sulfhidrúlicas (Sancovich y col., 1969 a, 1976; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Frydman y Feinstein, 1974; Russell y Rockwell, 1980). No obstante, aún no se conoce el mecanismo mediante el cual estos grupos sulfhidrilos participan en la reacción. Se ha propuesto que podrían ser indispensables para la formación de un complejo enzimático activo, confiriéndole al mismo el ordenamiento o disposición estructural necesarios para la expresión de su actividad. También se ha sugerido que podrían estabilizar el complejo enzima-sustrato (Llambías y Batlle, 1971 a, b). Dado que los inhibidores típicos de grupos tioles afectan en mayor grado la formación de porfirinas que el consumo de PBG, se ha propuesto que estos grupos -SH estarían involucra-

dos en la etapa de ciclación.

Se han encontrado evidencias de que grupos ditiolos serían esenciales para la actividad enzimática. Además, varios reactivos clivantes de uniones disulfuro inhiben parcialmente la reacción (Llambías y Batlle, 1971 a; Sancovich y col., 1976). El cianuro, si bien no disminuye la cantidad de porfirinas sintetizadas, afecta el tipo isomérico formándose un 80% de uroporfirinógeno I en detrimento del isómero III. Lockwood y Benson (1960) y Llambías y Batlle (1971a) han sugerido que el cianuro podría interferir o competir de algún modo con el sustrato de la Isomerasa o bloquear la acción de esta enzima.

Bogorad (1962, 1963) estudió el efecto del amonio y la hidroxilamina sobre la Deaminasa y encontró que ambos reactivos inhibían tanto la formación de porfirinas como el consumo de PBG. Sancovich y col. (1969 a, b) y Frydman y Feinstein (1974) observaron el mismo efecto inhibitorio sobre la PBG-asa y la Deaminasa de otras fuentes. Sancovich y col. (1969 a) y Stella y col. (1971) propusieron que los iones amonio inhibirían la actividad de la Isomerasa uniéndose a la enzima en el sitio activo correspondiente al PBG o a un intermediario polipirrólico. Otrashipótesis consideran la posibilidad de que los iones amonio podrían disociar al complejo PBG-asa o interferir en la interacción de sus componentes, que sería necesaria para su actividad.

Más recientemente Juknat (1983) estudiando el efecto del amonio sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris*, encontró que el mismo disminuía la cantidad total de porfirinas formadas a concentraciones crecientes de inhibidor (amonio) y sustrato, modificando sólo ligeramente la cinética de la reacción. En lo que respecta al tipo isomérico, observó que la acción inhibitoria sobre la Isomerasa disminuía al aumentar la concentración de sustrato, evidenciándose una interacción competitiva entre el PBG y el amonio. Además, a ciertas concentraciones de sustrato e inhibidor, parecía estimularse una mayor formación del isómero III a expensas del tipo I. En este caso, el amonio no afectó el consumo de PBG.

Asimismo, Fumagalli y col. (1985) reportaron que concentraciones crecientes de amonio inhibían la síntesis de porfirinas en mucho mayor grado que el consumo de PBG, por parte de la Deaminasa de eritrocitos humanos. En cambio, la hidroxilamina inhibió en forma total tanto la formación de producto como



el consumo de sustrato.

Eneritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 a), la adenina, ATP y ADP también inhibieron la enzima sin modificar el tipo isomérico; sin embargo, con enzimas de otras fuentes, los efectos de estos compuestos fueron algo diferentes y más complejos (Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col., 1976). Sancovich y col. (1976) también encontraron que un gran número de alquilaminas, y a ciertas concentraciones el ATP y el ADP, en presencia o ausencia de sales inhibían a estas enzimas; a otras concentraciones, el ATP y el ADP, producían activación. En base a estos resultados se postuló que estos compuestos básicos tendrían efectos separados sobre la Deaminasa y la Isomerasa y que existiría una competencia entre las enzimas y las bases por sus sustratos o intermediarios. Además, como el efecto inhibitorio es más significativo sobre la formación de porfirinas que sobre el consumo de sustrato, se propuso que la etapa de ciclación sería la más sensible al efecto de estos inhibidores.

En cuanto al efecto de las sales de sodio y magnesio sobre la actividad de la PBG-asa de ciertas fuentes (Llambías y Batlle, 1971 b; Sancovich y col., 1976; Clement y col., 1982) se observó una acción estimulante probablemente debida a la participación de estos iones en algún fenómeno de asociación-disociación de la proteína, la cual alcanzaría así un ordenamiento estructural adecuado para una actividad óptima. Este efecto estimulante no se observó en el caso de la PBG-asa de *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) y *Rp. palustris* (Juknat, 1983).

Llambías y Batlle (1971 a, b) y Sancovich y col. (1976) observaron que la Deaminasa se inhibía en presencia de algunos ácidos dicarboxílicos y de 2-metoxi-nitrotrona, reactivo que modifica química y específicamente a los grupos amino libres de las proteínas. Los autores propusieron que los ácidos dicarboxílicos ejercerían su efecto inhibitorio compitiendo con el PBG por algunos grupos de la enzima cargados positivamente (restos  $\epsilon$ -amino de la lisina o restos guanidino de la arginina). Esta hipótesis concuerda con los trabajos de Bogorad (1958 a) quien demostró que el formaldehído inhibía la Deaminasa uniéndose a los residuos lisina de la proteína.

Por otra parte, la misma enzima de germen de trigo y de eritrocitos humanos es inhibida por monopirroles sintéticos análogos al PBG, que poseen una posición  $\alpha$  libre, una cadena  $\alpha$ -

cido propiónico en posición  $\beta$  y un grupo metilo o aminometilo en la otra posición  $\alpha$  (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974).

Russell y Rockwell (1980) encontraron que el ácido opso pirrol dicarboxílico (OPD) inhibía la Deaminasa de germen de trigo. Estos autores estudiaron el efecto de reactivos mercuriales y de N-etilmaleimida (NEM) en presencia y ausencia de PBG y OPD observando que el OPD protegía a la Deaminasa de la inhibición ejercida por el NEM y por un derivado mercurial del PBG (PBG-Hg). Estas evidencias sugerirían la existencia de uno o más grupos -SH en el sitio activo de la enzima. En presencia de PBG, el efecto inhibitorio de los compuestos mercuriales fue mayor; se postuló entonces que el PBG podría provocar un cambio conformacional cuya consecuencia sería la exposición de los grupos tioles, o podría activar los reactivos mercuriales originando un compuesto más reactivo.

Se ha estudiado también el efecto de la butanodiona sobre la actividad de la Deaminasa de germen de trigo (Pollack y Russell, 1978). Así, se ha encontrado que este reactivo inhibe significativamente a la enzima y que el PBG puede revertir este efecto. En ciertas condiciones, la butanodiona inactiva varias enzimas por bloqueo de los grupos guanidino de residuos de arginina, que a su vez juegan un papel importante en el sitio activo de esas enzimas, cuyos sustratos contienen en su estructura grupos carboxilatos o fosfatos. Posiblemente la Deaminasa pertenezca también a esta familia de enzimas; se ha sugerido entonces que uno o más residuos arginina serían necesarios para la unión del sustrato PBG.

### III.2.8. Otras propiedades

Se ha encontrado que deaminasas de distintas fuentes eran fotosensibles (Frydman y Frydman, 1970; Frydman y Feinstein, 1974) e inhibidas por una pirroloxigenasa, oxidasa de función mixta que inactiva enzimas conteniendo residuos triptofano, en presencia de ditionito. Frydman y Frydman (1973) sugirieron que este aminoácido podría estar involucrado en el sitio activo de la enzima.

En nuestro laboratorio se ha logrado unir covalentemente a Sepharosa, la PBG-asa de hígado bovino (Rossetti y col.,

1976). La PBG-asa insolubilizada sintetizaba uroporfirinógeno III pero la relación urogen III: urogen I dependía del tratamiento previo de la enzima, de las condiciones de incubación y de las cantidades relativas de Isomerasa y Deaminasa activas.

La Deaminasa proveniente de una amplia variedad de fuentes, se ha comportado electroforéticamente como una proteína homogénea (Levin y Coleman, 1967; Stevens y col., 1968; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Jordan y Shemin, 1973; Frydman y Feinstein, 1974; Higuchi y Bogorad, 1975; Russell y Pollack, 1978). No obstante existen evidencias que demuestran la presencia de isoenzimas en eritrocitos humanos (Miyagi y col., 1979). Posteriormente, Miyagi y col. (1980) observaron la separación de preparaciones de Deaminasa purificada de eritrocitos humanos y bovinos, en seis bandas activas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. Estos autores dividieron las isoenzimas en grupos de baja estabilidad-alta actividad y alta estabilidad-baja actividad; postularon que estas isoenzimas tomarían parte en un proceso de síntesis enzimática y que tendrían cierta especificidad por algún órgano en particular, como ser, hígado, riñón, médula ósea, predominando en uno de ellos.

### III.2.9. Algo más acerca de la Isomerasa

La existencia y propiedades de la Isomerasa han sido estudiadas casi totalmente en forma indirecta, por cuanto para poder medir su actividad se la ha incubado en forma conjunta con la Deaminasa. Llambías y Batlle (1970 a), Rossetti y Batlle (1977), Rossetti y col. (1980) y Juknat (1983) incubaron Isomerasa purificada de numerosas fuentes con PBG y en algunos casos, con ciertos intermediarios polipirrólicos de callos de *soya*, *Euglena gracilis* y *Rp. palustris*, obteniéndose uroporfirinógenos. En base a estos hallazgos se postuló que los posibles sustratos para la Isomerasa serían el PBG y algún polipirrimetano unido a la proteína, formado durante la reacción.

Sin embargo, en el año 1979, casi simultáneamente, dos grupos informaron acerca de la existencia de dos intermediarios de reacción, sustratos de la Isomerasa. El grupo de Jordan y Scott presentó evidencias obtenidas mediante estudios espectroscópicos, indicando que la transformación enzimática del PBG en urogen I y III ocurría a través de un intermediario libre al

que denominaron preuroporfirinógeno (Burton y col., 1979a) (Figura III.2.). Este compuesto se formaría a partir de PBG y por acción de la Deaminasa, actuando a continuación como sustrato de la Isomerasa, para dar lugar al Uroporfirinógeno III (Jordan y col., 1979; Jordan y Berry, 1980). Por su parte, el grupo de Battersby informó que la síntesis del urogen III ocurría vía un intermediario que ellos identificaron como el hidroximetil-bilano (Figura III.3.); en este caso la Isomerasa produciría un reordenamiento intramolecular para originar el uroporfirinógeno III (Battersby y col., 1979 a).

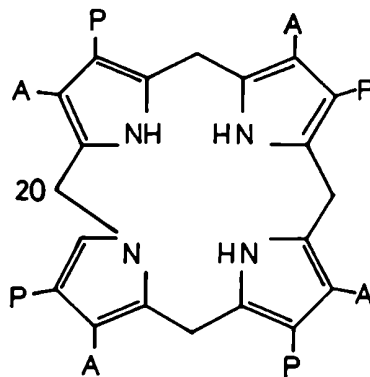


Figura III.2.: Preuroporfirinógeno.

Clement y col. (1982) aislaron y purificaron la Isomerasa de hígado de rata, estudiando algunas de sus propiedades. Los autores hallaron que manteniendo una relación de unidades de Isomerasa:Deaminasa igual a 14:1, se aseguraba la formación de un 80% de urogen III. Stevens y col. (1968) habían propuesto para extractos crudos de eritrocitos humanos, una relación de 10:1. Como ya se mencionó, Rossetti y Battle (1977) también se habían referido a este exceso de Isomerasa concluyendo que en condiciones fisiológicas aseguraría la síntesis exclusiva de urogen III.

Estudios efectuados acerca de la actividad de la PBG-asa, Deaminasa e Isomerasa de hígado de rata, en presencia de iones metálicos, revelaron que la Isomerasa sería más sensible que

la Deaminasa, a la inhibición ejercida por estos metales (Clement y col., 1982). Así, observaron una inhibición selectiva de esta enzima al incubarla con cloruro de cadmio, cloruro de zinc y cloruro de cobre, en concentraciones de 10  $\mu$ M. Probablemente estos iones interfieren con la formación del complejo activo Deaminasa:Isomerasa. Alternativamente, la Isomerasa poseería grupos monotioles que estarían más expuestos que los de la Deaminasa. Debido a que la inhibición por los metales es no-competitiva y se revierte en presencia de compuestos tiólicicos, es probable que dichos grupos no se encuentren en el sitio activo sino que estén involucrados en el mantenimiento de una conformación adecuada.

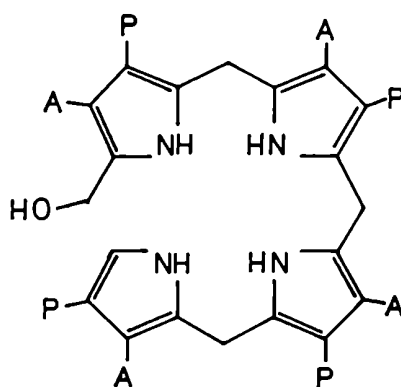


Figura III.3.: Hidroxi  
metilbílano.

Sancovich y col. (1969 a) aislaron a partir de preparaciones parcialmente purificadas de PBG-asa de hígado bovino, un factor ultrafiltrable que estimulaba la formación de uroporfirinógeno a partir de PBG. Más tarde, Tephly (1975) identificó una molécula de bajo peso molecular aislada del citosol de hígado de rata, que poseía un efecto protector sobre la inhibición por plomo de la Deaminasa de eritrocitos de aves y posteriormente, Piper y van Lier (1977) sugirieron que ese factor protector podría ser una molécula del tipo de los derivados del pteroilpoliglutamato de manera que podría lograrse un efecto análogo empleando como sustituto de esa molécula protectora, el ácido fólico. Asimismo, Rossetti (1978), Juknat de Geralnik y

col. (1981) y Juknat (1983) detectaron la presencia de un factor en *Euglena gracilis* que regularía la síntesis enzimática de porfirinógenos y describieron un esquema para explicar el mecanismo de acción de dicho factor, postulando la existencia de varias formas enzimáticas de la PBG-asa. Wider de Xifra y col. (1980) demostraron la recuperación clínica y bioquímica en pacientes con Porfiria Aguda Intermitente, luego de un corto tratamiento con ácido fólico. Estas observaciones, junto con los hallazgos de disminución del metabolismo de drogas, concentración de citocromo P-450 y contenido de hemo en ratas con deficiencia de folato (Parke, 1978) y cerdos de guinea (Clement y col., 1981), sugirieron que la regulación de la conversión de PBG en uroporfirinógenos, podría estar mediada por una molécula de folato. Las últimas evidencias experimentales obtenidas acerca de este tema (Kohashi y col., 1984) indican que un factor pteroilpoliglutamato reducido está asociado con la Isomerasa de hígado de rata pudiendo éste funcionar como una coenzima para la biosíntesis de uroporfirinógeno III.

### III.3. Estudios cinéticos

Se han efectuado extensos estudios acerca de las propiedades cinéticas de la PBG-asa y Deaminasa provenientes de numerosas fuentes. Un resumen de las características cinéticas más destacables de estas enzimas, se muestra en la Tabla III.1.

En el caso de las enzimas de hígado bovino (Sancovich y col., 1969 b), es importante mencionar que debido a que en la reacción catalizada por la Deaminasa, no se observaron efectos cooperativos en tanto que sí se manifestaron cuando actuaba la PBG-asa, se postuló que dichos efectos facilitaban la unión del PBG al componente Isomerasa del complejo.

Cuando la PBG-asa se calentaba o dializaba contra agua destilada, o cuando se agregaban iones amonio a la mezcla de reacción, la forma de la curva de saturación por sustrato cambiaba de sigmoidea a hiperbólica, desapareciendo el fenómeno de interacción homotrópica al mismo tiempo que tenía lugar un incremento en la afinidad por el PBG y se formaba urogen I en lugar de urogen III. El agregado de amonio no alteró, en cambio, el comportamiento michaeliano de la Deaminasa.

Llambías y col. (1971 a) estudiaron la cinética de es-

tas dos enzimas purificadas de eritrocitos de ave encontrando que, tanto en presencia como en ausencia del ión amonio, ambas exhibían un comportamiento semejante a las enzimas de hígado bovino.

Esta respuesta sigmoidea de la PBG-asa de hígado bovino y de eritrocitos de ave llevó, en ese momento, a clasificar a esta enzima, como una proteína alostérica con dos sitios interactuantes que en consecuencia estaría muy bien adaptada para ser regulada por su propio sustrato.

Los estudios cinéticos llevados a cabo con las enzimas de callos de soya revelaron que las mismas presentaban un comportamiento cinético bastante diferente a las anteriormente desc<sup>u</sup>riptas. Las curvas de saturación para la PBG-asa y Deaminasa, en presencia o ausencia de amonio, eran muy similares, respondiendo a una cinética no michaeliana y los gráficos de las inversas eran bifásicos dando origen a dos valores de Km (Tabla III.1.).

Esta desviación de un clásico comportamiento michaeliano se apreció también al calcular los valores de  $R_s$  y  $n$  de Hill para ambas enzimas. Así, los valores de  $R_s$  resultaron mayores que 81 y los  $n$ , en algunos casos fueron menores que 1, respondiendo a una cinética homotrópica negativa.

Williams y col. (1981) efectuaron estudios de velocidades iniciales empleando la Deaminasa de *Euglena gracilis* y midieron la velocidad de formación de urogen a tres valores de pH y en un amplio rango de concentraciones de sustrato. En todos los casos el gráfico de (PBG)/v vs (PBG) resultó lineal.

Fumagalli y col. (1985) investigaron el comportamiento cinético de la Deaminasa de eritrocitos humanos encontrando que cuando se graficaba la velocidad de formación de uroporfirinógeno o de consumo de sustrato, en función de la concentración de PBG, se obtenía una curva aparentemente michaeliana. Sin embargo, los gráficos de dobles recíprocas resultaron no-lineales sugiriendo la existencia de interacciones alostéricas. Además el valor de  $n = 2$  (Tabla III.1.) apoyó la idea de que esta enzima podría tener dos sitios de unión para su sustrato, si bien las interacciones positivas parecían no ser fuertes.

Estos hallazgos llaman la atención si se tiene en cuenta que todas las Deaminasas estudiadas, excepto la de callos de soya, han presentado una cinética michaeliana (Tabla III.1.). No obstante, debe notarse que en algunas de las referencias ci

tadas, no se analizaron los gráficos de las inversas y más aún, en el caso de la Deaminasa homóloga (Frydman y Feinstein, 1974), se examinó un rango más estrecho de concentraciones de sustrato. En base a estos resultados se ha sugerido que la Deaminasa podría contener al menos dos sitios de unión para el PBG y que probablemente la fuerza de las interacciones, positivas o negativas podría variar según la fuente en estudio. De este modo, las posibles desviaciones del comportamiento michaeliano podrían ser detectadas o no, dependiendo de las condiciones experimentales y del método de análisis empleado.

#### III.4. Estudios sobre el mecanismo de polimerización enzimática del PBG

##### III.4.1. Existencia de intermediarios polipirrólicos

Indudablemente, la pieza clave para la elucidación del mecanismo de acción coordinada de la Deaminasa y la Isomerasa, es la identificación del sustrato de la Isomerasa.

Como ya se mencionó, se han propuesto numerosos esquemas que tratan de explicar el mecanismo de acción de la PBG-asa. La mayoría de ellos suponen que durante la reacción se deberían formar intermediarios polipirrólicos di, tri y tetrapirrimetanos de cadena abierta. Si bien ya en el año 1963, Bogorad había postulado sobre bases teóricas, que la Isomerasa actuaba sobre un intermediario de estructura desconocida, producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG (Figura III.4.), hasta 1970 (Llambías y Batlle, 1970 a), no se lograron detectar estos supuestos intermediarios. Es más, cuando diferentes dipirroles sintetizados químicamente se incubaron con las enzimas, no se obtuvo conversión alguna a uroporfirinógenos (Hoare y Heath, 1960).

La primera demostración experimental de la formación enzimática de intermediarios polipirrólicos a partir de PBG, provino de los estudios con las enzimas de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970 a, 1971 b; Stella y col., 1971). De los resultados obtenidos estudiando la cinética de las enzimas de esta fuente (Llambías y Batlle, 1970 a) y de *E. gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti, 1978), se propuso que la conversión de PBG en uroporfirinógenos III ó I podría ocurrir en



dos etapas: en la primera tendría lugar la formación de un intermediario polipirrólico y en la segunda, la producción final de uroporfirinógeno.

Es importante mencionar que tanto en callos de soya como en *E. gracilis* se observaba un pronunciado lag en cuanto a la formación de producto, luego del cual la síntesis aumentaba en forma lineal con el tiempo. En cambio, no se encontró evidencia alguna de una fase lag, cuando se medía el consumo de PBG. Estos resultados y el hecho de que la cantidad de uroporfirinógenos totales formados, sólo daban cuenta de una parte del PBG consumido, condujeron a pensar que, en tales condiciones, debía estar formándose un compuesto intermediario, probablemente un polipirrilmetano.

Por otro lado, Llambías y Batlle (1971 b) observaron que la fase lag podía suprimirse o hacerse menos pronunciada, cuando ese intermediario se agregaba a la mezcla de reacción, desde el comienzo de la incubación. Esto llevó a sugerir que su ausencia o lenta formación, serían la causa de la demora en la aparición de uroporfirinógenos.

Llambías y Batlle (1970 a) y Rossetti (1978) separaron de las mezclas de reacción los intermediarios sintetizados por las enzimas de callos de soya y *E. gracilis* respectivamente. En base a sus estudios concluyeron que el polipirrol formado cuando se incubaba PBG con la PBG-asa, al cual se lo denominó "P" y aquel resultante de la incubación de PBG, en presencia de Deaminasa, llamado "D" eran diferentes. Se postuló entonces que, según las condiciones, es decir según actuare el complejo normal de la PBG-asa o tan sólo el componente Deaminasa, se formarían intermediarios distintos que por asimilación podríamos llamar "normales" (P) y "anormales" (D).

A partir del fundamental hallazgo de Llambías y Batlle (1970 a), aparecieron otros estudios de acumulación y aislamiento de di y tetrapirroles, obtenidos incubando PBG y Deaminasa, en presencia de inhibidores (amonio e hidroxilamina). Como ya mencionamos, altas concentraciones de hidroxilamina y amonio inhiben la síntesis de uroporfirinógenos en mayor grado que el consumo de PBG. Teniendo en cuenta este efecto Pluscec y Bogorad (1970) aislaron e identificaron un dipirrilmetano no isomerizado ( $DPM_1$  - Figura III.5A), de una mezcla de reacción de Deaminasa de espinaca con PBG, en presencia de hidroxilamina. Estos mismos autores y Frydman y col. (1971), empleando el

DPM-I sintetizado químicamente, demostraron que este dipirrol no actuaba ni como sustrato ni como intermediario en la síntesis del urogen III pero sí se comportaba como intermediario en la formación enzimática del urogen I.

En contraste, el grupo de Battersby (Battersby y col., 1977 a, b y c) empleando preparaciones enzimáticas de PBG-asa de *E. gracilis* demostró claramente que el DPM-I era convertido eficientemente en uroporfirinógeno III a través de un bilano tetrapirrólico lineal no isomerizado (Figura III.6.). Recién después de la formación de este intermediario tetrapirrólico tendría lugar el mecanismo por el cual ocurriría la inversión de un anillo de PBG.

En 1972, Radmer y Bogorad aislaron e identificaron de mezclas de incubación de Deaminasa de espinaca y PBG en presencia de amonio, un tetrapirrimetano (TPM-I, Figura III.6.) que formaba uroporfirinógeno I no enzimáticamente en una reacción de primer orden. Sin embargo, años atrás, el mismo Bogorad (1963) había propuesto que un compuesto de este tipo era el intermediario polipirrólico en la biosíntesis del urogen III. No obstante, la observación adicional de que la Deaminasa no aceleraba la conversión del tetrapirrol en urogen I, nos hace pensar que un compuesto de esa naturaleza podría ser un intermediario normal en la síntesis del urogen III, siempre y cuando no se encuentre libre en solución sino formando parte de un complejo transitorio con las dos enzimas.

Battersby y col. (1977 a) demostraron que la incubación de cantidades del orden de los mg (4 mg) del TPM-I sintético con PBG-asa purificada de *E. gracilis* producía un 70% de isómero III y un 30% de isómero I formado por ciclación no enzimática. Por su parte, Dauner y col. (1976) incubando el TPM-I obtenido por un método diferente con PBG-asa de *P. shermanii* producía un 20% de una mezcla de uroporfirinógenos en la cual había un 14-18% del tipo III y un 82-86% del tipo I. Estos datos podrían conciliarse con los del grupo de Battersby si atribuímos las diferencias en rendimiento y porcentajes relativos a la cantidad de bilano y a la actividad de PBG-asa empleadas, que eran muy superiores en los ensayos de Battersby.

En 1978, Valasinas y col. describieron un nuevo método de síntesis del TPM-I y encontraron que este último no era sustrato de la Deaminasa ni de la Isomerasa, como tampoco de la PBG-asa, siempre en apoyo de la teoría de que la inversión del anillo del PBG debe ocurrir en una etapa temprana de la reacción.

Tabla III.1.1.: Constantes cinéticas de la PBG-asa y Deaminasa de diversas fuentes

FUENTE	ENZIMA	CURVA CARACTERÍSTICA (v vs. s)		Km <sub>1</sub> (μM)	Km <sub>2</sub> (μM)	n de Hill	REFERENCIAS
		Michaeliana	Cooperativa Positiva Negativa				
Hígado bovino	PBG-asa	+	+	11-14		+2	Sancovich y col. (1969 b)
	Deaminasa	+		5		1	Llambfias y col. (1971 a)
	PBG-asa	+		28		2	Lockwood y Benson (1960)
Eritrocitos de ave	Deaminasa	+		9		1	
	PBG-asa			18			
	Deaminasa			10			
Callos de soya	PBG-asa	+	- (**)	6,5	500	>1 (**)	Llambfias y Batlle (1970 b y c)
	Deaminasa	+	+	32	190	1 (**)	
	Deaminasa			13		+2 (*)	Jordan y Shemin (1973)
Rp. sphaeroides	PBG-asa	+		51			Frydman y Feinstein (1974)
	Deaminasa	+		77			Anderson y Desnick (1980)
	Deaminasa			~ 6		2	Fumagalli y col. (1985)
Eritrocitos humanos	PBG-asa			167		1	Fumagalli y col. (res. no publ.)
	Deaminasa			2,3		1	Frydman y Frydman (1970)
	Deaminasa			70			Shioi y col. (1980)
Hígado de cerdo	PBG-asa	+		85		1	Rossetti y col. (1987)
	Deaminasa	+		13,3			Williams y col. (1981)
	Deaminasa					2	Juknat (1983); Kotel y col. (1987)
Gérmen de trigo	PBG-asa	+		50		1	Farmer y Hollebene (1984)
	Deaminasa	+		2,5-3,5			Hart y col. (1986)
	Deaminasa			8,6-25			
Ck. tequilensis	PBG-asa de pellet	+		PH: 6,2-8,8			
	Deaminasa	+					
	Deaminasa						

(\*) A altas concentraciones de PBG, (\*\*) a bajas concentraciones de PBG

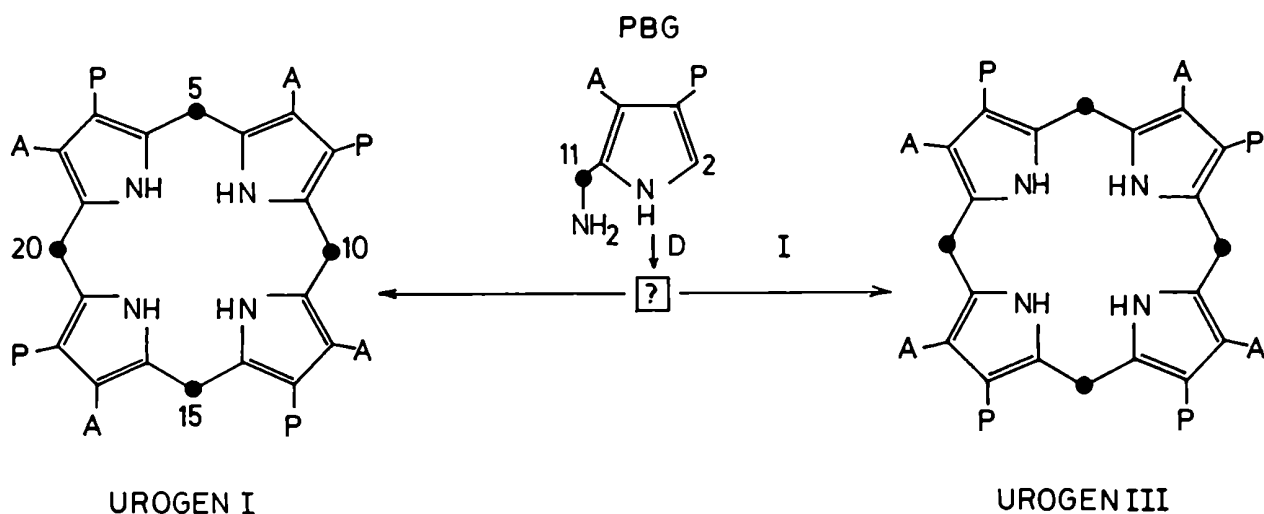


Figura III.4.: Intermediario polipirrólico (?) producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG, propuesto por Bogorad (1963) como sustrato de la Isomerasa (I).

El dipirrilmetano III (DPM-III, Figura III.5.B) se incorpora específicamente en el urogen III en presencia de PBG y por acción de la PBG-asa (Frydman y col., 1972 b). Dado que en ausencia de PBG no existe incorporación, los autores eliminaron la posibilidad de una condensación de pares de moléculas de DPM-III. Sin embargo, la incorporación del DPM-III es baja y del mismo orden que la hallada para el DPM-I con la Deaminasa, en contraste con la significativa incorporación del DPM-I en urogen III, obtenida por Battersby (1977 c).



Figura III.5.: Dipirrilmetanos I y III.

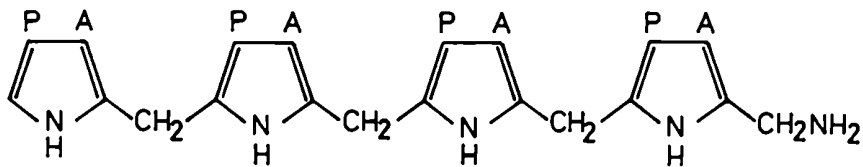


Figura III.6.: Tetrapirrimetano I

Por otra parte, Battersby y col. (1973 a) reportaron que el DPM-I se incorporaba en la protoporfirina IX, por hemolizados de eritrocitos de pato o extractos crudos de *E. gracilis*. Frydman y Frydman (1975 a) consideraron que estos resultados podrían explicarse como debidos a la acción de las enzimas decarboxilantes, sobre el urogen IV, formado por dimerización química del DPM-I. Según los autores, el urogen IV formaría luego una protoporfirina isomérica con la protoporfirina IX, no fácilmente distinguibles una de otra.

Nuevamente, Battersby y col. (1973 b), estudiando la incorporación de (2, 11  $^{13}\text{C}$ ) PBG en protoporfirina IX, producida por las mismas fuentes antes mencionadas, demostraron que era el anillo D el que sufría un reordenamiento intramolecular en tanto que las otras tres unidades de PBG se incorporaban intactas en los restantes anillos (A, B y C).

A su vez, con el objeto de estudiar la especificidad del sistema enzimático, Frydman y col. (1978 a) sintetizaron mediante una nueva metodología, el DPM-I, DPM-III y DPM-II (Figura III.7.) confirmando la incorporación del DPM-I y DPM-III en urogen I y urogen III respectivamente. El DPM-II no sólo no se incorporaba a ninguno de los isómeros sino que ejercía un efecto inhibitorio sobre el sistema Deaminasa-Isomerasa.

Hasta aquí, puede notarse que existe un acuerdo en cuanto a que un aminometildipirrimetano estaría involucrado en la conversión del PBG en urogen III aunque hay discrepancias respecto al momento en el cual ocurriría la isomerización. Según Battersby y col. (1977 a, b y c) la isomerización ocurriría luego de la formación de un bilano lineal no isomerizado mientras que de acuerdo con las propuestas de Llambías y Batlle (1970 a, 1971 b), Frydman y Frydman (1975 a) y Batlle y Rossetti (1977),

la isomerización tendría lugar en la etapa de condensación de las dos primeras moléculas de sustrato.

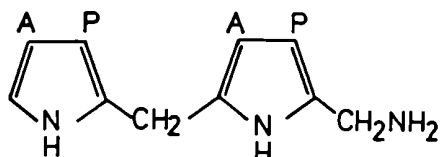


Figura III.7.: Dipirril-  
metano II

Con el objeto de definir esta situación, Scott y col. (1976) desarrollaron un nuevo enfoque para el estudio de esta reacción, el cual aparentemente puede proveer la forma de distinguir entre ambos mecanismos (Figuras III.8. y III.9.). La hipótesis de Mathewson y Corwin (1961) (Figura III.8.) esquematiza la vía del bilano simétrico en tanto que la teoría de Rimington-Johnson (Figura III.9.) estaría de acuerdo con las hipótesis de Cookson y Rimington (1954) y Bullock y col. (1958). En el último esquema, el camino A involucra una reacción intramolecular de tipo estrictamente químico, a través de un reordenamiento concertado  $7 \rightarrow 6$ , no excluyéndose la posibilidad de un reordenamiento intramolecular enzimático  $7 \rightarrow 8 \rightarrow 6$  (camino B). Scott y col. (1976) incubaron un dipirrometano simétrico, que carecía de grupo aminometilo (DPM 8) (Figura III.10.), marcado con  $^{14}\text{C}$ , con PBG-asa purificada de espinaca, extractos libres de células de *Clostridium tetanomorphum* y células enteras de *P. shermanii*. En todos los casos observaron que el DPM 8 se incorporaba en el urogen III y no en el I. Scott y col. (1976) propusieron que este compuesto se debería intercambiar con una molécula igual lo cual revelaría que durante la reacción el resto aminometilo se separaría totalmente del DPM formado en el primer paso de la reacción. Esto estaría probando que la síntesis del isómero III está controlada por la formación del DPM III y apoyaría la hipótesis de que la inversión del anillo se produciría durante la condensación de las dos primeras moléculas de PBG, mediante un mecanismo de transferencia del grupo aminometilo (Figura III.11.).

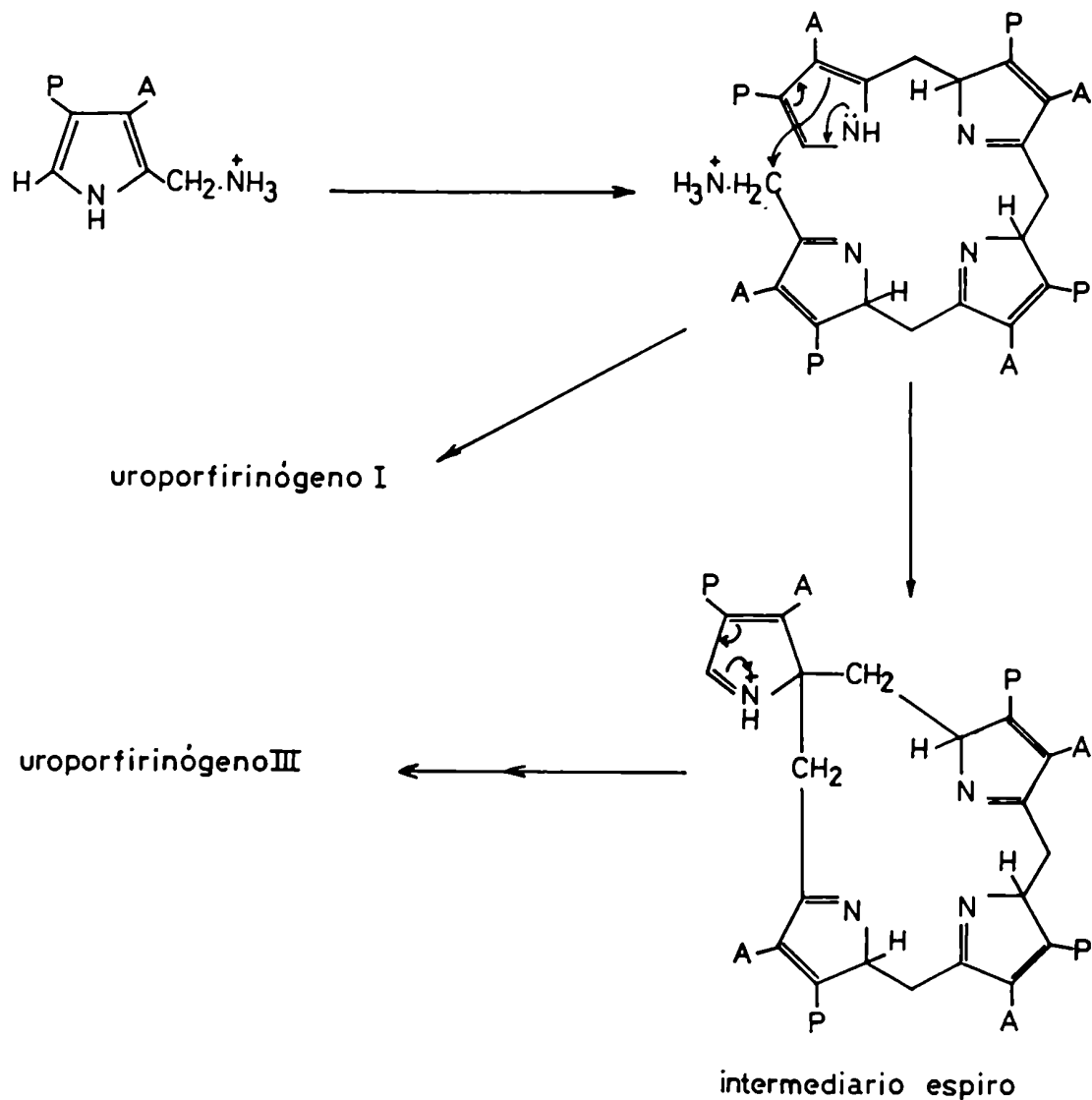


Figura III.8.: Hipótesis de Corwin para la formación del uroporfirinógeno III ó I.

Frydman y col. (1974) demostraron que el 2-aminometil tripirrano sintético (tripirrano I) (Figura III.12 A) no era sustrato de la Isomerasa ya fuera agregado sólo o bien en presencia de PBG en la mezcla de reacción. Tampoco se comportó como sustrato de la Deaminasa en ausencia de PBG e inhibió la síntesis enzimática de urogen III. Notaron además que este compuesto se incorporaba pobremente en el urogen I lo cual sugirió que no era un sustrato de la Deaminasa aunque sí podría ser un intermediario en la formación de uroporfirinógeno I. Asimismo, Frydman y col. (1978 b) estudiaron la interacción de los tripirranos II, III y IV (Figuras III.13., III.12 B y III.14.) con

las enzimas involucradas en la biosíntesis de uroporfirinógenos. El tripirrano III no funcionó como sustrato de la Isomerasa, ni de la Deaminasa, ni aún de la PBG-asa, ya fuera sólo o en presencia de PBG. Al igual que el tripirrano I no se incorporó en uroporfirinógeno I e inhibió la síntesis enzimática de urogen III. Cuando el tripirrano II se incubó en presencia de PBG y de cada una de las tres enzimas se observó que no sólo no se comportaba como sustrato de ninguna de ellas, sino que además ejercía un efecto inhibitorio mayor sobre la formación de urogen III que sobre la de urogen I. Este último efecto también fue observado con el tripirrano IV, el cual no se comportó como sustrato ni como intermediario en la biosíntesis de urogen III como tampoco en la de urogen I. Sin embargo, Franck y col. (1977 a, b) encontraron que el tripirrano IV se incorporaba significativamente en el hemo formado por hemolizados de sangre de pato. El tripirrano V (Figura III.15.) también era incorporado aunque en menor proporción que el anterior.

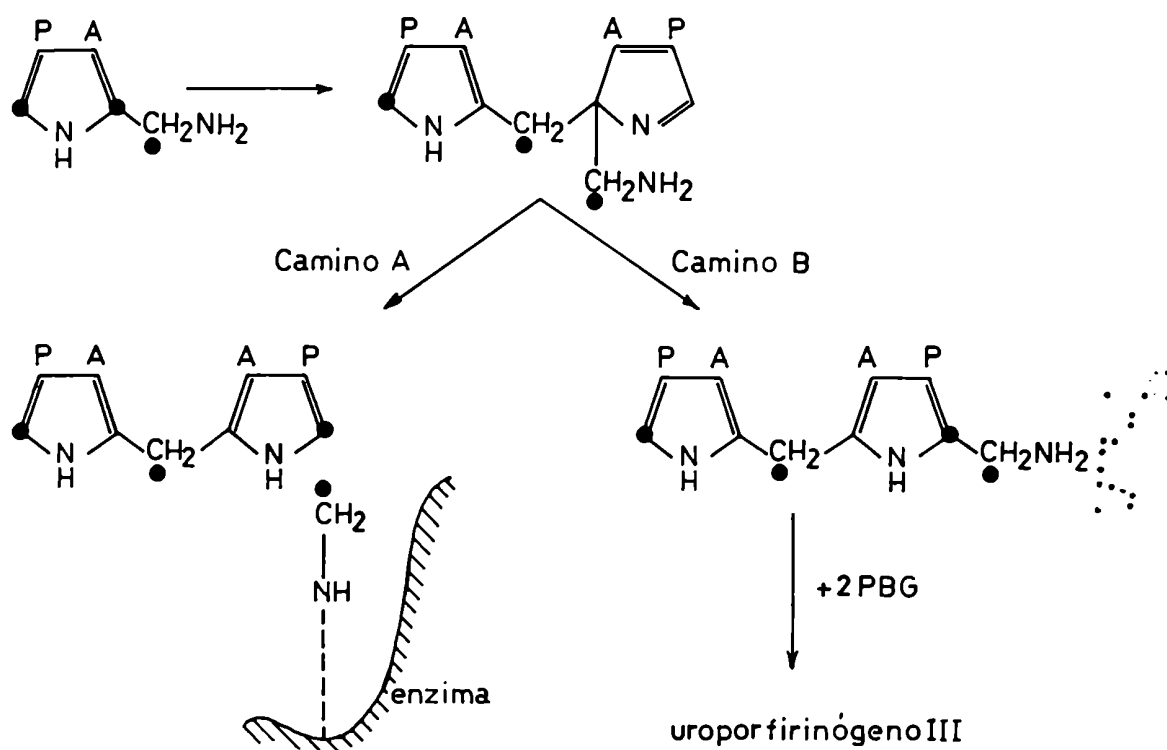


Figura III.9.: Hipótesis de Rimington-Johnson.



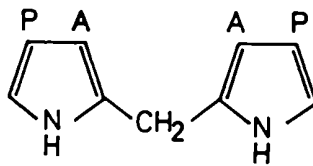


Figura III.10.: Dipirrometano "sin cabeza".

Los estudios de Franck sugieren que el sistema enzimático de sangre de pato podría utilizar, además del precursor biosintético preferido, otros oligopirroles isoméricos. Así, la enzima sería capaz de emplear no sólo uno sino varios intermediarios para la biosíntesis del hemo, si bien cada uno de ellos funciona con una eficiencia diferente. Este hecho, sumado a que en diferentes casos se han usado muy pequeñas cantidades de dipirroles y oligopirroles, a que existe una gran variación en las actividades enzimáticas y en las fuentes empleadas y además, a la notable tendencia de los oligopirroles a sufrir una condensación no enzimática, explicarían de algún modo los hallazgos contradictorios encontrados con precursores análogos (Frydman y col., 1978 a, b; Battersby y col., 1977 a, b, c; Franck y col., 1977 a, b; Scott y col., 1976).

Por otra parte, Davies y Neuberger (1973) incubando la Deaminasa obtenida de *Rp. spheroides* con PBG y en presencia de  $\text{NH}_3$ , hidroxilamina o metoxamina, aislaron distintos intermediarios empleando el método de filtración por geles de Sephadex G-25. En base a sus estudios los autores sugirieron que esos intermediarios serían tetrapirroles de cadena abierta en los cuales, el grupo amino del sustituyente lateral aminometilo de la unidad pirrol terminal, ha sido reemplazado por las bases, contienen una posición  $\alpha$  pirrólica libre y son relativamente inestables. Estos pirroles no eran utilizados por la Deaminasa ni inhibían la síntesis de urogen I (Figura III.16. B - D). Empleando hidroxilamina se aislaron también pequeñas cantidades de un monopirrol modificado (Figura III.16 A). Se ha propuesto que estos tetrapirroles sustituidos se forman por reacción de las bases con el complejo enzima-polipirrol, con la subsiguien

te liberación del producto modificado, de la superficie de la enzima.

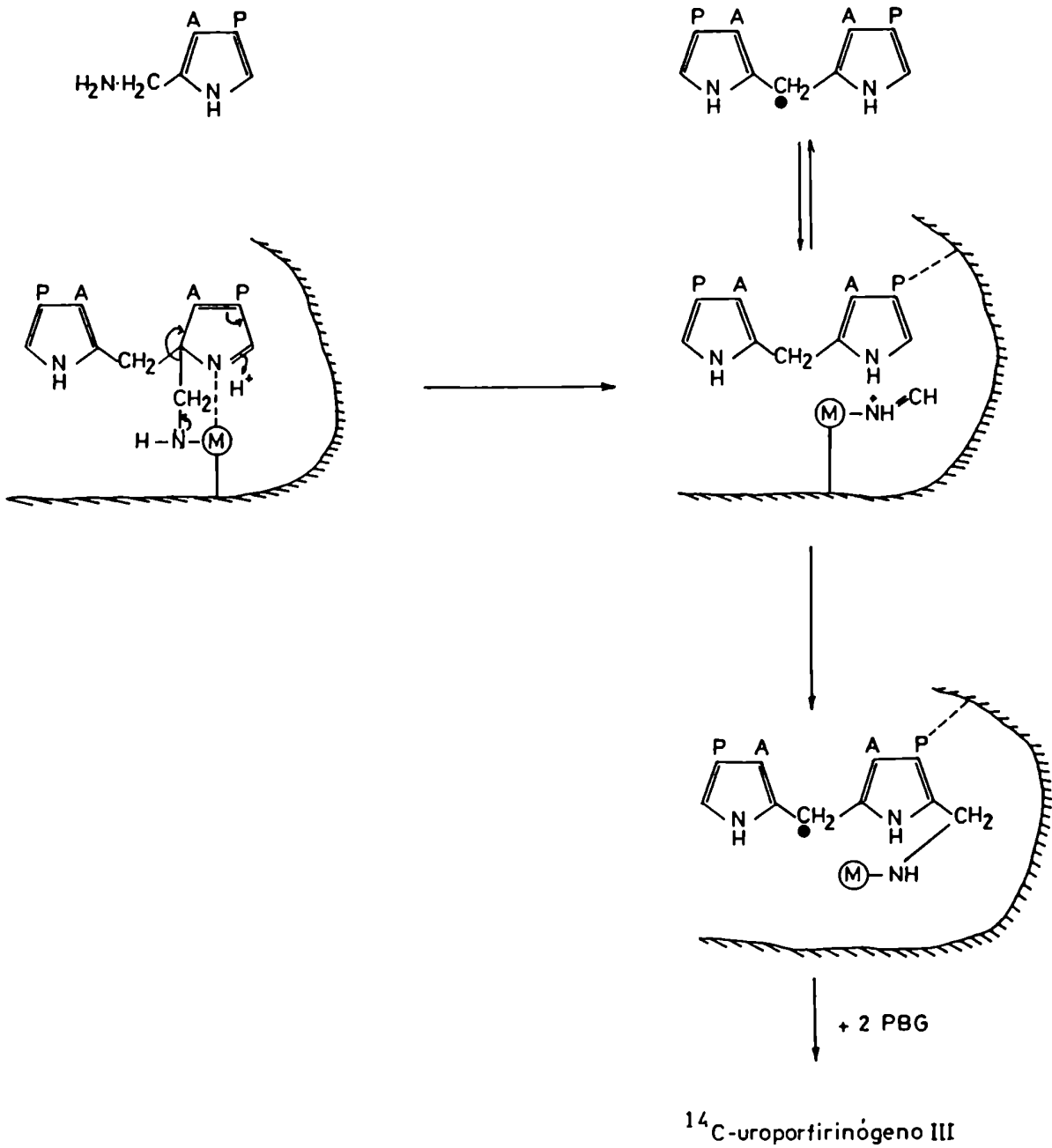
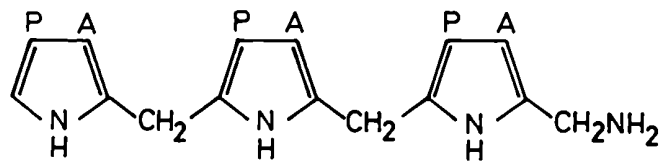
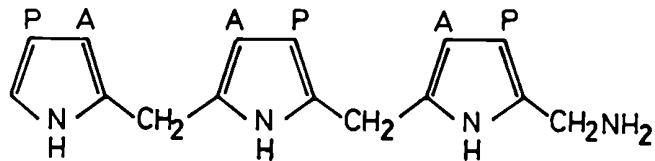


Figura III.11.: Hipótesis de Scott del dipirrilmetano "sin cabeza"



A



B

Figura III.12.: Tripirranos I (A) y III (B)

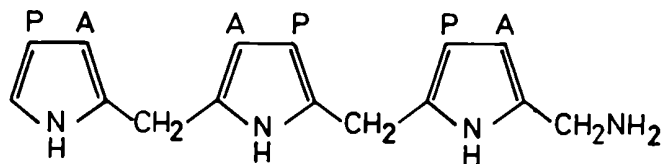


Figura III.13.: Tripirrano II

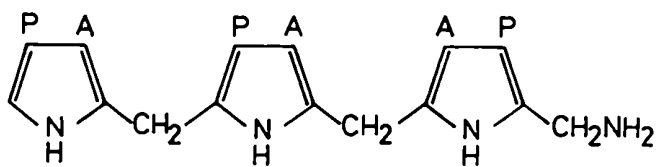


Figura III.14.: Tripirrano IV

#### III.4.2. Intermediarios tetrapirrólicos y mecanismo de acción

Un mecanismo que explique la naturaleza del proceso biosintético que conduce a la síntesis enzimática de uroporfirinó

genos a partir de PBG, debe necesariamente tener en cuenta to dos los aportes experimentales obtenidos. Hasta aquí, se han recopilado datos referentes a la detección, aislamiento, identificación y síntesis química y bioquímica de intermediarios po lipirrólicos de longitud variable, algunos de los cuales llevan a la formación del isómero III o I, según el caso. Discutiremos ahora, aspectos referentes al mecanismo de biosíntesis de uroporfirinógenos como así también las evidencias que permitieron identificar, en forma definitiva, al verdadero intermediario te trapirrólico involucrado en la misma. Paralelamente, veremos cómo la existencia de ese intermediario permitió postular un mecanismo de acción para la PBG-asa, el cual difiere en muchos aspectos, de los sugeridos por otros grupos de trabajo.

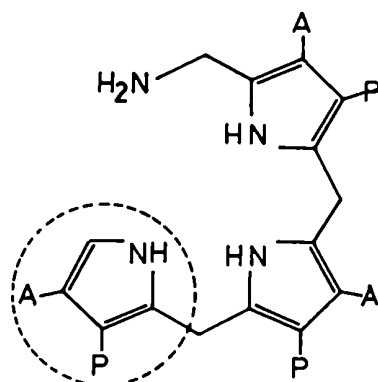


Figura III.15.: Tripirano V.

Hasta 1971 todavía no se había logrado demostrar si la Isomerasa era una enzima que actuaba complementando o modificando el modo de acción de la Deaminasa, o si tenía la función de una transferasa. En ese momento, la mayor parte de los datos con que se contaba, hacían pensar que la etapa de isomerización tendría lugar en el comienzo mismo de la condensación, aunque existían algunas dudas al respecto. A esa altura de las investigaciones, Llambías y Batlle (1971 b) postularon un esquema de reacción (Figura III.17.) que tenía en cuenta los hechos experimentales mencionados anteriormente. Los autores propusieron que la primer molécula de PBG se unía a la Deaminasa a través

de sus dos sustituyentes carboxílicos y su posición  $\alpha$  libre. La Deaminasa catalizaría luego la formación de un dipirrol con la segunda molécula de PBG, a partir del cual se originaría un tripirrol lineal que ya poseería la estructura de la serie III, por acción combinada de la Isomerasa. Como ya se dijo entonces, sobre la base de resultados preliminares que sugerían que los intermediarios polipirrólicos aislados naturalmente eran tripirranos, la Isomerasa funcionaría en una etapa posterior a la formación del dipirrol, pero antes de la inserción de la última molécula de PBG, si bien se consideraba la posibilidad de que la Isomerasa actuara en una etapa todavía anterior, es decir durante la formación del dipirrol (Llambías y Batlle, 1971 a, b).

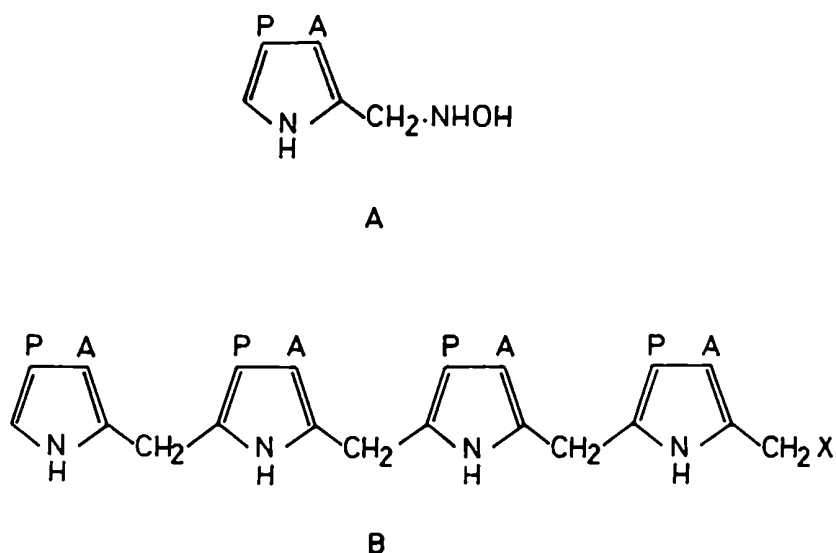


Figura III.16.: Estructuras sugeridas para los intermediarios aislados por Davies y Neugerger (1973).  
 X: NH.OH (B), NH<sub>2</sub> (C),  
 NH.OCH<sub>3</sub> (D)

Posteriormente, este mecanismo sufrió modificaciones de modo de ajustarse a las nuevas evidencias experimentales (Batlle y Rossetti, 1977) (Figura III.18.). Si no existen intermediarios pirrilmétanos comunes a los urógenos III y I, la unión y reacción inicial de las dos primeras moléculas de PBG

debería ser diferente según se tratara de la PBG-asa o la Deaminasa. Así, la primera molécula de PBG correspondiente al anillo D se uniría al complejo enzimático, posiblemente a la Deaminasa, a través de sus sustituyentes  $\beta$  carboxílicos y su posición  $\alpha$  libre y a la Isomerasa mediante su grupo  $\alpha$ -amino-metilo. En presencia de una segunda molécula de PBG, la Isomerasa actuaría modificando el sitio de condensación. De esta forma, como resultado de dicha condensación y del reordenamiento de las dos primeras moléculas de PBG se produciría un dipirrol del tipo PAAP o DPM III. En ausencia de Isomerasa, la condensación sería normal (cabeza-cola) lo que originaría el dipirrimetano I (DPM-I) o PAPA. Una vez formado el dipirrol, ocurriría la inserción de dos moléculas más de PBG. Cuando la cadena alcanza la longitud crítica correspondiente a un tetrapirrol, se produciría la ciclación. Una vez finalizado este proceso se separarían las enzimas las cuales volverían a asociarse para iniciar un nuevo ciclo. De acuerdo con este mecanismo, el intermediario tetrapirrólico de una síntesis normal correspondería a un tetrapirrimetano isomerizado PAAPAPAP y el proveniente de la Deaminasa, a un PAPAPAPA. Esta última hipótesis no está de acuerdo con la sugerida por los grupos de Scott y Jordan y de Battersby, según veremos más adelante.

El grupo de Battersby demostró, mediante experiencias empleando  $^{13}\text{C}$ , que los 4 anillos pirrólicos del urogen III se unían en forma secuencial siendo el último (anillo D) el que sufría un reordenamiento intramolecular (Battersby y col., 1978; 1979 a, b). Battersby y col. (1979 c) hallaron que la Deaminasa en presencia de PBG formaba como intermediario un bilano lineal no isomerizado, el cual en ausencia de Isomerasa se liberaría como hidroximetilbilano (HMB) (Figura III.3.). El HMB se transformaría no enzimáticamente en urogen I, pero en presencia de Isomerasa se convertiría rápidamente en urogen III.

En 1980, Battersby y col. corroboraron la acción de la Isomerasa sobre el HMB, produciendo una isomerización solamente sobre el anillo D y una rápida ciclación para originar el urogen III.

En forma paralela, el grupo de Scott encontró también un posible sustrato para la Isomerasa. Burton y col. (1979b) efectuaron estudios de espectroscopía RMN de  $^{13}\text{C}$  y presentaron evidencias de que la transformación enzimática de PBG en urogen I y urogen III ocurriría a través de un intermediario libre deno

minado preuroporfirinógeno. La estructura de este intermediario no fue totalmente elucidada en ese momento, sugiriéndose tres posibles compuestos (Figura III.19.). Jordan y col. (1979) demostraron que el preuroporfirinógeno, producto de la acción del PBG sobre la Deaminasa actuaba como sustrato de la Isomerasa originando un alto porcentaje de tipo III. En ausencia de Isomerasa, este intermediario se ciclaría químicamente formando el urogen I. Estos mismos autores presentaron también evidencias que demostraron que la Deaminasa y la Isomerasa funcionarían independiente y secuencialmente en la conversión de PBG en urogen III.

En 1979, Jordan y Seehra usando cantidades estequiométricas de PBG marcado con  $^{14}\text{C}$  y Deaminasa parcialmente purificada de *Rp. spheroides*, seguida de la adición de un exceso de PBG frío, demostraron que el orden de unión de las cuatro moléculas de sustrato correspondía al ABCD. Estos resultados son coincidentes con los reportados por Battersby y col. (1978, 1979 b).

Scott y col. (1980) sobre la base de evidencias bioquímicas y de estudios de NMR, pusieron fin a las controversias suscitadas entre este grupo y el de Battersby, en lo referente a la estructura del intermediario tetrapirrólico HMB o preuroporfirinógeno. Los autores confirman para el preuroporfirinógeno la estructura A de la Figura III.19.; este intermediario sería el sustrato natural para la isomerasa, a pH 7,8-8,5 y 37 °C. A 0 °C, podría ocurrir la formación de otras especies como el N-alquilpirrol de la Figura III.19.B, como observaron en sus primeras experiencias (Burton y col., 1979a y b).

Según Scott y col. (1980), es probable que las especies mayoritarias liberadas al medio por la Deaminasa, posean la estructura 1 (Figura III.20.). Esta última especie puede sufrir:

- a) hidratación a 2 y cierre del anillo formando así urogen I (3), en ausencia de Cosintetasa;
- b) adición de nucleófilos catalizada por la Deaminasa ( $\rightarrow$  4);
- c) reordenamiento a uroporfirinógeno III (5) catalizado por la Isomerasa.

Por su parte, en otra publicación, Jordan y Berry (1980) considerando los datos obtenidos por espectroscopía de RMN concluyeron que la estructura más probable para el preuroporfirinógeno sería la de un hidroximetilbilano. Estos autores obtuvieron el intermediario incubando PBG con Deaminasa de *Rp. spheroides*. Una vez sintetizado el preuroporfirinógeno lo utilizaron como sustrato de la Isomerasa proveniente de diversas fuentes:

*Rp. spheroides*, levaduras, germen de trigo, reticulocitos humanos, eritrocitos de ave y bazo de ratón. En todos los casos se obtuvo un excelente rendimiento de urogen III.

El preuroporfirinógeno es un intermediario sumamente inestable a pH fisiológico ( $t_{1/2} = 4$  minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , pH: 8,2-8,5) (Jordan y Berry, 1980; Jordan y col., 1980).

Berry y Jordan (1981) trataron de aislar y caracterizar los complejos enzima-sustrato formados mezclando en forma rápida Deaminasa purificada de *Rp. spheroides* y cantidades crecientes y estequiométricas de ( $^{14}\text{C}$ ) PBG. El empleo de la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida permitió determinar que la Deaminasa presentaba una sola banda, en tanto que las muestras provenientes de los distintos sistemas de mezclado poseían movilidad electroforética progresivamente superior y migraban en bandas discretas. Anderson y Desnick (1980) habían reportado la presencia de bandas múltiples cuando incubaron la Deaminasa aislada de eritrocitos humanos, con exceso de PBG; estas bandas corresponderían también a los intermediarios enzima-PBG<sub>n</sub>. Las importantes observaciones efectuadas por Berry y Jordan (1981), sugirieron a los autores que estaban en presencia de los distintos intermediarios de la reacción catalítica, involucrando uno, dos y tres residuos pirrólicos unidos a la Deaminasa: a) la cantidad de marca ( $^{14}\text{C}$ ) asociada a la proteína era mayor en las bandas de mayor movilidad electroforética; b) a medida que la cantidad de PBG que interaccionaba con la enzima aumentaba, las bandas de proteína de mayor movilidad electroforética se formaban a expensas de las bandas de menor movilidad y de la enzima nativa; c) las muestras con proteína marcada, aisladas e incubadas con PBG frío en exceso, mostraron actividad de Deaminasa y rindieron urogen I. Debido a que ya se había establecido (Jordan y Berry, 1981) que la interacción de la Deaminasa con PBG conducía a la formación de complejos intermediarios covalentes, Berry y Jordan (1981) concluyen que sólo el PBG que forma el anillo A en el preuroporfirinógeno, está covalentemente unido a la enzima y que las moléculas siguientes de sustrato contribuyen a la formación del tetrapirrol en tanto que el primer PBG del anillo se mantiene unido en forma covalente al sitio activo de la Deaminasa. Bajo las condiciones de esta experiencia, los autores observaron sólo 3 complejos enzima-intermediario presumiblemente debido a que el complejo enzima-tetrapirrol es inestable y se libera rápidamente para formar el preuroporfirinógeno.



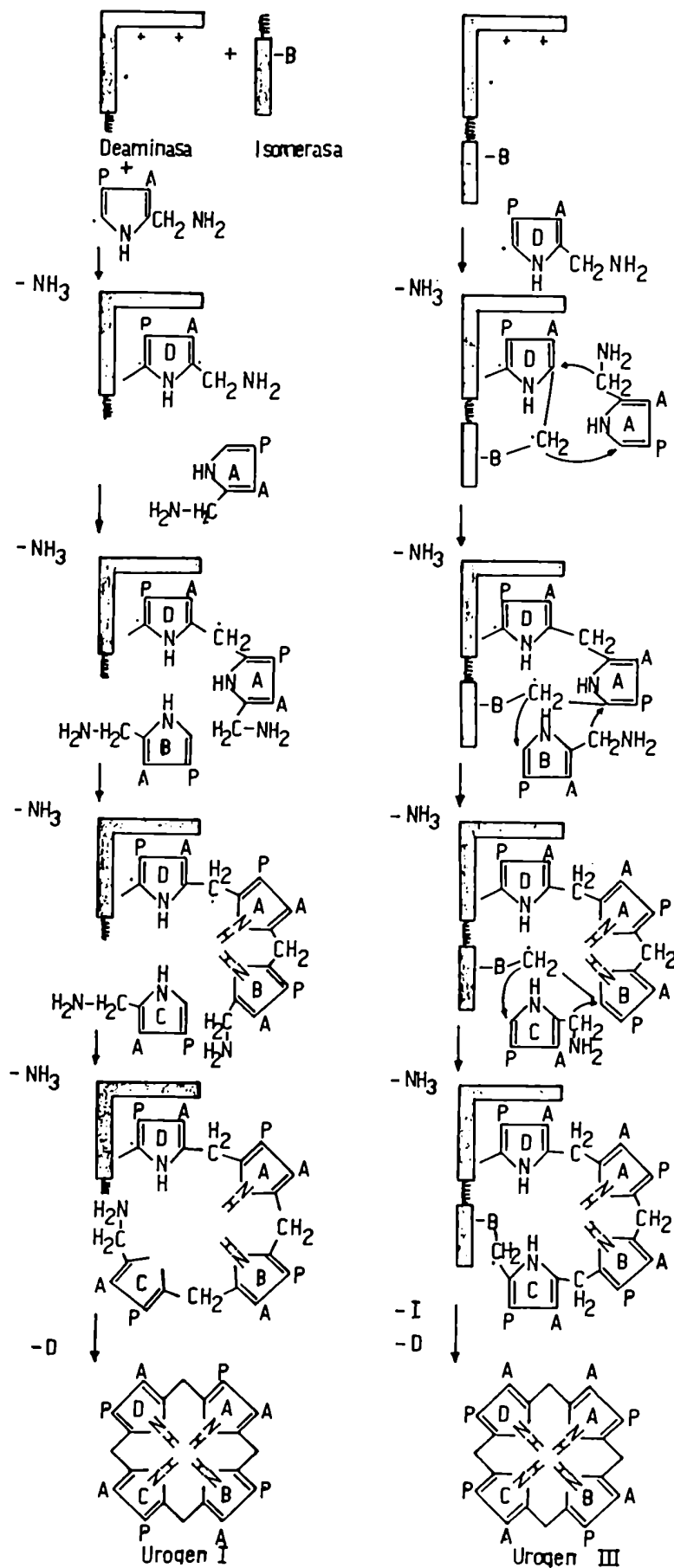


Figura III.17.: Esquema propuesto para la formación enzimática de uroporfirinógenos I y III a partir de PBG.

A: cadena lateral acética; P: cadena lateral propiónica; D o I: Deaminasa; I: Isomerasa.

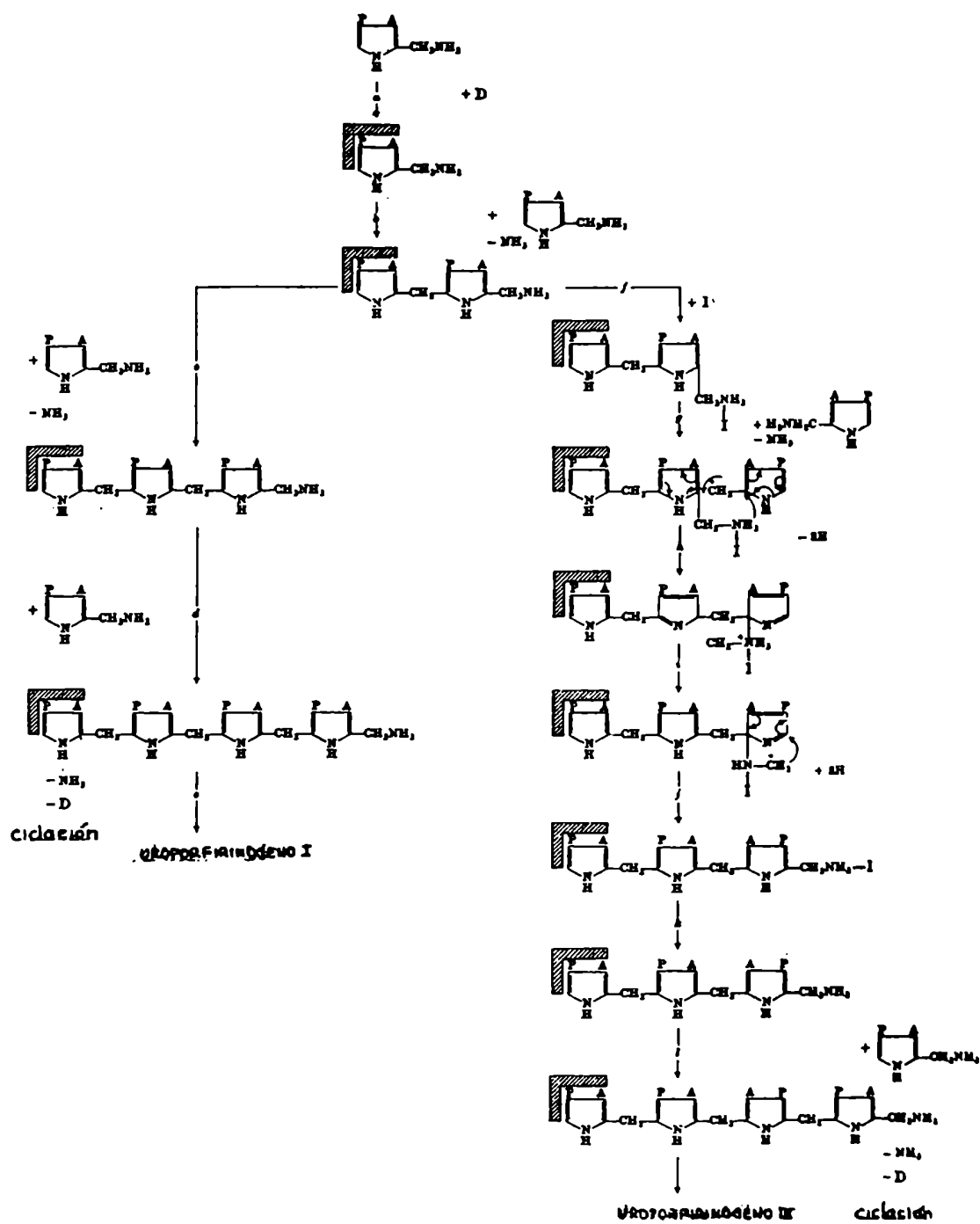


Figura III.18.: Mecanismo de acción de la PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977).

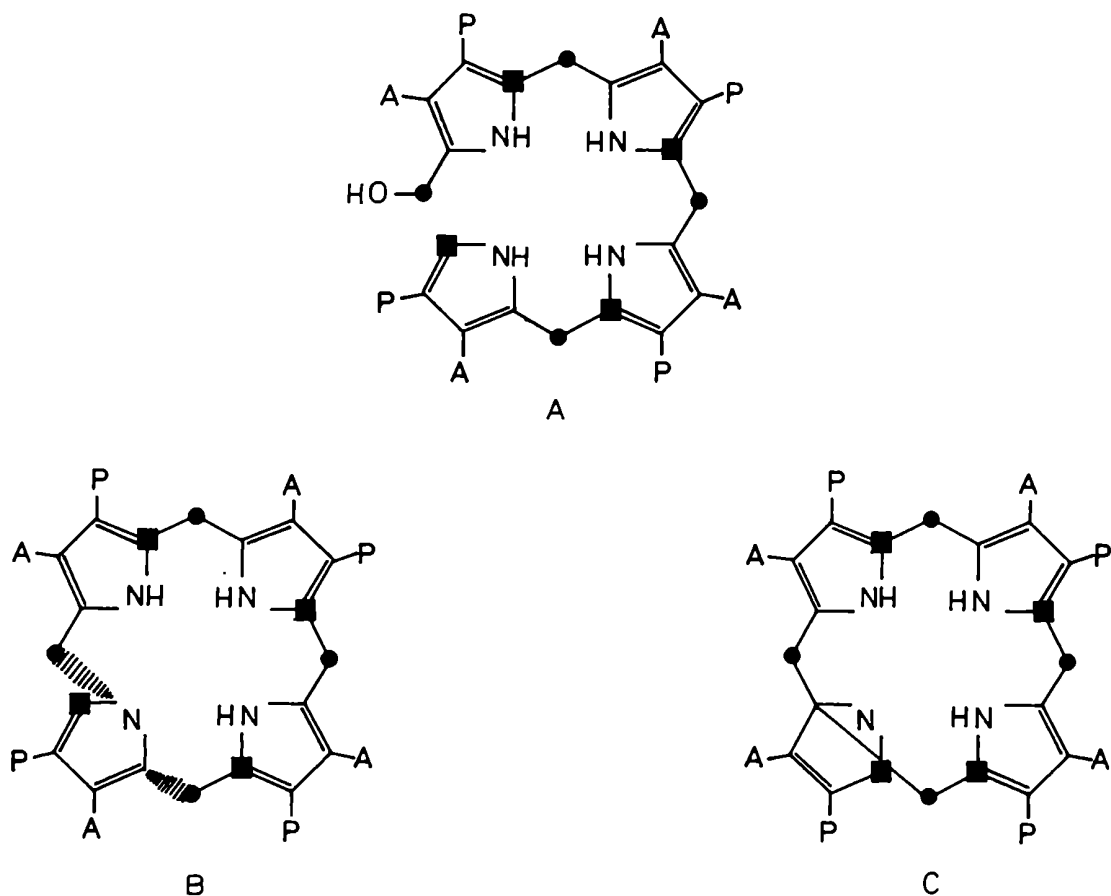


Figura III.19.: Estructuras sugeridas por Burton y col. (1979) para el preuroporfirinógeno.

Numerosos grupos de trabajo se han ocupado de estudiar el mecanismo de acción de la Deaminasa. Entre ellos, podemos mencionar los correspondientes a Jordan y Seehra (1979), Battersby y col. (1979 b); Seehra y Jordan (1980) y Jordan y Berry (1981). Resumiendo entonces, Seehra y Jordan (1980) corroboraron el orden de adición de las 4 moléculas de PBG para formar el preuroporfirinógeno. Bajo condiciones normales no hay liberación de intermediarios durante la síntesis del preuroporfirinógeno, encontrándose los mismos unidos a la enzima (Frydman y col., 1976). Jordan y Berry (1981) propusieron un mecanismo de acción para la Deaminasa, en el cual la primera molécula de sustrato que da origen al anillo A del producto (Jordan y Seehra, 1979) se encuentra covalentemente unida a la enzima habiéndose desplazado el residuo amino. Sucesivamente se van uniéndose las siguien

tes moléculas de PBG, liberándose el tetrapirrol formado, a nivel de la unión covalente. Este mecanismo difiere del de Anderson y Desnick (1980) en que el grupo amino del PBG es desplazado durante la unión inicial a la enzima, debido a la formación de la unión covalente.

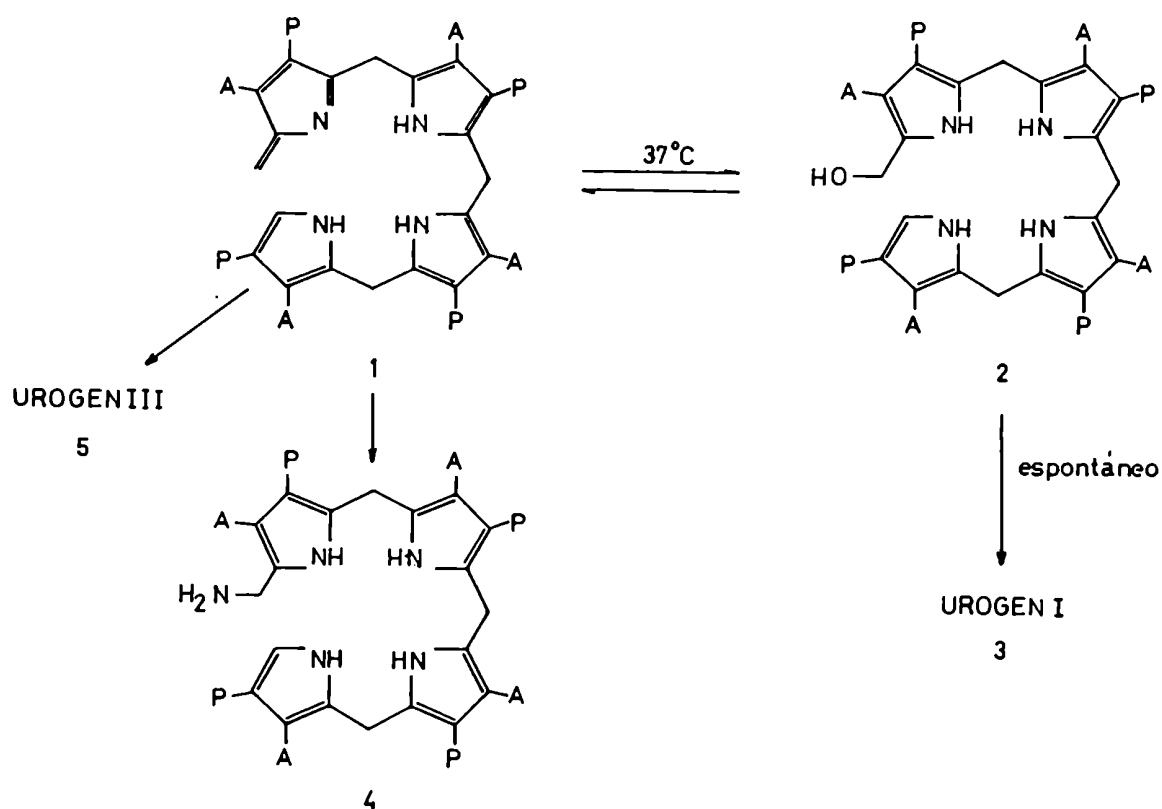


Figura III.20.: Especies propuestas por Scott y col. (1980).

La incorporación específica del bilano intacto no reordenado 1 (Figura III.21.) en uroporfirinógeno III, por parte de las enzimas Deaminasa e Isomerasa de *Euglena gracilis* permitió demostrar (Battersby y col., 1981 c; Dauner y col., 1976) que el único reordenamiento intramolecular establecido para la biosíntesis de las porfirinas naturales tipo III (Battersby y col., 1976), ocurre a nivel del tetrapirrol. Estas conclusiones resultaron diferentes a las alcanzadas por otros autores (Frydman y col., 1973; Frydman y Frydman, 1975 b; Scott y col., 1976) quienes sugirieron que ocurriría un reordenamiento inicial a pirrometano (Figura III.22.). Debido a ello fue de importancia dilucidar si las enzimas reconocían preferentemente al bilano 1 y có

mo actuaban frente a otros bilanos isoméricos. Con este fin, Battersby y col. (1982 a) estudiaron la acción de la PBG-asa de *Euglena gracilis* sobre los aminometilbilanos sintéticos 1-6 (Figura III.21.). Estos aminometilbilanos fueron seleccionados de modo tal que el 1 poseía una estructura no reordenada correspondiente a una condensación cabeza-cola de 4 moléculas de PBG; los bilanos 2-5 tenían un anillo invertido y el bilano 6, 3 anillos invertidos. Los datos experimentales indicaron que los bilanos 2 y 6 no eran buenos sustratos para el sistema enzimático. En contraste, se encontró que la PBG-asa incrementaba la velocidad de cierre del anillo más eficientemente para el bilano 1 que para los 3, 4 y 5. Estos hallazgos demuestran que evidentemente, el reordenamiento no ocurre al comienzo del proceso de condensación originando el pirrometano de la Figura III.22.), como afirmaban algunos autores (Frydman y col., 1973; Frydman y Frydman, 1975 b; Scott y col., 1976). Además, los resultados obtenidos para los bilanos 4 y 5 mostraron que la inversión del anillo terminal puede ser llevada a cabo por el sistema enzimático aún con sustratos diferentes del natural. El bilano no reordenado 1 resultó ser el mejor sustrato para la PBG-asa; no sólo exhibió la mayor afinidad de unión al sitio activo (menor Km) sino que se transformó en urogen III a una velocidad mucho mayor que la medida para los otros bilanos. Sin embargo, este sustrato fue convertido en urogen III a una velocidad menor que la correspondiente al PBG. En base a ello, los autores postulan que el bilano 1 no puede ser, con esa estructura exacta, el verdadero intermediario en el camino biosintético de PBG a urogen III. Las conclusiones anteriores y las derivadas de los trabajos con los pirrometanos (Battersby y col., 1981 a) son consistentes con el hecho de que el aminometilbilano 1 puede ser aceptado por la enzima y que reacciona para generar el intermediario 7 (Figura III.23.). Este último compuesto se formaría, en condiciones normales, sobre la enzima a partir de 4 moles de PBG.

Por otra parte, Battersby y col. (1982 a) observaron que cuando ocurría un aumento en la velocidad enzimática de cierre del anillo del bilano 1, existía un corto lag de sólo unos pocos minutos, antes de que la formación de urogen I alcance la velocidad máxima. Esto no ocurría cuando se estudiaba la síntesis de urogen III. En un trabajo posterior, Battersby y col. (1982 b) investigaron la estructura y síntesis del intermedia-

rio acumulado durante dicho lag y trataron de clarificar el rol de las enzimas Deaminasa e Isomerasa en la biosíntesis de urogen III. Los resultados revelaron que la Deaminasa convertía PBG en un intermediario inestable el cual se transformaba espontáneamente en urogen I a pH 8,25. Por acción de la PBG-asa, este intermediario se convertía en urogen III. Como se demostró que la Deaminasa no tenía aparentemente efecto sobre el intermediario, se consideró probable que la síntesis de urogen III a partir del mismo, ocurriría mediada solamente por la Isomerasa. Mediante estudios de espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  sobre el intermediario generado a partir de PBG marcado con  $^{13}\text{C}$  y estudios de síntesis a partir de hidroximetilpirrol, que es el hidroxianálogo del PBG, los autores establecieron que su estructura era la de un tetrapirrol lineal no reordenado, el hidroximetilbilano (Figura III.24.A). Poco tiempo antes de efectuado este hallazgo, como ya se mencionó, el grupo de Scott (Burton y col., 1979) había reportado la detección de un intermediario obtenido a partir de Deaminasa, cuya estructura podría responder al compuesto cíclico de la Figura III.24. B que era una de las tres propuestas. Battersby y col. (1982 b) demostraron que esa estructura era incorrecta en base a estudios químicos, espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  y experimentos de doble marcación con  $^{13}\text{C}$ : $^{15}\text{N}$ . Estos últimos autores comprobaron también que el aminometilbilano 1 (Figura III.21.) era convertido por la Deaminasa en hidroximetilbilano justificando, de esta manera la presencia de un lag en la formación de urogen I cuando el bilano 1 era tratado con Deaminasa. Evidentemente, esta fase lag representaba la formación del HMB hasta que el pool de este producto fuese suficiente como para que su remoción por ciclación a urogen I balanceara la velocidad de su formación enzimática a partir de aminometilbilano. Además, se encontró que las muestras naturales y sintéticas del HMB se comportaban como sustratos excelentes e idénticos de la Isomerasa (libre de Deaminasa), produciendo urogen III. Entonces, en cuanto al rol de las enzimas Deaminasa e Isomerasa, los hallazgos de Battersby y col. (1982 b) prueban concluyentemente que: la Deaminasa, en ausencia de Isomerasa, une 4 moléculas de PBG mediante una condensación cabeza-cola, liberando a la solución el HMB no reordenado; o sea, la Deaminasa es una enzima condensante; la Isomerasa convierte el HMB en urogen III mediante un reordenamiento intramolecular del anillo D; así la Isomerasa es justamente una enzima reordenadora y ciclante.

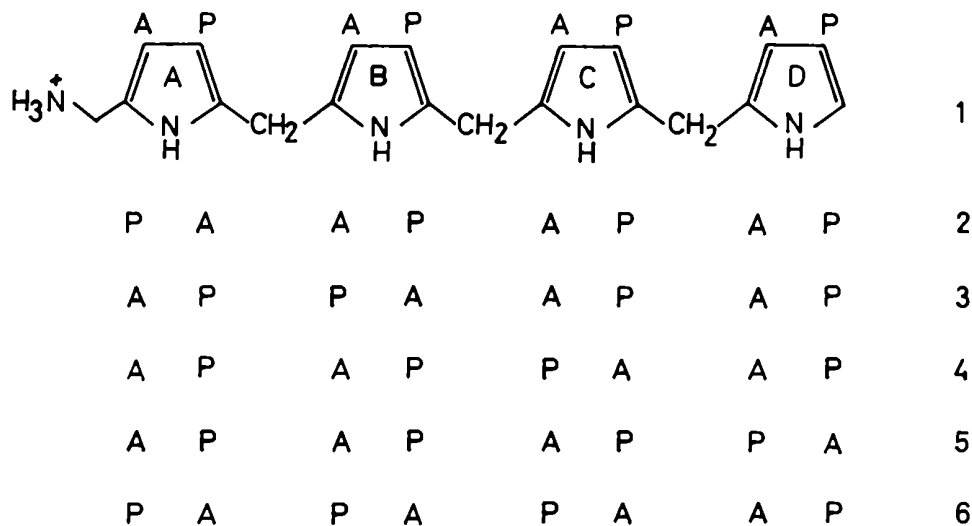


Figura III.21.: Estructura de los aminometilbilanos sintéticos ensayados por Battersby y col. (1982 a) sobre la PBG-asa de *E. gracilis*.

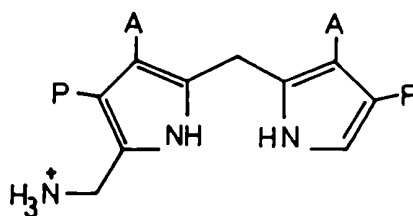


Figura III.22.: Estructura del pirrometano postulada por Frydman y col. (1973), Frydman y Frydman (1975 b), Scott y col. (1976).

En base a todos los datos experimentales obtenidos hasta ese momento, el grupo de Cambridge (Battersby y col., 1982 b) ha postulado un nuevo mecanismo para la biosíntesis de urogen III (Figura III.25.). Como ya se mencionó, la primera unidad de PBG se encuentra covalentemente unida a la Deaminasa a través de un grupo nucleofílico X (Battersby y col., 1979 b; Anderson y Desnick, 1980, Jordan y Berry, 1981). Una vez formado el tetrapirrol lineal A, la eliminación de X formaría el azafulveno B el cual podría reaccionar con agua dando el hidroximetilbilano C. Pequeños nucleófilos como amonio, hidroxil-

amina y metoxiamina pueden competir con el agua por el azafulveno produciendo los bilanos moderadamente estables D, E y F, detectados en los trabajos de Bogorad y Neuberger (Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973). Battersby y col. (1983 a) llevaron a cabo experiencias de intercambio y atrapamiento semejantes a las mencionadas. El aminometilbilano D está en equilibrio con el azafulveno sobre la superficie de la Deaminasa lo cual permite que el bilano sintético D actúe como sustrato para el sistema Deaminasa-Cosintetasa y entre en el camino biosintético normal.

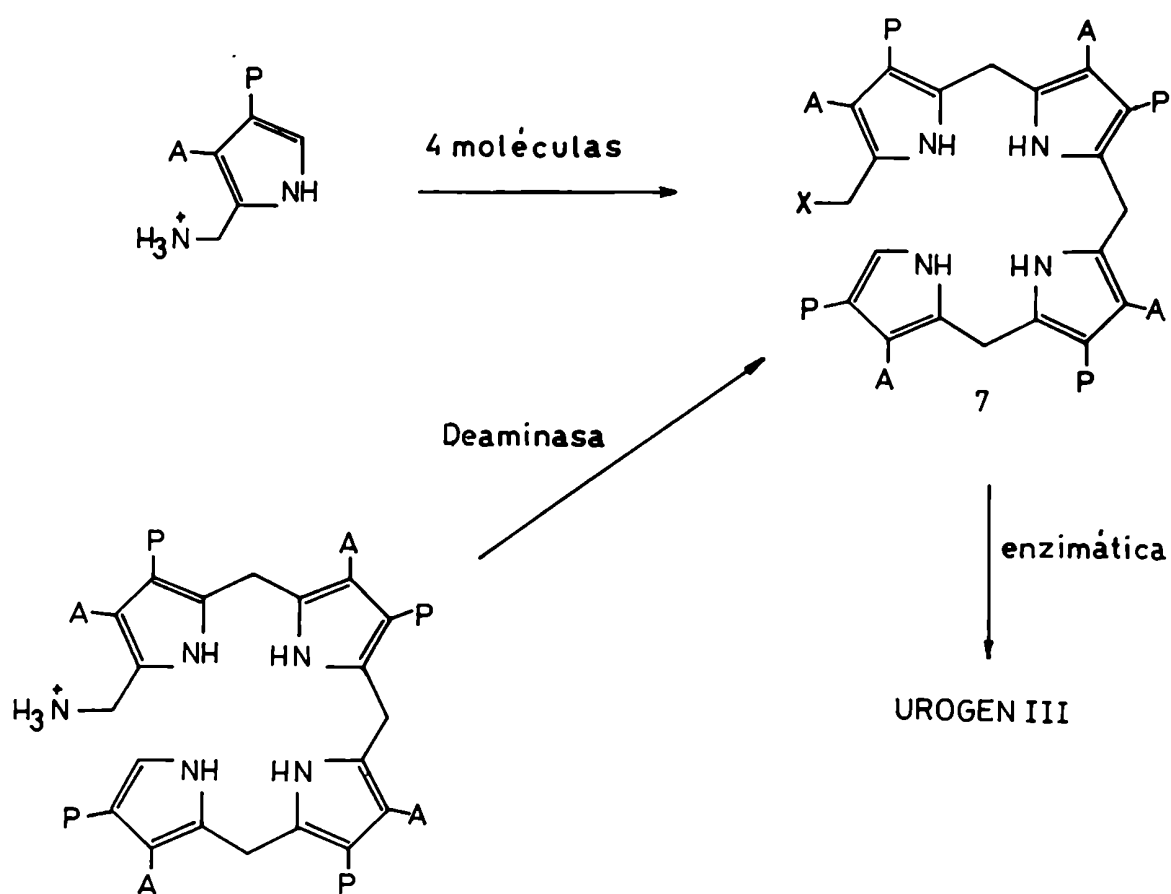


Figura III.23.: Esquema propuesto por Battersby y col. (1982 a) para la formación del intermediario 7 a partir del aminometilbilano 1.

El hidroximetilbilano puede ciclarse químicamente a considerable velocidad para dar urogen I, pero su rol natural consiste en actuar como sustrato de la Isomerasa para formar uro-



gen III. Un posible intermediario en el proceso de reordenamiento es el sistema spiro (G), similar al considerado en 1961 por Mathewson y Corwin. El proceso de formación de urogen III podría entonces involucrar fisión y recombinación, pero una serie de corrimientos (1,5) sigmatrópicos alrededor del anillo D, también es posible.

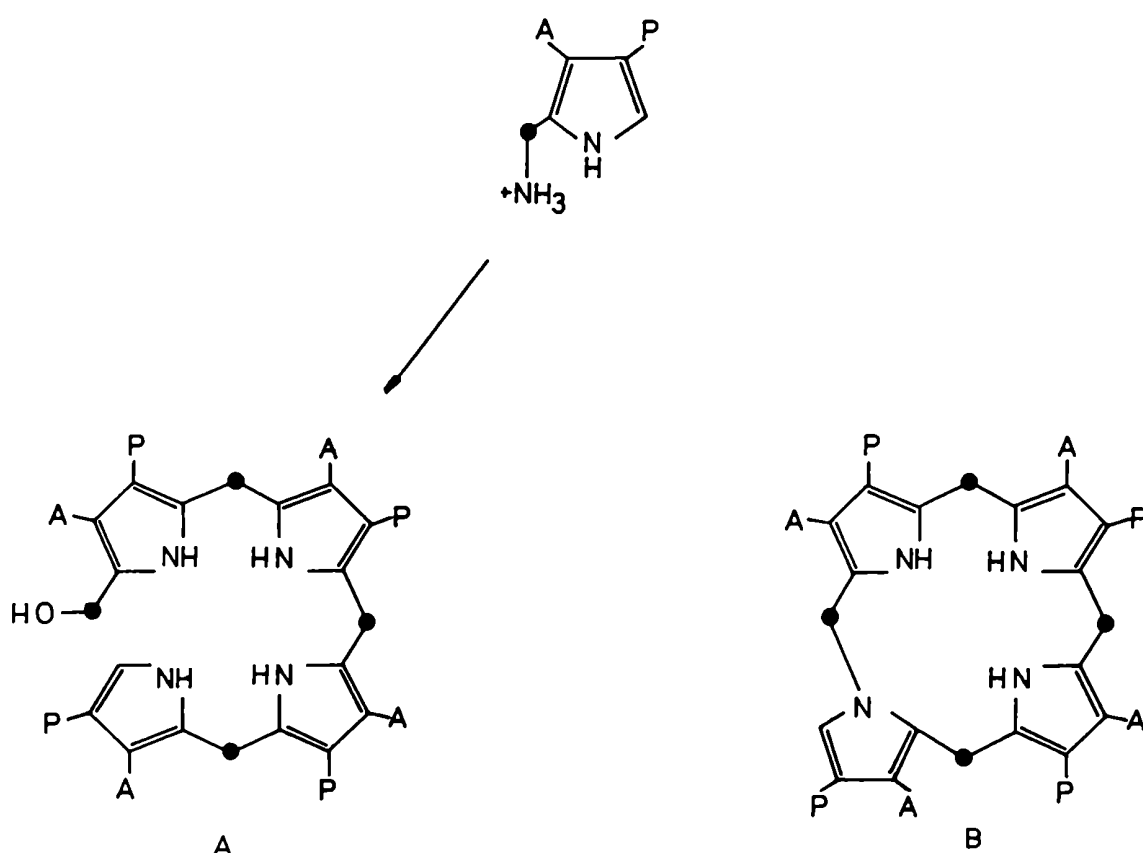


Figura III.24.: Estructuras propuestas por Battersby y col. (1982 a) (A) y Burton y col. (1979) (B) para los posibles sustratos de la Isomerasa.

Un segundo mecanismo probable involucra la fisión de la unión C-15/ 16 del bilano C, después de la protonación del C-16, mientras está sobre la superficie de la Isomerasa, seguida por la inversión del anillo D sin involucrar ningún intercambio con el medio por parte del fragmento pirrólico separado. La recombinación podría rendir el bilano H con el anillo invertido el cual por ciclización lineal formaría el urogen III. Sin embargo, el bilano H mostró ser un sustrato pobre para la Isomerasa, con lo cual esta posibilidad fue eliminada (Battersby y col., 1981 b).

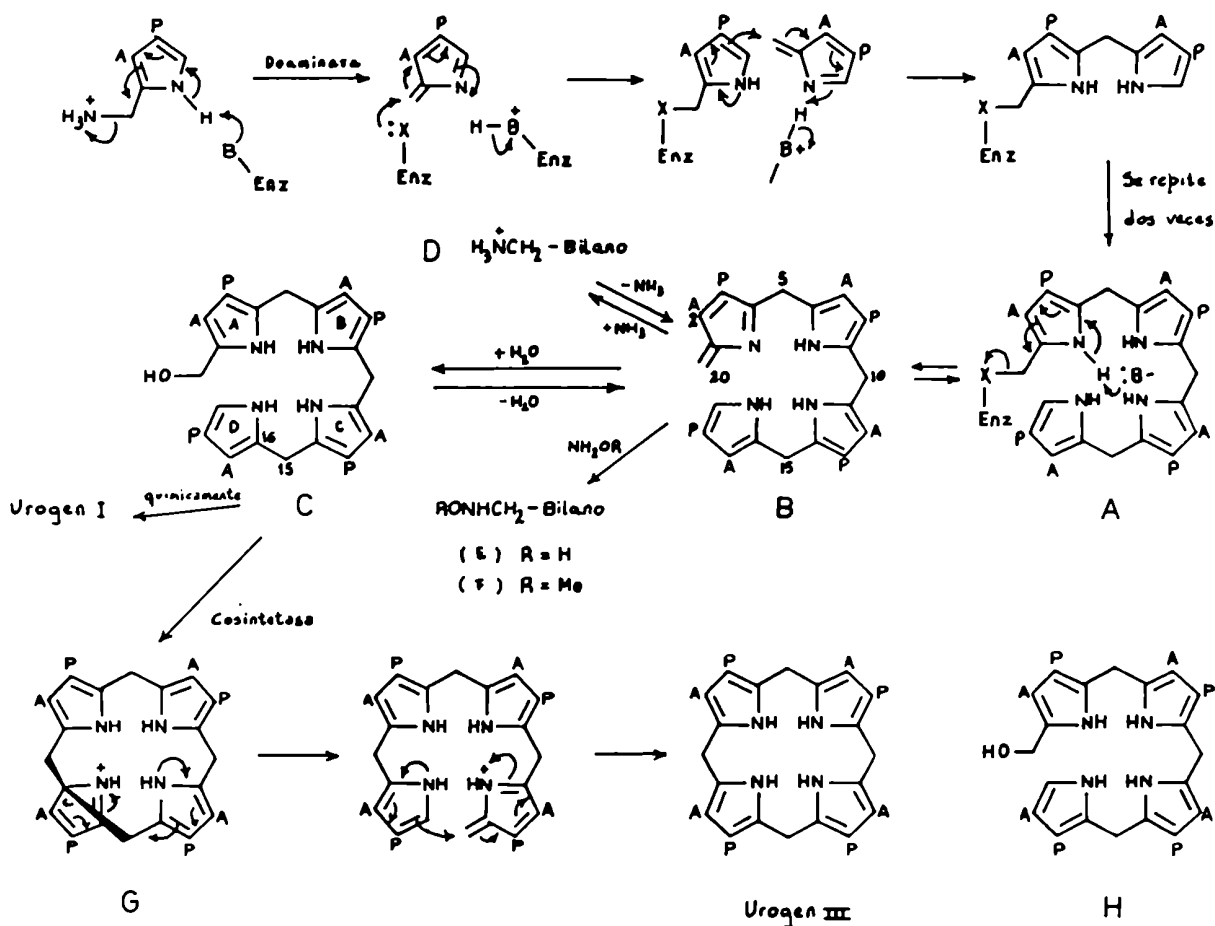


Figura III.25.: Mecanismo de biosíntesis de urogen III propues to por Battersby y col. (1982 b).

No obstante, existe una alternativa atractiva con respec to al mecanismo spiro al cual nos referiremos como mecanismo del metileno externo (Figura III.26.) (imina cuaternaria). En este caso, durante la secuencia de inversión, el anillo D se encuentra covalentemente unido al grupo metileno externo y finalmente este metileno electrofílico es regenerado cuando se forma el urogen III.

Un año después el grupo de Battersby (Battersby y col., 1983 a), trabajando con la Deaminasa purificada de *Euglena gracilis* demostró que esta enzima une 4 unidades intactas de PBG en la secuencia de formación de urogen I y que los intermedios mono, di, tri y tetrapirrólicos están covalentemente unidos a la Deaminasa, antes de la liberación de HMB. Observaron además que la síntesis de este bilano se iniciaba con el ani-

llo A y finalizaba con el D, incorporándose cada una de las moléculas de PBG en el tetrapirrol, a la misma velocidad. Los autores lograron detectar un intermediario muy reactivo (más reactivo que el HMB) cuya estructura se identificó con el tetrapirrol lineal azafulveno.

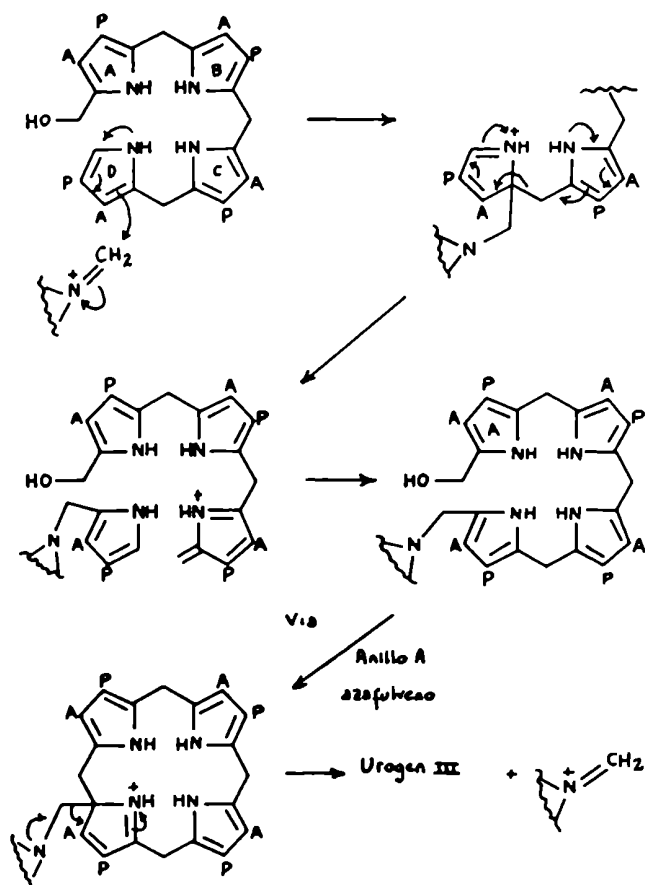


Figura III.26.: Mecanismo del "metileno externo" (imina cuaternaria).

Battersby y col. (1983 b) estudiaron la interacción entre la Deaminasa y su producto, el hidroximetilbilano, como así también la relación entre Deaminasa e Isomerasa. Mediante experiencias cinéticas demostraron que la Deaminasa es inhibida por su propio producto, el HMB. Esta inhibición, medida en función del consumo de sustrato PBG resultó ser competitiva, afectando el Km pero no la Vmax. Estos resultados avalan la hipótesis de Levin (1971) quien había propuesto que la Isomerasa posiblemente, era capaz de remover algún intermediario generado por la

Deaminasa, el cual inhibía la actividad de esta última. En base a los hallazgos de Battersby y col. (1983 b) se deduce ahora fácilmente que la estimulación encontrada por Levin (1971) de la actividad de la Deaminasa por agregado de Isomerasa a pH's alcalinos, donde el HMB ve aumentada su estabilidad, se debía a que la Isomerasa removía este intermediario inhibitorio. A pH's menores no se observa este fenómeno ya que, en estas condiciones, ocurre la ciclación del HMB a una velocidad extremadamente alta.

En una segunda serie de experiencias, Battersby y col. (1983 b) lograron obtener el intermediario tetrapirrólico covalentemente unido a la Deaminasa = (1-<sup>3</sup>H) HMB-Deaminasa. Disponiendo de este sistema Deaminasa-bilano los autores efectuaron ensayos tendientes a determinar cual era la causa de que el HMB fuese liberado de la enzima. Los resultados obtenidos mostraron que era la unión de la siguiente molécula de PBG a la Deaminasa, una vez construido el tetrapirrol, lo que conducía a la rápida liberación del HMB. En ausencia de PBG, pequeñas cantidades de azafulveno y HMB estarían en equilibrio con el sistema Deaminasa-bilano y el HMB libre se ciclaría lentamente para convertirse en urogen I. Sobre esta base, el efecto de la Isomerasa (la Isomerasa es capaz de liberar el 72% del HMB unido al sistema Deaminasa-bilano, luego de 15 minutos) puede comprenderse como debido a la conversión de las pequeñas cantidades de HMB libre en urogen III; esta remoción del bilano libre desplazaría el equilibrio bilano unido  $\rightleftharpoons$  azafulveno  $\rightleftharpoons$  bilano libre, causando la liberación del bilano unido. Los estudios cinéticos de Williams y col. (1981) y Williams (1984) indicaron que la Deaminasa trabajaba a través de un mecanismo de desplazamiento y que la reacción total estaba controlada por un único paso limitante de la velocidad. Evidentemente, estos resultados están de acuerdo con los de Battersby y col. (1983 b).

Por último, Battersby y col. (1983 b) postularon que la unión del PBG al sitio activo de la Deaminasa, ocurriría vía el grupo  $\epsilon$ -amino de una lisina, demostrando además que la Deaminasa no tiene efecto sobre la velocidad de formación de urogen III a partir de HMB, por parte de la Isomerasa.

Estos estudios han clarificado considerablemente la relación existente entre la Deaminasa, su producto, el HMB y la Isomerasa. Los nuevos conocimientos evidencian que si bien Deaminasa e Isomerasa pueden encontrarse físicamente cercanas o

aún asociadas en su estado natural, tal asociación no es esencial para su modo de acción.

En una publicación posterior Hart y col. (1984) encontraron que cuando la Deaminasa proveniente de *Euglena gracilis* se incubaba con 5'-fosfato de piridoxal a pH 7,0 y 0 °C, perdía rápidamente parte de su actividad. La diálisis de la enzima parcialmente inactivada restauraba su capacidad catalítica en tanto que la reducción con  $\text{NaBH}_4$  previa al paso de diálisis, hacía que la inactivación fuese permanente. La enzima de *Rp. spheroides* se comportó en forma similar aunque con diferencias cuantitativas. Los autores observaron que la inactivación estaba acompañada por la modificación de residuos lisina y que el PBG protegía a la enzima contra este proceso. Estas y otras evidencias indicaron la existencia de un residuo lisina esencial en cada molécula de enzima, sugiriéndose que el rol de ese residuo consistía en unir covalentemente la primera molécula de PBG a la Deaminasa, durante la biosíntesis del hidroximetilbilano.

### III.5. Referencias

- Anderson, P.M. & Desnick, R.J. (1980), J. Biol. Chem. 255 (5), 1993.
- Battersby, A.R.; Hunt, E. & Mc Donald, E. (1973 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 442.
- Battersby, A.R.; Gibson, K.H.; Mc Donald, E.; Mander, L.N.; Moron, J. & Nixon, L.N. (1973 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 768.
- Battersby, A.R.; Hodgson, G.L.; Hunt, E.; Mc Donald, E. & Saunders, J. (1976), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 273.
- Battersby, A.R.; Mc Donald, E.; Williams, D.C. & Wurziger, H. K.W. (1977 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 113.
- Battersby, A.R.; Buckley, D.G.; Mc Donald, E. & Williams, D. C. (1977 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 115.
- Battersby, A.R.; Johnson, D.W.; Mc Donald, E. & Williams, D. C. (1977 c), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 117.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Mc Donald, E. & Meegan, M.J. (1978), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 185.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; Mc Donald, E. & Gustafson-Potter, K.E. (1979 a), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 316.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 539.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979 c), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1155.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1980), Nature 285 (5759), 17.
- Battersby, A.R.; Buckley, D.G.; Johnson, D.W.; Mander, L.N.; Mc Donald, E. & Williams, D.C. (1981 a), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2779.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J. & Pandley, P.S. (1981 b), Angew. Chem., Int. Ed. Engl. 20, 293.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Meegan, M.J.; Mc Donald, E. & Wurziger, H.K.W. (1981 c), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2786.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Mc Donald, E. & Matcham, G.W.J. (1982 a), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 2413.

- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Mc Donald, E. & Matcham, G.W.J. (1982 b), J. Chem. Soc., Perkin Trans I, 2427.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; Mc Donald, E. & Hollenstein, R. (1983 a), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 3031.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Hart, G.; Matcham, G.W.J. & Pandley, P.S. (1983 b), J. Chem. Soc., Perkin Trans. I, 3041.
- Berry, A. & Jordan, P.M. (1981), Biochem. Soc. Trans. 9 (3), 231.
- Bogorad, L. (1955), Plant Physiol. 30, XLV.
- Bogorad, L. (1958 a), J. Biol. Chem. 233, 501.
- Bogorad, L. (1958 b), J. Biol. Chem. 233, 510.
- Bogorad, L. (1962), "Methods in Enzymology" (Collowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.), Academic Press, New York, 5, p. 885.
- Bogorad, L. (1963), Ann. N.Y. Acad. Sci. 104, 676.
- Bullock, E.; Johnson, A.W.; Makman, E. & Shaw, K.B. (1958), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1430.
- Burton, G.; Nordlöv, H.; Hosozawa, S.; Matsumoto, H.; Jordan, P.; Fagerness, P.; Pryde, L.A. & Scott, A. (1979 a), J. Amer. Chem. Soc. 101, 3114.
- Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, I. (1979 b), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 202.
- Carell, E.F. & Kahn, J.S. (1964), Arch. Biochem. Biophys. 108, 1.
- Claustres, M. & Sultan, C. (1986), Hormone Res. 23, 91.
- Clement, R.P.; Tofilon, P.J. & Piper, W.N. (1981), Nutr. Cancer 3, 1.
- Clement, R.P.; Kohashi, M. & Piper, W. (1982), Arch. Biochem. Biophys. 214 (2), 657.
- Cornford, P. (1964), Biochem. J. 91, 64.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954), Biochem. J. 57, 476.
- Dauner, H.O.; Gunzer, G.; Heger, I. & Muller, G. (1976), Z. Physiol. Chem. 357, 147.
- Davies, R.C. & Neuberger, A. (1973), Biochem. J. 133, 471.
- Falk, J.E. & Dresel, E.I.B. (1960), Biochim. Biophys. Acta, 39, 458.
- Farmer, D.J. & Hollebone, B.R. (1984), Can. J. Biochem. Cell Biol. 62, 49.
- Franck, B.; Fels, G. & Ufer, G. (1977 a), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 652.
- Franck, B.; Fels, G.; Ufer, G. & Rowold, A. (1977 b), Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 16, 651.

- Frydman, B. & Frydman, R.B. (1975 b) *Acc. Chem. Res.* 98, 1589.
- Frydman, B.; Reil, S.; Valasinas, A.; Frydman, R.B. & Rapoport, H. (1971), *J. Am. Chem. Soc.* 93, 2738.
- Frydman, B.; Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Levy, S. & Feinstein, G. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. London Ser. B* 273, 137.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 193.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 293, 506.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1975 a), *FEBS lett.* 52, 317.
- Frydman, R.B.; Tomaro, M.L.; Wanschelbaum, A. & Frydman, B. (1972 a) *FEBS lett.* 26, 203.
- Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Rapoport, H. & Frydman, B. (1972 b), *FEBS lett.* 25, 309.
- Frydman, R.B.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1973), *Biochemistry* 12, 80.
- Frydman, R.B.; Valasinas, A.; Levy, S. & Frydman, B. (1974), *FEBS lett.* 38, 134.
- Frydman, R.B.; Levy, E.S.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 a), *Biochemistry* 17 (1), 110.
- Frydman, R.B.; Levy, E.S.; Valasinas, A. & Frydman, B. (1978 b), *Biochemistry* 17 (1), 115.
- Fumagalli, S.A.; Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L. & Batlle, A.M. del C. (1982), *Anales Asoc. Quim. Argentina* 70, 375.
- Fumagalli, S.A.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1985), *Int. J. Biochem.* 17 (4) 485.
- Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1985), *Biochem. J.* 232, 151.
- Hart, G.J.; Leeper, F.Y. & Battersby, A.R. (1984), *Biochem. J.* 222, 93.
- Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1986), *Biochem. J.* 240, 273.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975), *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Hoare, D.S. & Heath, H. (1960), *Biochim. Biophys. Acta* 39, 167.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1980), *FEBS lett.* 112, (1), 86.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981), *Biochem. J.* 195, 177.
- Jordan, P.M. & Sehra, J.S. (1979), *FEBS lett.* 104, 364.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 1019.



- Jordan, P.M.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.M.; Pryde, L.M. & Scott, A.L. (1979), J. Chem. Soc. Chem. Commun., 104.
- Jordan, P.M.; Nordlov, H.; Burton, G. & Scott, I. (1980), FEBS lett. 115 (2), 269.
- Juknat de Geralnik, A.A. (1983), Tesis de Doctorado (UBA).
- Juknat, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981), Int. J. Biochem. 13 (3), 343.
- Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. & Piper, W.N. (1984), Biochem. J. 220, 755.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987) Comp. Biochem. Physiol. 87 B (3) 601.
- Levin, E.Y. (1971), Biochemistry 10, 4669.
- Levin, E.Y. & Coleman, D.L. (1967), J. Biol. Chem. 242, 4248.
- Lockwood, W. & Benson, A. (1960), Biochem. J. 75, 372.
- Lockwood, W. & Rimington, C. (1957), Biochem. J. 67, 8.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 a), FEBS lett. 6, 285.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 b), FEBS lett. 9, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970 c), Biochim. Biophys. Acta 220, 552.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a), Biochim. Biophys. Acta 227, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G.A. & Batlle, A.M. del C. (1971), Anales Asoc. Quim. Argentina 59, 271.
- Mathewson, J.H. & Corwin, A.H. (1961), J. Am. Chem. Soc. 83, 135.
- Miyagi, K.; Kaneshima, M.; Kawakami, J.; Nakada, F.; Petryka, Z.J. & Watson, C.J. (1979), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (12), 6172.
- Miyagi, K.; Petryka, Z.J.; Kaneshima, M.; Kawakami, J. & Pierach, C. (1980), Int. J. Biochem. 12 769.
- Parke, D.V. (1978), World, Rev. Nutr. Diet. 29, 107.
- Piper, W.N. & van Lier, R.B.L. (1977), Mol. Pharmacol. 13, 1126.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970), Biochemistry 9, 4736.
- Pollack, S.E. & Russell, C.S. (1978), FEBS lett. 90 (1), 47.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972), Biochemistry 11, 904.
- Rossetti, M.V. (1978), Tesis de Doctorado (UBA).

- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Parera, V.E. & Batlle, A.M. del C. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 371.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Rossetti, M.V.; Lombardo, M.E.; Juknat, A.A.; Araujo, L.S. & Batlle, A.M. del C. (1986) *Comp. Biochem. Physiol.* 85 B, 451.
- Rossetti, M.V.; Araujo, L.S.; Lombardo, M.E.; Correa, S.R. & Batlle, A.M. del C. (1987), *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B (3) 593.
- Russell, C.S. & Pollack, S.E. (1978), *J. Chromat.* 166, 632.
- Russell, C.S. & Rockwell, P. (1980), *FEBS lett.* 116 (2), 99.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 a), *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 b), *FEBS lett.* 3, 223.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26 (5), 379.
- Scott, A.I.; Ho, K.S.; Kajiwara, M. & Takahashi, T. (1976), *J. Am. Chem. Soc.* 98 (6), 1589.
- Scott, A.I.; Burton, G.; Jordan, P.M.; Matsumoto, H.; Fagerness, P.E. & Pryde, L.M. (1980), *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 384.
- Seehra, J.S. & Jordan, P.M. (1980), *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6841.
- Shioi, Y.; Nagamine, M.; Kuroki, M. & Sasa, T. (1980), *Biochim. Biophys. Acta* 616, 300.
- Stella, A.M.; Parera, V.E.; Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971), *Biochim. Biophys. Acta* 252, 481.
- Stevens, E.; Frydman, R.B. & Frydman, B. (1968), *Biochim. Biophys. Acta* 158, 496.
- Tephly, T.R. (1975), "Porphyrins in Human Diseases". Report of the Discussions, p. 128.
- Valasinas, A.; Frydman, R.B.; Díaz, L. & Frydman, B. (1978), XIV Reunión Nacional de la SAIB, Abstract D-26.
- Wider de Xifra, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M. & Malamud, S. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 819.
- Williams, D.C. (1984), *Biochem. J.* 217, 675.
- Williams, D.C.; Morgan, G.S.; Mc Donald, E. & Battersby, A.R. (1981), *Biochem. J.* 193, 301.

## CAPITULO IV

### PORFIRIAS

---

	Página
IV.1. Introducción	130
IV.2. Clasificación de las porfirias	131
IV.2.1. Porfirias agudas	132
IV.2.2. Porfirias no agudas	133
IV.3. Anormalidades enzimáticas en las porfirias	134
IV.3.1. Porfiria Aguda Intermitente (PAI)	134
IV.3.2. Coproporfiria Hereditaria (CPH)	135
IV.3.3. Porfiria Variegata (PV)	136
IV.3.4. Porfiria Aguda de Doss	139
IV.3.5. Porfiria Cutánea Tardía (PCT)	139
IV.3.6. Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)	142
IV.3.7. Protoporfiria Eritropoyética (PPE)	144
IV.3.8. Coproporfiria Eritropoyética (CPE)	144
IV.3.9. Porfirinurias	144
IV.3.9.1. Intoxicación por plomo	144
IV.4. Referencias	150

## IV. PORFIRIAS

### IV.1. Introducción

Las porfirias son desórdenes del camino biosintético del hemo en las cuales los cuadros clínicos característicos están acompañados por modelos específicos de superproducción, acumulación y excreción de porfirinas y precursores de las mismas, cada uno de los cuales define un tipo particular de porfiria.

En todas las formas de porfirias, la actividad de la enzima ALA-S se encuentra aumentada, lo cual constituye el principal punto de control del camino metabólico. El control secundario en estas enfermedades tiene lugar a nivel de la Uroporfirinógeno I sintetasa. Como consecuencia de este control secundario existe una excreción excesiva de los precursores ALA y PBG en las porfirias agudas y de porfirinas en las porfirias no agudas, Porfiria Variegata y Coproporfiria Hereditaria. Aquellas formas de porfirias en las cuales hay una superproducción de porfirinas tienen como cuadro clínico común, la fotosensibilidad cutánea frente a la luz solar.

Estos desórdenes están asociados, además, con una serie de aspectos metabólicos secundarios tales como el rol desempeñado por el metabolismo de esteroides, la influencia de ciertas drogas en la potenciación de los ataques y la posibilidad de que el camino se ramifique en puntos previos a la formación de porfirinas, conduciendo a la síntesis de varios monopirroles.

Las terapias a aplicar en los dos tipos de porfirias son bastante diferentes. La profilaxis es importante en ambas y en forma especial cuando tiende a evitar la administración de ciertas drogas en las porfirias agudas. La terapia, en el caso de los ataques agudos, consiste en la administración de carbohidratos,  $\beta$ -bloqueantes y hematina. La Porfiria Hepática Cutánea puede tratarse con flebotomía, la Protoporfiria Eritropoyética con  $\beta$ -caroteno mientras que la Porfiria Congénita suele mejorarse por esplenectomía y terapia con cloroquina. No es nuestra intención detenernos en la descripción de los distintos tratamientos que se emplean hoy día acerca de los cuales puede encontrarse suficiente información en el libro de Batlle

y col. (1981).

Las porfirias son desórdenes metabólicos, de origen a veces hereditario en los cuales una de las expresiones clínicas comunes es, muy a menudo, la presencia de orinas oscuras. Ellas pertenecen a una gran familia de enfermedades llamadas "errores congénitos del metabolismo". Es bien conocido que el metabolismo del cuerpo está regulado por un intrincado mosaico de enzimas cuya síntesis está sujeta a un estricto control genético. Un defecto en este control puede resultar en la formación defectuosa de una o más enzimas específicas y conducir así a estos errores congénitos. Las porfirias son un ejemplo de tales grupos de enfermedades en las cuales los defectos enzimáticos específicos están relacionados directa o indirectamente, con la biosíntesis de las porfirinas y pueden causar anomalías clínicas generalizadas.

#### IV.2. Clasificación de las porfirias

La clasificación de las porfirias depende de tres aspectos fundamentales. En primer lugar, del sitio principal de biosíntesis de porfirinas; segundo, de si la enfermedad muestra un cuadro agudo y finalmente del modelo de producción de precursores y porfirinas formadas. En la Tabla IV.1. se muestra un cuadro de clasificación de estas enfermedades.

Esta clasificación tiene un sentido ordenador, pero debe recordarse que el trastorno del metabolismo de las porfirinas en algunos casos, no es exclusivo de un determinado sector, eritropoyético o hepático, sino que se puede encontrar indistintamente en ambos.

Así, Piñol Aguadé y col. (1975), presentan una Porfiria Hepatoeritrocitaria, proponiendo una nueva forma de porfiria. En la misma se encuentran características pertenecientes a la Porfiria Cutánea Tardía (uroporfirina, coproporfirina y porfirina heptacarboxílica) y a la Protoporfiria Eritropoyética (protoporfirina aumentada en los glóbulos rojos), además de un patrón de excreción de porfirinas urinarias, que no corresponde a ninguno de los dos tipos.

Se encuentran publicados otros casos de participación hepática en la Protoporfiria Eritropoyética (Doss, 1976; Cripps y Goldfart, 1978), hecho que es frecuente.

Tabla IV.1.: Clasificación de las porfirias

(1) <u>Porfirias Hepáticas</u>	
. Porfiria Aguda Intermitente	] <u>Porfirias Agudas</u>
. Coproporfiria Hereditaria	
. Porfiria Variegata o Mixta	
. Porfiria Aguda de Doss	
. Porfiria Cutánea Tardía	
(2) <u>Porfirias Eritropoyéticas</u>	
. Porfiria Congénita Eritropoyética	] <u>Porfirias No Agudas</u>
. Protoporfiria Eritropoyética	
. Coproporfiria Eritropoyética	
(3) <u>Porfirinurias</u>	

IV.2.1. Porfirias agudas

Las porfirias agudas son hereditarias con caracteres mendelianos autosómicos dominantes. En todas ellas los individuos son típicamente proclives a desarrollar ataques agudos, con frecuencia provocados por una serie de factores, especialmente determinadas drogas. Los ataques agudos pueden también precipiitarse como consecuencia de cambios en el balance esteroideo, comúnmente encontrado durante el período menstrual femenino. En este tipo de enfermedades existen tres fases: la fase de latencia, la de remisión y la fase de ataque agudo. La fase latente en general está compensada bioquímicamente de forma tal, que ocurre una excreción aumentada pero no demasiado excesiva, de precursores porfirínicos. Las porfirias agudas en su etapa de ataque se presentan con dolores en miembros y abdomen, disturbios neuropsiquiátricos y disfunción autonómica (Goldberg y Rimmington, 1962). La Porfiria Aguda Intermitente y la Porfiria Aguda de Doss, nunca presentan fotosensibilización (Beattie y Goldberg, 1976) como ocurre con las otras dos. La Coproporfiria Hereditaria y la Porfiria Variegata pueden presentar lesiones

cutáneas luego de la exposición a la luz solar (Goldberg y col., 1978).

#### IV.2.2. Porfirias no agudas

El grupo al que pertenecen las porfirias no agudas es ciertamente más heterogéneo que el anterior. La Porfiria Hepática Cutánea Tardía posee en general cierto carácter hereditario aunque normalmente se adquiere como resultado del abuso del alcohol y lleva asociada la producción de depósitos de hierro en el hígado. Hay además, formas de esta enfermedad que son totalmente adquiridas como por ejemplo la que tuvo lugar en forma masiva en Turquía en el año 1955 como consecuencia de la ingestión de germen de trigo contaminado con hexaclorobenceno. Existen también tipos poco frecuentes de esta porfiria en los cuales el neoplasma hepático desempeña algún papel. La Protoporfiría Eritropoyética es hereditaria con carácter autosómico dominante mientras que la Congénita lo es con carácter autosómico recesivo. Cada una de las 3 enfermedades mencionadas se presenta generalmente con fotosensibilidad cutánea. Hay formación de ampollas eruptivas en las áreas expuestas de la piel, hiperpigmentación e hirsuto en la mujer. En la Protoporfiría Eritropoyética puede haber prurito de tipo urticaria en la piel acompañado de complicaciones hepáticas posiblemente debidas a concentraciones tóxicas de protoporfirina en el hígado. Las lesiones cutáneas de la Porfiria Congénita son extremadamente graves y pueden resultar en una severa necrosis y desfiguración. En esta porfiria se observa frecuentemente fluorescencia en dientes y huesos y algunas veces esplenomegalia asociada con anemia hemolítica.

Es evidente entonces que al abordar el problema de estas enfermedades, uno está tratando con dos grupos que responden de manera diferente a los mecanismos de regulación del camino del hemo. Así, en las porfirias agudas se produce una gran acumulación de precursores mientras que en las no agudas sólo se forman porfirinas en exceso. El principal punto de control de la biosíntesis del hemo se encuentra a nivel de la enzima ALA-S (Granick y Sassa, 1971). La retro-inhibición ejercida por el hemo sobre el sistema que produce ALA-S puede alterarse como consecuencia de una síntesis inadecuada de hemo que conduzca a

una de-represión de la síntesis de esta enzima, o, alternativamente mediante la acción de drogas u hormonas. Este cambio en la actividad de ALA-S no es suficiente para explicar los diferentes modelos de producción de porfirinas y precursores en cada una de las porfirias. Se debe considerar entonces que cada porfiria posee un defecto enzimático individual dentro de la secuencia biosintética, lo cual resulta en una formación disminuida de hemo libre con el consecuente incremento de la actividad de ALA-S. Aún así, este hecho es insuficiente para explicar todos los eventos bioquímicos de las porfirias y además, es razonable suponer que tiene lugar, un mecanismo de control secundario a nivel de la Uroporfirinógeno I sintetasa; de este modo podrían justificarse las diferencias en los modelos bioquímicos (Brodie y col., 1977 a, b; Doss, 1978; Doss y von Tiepermann, 1978 a).

#### IV.3. Anormalidades enzimáticas en las porfirias

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, resulta conveniente identificar a las porfirias sobre la base de las anomalías enzimáticas que se presentan en cada una de ellas. Para ello, es importante recordar que en todos los casos la actividad de la enzima inicial y limitante de la velocidad del camino biosintético se encuentra elevada (Moore y Goldberg, 1974). Por otra parte, en la mayoría de los casos, el defecto enzimático se ha demostrado en fibroblastos, células amnióticas y en sangre periférica, además de los encontrados en hígado y médula ósea (Granick y col., 1972; Bloomer, 1976).

##### IV.3.1. Porfiria Aguda Intermitente (PAI)

En esta porfiria, la excreción urinaria de ALA y PBG está muy aumentada, tanto en la fase aguda como en remisión, en los casos clínicamente manifiestos, y pueden encontrarse también concentraciones excesivas de uroporfirina III. Esto sugiere que el defecto enzimático se halla a nivel de la PBG-asa (Figura IV.1.).

Esta deficiencia enzimática fue reportada por primera vez por Strand y col. (1970) quienes demostraron que el defec-



to enzimático primario en la PAI es una deficiencia de la Urogen I sintetasa, la cual limitaría la velocidad de síntesis de hemo, interfiriendo a su vez con la regulación del ALA-S, deprimiendo su síntesis. Posteriormente se estableció que esta deficiencia enzimática estaba determinada genéticamente.

La actividad reducida de esta enzima ha sido detectada en eritrocitos, en cultivos de fibroblastos de piel y en células amnióticas de pacientes con PAI (Strand y col., 1972; Meyer y col., 1972; Magnussen y col., 1974; Bonkowsky y col., 1975 a; Sassa y col., 1975 a, 1978; Mustajoki, 1976; Brodie y col., 1977 c; Doss y Tiepermann, 1978 b y Leonhardt y col., 1978).

Es importante señalar que la deficiencia de Urogen I sintetasa en eritrocitos es el mejor y uno de los indicadores más seguros para el diagnóstico de una PAI, no sólo en los casos clínicamente manifiestos, sino también en portadores asintomáticos de la anomalía genética, incluyendo niños; también puede permitir un diagnóstico neonatal, puesto que se han desarrollado técnicas para su medición en células de fluido amniótico (Meyer y col., 1972; Magnussen y col., 1974; Sassa y col., 1975 a; Mustajoki, 1976).

En todos los estudios efectuados acerca de esta enfermedad se ha encontrado una actividad aumentada de ALA-S (Moore y Goldberg, 1974). También se ha demostrado cierta disminución en la actividad de Uroporfirinógeno decarboxilasa (Brodie y col., 1977 c).

#### IV.3.2. Coproporfiria Hereditaria (CPH)

Elder y col. (1976) y Grandchamp y col. (1977 a) han confirmado en forma independiente que la deficiencia enzimática primaria en esta porfiria, se encuentra a nivel de la Coproporfirinógeno oxidasa. Estos investigadores demostraron que la actividad de la CPG-asa en pacientes con CPH clínicamente manifiesta y en portadores del defecto genético, estaba reducida en un 50% con respecto a los controles normales y a individuos que padecían otros tipos de porfirias.

La existencia de esta deficiencia enzimática específica en CPH es de gran importancia práctica y explica claramente la acumulación y excreción aumentada de coproporfirina III, la li

mitación de la concentración del hemo y la activación del ALA-S por de-represión (Figura IV.2.). La actividad disminuída de CPG-asa ha sido observada en leucocitos, hígado, cultivo de fibroblastos y linfocitos (Elder y col., 1976; Brodie y col., 1977 d; Nordmann y col., 1977; Hawk y col., 1978).

#### IV.3.3. Porfiria Variegata (PV)

Este tipo de porfiria que es particularmente común en la población negra de Sudáfrica presenta características similares a la PAI en su fase aguda en lo que se refiere a los síntomos neurológicos y psíquicos, relacionados con una elevada excreción de ALA y PBG en orina (Becker y Kramer, 1977). A la vez, posee también semejanzas con la PCT. Sin embargo, en contraste con la PAI, la cantidad de PBG excretada en orina durante la fase de remisión decae rápidamente, retornando en general a los valores normales en un período de pocas semanas (Eales y col., 1966).

En la PV, la coproporfirina y un complejo protoporfirina-dipéptido (porfirina X) (Rimington y col., 1968), así como también la protoporfirina se excretan en cantidades significativas en materia fecal.

Con respecto a la deficiencia enzimática específica en esta enfermedad, algunos autores habían postulado un bloqueo a nivel de la Ferroquelatasa (Becker y col., 1977; Viljoen y col., 1979); entre ellos, el grupo de Becker (Becker y col., 1977) atribuyó la actividad reducida de Ferroquelatasa en pacientes con PV, a una mutación en el gen estructural dominante, la cual originaría una enzima inactiva. En cambio Smith y col., en el año 1976, propusieron que la falla podría ubicarse en la etapa de la oxidación a protoporfirina IX. Recientemente Deyback y col. (1981) han obtenido evidencias experimentales que apoyan esta última hipótesis.

Nuevamente, en este caso, se ha demostrado que la actividad de ALA-S se encuentra aumentada (Moore y col., 1980).

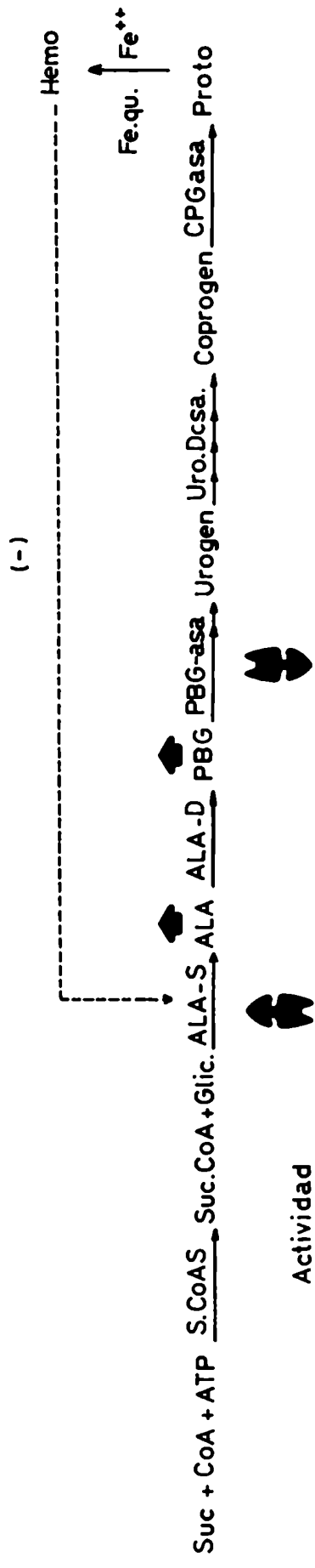


Figura IV.1.: Relación entre la deficiencia de Porfobilinogenasa y el incremento de ALA-S en la Porfiria Aguda Intermitente.

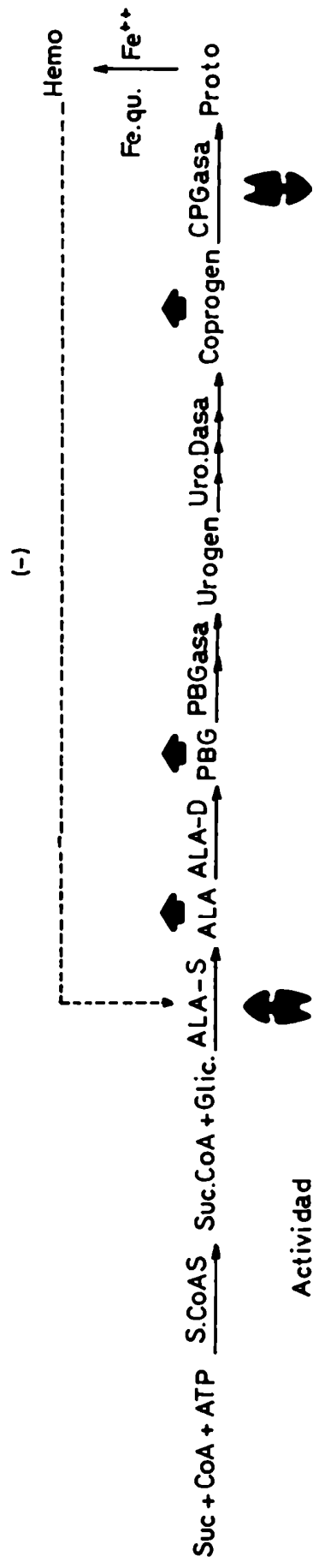


Figura IV.2.: Relación entre la deficiencia de Coproporfirinogenasa y el incremento de ALA-S en la Coproporfiria Hereditaria.

#### IV.3.4. Porfiria Aguda de Doss

Doss y col. (1980) describieron un nuevo tipo de porfiria hepática aguda la cual se caracteriza por tener el ALA-D significativamente disminuída y manifestaciones agudas intermitentes. Estos autores estudiaron dos pacientes que presentaban una elevada excreción urinaria de ALA, un ligero aumento de PBG y un gran incremento de porfirinas, principalmente coproporfirina.

La actividad de ALA-D eritrocitaria resultó en ambos casos inferior al 1% de los valores normales sin que se detectara plomo en sangre, orina y médula ósea, ni tampoco aminoácidos en orina y plasma. El estudio de los miembros de la familia reveló también una disminución en la actividad de ALA-D.

Estos datos indican que no existe una causa "tóxica" exógena para esta porfiria, sino que se trata de un nuevo tipo de porfiria hepática aguda hereditaria, con manifestaciones intermitentes, clínicamente análoga a la PAI.

#### IV.3.5. Porfiria Cutánea Tardía (PCT)

Elder y col. (1980) han propuesto la existencia de dos tipos de Porfiria Cutánea Tarda: la hereditaria y la esporádica. En la forma hereditaria, la actividad de la Uroporfirinógeno decarboxilasa de hígado y células rojas es aproximadamente un 25% de la encontrada en individuos normales (Kushner y col., 1976; Felsher y col., 1978). En la forma esporádica, la actividad enzimática es normal en los eritrocitos y está disminuída en el hígado (Elder y col., 1978). En ambos tipos de porfiria, generalmente la enfermedad se precipita por ingestión excesiva de etanol o, en casos menos frecuentes, como consecuencia de una terapia con estrógenos. El hecho de que sólo una pequeña proporción de personas expuestas a estas toxinas desarrollen Porfiria Cutánea Tardía esporádica apoya la teoría que sugiere que algún otro factor, en forma conjunta con la toxina, produce el defecto enzimático en este grupo. Existen evidencias que indican que la PCT hereditaria podría existir en la forma homocigota (Elder y col., 1981).

Aproximadamente un 80% de los pacientes con PCT presentan siderosis hepática; esto generalmente no es atribuible a

una captación excesiva de hierro y puede ser consecuencia de una absorción incrementada del mismo a partir del tracto gastrointestinal (Felsher y Kushner, 1977). La disminución del exceso de hierro almacenado produce la remisión clínica y bioquímica de la enfermedad pero no aumenta la actividad de la Urogen decarboxilasa en hígado (Felsher y col., 1982) indicando que la siderosis hepática no es la causa primaria de la actividad reducida de la enzima.

La primera propuesta acerca de la existencia de una deficiencia enzimática específica en la PCT, provino de Doss y col. (1971) quienes en base a sus observaciones acerca de una particular acumulación en hígado, y aumentada excreción renal de porfirina heptacarboxílica, además de Uro y en menor grado de porfirinas con 6 y 5 carboxilos, postularon una falla a nivel de Urogen decarboxilasa (Figura IV.3.).

La actividad de la enzima ALA-S se encuentra aumentada en este tipo de porfiria probablemente como consecuencia de una de-represión de la enzima. Se observa también un incremento en la actividad de PBG-deaminasa lo cual explica que no se observe acumulación de precursores (Felsher y col., 1982; Brodie y col., 1977 b).

El síndrome bioquímico de esta enfermedad se expresa por un aumento de la uroporfirina, heptaporfirina y en menor grado coproporfirina de las series III y I en orina y accesoriamente en materia fecal. El color de la misma es rojo oscuro cuando la uroporfirina se encuentra en alta concentración y muestra intensa fluorescencia a la luz de Wood. En las materias fecales pueden encontrarse aumentadas uroporfirina, heptaporfirina y en menor proporción hexa y penta, además de coproporfirina y eventualmente hasta protoporfirina. En el plasma se detecta uroporfirina responsable de la fotosensibilización.

Por último, es importante mencionar que existe un tercer grupo de estas porfirias asociadas con tumores hepáticos benignos y malignos (Tio y col., 1957; Kordac, 1978); sin embargo aún no se conoce si el tumor precede o sucede al ataque de porfiria (Keczkes y Barker, 1976). Estudios más recientes han descrito tejidos tumorales hepáticos en los cuales la producción de porfirinas era normal aunque los tejidos que rodeaban al hígado producían porfirinas en forma excesiva.



#### IV.3.6. Porfiria Congénita Eritropoyética (PCE)

La PCE es una de las formas de porfiria más rara encontrada en humanos y animales. Se hereda según un carácter autosómico recesivo.

Desde el punto de vista bioquímico se observa una elevada eliminación de uroporfirina I y coproporfirina I en orina y heces respectivamente. Los cambios se inician en la médula ósea y la mayoría de las manifestaciones de esta enfermedad se explican por la excesiva producción en la misma, de Uro y coproporfirina I. El cuadro bioquímico de la PCE se ilustra en la Figura IV.4.

Existen varias teorías propuestas que tratan de explicar el defecto enzimático primario de esta porfiria. Una de ellas propone que la deficiencia enzimática específica está localizada a nivel de la Isomerasa (Levin, 1968). Estos autores midieron la actividad de la enzima en eritrocitos hemolizados de humanos y bovinos con PCE encontrando que se hallaba considerablemente reducida. Romeo y col. (1970 a y b) observaron la misma deficiencia en otros tejidos de 5 pacientes que padecían esta enfermedad y en familiares de los mismos. Así, la deficiencia enzimática permitía detectar los portadores asintomáticos de la falla genética. Según esta teoría entonces, la actividad disminuída de Isomerasa, enzima responsable de la conversión de PBG en uroporfirinógeno III, explicaría la formación de isómeros I, intermediarios no fisiológicos que se acumularían para luego excretarse.

Otra hipótesis postula que la falla enzimática consiste en una actividad aumentada de Deaminasa; esto originaría cantidades excesivas de isómeros tipo I y explicaría además la acumulación de porfirinas de las series I y III encontrada en este caso (Heilmeyer y col., 1963; Watson y col., 1964).

Una tercera posibilidad podría ser una actividad aumentada de Deaminasa asociada a una deficiencia en la Isomerasa (Batlle y col., 1979).

Nuevamente en este tipo de porfiria, la actividad de ALA-S se encuentra incrementada (Masuya, 1969; Moore y col., 1978; Batlle y col., 1979).



(-)

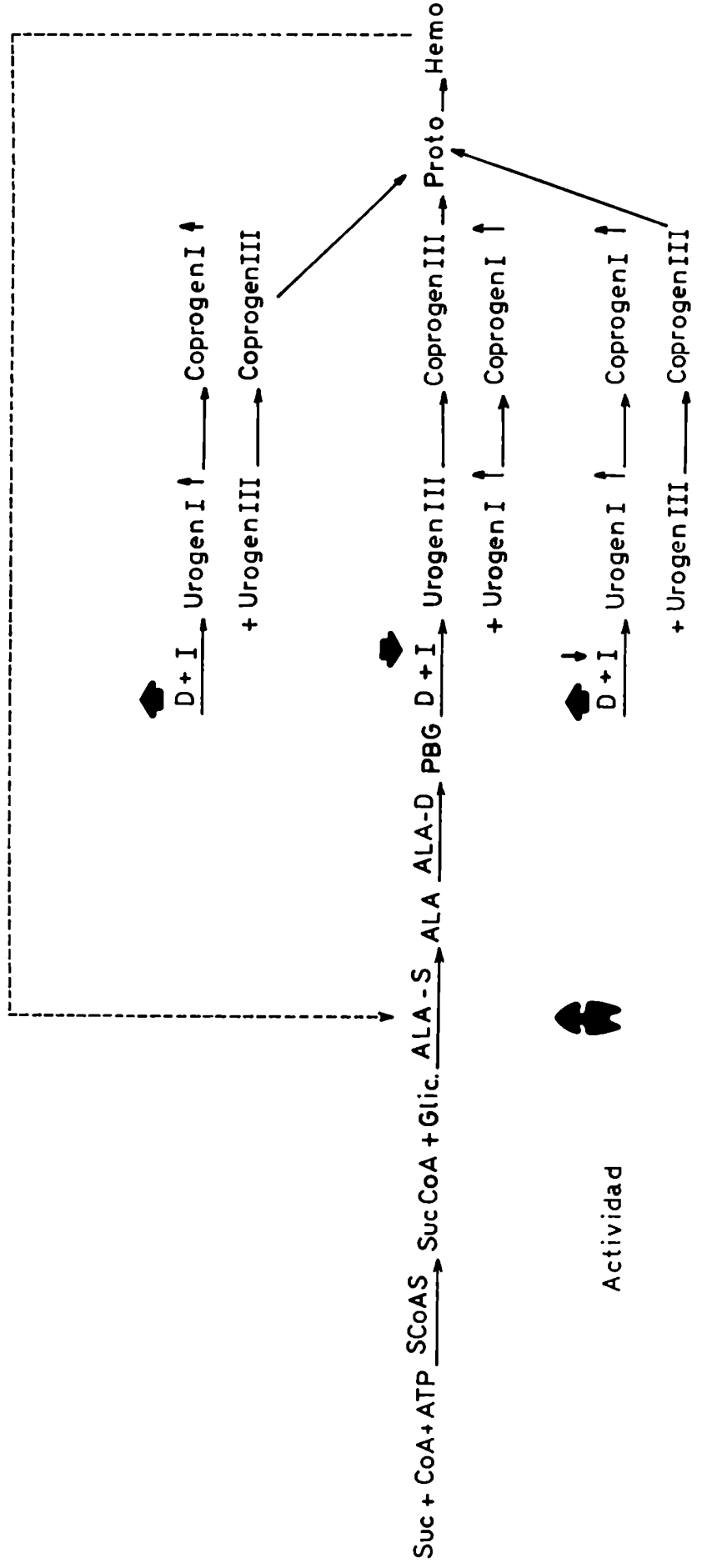


Figura IV.4.: Posibles modelos para explicar el patrón de excreción anormal de isómeros tipo I en la Porfiria Congénita Eritropoyética.

#### IV.3.7. Protoporfiria Eritropoyética (PPE)

La característica principal de esta enfermedad es la fotosensibilidad solar ocasionada por las excesivas concentraciones de protoporfirina circulante (Poth-Fitzpatrick, 1977). La deficiencia enzimática específica en la PPE está ubicada a nivel de la Ferroquelatasa (Figura IV.5.) y ha sido confirmada experimentalmente por varios grupos de investigadores en diferentes tejidos (Schwartz y col., 1971; Cripps y Mac Eachern, 1971; Bonkowsky y col., 1975 b; Bottomley y col., 1975; De Goeij y col., 1975, 1977; Brodie y col., 1977 e; Stella y col., 1981).

Además de la médula ósea, también el hígado se halla involucrado en esta porfiria; es evidente que existe un daño celular hepático que oscila entre una mínima necrosis celular y la posible fibrosis la cual en parte puede atribuirse a la presencia de concentraciones excesivas de protoporfirina en el hígado (Pimstone y col., 1976; Romslo y col., 1978).

A pesar de la existencia del defecto enzimático, se forman sin embargo cantidades de hemo que, aunque menores, son suficientes para una adecuada síntesis de hemoglobina. También en este caso se ha reportado un aumento en la actividad de ALA-S (Schwartz y col., 1971; Brodie y col., 1977 e).

#### IV.3.8. Coproporfiria Eritropoyética (CPE)

Se caracteriza por trastornos de fotosensibilización con aumento de coproporfirina III en glóbulos rojos.

El mecanismo de producción se explicaría, teniendo en cuenta que no se acompaña de anemia ni de trastornos del hemo, por un aumento de hasta 100 veces sobre los niveles normales de coproporfirina III, debido a una deficiencia en la CPG-asa. Se transmitiría según un carácter autosómico dominante.

#### IV.3.9. Porfirinurias

##### IV.3.9.1. Intoxicación por plomo

La intoxicación crónica por plomo es la enfermedad pro-

fesional más frecuente en nuestro país por la gran utilización de este metal en la industria. El metal no sólo constituye una amenaza para quienes tienen un contacto directo con el mismo, sino también, en forma accidental, para los usuarios y aún para los familiares de las personas expuestas.

Existen dos vías de entrada de los compuestos de plomo inorgánicos en el cuerpo humano:

- i) por el tracto respiratorio, a través de la inhalación de vapor, humo, polvo o niebla,
- ii) por el tracto digestivo, por ingestión de compuestos de plomo atrapado en la parte superior del tracto respiratorio o introducidos en la boca con la comida, cigarrillos, herramientas, dedos y otros objetos. Los compuestos inorgánicos de plomo, en forma sólida o en soluciones o dispersiones en diversos solventes no penetran la piel normal o dañada, en cantidades significativas. Ciertos compuestos pueden irritar la piel, pero aún en esas condiciones la absorción cutánea no es significativa.

La presencia de vapores, humo o polvo fino de compuestos inorgánicos de plomo en el aire respirado por los trabajadores es el factor más importante. De todas maneras, la vía oral es también una ruta común de ingestión (Calabrese y Ascoli, 1980).

La presunción de intoxicación plúmbica se corrobora por:

- i) ALA-Dehidrasa eritrocitaria disminuída.
- ii) ALA aumentado en orina.
- iii) Coproporfirina III aumentada en orina.
- iv) Investigación de la plumbemia: normal hasta 30-35  $\mu\text{g}/100$  ml de GR; para adultos, cifras mayores hasta 70  $\mu\text{g}$  indican contaminación; más de 70  $\mu\text{g}$ : saturnismo. Estos valores no pueden emplearse en casos de exposición a tetraetilo de plomo. La absorción de este compuesto no produce un aumento del contenido de plomo en sangre, proporcional a la cantidad de plomo absorbido. Así, un análisis del metal en sangre, en estas circunstancias, llevaría a resultados erróneos (Kehoe, 1963).
- v) Investigación de la plumburia: más de 80  $\mu\text{g}$  de plomo en 24 horas en pacientes sin tratamiento, indican saturnismo.

(-)

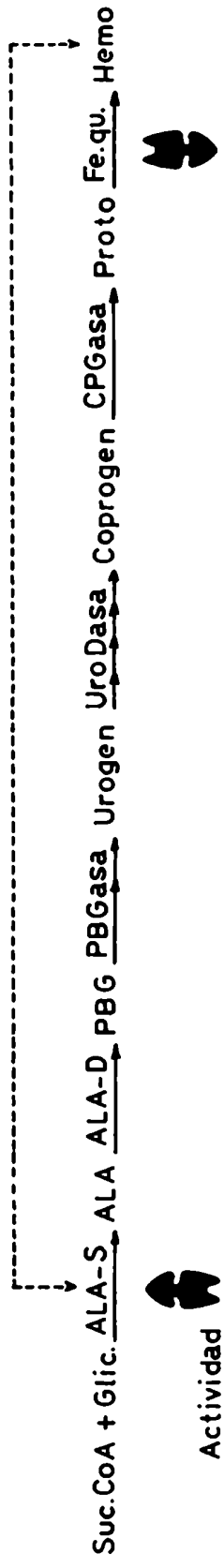


Figura IV.5.: Relación entre la deficiencia enzimática primaria de Ferroquelatasa y el aumento de ALA-S en Protoporfiria Eritropoyética.

- vi) Glóbulos rojos con punteado basófilo, en proporción 0,1 por mil o más.
- vii) Radiografías de huesos largos - en jóvenes - con incremento en la densidad de las metafisis y diáfisis (donde es más activo el depósito cálcico, reemplazado por plomo en el intoxicado).

A nivel del metabolismo celular el efecto más conocido del plomo es su acción inhibitoria sobre aquellas enzimas cuya actividad depende de la presencia de ciertos grupos -SH libres. Una de las manifestaciones más evidentes de ese efecto inhibitorio es el disturbio que se produce en la biosíntesis del hemo. Aún a concentraciones relativamente bajas, una de las enzimas más sensiblemente afectadas es el ALA-D; esto explica el aumento en la excreción de ALA y su acumulación en los tejidos. En los animales de laboratorio, el plomo inhibe la actividad del ALA-D en médula ósea, sangre periférica, hígado, riñón y cerebro (Gibson y Goldberg, 1970). La medida de la actividad del ALA-D es un indicador más sensible de una intoxicación plúmbica que la excreción misma de ALA y que los niveles de plomo en sangre.

Por otra parte, existe una notable correlación entre las concentraciones de protoporfirina y plomo en sangre de manera que, en los últimos tiempos se ha venido enfatizando la eficiencia de la medición de protoporfirina en eritrocitos como otro parámetro de gran utilidad para detectar un envenenamiento crónico por plomo (Sassa y col., 1975 b). En la intoxicación por plomo, la protoporfirina se acumula dentro de la célula, a diferencia de lo que ocurre en la Protoporfiria. La retención de protoporfirina dentro del eritrocito explicaría la ausencia de fotosensibilidad en el caso de intoxicación plúmbica (Piomelli y col., 1975).

Se ha sugerido que la inhibición de la Ferroquelatasa sería la causa de la acumulación de protoporfirina (Goldberg, 1968). Moore y col. (1975) han demostrado que efectivamente, la actividad de esta enzima está disminuída en hígado y músculo cardíaco de ratas intoxicadas con plomo.

El mecanismo por el cual se produce una excreción urinaria aumentada de coproporfirina en esta enfermedad, no se ha estudiado en forma intensiva y aún no se ha establecido claramente cual es la causa de la superproducción de coprogen III.

Las evidencias disponibles sugieren que ocurre una inhibición directa de la CPG-asa (Batlle y col., 1965).

Si bien la anemia es otra de las características del saturnismo agudo (Piddington y White, 1974), no se han observado signos de una formación deficiente de hemo en muchos pacientes que padecían intoxicación crónica plúmbica. Así, Moore y col. (1975) han reportado niveles normales de ALA-S en animales con saturnismo crónico.

También se ha encontrado que ciertos pacientes con intoxicación plúmbica, excretan grandes cantidades de PBG en orina proponiéndose que este se debe a una inactivación directa de la Deaminasa producida por el plomo (Piper y Tephly, 1974).

Si bien la enzima más sensiblemente afectada por el plomo es el ALA-D, existen como vemos otras etapas del camino biosintético del hemo sobre las cuales el metal ejerce su efecto inhibitorio, que explican el cuadro bioquímico anormal característico de un saturnismo (Figura IV.6.).

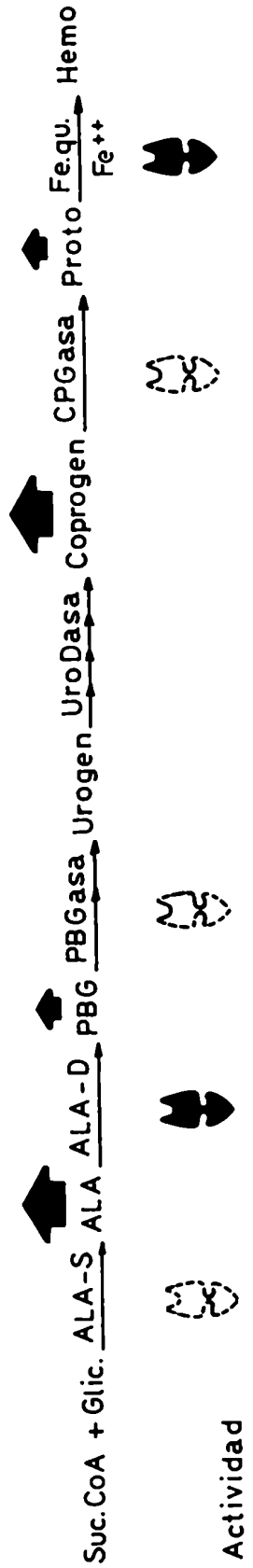


Figura IV.6.: Efecto del plomo sobre la actividad de distintas enzimas del camino del hemo. Inhibición demostrada (flechas sólidas) y postulada (flechas punteadas).

#### IV.4. Referencias

- Batlle, A.M. del C.; Benson, A. & Rimington, C. (1965), *Biochem. J.* 97, 731.
- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M.; Bustos, N. & With, T.K. (1979), *Clin. Sci.* 57, 63.
- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981), "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, clínica y tratamiento" (Ed. Eudeba).
- Beattie, A.D.; Goldberg, A. (1976), "Porphyrins in Human Diseases" (Doss, M., ed.) Karger, Basel, p. 245.
- Becker, D.M. & Kramer, S. (1977), *Medicine* 56, 411.
- Becker, D.M.; Viljoen, J.D.; Katz, J. & Kramer, S. (1977), *Am. J. Hematol.* 6, 185.
- Bloomer, R. (1976), *Gastroenterology* 71, 689.
- Bonkowsky, H.L.; Tschudy, D.P.; Weinbach, E.C.; Ebert, P.S. & Doherty, J.M. (1975 a) *J. Lab. Clin. Med.* 85, 93.
- Bonkowsky, H.L.; Bloomer, J.R.; Ebert, P.S. & Mahoney, M.J. (1975 b), *J. Clin. Invest.* 56, 1139.
- Bottomley, S.S.; Tanaka, M. & Everett, M.A. (1975), *J. Lab. Clin. Med.* 86, 126.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Thompson, G.G.; Campbell, B.C. & Goldberg, A. (1977 a), *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1466.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R. & Goldberg, A. (1977 b), *Lancet* 2, 699.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Thompson, G.G. & Goldberg, A. (1977 c), *Clin. Sci. and Molec. Med.* 53, 365.
- Brodie, M.J.; Thompson, G.G.; Moore, M.R.; Beattie, A.D. & Goldberg, A. (1977 d), *Quart. J. Med.* 46, 229.
- Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Thompson, G.G.; Goldberg, A. & Holti, G. (1977 e) *Clin. and Exper. Derm.* 2, 381.
- Calabrese, E.J. & Astolfi, M. (1980), "Toxicología" (Ed. Kapelusz), p. 131.
- Cripps, D.J. & Mac Eachern, W.N. (1971), *Arch. Path.* 91, 497.
- Cripps, D.J. & Goldfarb, S.S. (1978), *Brit. J. Derm.* 98.
- De Goeij, A.F.P.M.; Smit, S. & Van Steveninck, J. (1975), *Europ. J. Clin. Invest.* 5, 397.
- De Goeij, A.F.P.M.; Christianse, K. & Van Steveninck, J. (1977), *Clin. Chim. Acta* 74, 27.
- Deybach, J.C.; De Verneuil, H. & Nordmann, Y. (1981), *Hum. Genet.* 58, 425.



- Doss, M. (1976), Editor: "Porphyrins in Human Disease". S. Karger Basel Publishers, 1.
- Doss, M. (1978), Int. J. Biochem. 9, 911.
- Doss, M. & von Tiepermann, R. (1978 a), "Diagnosis and Therapy of Porphyrrias and Lead Intoxication" (Doss, M., ed.) Springer-Verlag, Berlin, p. 29.
- Doss, M. & von Tiepermann, R. (1978 b), J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 16, 111.
- Doss, M.; Meinhof, N.; Look, D.; Henning, H.; Nawrocki, P.; Dolle, W.; Strohmeyer, G. & Fillipini, L. (1971), South Afr. J. Lab. Clin. Med. 17, 50.
- Doss, M.; von Tiepermann, R. & Schneider, J. (1980), Int. J. Biochem. 12, 823.
- Eales, L.; Dowdle, E.B.; Levey, M.J. & Sweeney, G.D. (1966), S. Afr. Med. J. 40, 380.
- Elder, G.H.; Evans, J.O.; Thomas, N.; Cox, R.; Brodie, M.J.; Moore, M.R.; Goldberg, A. & Nicholson, D.C. (1976), Lancet 2, 1217.
- Elder, G.H.; Lee, G.B. & Tovey, J.A. (1978), N. Engl. J. Med. 299, 274.
- Elder, G.H.; Sheppard, D.M.; De Salamanca, R.E. & Olmos, A. (1980), Clin. Sci. 58, 477.
- Elder, G.H.; Smith, S.G. & Herrero, E. (1981), Lancet I, 916.
- Felsher, B.F. & Kushner, J.P. (1977), Semin. Hematol. 14, 243.
- Felsher, B.F.; Norris, M.E. & Shih, J.C. (1978), N. Engl. J. Med. 299, 1095.
- Felsher, B.F.; Carpio, N.; Engleking, D.W. & Nunn, A.T. (1982), N. Engl. J. Med. 306, 766.
- Gibson, S.L.M. & Goldberg, A. (1970), Clin. Sci. 38, 63.
- Goldberg, A. (1968), Semin. Hematol. 5, 424.
- Goldberg, A. & Rimington, C. (1962), "Diseases of porphyrin metabolism" Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Goldberg, A.; Brodie, M.J.; Moore, M.R. (1978), "Porphyrin Metabolism and the Porphyrrias" en Price-text-book of Medicine 12th Edition (Bodley-Scott, R., ed.) Oxford University Press, Oxford, p. 420.
- Grandchamp, B.; Phung, N.; Greller, M.; De Verneuil, H.; Noire, J.; Ohnet, J.P. & Nordmann, Y. (1977 a) Nouv. Presse Med. 6, 1537.

- Granick, S. & Sassa, S. (1971), "Metabolic Regulation" (Vogel, H.J., ed.) Acad. Press, New York and London, p. 77.
- Granick, S.; Sassa, S.; Granick, J.L.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1972), Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2381.
- Hawk, J.L.M.; Magnus, I.A.; Parkes, A.; Elder, G.H. & Doyle, M. (1978), J. Roy. Soc. Med. 71, 775.
- Heilmeyer, L.; Clotten, R.; Kerp, L.; Merker, H.; Porra, A. & Wetzell, H.P. (1963), Dtsch. Med. Wschr. 88, 2449.
- Keczkcs, K. & Barker, D.J. (1976), Arch. Dermatol. 112, 78.
- Kehoe, R.A. (1963), Industrial Lead Poisoning en "Industrial Hygiene and Toxicology" (Patty, F.A., ed.) Interscience Publishers (John Wiley y Sons, N. York - London) vol.II, p. 941.
- Kordac, V. (1978), "Diagnosis and Therapy of Porphyrias and Lead Intoxication" (Doss, M., ed.), Springer-Verlag, Berlin, p. 240.
- Kushner, J.P.; Barbuto, A.J. & Lee, G.R. (1976), J. Clin. Invest. 58, 1089.
- Leonhardt, K.F.; Tiepermann, R. & Doss, M. (1978), J. Neurol. 218, 107.
- Levin, E.Y. (1968), Science 161, 907.
- Magnussen, C.R.; Levine, J.B.; Doherty, J.M.; Cheeseman, J. O. & Tschudy, D.P. (1974), Blood 44, 857.
- Masuya, T. (1969), Acta Hematol. Japonica 32, 465.
- Meyer, U.A.; Strand, J.; Doss, M.; Rees, A.C. & Marver, H.S. (1972), New Engl. J. Med. 286, 1277.
- Moore, M.R. & Goldberg, A. (1974), "Iron in Biochemistry and Medicine" (Jacobs, A. y Worwood, M., eds.) Academic Press, New York, p.115.
- Moore, M.R.; Meredith, P.A.; Goldberg, A.; Carr, K.; Toner, P. & Lawrie, T.D.U. (1975), Clin. Sci. Mol. Med. 49, 337.
- Moore, M.R.; Thompson, G.G.; Goldberg, A.; Ippen, H.; Seubert, A. & Seubert, S. (1978), Int. J. Biochem. 9, 933.
- Moore, M.R.; Mc Coll, K.E.L. & Goldberg, A. (1980), Int. J. Biochem. 12, 941.
- Mustajoki, P. (1976), Ann. of Clin. Res. 8, 133.
- Nordmann, Y.; Grandchamp, B.; Phung, N.; De Verneuil, H.; Grelrier, M. & Noire, J. (1977), Lancet I, 140 (letter to the editor).
- Piddington, S.K. & White, J.M. (1974), Br. J. Haematol. 27, 415.

- Pimstone, N.R.; Webber, B.L.; Blekkenhorst, G.H. & Eales, L. (1976), *Ann. Clin. Res.* 8, 122.
- Piñol Aguadé, J.; Herrero, C.; Almeida, J.; Castells Mas, A.; Ferrando, J.; Asprer, J. de; Palov, A. & Gimenez, A. (1975), *Ann. Derm. Syph.* 102, 129.
- Piomelli, S.; Lamola, A.A.; Poth-Fitzpatrick, M.B.; Seaman, C. & Harber, L.C. (1975), *J. Clin. Inv.* 56, 1519.
- Piper, W. & Tephly, T.R. (1974), *Life Sci.* 14, 873.
- Poth-Fitzpatrick, M.B. (1977), "Iron Excess" (Muller-Eberhard, U.; Miescher, P.A. & Jaffe, E.R., eds.) Grune-Stratton, New York, p. 211.
- Rimington, C.; Lockwood, W.H. & Belcher, R.V. (1968), *Clin. Sci.* 35, 211.
- Romeo, G.; Kaback, M.M. & Levin, E.Y. (1970 a), *Biochem. Genet.* 4, 659.
- Romeo, G.; Kaback, M.M. & Levin, E.Y. (1970 b), *Biochem. Genet.* 4 719.
- Romslo, I.; Hovding, G.; Hambre, E. & Laerum, O.D. (1978), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 38, 529.
- Sassa, S.; Solish, G.; Levere, R.D. & Kappas, A. (1975 a) *J. Exp. Med.* 142, 722.
- Sassa, S.; Granick, S. & Kappas, A. (1975 b), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 419.
- Sassa, S.; Zalar, G.L. & Kappas, A. (1978), *J. Clin. Invest.* 61, 499.
- Schwartz, S.; Johnson, J.A.; Stephenson, B.D.; Anderson, A. S.; Edmonson, P.R. & Fussaro, R.M. (1971), *J. Lab. Clin. Med.* 78, 411.
- Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A.; Lenczner, M.; Magnin, P. & Batlle. A.M. del C. (1981), *Rev. Arg. Dermatol.* 62, 7.
- Strand, L.J.; Felsher, B.F.; Redeker, A.G. & Marver, H.S. (1970), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 67, 1315.
- Strand, L.J.; Meyer, U.A.; Felsher, B.F.; Redeker, A.G. & Marver, H.S. (1972), *J. Clin. Invest.* 51, 2530.
- Tio, T.H.; Leijnse, B.; Jarrett, A. & Rimington, C. (1957), *Clin. Sci.* 16, 517.
- Viljoen, J.D.; Cayanis, E.; Becker, D.M.; Dawson, B.; Bernstein, R. & Kramer, S. (1979), *Am. J. Hemat.* 6, 185.
- Watson, C.; Runge, W.; Raddeimi, L.; Dossenmaier, I. & Cardinale, R. (1964), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 52, 478.

## CAPITULO V

### REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

---

	Página
V.1. Introducción	154
V.2. Mecanismos de control	154
V.2.1. Control a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante	155
V.2.1.1. Control por cambios en la actividad de ALA-S	155
V.2.1.2. Control por cambios en la cantidad de ALA-S	157
V.2.2. Control por localización celular y tisular	159
V.2.2.1. Especialización tisular	159
V.2.2.2. Compartimentalización intracelular	159
V.2.3. Control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular	161
V.2.3.1. Oxígeno	161
V.2.3.2. Iluminación	161
V.2.3.3. ATP	162
V.2.4. Control por interconexión con otros caminos metabólicos	162
V.3. Referencias	166

## V. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE TETRAPIRROLES

### V.1. Introducción

La maquinaria metabólica de toda célula viva debe funcionar de una manera perfectamente coordinada, ajustándose continuamente a sus necesidades. Sólo de ese modo se producirán los metabolitos necesarios en cantidad adecuada y dejarán de sintetizarse aquellos que momentáneamente no sean requeridos, evitándose así su carencia o superproducción. Además es esencial para todas las células vivas aprovechar al máximo la energía disponible; esto comprende el ahorro de energía obtenido al cesar la producción de metabolitos innecesarios, el uso de la fuente de energía más fácilmente metabolizable en determinadas circunstancias y el control estricto de la degradación de fuentes energéticas tales como la glucosa, de modo de impedir su derroche, manteniendo al mismo tiempo un nivel adecuado de ATP. Para estos fines es esencial la regulación de la actividad de las enzimas, la cual puede llevarse a cabo de diferentes maneras y a distintos niveles.

La biosíntesis de porfirinas, atributo de todas las células, responde a esta regla general y se lleva a cabo con un rendimiento del orden del 95%. Esta notable eficiencia es el resultado de la existencia de una serie de controles estrechamente ligados que, cuando fallan, como ocurre en las porfirias conduce a la síntesis de cantidades elevadas de intermediarios del camino biosintético del hemo, con serias consecuencias para el organismo (Batlle y col., 1981).

La elevada concentración de precursores y/o intermediarios que puede alcanzarse cuando fallan los mecanismos de regulación, demuestran la capacidad potencial de funcionamiento de las enzimas del camino del hemo cuando pueden actuar libremente y enfatizan, además, la necesidad natural de la existencia de sistemas de control, en favor de la economía y salud celular.

### V.2. Mecanismos de control

Se han postulado diferentes mecanismos de control de los cuales puede disponer la célula para regular su contenido de te

trapiroles: i) control a través de cambios en la actividad enzimática y en la cantidad de enzima sintetizada, ii) control por localización celular y tisular, iii) control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular (oxígeno, luz, estado de óxido-reducción intracelular), iv) control por interconexión con otros caminos metabólicos.

#### V.2.1. Control a través de cambios en la actividad y cantidad de la enzima limitante

Como ya se mencionó, la síntesis de porfirinas está controlada principalmente por cambios en la actividad del ALA-S, la primer enzima específica de esta secuencia y además, la limitante. En la mayoría de las células estudiadas, las demás enzimas del camino biosintético del hemo se encuentran en cantidades y con actividades no limitantes.

Es importante tener en cuenta que la cantidad de hemo sintetizada depende de la actividad del ALA-S presente. En consecuencia, esta enzima desempeña un papel fundamental en la regulación de esta secuencia metabólica.

Existen tres mecanismos por medio de los cuales puede controlarse la formación del hemo a través del ALA-S: uno de ellos involucra cambios en su actividad; otro, cambios en la cantidad de enzima presente (Batlle y col., 1981) y el tercero, que regula la translocación de la enzima desde el citosol a la mitocondria (Ohashi y Kikuchi, 1972).

De este modo, el hemo libre o fácilmente intercambiable, que constituye lo que se ha denominado "pool de hemo regulatorio", sería el responsable del control entre la velocidad de formación y degradación del hemo (Granick y col., 1975).

##### V.2.1.1. Control por cambios en la actividad de ALA-S

Muchos sistemas multienzimáticos presentan un tipo de inhibición conocida como inhibición por producto final, retroinhibición o inhibición feed-back, en la cual, el producto final de una secuencia de reacciones puede actuar como inhibidor específico de la primer enzima de esa secuencia. Cuando ocurre este tipo de inhibición, la enzima cuya actividad es controlada-

da por la concentración del producto final responde a las características de una enzima regulatoria y tal es el caso del ALA-S. Es decir, cuando la concentración de hemo en la célula supera los niveles normales, éste inhibe directamente la primera enzima del camino, el ALA-S (Figura V.1.1).

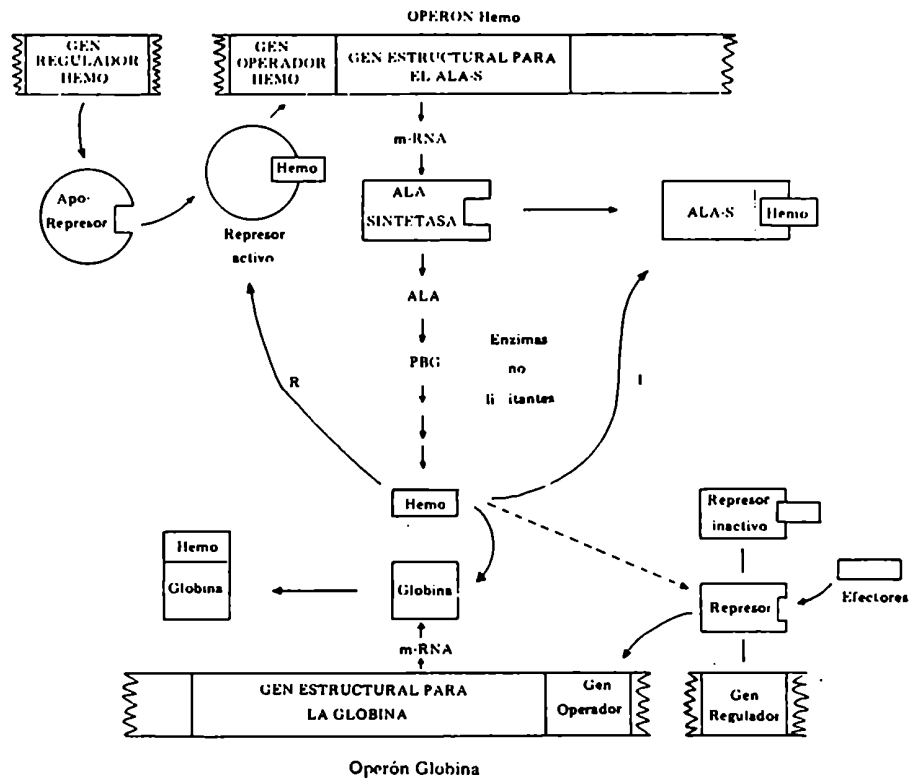


Figura V.1.: Mecanismo de regulación de la biosíntesis del hemo; I: por inhibición feed-back del ALA-S; R: por represión de síntesis proteica del ALA-S. Su coordinación con un hipotético esquema de control de la síntesis de hemoglobina y globina.

La primera prueba acerca de la existencia de este mecanismo de control rápido, provino de los estudios de Lascelles (1964) quien demostró que cuando *Rp. spheroides* se hacía crecer en un medio deficiente en hierro, se acumulaban grandes cantidades de coproporfirina. El agregado de metal corregía este problema. Se postuló entonces que el hierro actuaba promovien-

do la síntesis de hemo el cual a su vez actuaba inhibiendo al ALA-S. Poco tiempo después esta hipótesis fue confirmada tanto en *Rp. sphaeroides* como en otras fuentes. Incluso en el hombre operaría un tipo de inhibición similar, la cual explicaría la acumulación de porfirinas en eritrocitos, observada en la anemia por deficiencia de hierro (Rimington, 1966).

#### V.2.1.2. Control por cambios en la cantidad de ALA-S

Además de la inhibición por producto final, se ha encontrado que muchos sistemas responden a un mecanismo de control más lento, denominado control por represión. En el caso de la biosíntesis de hemo, un control genético de la síntesis de ALA-S, dependiente de DNA, regula la cantidad de ALA-S formada en la célula.

El mecanismo postulado para explicar la formación y control del ALA-S se basa en la conocida hipótesis de Jacob y Monod (Figura V.1.R.) (Rimington, 1966).

En el esquema propuesto por Granick y Levere (1964) se considera el hecho experimental de que en la mayoría de los tejidos la síntesis del hemo se encuentra normalmente reprimida debido a que sus requerimientos son generalmente bajos y además a que el mismo hemo actúa como represor de su propia síntesis.

El gen estructural del operón hemo, una porción del DNA cromosómico nuclear que lleva la información para la síntesis del ALA-S, se activa por medio de un gen operador, el cual a su vez responde a la presencia de un represor activo. Este represor activo actúa reprimiendo al gen operador con lo cual se detiene la producción del RNA mensajero por parte del gen estructural y como consecuencia se interrumpe la síntesis de ALA-S.

Por otra parte, el gen regulador produce una molécula proteica o apo-represor que es la encargada de formar el represor activo por unión con su co-represor, que en nuestro caso es el hemo. Cuando el hemo no puede unirse al apo-represor ya sea porque su concentración es baja o porque su sitio de unión está bloqueado, no puede formarse el represor activo y por lo tanto recomienza la síntesis del ALA-S que se llevará a cabo a máxima velocidad.

De manera que el hemo puede entonces controlar su propia síntesis actuando rápidamente por un mecanismo de tipo



feed-back, a través del cual inhibe en forma directa la actividad del ALA-S y en forma más lenta, mediante un mecanismo de represión de la síntesis proteica del ALA-S. Este último mecanismo ha sido demostrado en diferentes tejidos, entre ellos *Rp. spheroides* (Lascelles, 1964) y organismos superiores (Rimington, 1966).

Se ha comprobado que el ALA-S es también una enzima inducible por acción de ciertos compuestos fisiológicos, farmacológicos y químicos. La respuesta de este sistema de controles frente a tales inductores se explica, en términos generales, suponiendo que los inductores interfieren directa o indirectamente en la combinación del hemo con el apo-represor, o bien alteran el destino metabólico del hemo disminuyendo su concentración celular de modo que quede menos co-represor disponible para dicha combinación.

Resulta evidente, además, que la utilización del hemo por las distintas hemoproteínas debe encontrarse perfectamente coordinada con la formación de sus componentes proteicos específicos. Por ejemplo, el monómero de la hemoglobina contiene hemo y globina en la relación 1:1 y se ha demostrado que en reticulocitos y médula de conejo, existe un paralelismo entre la síntesis de globina y hemo.

Se postuló (Figura V.1.) que la entrada de sustancias efectoras en las células eritroides (como por ejemplo, hemo) transforma el represor activo en un represor incapaz de actuar sobre el gen operador de la globina. Como consecuencia, comienza la síntesis de globina la cual utiliza el hemo libre disponible para la formación de hemoglobina. Debido a este proceso queda menos hemo disponible de modo que el represor del gen operador hemo pierde actividad recomenzando la síntesis de ALA-S y por lo tanto de hemo. Vemos así que existe una cierta relación entre la síntesis de hemo y globina; por un lado, el exceso de hemo inhibe su propia síntesis por los mecanismos antes mencionados pero, por otra parte, estimula la síntesis de globina con los resultados ya descriptos.

Para explicar la relación 1:1 (globina:hemo) en el monómero de la hemoglobina, Granick y Levere (1964) postularon que la globina no se liberaba del polisoma a menos que estuviera correctamente enrollada alrededor del hemo y que al aumentar la concentración de hemoglobina, ésta se combinaría con el DNA inactivándolo.

## V.2.2. Control por localización celular y tisular

Evidentemente en todos los organismos la síntesis de tetrapirroles debe estar regulada en última instancia en los tejidos, a nivel de las etapas catalizadas por las enzimas involucradas en su camino biosintético.

### V.2.2.1. Especialización tisular

La localización de la síntesis de hemoglobina en los tejidos eritropoyéticos especializados en animales superiores, permite explicar el problema que existiría de ocurrir una síntesis masiva de hemoglobina simultáneamente con una síntesis mucho menor, necesaria para otras hemoproteínas esenciales, tales como los citocromos. Los niveles de hemoproteínas varían considerablemente en los distintos tejidos y existen evidencias de que las células de cada tejido son capaces de sintetizar sus propias hemoproteínas de novo, de acuerdo con sus necesidades específicas.

La información disponible acerca de la biosíntesis de tetrapirroles en los distintos tejidos, indica que parece existir una precisa correlación entre los niveles de las enzimas y su correspondiente capacidad para formar sus hemoproteínas. Por ejemplo, la actividad del ALA-D en conejo, es elevada en hígado, relativamente alta en médula ósea y riñón y muy baja en otros tejidos como ser, intestino delgado.

Estos hechos sugieren que la concentración de las enzimas del hemo determina o regula la cantidad de porfirinas formadas por un dado tejido u órgano.

### V.2.2.2. Compartimentalización intracelular

Observando la localización intracelular de las enzimas de la biosíntesis de porfirinas, ha llamado la atención el hecho de que determinadas etapas tienen lugar dentro de la mitocondria, en tanto que otras suceden en el citoplasma (Figura V.2.). Así, los compuestos intermedios formados se ven forzados a difundir de un compartimiento a otro. Esto podría constituir de por sí un mecanismo regulatorio, sobre todo si algunos

de estos sustratos se encontraran en ciertas etapas, unidos a proteínas; de este modo su difusión podría verse modificada según el estado de la célula (Batlle y col., 1981).

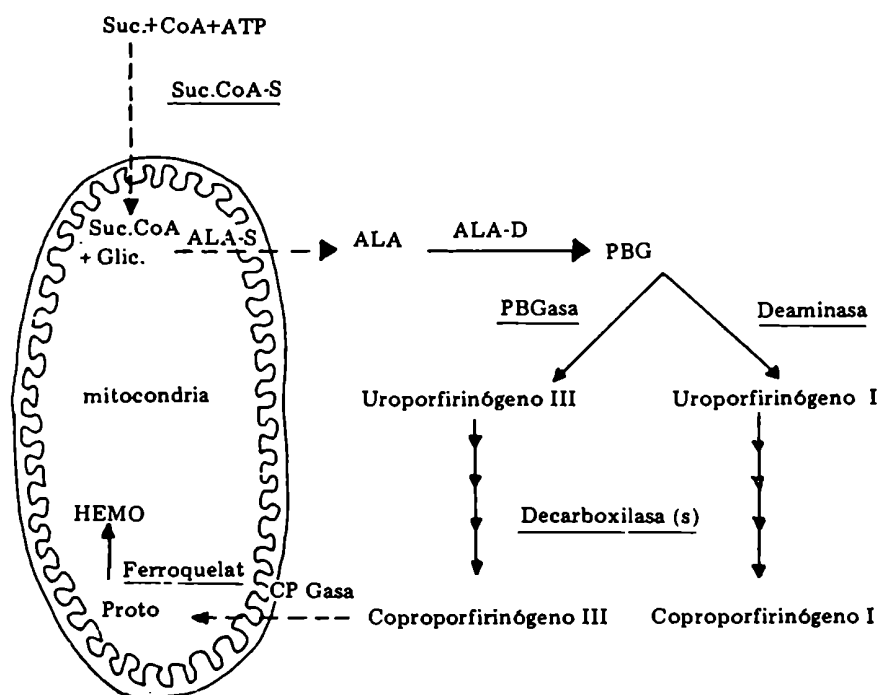


Figura V.2.: Localización intracelular de las enzimas involucradas en el camino biosintético del hemo.

Se ha postulado la existencia de permeasas específicas que controlarían el pasaje de  $\text{ALA}$  y  $\text{coproporfirinógeno}$  a través de la membrana mitocondrial; no obstante esta teoría no está aún avalada por evidencias experimentales.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que la cantidad de  $\text{ALA}$  que se transporte al citoplasma y que por lo tanto va a estar disponible para la síntesis de tetrapirroles, estará determinada por la concentración estacionaria de  $\text{ALA}$  dentro de la mitocondria. A su vez, la concentración estacionaria de  $\text{ALA}$  intramitocondrial estará gobernada por el nivel de  $\text{succinil CoA}$  generado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Vemos así, que la maquinaria regulatoria de este camino es relativamente compleja y se encuentra interconectada con otros

caminos metabólicos.

### V.2.3. Control por efectos de constituyentes del medio ambiente o del medio celular

Como vimos, la biosíntesis de los derivados porfirínicos en distintos organismos está influenciada por diferentes factores. Entre ellos discutiremos en esta sección el efecto de la luz y tensión de oxígeno, particularmente importantes en el caso de microorganismos, durante el crecimiento de los tejidos y el efecto de la concentración intracelular de ATP.

#### V.2.3.1. Oxígeno

La tensión de oxígeno y el estado de óxido-reducción de la célula influyen diferencialmente sobre las distintas etapas del camino biosintético del hemo, desempeñando de este modo un posible rol regulatorio. Así, por ejemplo, la conversión del coproporfirinógeno III a protoporfirinógeno IX es una reacción necesariamente aeróbica mientras que la inserción de hierro en protoporfirina IX para dar hemo está favorecida en ausencia de oxígeno (Batlle y col., 1981).

El mecanismo mediante el cual el oxígeno ejerce su influencia sobre la síntesis de tetrapirroles en animales superiores, es en apariencia, bastante complejo. En bacterias fotosintéticas, en cambio, si bien tampoco es simple, está algo más aclarado; se cree que actuaría en última instancia aumentando la síntesis de un compuesto que a su vez inhibiría al ALA-S.

#### V.2.3.2. Iluminación

Como en el caso del oxígeno, en bacterias fotosintéticas, las condiciones de iluminación desempeñan un rol importante en la regulación de la biosíntesis de  $\beta$ cl; así, una elevada intensidad luminosa reprime la síntesis de ALA-S, de manera que se ha sugerido que en estos organismos los efectos de la luz y el oxígeno podrían responder a un mecanismo de control común, vinculado con la concentración de cierto carrier en la

cadena de transporte de electrones y eventualmente con los niveles de ATP (Batlle y col., 1981).

#### V.2.3.3. ATP

Las primeras evidencias experimentales que demostraron la importancia de la concentración intracelular de ATP en el control de la síntesis de porfirinas provienen de los trabajos de Gajdos y Gajdos-Török (1969). Estos autores encontraron que el agregado de ATP al medio de crecimiento de *Rp. spheroides*, inhibía significativamente la síntesis de porfirinas. Paralelamente observaron que animales de laboratorio, con porfiria inducida por ciertos agentes porfirinogénicos poseían niveles de ATP disminuídos, corrigiéndose la porfiria cuando se administraba ATP, ADP o AMP. Postularon entonces, que el ATP inducía la formación de un inhibidor de naturaleza proteica y que su efecto se localizaba a nivel del ALA-S mitocondrial.

Años más tarde, Ohashi y Sinohara (1978) demostraron que el ATP estimulaba significativamente la actividad del ALA-S citoplasmática en hígado de rata; sugirieron entonces que el ATP se uniría a un sitio alostérico de la enzima provocando cambios conformacionales positivos en los sitios de unión de los sustratos glicina y succinil-CoA, conduciendo a una estimulación de la actividad del ALA-S.

Si bien ambas hipótesis difieren en cuanto a la acción concreta del ATP, resultan compatibles en el sentido de que el ATP podría desempeñar un papel regulatorio dual, actuando directa o indirectamente sobre la actividad de la enzima reguladora ALA-S.

#### V.2.4. Control por interconexión con otros caminos metabólicos

Los mecanismos de regulación del hemo se encuentran muy bien coordinados, por ejemplo, con los de formación de las proteínas específicas que constituyen las distintas hemoproteínas. Otro hecho importante es el estado estacionario de la concentración de ALA mitocondrial, que a su vez está estrechamente vinculado con el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, que regula el nivel de succinil-CoA, sustrato necesario para la síntesis

de ALA. Si recordamos ahora que el estado de óxido-reducción y la concentración de ATP celular eran otros factores que jugaban un papel significativo, podemos ver claramente que el sistema de regulación de esta ruta metabólica es bastante complejo y que está interrelacionado con el de varios otros caminos.

Además de los ya descritos, existe un mecanismo adicional de control de la biosíntesis de tetrapirroles en el que se encuentran involucradas enzimas del metabolismo de sulfocompuestos. La existencia de este mecanismo de control surgió de estudios efectuados casi simultáneamente por dos grupos de investigadores. Tuboi y col. (1970 a y b) demostraron que cultivos de *Rp. spheroides* contenían dos tipos de ALA-S (fracción I y II) que eran inducidas de forma diferente por variaciones del medio ambiente. A su vez, la fracción I podía existir en dos formas: inactiva y activa. En un principio se pensó que la conversión de la forma inactiva en la activa se debía a alguna modificación enzimática de la molécula en la fracción I (Tuboi y Hayasaka, 1971), comprobándose luego que para que dicha conversión ocurra, era necesaria la presencia de un compuesto de tipo disulfuro y un componente proteico (Tuboi y Hayasaka, 1972 a); los disulfuros utilizados podían ser homocistina o L-cistina. Estos mismos autores (1972 b) observaron que la enzima responsable de la activación se encontraba en alta concentración cuando el tejido se hacía crecer en luz y anaerobiosis.

Posteriormente, Neuberger y col. (1973 a, b y c) trabajando con extractos libres de células de *Rp. spheroides*, comprobaron que la oxigenación del tejido producía la anulación de la activación espontánea del ALA-S y atribuyeron ese fenómeno al efecto del oxígeno sobre el metabolismo de sulfocompuestos. Asimismo, purificaron un compuesto de bajo peso molecular que activaba el ALA-S por interacción directa con la misma y estudiaron el efecto de compuestos tiólicos encontrando que la cistina y el glutatión (GSSG) eran los más efectivos. Se supuso entonces que la cistina agregada a un extracto enzimático crudo, se convertía en trisulfocistina (CySSSCy), la cual actuaría directamente sobre la enzima. El descubrimiento de polisulfuros orgánicos en extractos de *Rp. spheroides* crecidas en semianaerobiosis y luz llevó a pensar que este tipo de compuestos controlarían también la actividad de ALA-S en células en crecimiento. En presencia de oxígeno molecular, los polisulfuros podrían convertir a la enzima en una forma inactiva (Neu-

berger y col., 1973 c).

Por su parte, Wider y col. (1976) postularon un esquema para explicar el control de la actividad de ALA-S en *Rp. spheroides* (Figura V.3.). Según este mecanismo, la actividad de la enzima regulatoria ALA-S estaría controlada por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, como la trisulfocistina, que es capaz de convertir una forma inactiva del ALA-S en una forma de alta actividad, según las necesidades de la célula. Lo interesante es que la formación de este activador, está catalizada por una enzima, la Cistationasa, que ha sido extraída e identificada mientras que de las mismas células se ha extraído otra enzima, la Rodenasa, que cataliza la degradación de trisulfocistina. Se postula entonces que el contenido intracelular del activador del ALA-S, trisulfocistina, está controlado por las actividades relativas de la Cistationasa y la Rodenasa, que son dos enzimas involucradas en el metabolismo de los compuestos sulfurados. Además, la disminución en el contenido celular del trisulfuro por oxigenación, sería el resultado de cambios en el nivel de los sustratos para la Cistationasa y Rodenasa y no de cambios en las cantidades de estas enzimas.

Más recientemente, Viale y col. (1980) comprobaron que en *Rp. palustris* la actividad del ALA-S se encontraría controlada por la presencia de un compuesto de bajo peso molecular, aunque el mecanismo de acción de este factor regulador sería diferente al existente en *Rp. spheroides*.

Vemos así, otro ejemplo más de la extraordinaria eficiencia y complejidad de los finos sistemas de control, de los cuales depende y al mismo tiempo aseguran el normal funcionamiento de la intrincada maquinaria celular.





### V.3. Referencias

- Batlle, A.M. del C.; Magnin, P.H. & Wider, E.A. (1981), "Porfirinas y Porfirias. Etiopatogenia, clínica y tratamiento" (Editorial Universitaria de Buenos Aires).
- Gajdos, A. & Gajdos-Török, M. (1969), "Porphyrines et Porphyrines Biochimie et Clinique" (Masson and Co., ed.).
- Granick, S. & Levere, R.D. (1964), *Progress in Haematology* 4, 1.
- Granick, S.; Sinclair, P.; Sassa, S. & Grieneringer, G. (1975), *J. Biol. Chem.* 250, 9215.
- Lascelles, J. (1964), "Tetrapyrrole biosynthesis and its regulation" (W.A. Benjamin, Inc., ed.) New York, Amsterdam.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 a) *Biochem. J.* 136, 477.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 b) *Biochem. J.* 136, 491.
- Neuberger, A.; Sandy, J.D. & Tait, G.H. (1973 c) *Enzyme* 16, 79.
- Ohashi, A. & Kikuchi, G. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 34.
- Ohashi, A. & Sinohara, H. (1978), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 80, 370.
- Rimington, C. (1966), "Control of Haemoglobin and Porphyrin synthesis with special reference to porphyrias" *Relazione al VI Congresso Internazionale di Patologia Clinica. Roma*, p. 341.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1971), *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 282.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1972 a), *Arch. Biochem. Biophys.* 150, 690.
- Tuboi, S. & Hayasaka, S. (1972 b), *J. Biochem.* 72, 219.
- Tuboi, S.; Kim, H.J. & Kikuchi, G. (1970 a), *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 147.
- Tuboi, S.; Kim, H.J. & Kikuchi, G. (1970 b), *Arch. Biochem. Biophys.* 138, 155.
- Viale, A.A.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 729.
- Wider de Xifra, E.A.; Sandy, J.D.; Davies, R.C. & Neuberger, A. (1976), *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 273, 79.

**B**

## CAPITULO I

### ASPECTOS GENERALES

---

	Página
I.1. Introducción	167
I.2. Estabilidad de las enzimas inmovilizadas	169
I.3. Comportamiento cinético de las enzimas inmovili <u>zadas</u>	173
I.4. Referencias	176

## I. ASPECTOS GENERALES

### I.1. Introducción

La compleja maquinaria química de la célula viva está dirigida por miles de enzimas diferentes, cada una de las cuales cataliza reacciones químicas particulares. Indudablemente, la célula no funciona como un simple receptáculo de enzimas. Por el contrario, existen numerosas evidencias que indican que la gran mayoría de las enzimas intracelulares actúan en un medio circundante que podría asemejarse a un gel, o bien adsorbidas en interfases o membranas, o formando parte de ensamblamientos de tipo cuasi-sólido como parecen existir en las mitocondrias y otras organelas celulares. Además, la distribución arquitectónica de las enzimas dentro de la célula, debe ser extremadamente precisa ya que de lo contrario, los sustratos sobre los cuales actúan cada una de ellas, así como los productos de reacción y la inmensa variedad de sustancias que podrían inhibir o modificar determinadas reacciones, se mezclarían en forma caótica.

Hasta hace relativamente poco tiempo, la mayoría de los estudios realizados sobre enzimas se efectuaban utilizando extractos más o menos purificados de las mismas, en soluciones acuosas diluídas, es decir, en condiciones bastante diferentes a las existentes en el interior de la célula. Probablemente, sólo unas pocas enzimas, las verdaderas enzimas extracelulares, llevan a cabo su función biológica primaria en estas condiciones. De este modo, los enzimólogos no sabían con certeza si las propiedades químicas y físicas de las enzimas determinadas *in vitro*, eran semejantes a las que poseían esas mismas enzimas en la célula viva (Batlle y col., 1976).

Para resolver este problema, lo ideal sería estudiar las enzimas intracelulares en su ambiente natural tratando de reconstruirlo por ejemplo, por recombinación de las enzimas aisladas, con el medio circundante con el cual están normalmente asociadas en la célula. Sin embargo, las dificultades en este sentido son numerosas. Otra alternativa más práctica y sencilla, consiste en unir o asociar las enzimas aisladas a matrices artificiales mecánicamente estables, tales como soportes hidrofílicos, hidrofóbicos o inertes.

Estos sistemas enzima-matriz no sólo pueden servir como modelos valiosos para estudiar el comportamiento de las enzimas en condiciones más similares a las de su medio natural, sino

que también pueden emplearse como biocatalizadores eficientes, con numerosas aplicaciones prácticas, tales como producción industrial de ciertos compuestos e ingeniería biomédica.

Históricamente, Grubhofer y Schleith, en 1954, fueron los primeros en describir la insolubilización de la pepsina y otras proteínas sobre poliaminoestireno. No obstante, los mayores aportes acerca de este nuevo enfoque en el estudio de la tecnología de las enzimas, son de data más reciente. Actualmente se conocen más de 1000 trabajos al respecto y en los últimos años se han publicado importantes recopilaciones que discuten varios aspectos de este campo (Zaborsky, 1973; Weetall, 1973; Messing, 1975; Dunlap, 1974; Salomona y col., 1973 y Pye y Wingard, 1973).

Las ventajas que ofrece el empleo de enzimas insolubilizadas son numerosas:

i) Frecuentemente se produce un aumento en la estabilidad de la enzima.

ii) El sistema enzima-soporte puede separarse fácilmente de la solución, evitándose la contaminación entre la mezcla de reacción y la preparación enzimática.

iii) Debido a la estabilidad de la enzima inmovilizada, es posible usar una misma preparación repetidas veces. De esta forma, pueden llevarse a cabo muchas más determinaciones que las que podrían realizarse con la misma cantidad de enzima en solución.

iv) Finalmente, es posible obtener ciertos reactivos inestables, sensibles o caros, empleando enzimas inmovilizadas. Sin embargo, esta última alternativa no ha sido explotada convenientemente.

Hay dos aspectos principales que deben considerarse cuando se trata de insolubilizar una proteína: la recuperación de la actividad fisiológica y la estabilidad de la preparación. Está comprobado que generalmente durante el proceso de inmovilización existe una pérdida de actividad enzimática, la cual está relacionada principalmente con factores tales como el grado de modificación que sufre la proteína y las interacciones entre la enzima y la matriz.

Por otra parte, la estabilidad de una preparación es muy difícil de fijar; esta propiedad puede verse aumentada o disminuida según el caso, como ocurre con todos los parámetros relacionados con la unión de enzimas a matrices. Además, pueden considerarse distintos tipos de estabilidad: estabilidad térmica,

operacional y estabilidad frente al estacionamiento.

La estabilidad térmica refleja la capacidad del sistema enzima-soporte para resistir temperaturas elevadas, antes de que tenga lugar el proceso de desnaturalización. En muchos casos, si la estabilidad térmica es mayor, la enzima puede usarse a temperaturas elevadas con un grado de eficiencia significativo.

La estabilidad frente al estacionamiento consiste simplemente en la capacidad de la preparación para retener su actividad bajo condiciones específicas de almacenamiento. Esta propiedad puede proporcionar información acerca de la estabilidad a temperatura ambiente.

Probablemente, el parámetro de estabilidad más importante y uno de los menos investigados, es la estabilidad operacional. La estabilidad operacional de una preparación no es sólo función de la enzima sino también de la durabilidad del carrier, concentración de inhibidores (en particular inhibidores irreversibles), etc.

No es nuestro objetivo detenernos a estudiar la numerosa cantidad de enzimas que han sido inmovilizadas. Puede encontrarse una lista amplia en el libro de Zaborsky (1973) o en el compendio publicado por Corning Glass Works (Weetall, 1973). Además, es imposible enumerar todos los procedimientos de inmovilización que se han publicado. Nos limitaremos, por lo tanto, a discutir los principales y mejores procesos de inmovilización en lo referente a sus aspectos químicos, ventajas y limitaciones. Enfatizaremos en particular, los esquemas que han sido útiles analíticamente.

## I.2. Estabilidad de las enzimas inmovilizadas

Una de las principales ventajas de las enzimas inmovilizadas, particularmente para propósitos analíticos, es el prolongado tiempo de vida de la preparación. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos, este parámetro es difícil de predecir, debido en parte, a la naturaleza compleja del proceso. Además, aún es incompleto el conocimiento acerca del rol de la estructura enzimática y las fuerzas que la afectan.

Parece ser que algunas especies tales como los electrolitos o zwitterions del ácido sulfónico son capaces de estabilizar algunas enzimas en solución. Se han observado efectos similares

con enzimas unidas covalentemente a determinados soportes, donde las matrices polianiónicas y policatiónicas parecen incrementar la estabilidad de la enzima en soluciones alcalinas y ácidas respectivamente (Goldstein, 1970 y Levin y col., 1964). Esto estaría relacionado con la presencia de un medio circundante capaz de regular el pH.

Si la disminución de la actividad enzimática se debe primariamente a la desnaturalización de la proteína, es de utilidad tratar de establecer cómo y por qué se desnaturaliza ya que esto contribuiría, en última instancia, a conocer el modo de incrementar su estabilidad. No obstante, muchas veces ocurre que proteínas distintas exhiben diferentes características en lo referente a la desnaturalización y renaturalización. Debido a ello ha sido difícil formular una teoría general para este tipo de procesos. Sin embargo, pese a la falta de una teoría que considere los efectos conformacionales, del medio ambiente y efectos inhibitorios, es posible reunir una importante cantidad de datos acerca del papel desempeñado por el proceso de inmovilización en el aumento de la estabilidad enzimática.

Se ha estudiado la estabilidad de 50 enzimas inmovilizadas frente al estacionamiento (Melrose, 1971). De ellas, en 12 sistemas no hubo cambios en la estabilidad comparada con la de la enzima en solución, 30 exhibieron un incremento en esta propiedad y las 8 restantes mostraron una disminución en la estabilidad. Así, en la mayoría de los casos, es esperable observar un aumento en la estabilidad de la enzima como consecuencia de su inmovilización.

Si realmente la desnaturalización es la causa principal de la pérdida de actividad enzimática, es probable que la aplicación de una técnica que prevenga este proceso, incremente la estabilidad. Debido a que el mecanismo de desnaturalización involucra un desdoblamiento de la proteína, la inmovilización de la enzima por un método que evite que tengan lugar las transformaciones conformacionales que conducen a la desnaturalización, permitiendo sólo aquellas que son necesarias para la actividad, dará como resultado una preparación más estable.

Como se muestra en la Figura I.1., pueden presentarse diferentes arreglos estereoquímicos en la unión de una enzima a una matriz. Aunque las uniones de la figura se ilustran como uniones covalentes, también existen interacciones enzima-matriz que contribuyen a la estabilización. Se ha demostrado que cuanto mayor es el número de uniones formadas entre la tripsina y

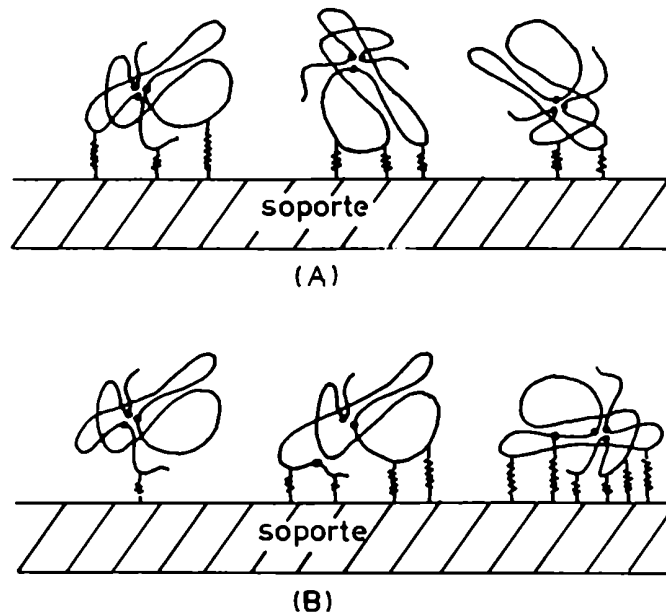


FIGURA I.1.: Posibles orientaciones random de enzimas unidas a una matriz sólida. La heterogeneidad no sólo se presenta en la orientación (A) sino también en la rigidez de la unión (B).

el Sephadex, la enzima es menos susceptible a la desnaturalización producida por la urea (Gabel, 1973). Estudios más recientes han confirmado estas observaciones (Martinek y col., 1977a).

No obstante parece ser que un cambio conformacional causado por el proceso de inmovilización, podría dar como resultado la unión de la proteína a través de un número elevado de puntos, lo cual a su vez restringiría los cambios conformacionales requeridos para la formación del sitio activo. Asimismo impedimentos estéricos por parte de la matriz podrían resultar en la producción de moléculas inactivas unidas al soporte (Figura I.1.). Sin embargo, un estudio de las interacciones no covalentes entre matriz y proteína ha confirmado que estas fuerzas pueden estabilizar la enzima. La poli(acrilamida), que es una matriz neutra, no es capaz de estabilizar a la tripsina en un rango de 0-50% de gel. Por otra parte, el polimetacrilato disminuyó 1000 veces la velocidad de descomposición térmica a



concentraciones mayores que 30% de gel. Otros estudios demostraron que el movimiento transitorio de la enzima atrapada era 1000 veces menor al de la enzima libre y que su movimiento rotacional estaba también enormemente disminuído. La modificación de la proteína indicó que las interacciones específicas puente de hidrógeno, eran las responsables de la estabilización (Martinek y col., 1977b). En base a estos datos podríamos esperar que las proteínas de elevado peso molecular exhibieran mayor estabilidad térmica que las de menor tamaño, cuando son sometidas a procedimientos de inmovilización. Esto parece cumplirse por ejemplo, para la glucosa oxidasa y la peroxidasa en relación a la acetilcolinesterasa cuando son atrapadas en una matriz silástica.

Es interesante considerar qué número de uniones se forman cuando se une una enzima a un soporte sólido. Se ha demostrado que cuando se inmoviliza la tripsina sobre CPG arilamina, se modifican en número promedio 11 residuos aminoacídicos por mol de enzima (Royer y Uy, 1973). El uso de complejos enzima-sustrato para la inmovilización, una práctica relativamente común, incrementa la actividad remanente, la estabilidad y el número de uniones formadas a 14. En la unión de la leucina-aminopeptidasa a agarosa activada con bromuro de cianógeno (Lasch y Koelsch, 1978) se observó la formación de 22 uniones entre la matriz y la enzima. Aparentemente entonces, el acople de una enzima a una matriz insoluble, tiene lugar a través de múltiples uniones.

Se han encontrado algunas relaciones interesantes entre la estabilidad y el sistema enzima-matriz empleado. Usando la misma matriz y la misma reacción de acople, varias isoenzimas de la lactato dehidrogenasa y de la glucosa isomerasa, exhibieron diferentes estabilidades. La recuperación de la actividad, en cada caso, también fue significativamente distinta. Sin embargo, no se ha hallado aún una explicación clara para este fenómeno. Como ya vimos, el carrier desempeña un papel importante en la estabilidad de la preparación debido a su carácter hidrofílico, su carga y otras propiedades. Finalmente, otro punto a resaltar es el concerniente a las condiciones de reacción bajo las cuales ocurre el acople. A menudo se ha observado que cantidades crecientes de proteína unida al soporte, aumentan la estabilidad del producto (Herring y col., 1975; Morris y col., 1975; Johnson, 1978 y Johnson y Coughlin, 1979). Es necesario

destacar que la proteína real utilizada carece de importancia. Así, la albúmina puede mezclarse con la proteína en estudio para lograr una mayor estabilidad.

Un aumento en el tiempo de contacto entre la solución enzimática acuosa y el soporte, conduce también a un incremento en la estabilidad (Johnson y Coughlin, 1979).

Una vez que la enzima ha sido inmovilizada, surgen nuevos factores que pueden influenciar su estabilidad. Por ejemplo, la compactación de una resina orgánica de intercambio iónico a elevadas fuerzas iónicas, o la disolución de una matriz de sílica a altos pH's, pueden ocasionar una pérdida en la actividad enzimática.

El ataque microbiano de la matriz o de la enzima, es otro problema, aunque factible de superar. Una dificultad más significativa es la debida a las limitaciones de transferencia de masa o a partículas de poro grande. Aunque estas condiciones a veces pueden resultar en propiedades cinéticas más convenientes, también incrementan la concentración de producto en el micromedio, y si el producto es nocivo para la actividad enzimática, la situación causaría un rápido deterioro de la capacidad catalítica de la preparación. Un buen ejemplo es la glucosa oxidasa (Krishnaswamg y Kittrell, 1978) cuyo producto de reacción,  $H_2O_2$ , inactiva la enzima. En este caso, las restricciones difusionales impuestas por el soporte, aumentan considerablemente la constante de velocidad de inactivación. Este problema puede solucionarse co-inmovilizando la enzima catalasa, que descompone al peróxido de hidrógeno.

### 1.3. Comportamiento cinético de las enzimas inmovilizadas

Se ha observado que en muchos casos, las propiedades cinéticas de las enzimas insolubilizadas difieren de las de las correspondientes especies solubles. Las causas de estas diferencias pueden clasificarse esencialmente en 4 grupos:

i) Efectos estéricos y conformacionales: es muy probable que una enzima unida a un soporte sólido sea conformacionalmente distinta de la misma enzima en solución. Además, la enzima puede estar acoplada al carrier de tal modo que el sitio activo u otros sitios sean inaccesibles o sólo parcialmente accesibles a la entrada del sustrato o efectores. Ocasional-

mente, la proteína puede adoptar una conformación inactiva tal, que la función catalítica se vea parcial o totalmente bloqueada. Es posible que estas situaciones contribuyan a las constantes cinéticas del sistema total, aunque esto aún no ha sido bien estudiado.

ii) Efectos de partición: las concentraciones de equilibrio del sustrato o efectores dentro del soporte, suelen ser distintas de las correspondientes a la solución. Estos efectos, relacionados con la naturaleza química de la matriz, se deben probablemente, a las interacciones electrostáticas o hidrofóbicas entre el soporte y las especies de bajo peso molecular presentes en el medio, lo cual da como resultado un "micromedio" modificado; o sea, existen diferentes concentraciones de sustrato, productos o efectores, protones, hidroxilos, etc., en las cercanías de las partículas de la enzima inmovilizada.

iii) Efectos del micromedio circundante sobre los parámetros catalíticos intrínsecos de la enzima: se deben a la perturbación de los pasos catalíticos de la reacción enzimática y reflejan eventos ocurridos como consecuencia de las diferentes interacciones enzima-sustrato, que tienen lugar en un microambiente distinto, cuando la enzima está inmovilizada sobre un soporte sólido.

iv) Efectos difusionales o de transferencia de masa: se originan debido a las resistencias difusionales a la traslocación de sustratos, productos o efectores, hacia o desde el sitio de la reacción enzimática. Son particularmente pronunciados en el caso de reacciones enzimáticas rápidas y para configuraciones donde el tamaño de la partícula o el espesor de la membrana son relativamente grandes. Una enzima insolubilizada funcionando bajo condiciones difusionales restringidas estaría expuesta, aún en el estado estacionario, a diferentes concentraciones locales de sustrato, producto o efectores, comparadas con las de la enzima en solución. Esto se reflejaría en los valores de los parámetros cinéticos que se emplean comúnmente para caracterizar las reacciones enzimáticas.

Debido a la existencia de los efectos mencionados anteriormente, en el caso de las enzimas inmovilizadas, donde el comportamiento cinético aparente puede estar controlado por el micromedio circundante o por efectos de transferencia de masa, es de utilidad distinguir entre:

a) Parámetros de velocidad intrínsecos de la reacción,

o sea, los parámetros cinéticos característicos de la enzima nativa en solución.

b) Parámetros de velocidad inherentes, que son los correspondientes a la enzima inmovilizada, en ausencia de limitaciones difusionales.

c) Parámetros de velocidad efectiva, observados para una enzima inmovilizada, cuando las limitaciones difusionales son significativas.

#### I.4. Referencias

- Batlle, A.M. del C.; Xifra, E.A.; Stella, A.M.; Parera, V. & Rossetti, M.V. (1976), 5ta. Reunión Anual de la Soc. Arg. de Biofísica, Bs.As., 16-17 Dic.
- Dunlap, R.B. (ed.) (1974), "Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography", Plenum Press, New York.
- Gabel, D. (1973), Eur. J. Biochem. 33, 348.
- Goldstein, L. (ed.) (1970), "Methods in Enzymology", Academic Press, London, New York, vol. 19, p. 935.
- Grubhofer, H. & Schleith, L.Z. (1954), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 297, 108.
- Herring, W.M.; Laurence, R.L. & Kittrell, J.R. (1975), Biotechnol. Bioeng. 14, 975.
- Johnson, D.B. (1978), Biotechnol. Bioeng. 20, 1117.
- Johnson, D.B. & Coughlin, M.P. (1979), Biotechnol. Bioeng. 20, 1085.
- Krishnaswami, S. & Kittrell, J.R. (1978), Biotechnol. Bioeng. 20, 821.
- Lash, J. & Koelsch, R. (1978), Eur. J. Biochem. 82, 181.
- Levin, Y.; Pecht, M.; Goldstein, L. & Katchalski, E. (1964), Biochemistry 3, 1905.
- Martinek, K.; Klimbov, A.M.; Goldmacher, V.S. & Berezin, I.V. (1977 a), Biochim. Biophys. Acta 485, 1.
- Martinek, K.; Klimbov, A.M.; Goldmacher, V.S.; Tchernysheva, A.V.; Mozhaev, V.; Berezin, I.V. & Glotov, B.O. (1977 b), Biochim. Biophys. Acta 485, 13.
- Melrose, G.J.H. (1971), Rev. Pure Appl. Chem. 21, 83.
- Messing, R.A. (ed.) (1975), "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors", Academic, New York.
- Morris, D.L.; Campbell, J. & Hornby, W.E. (1975), Biochem. J. 147, 593.
- Pye, E.K. & Wingard, L.B. (eds.) (1973), "Enzyme Engineering", Plenum Press, New York, vol. II.
- Royer, C.P. & Uy, R. (1973), J. Biol. Chem. 248, 2627.
- Salomona, M.; Saronia, C. & Garattini, S. (1973), "Insolubilized Enzymes", Raven Press, New York.
- Weetall, H.H. (1973), "Immobilized Enzymes. A compendium of references from the Recent Literature". Corning Glass Works, Corning, N.Y. and New England Research Applications Center, University of Connecticut, Storrs, C.
- Zaborsky, O.R. (1973), "Immobilized Enzymes", CRC Press, Cleveland, Ohio.

	Página
II.4.7. Reacciones específicas de acople	203
II.5. Referencias	208

## CAPITULO II

### TECNICAS PARA LA INMOVILIZACION DE PROTEINAS

---

	Página
II.1. Clasificación	177
II.2. Técnicas de adsorción	177
II.2.1. Definición	177
II.2.2. Soportes y mecanismos de unión	178
II.2.3. Factores involucrados en el proceso de adsorción	183
II.2.4. Preparación de los soportes para la adsorción	184
II.2.5. Métodos para la inmovilización de enzimas por adsorción	186
II.2.6. Regeneración	187
II.2.7. Inmovilización por formación de puentes inorgánicos	188
II.3. Técnicas de atrapamiento de enzimas en geles	188
II.3.1. Consideraciones generales	188
II.3.2. Atrapamiento en geles por polimerización	190
II.3.3. Solución polimerizante	191
II.3.4. Suspensiones polimerizantes	193
II.3.5. Atrapamiento en geles por entrecruzamiento de polímeros	193
II.3.6. Interpenetración de redes	195
II.3.7. Copolimerización	195
II.4. Técnicas de acople covalente	196
II.4.1. Consideraciones generales	196
II.4.2. Condiciones para el acople	196
II.4.3. Grupos proteicos disponibles para la unión covalente	197
II.4.4. Reactividad de los residuos aminoácídicos	200
II.4.5. Sitio activo	201
II.4.6. Determinación del grupo involucrado en la unión	203

## II. TECNICAS PARA LA INMOVILIZACION DE PROTEINAS

### II.1. Clasificación

Para obtener los derivados insolubles de proteínas con actividad biológica, se utilizan fundamentalmente los siguientes métodos:

i) Adsorción sobre soportes inertes o resinas sintéticas de intercambio iónico.

ii) Atrapamiento de enzimas en geles, comprende aquellas técnicas en las cuales la polimerización da como resultado el atrapamiento de la enzima y aquellas donde la proteína se introduce en un polímero preformado y las reacciones que tienen lugar producen una malla entrecruzada, disminuyendo así la movilidad enzimática.

iii) Unión covalente de proteínas a matrices insolubles en agua, a través de grupos funcionales no involucrados en la actividad biológica.

### II.2. Técnicas de adsorción

Aparentemente, las técnicas de adsorción son los procedimientos más económicos para la insolubilización de una enzima sobre un soporte. Aunque el proceso de inmovilización es en general simple, involucra reacciones complejas y la formación de múltiples tipos de uniones. La estabilidad de la enzima adsorbida depende de la fuerza y del mantenimiento de esas uniones cuando la proteína se utiliza bajo determinadas condiciones.

#### II.2.1. Definición

Generalmente se acepta que la adsorción consiste en la adhesión o condensación de las moléculas de soluto sobre la superficie de los sólidos. Esta definición no es totalmente aceptable a los propósitos de esta discusión. Si así fuera, las enzimas inmovilizadas mediante uniones covalentes también se considerarían como adsorbidas, ya que de alguna manera estarían acumuladas sobre la superficie del sólido. Para resolver este dilema adoptaremos otra definición: "adsorción es la adhesión



de una enzima a la superficie de un soporte el cual no cumple con los requisitos "funcionales" necesarios para el acople covalente".

### II.2.2. Soportes y mecanismos de unión

La unión o uniones formadas entre la enzima y el soporte durante el proceso de adsorción, dependerán de las propiedades de superficie y de la naturaleza química del soporte. Los dos tipos de uniones más frecuentemente encontrados en la literatura son:

i) Las resultantes de las interacciones carga-carga (uniones iónicas o puentes salinos).

ii) Las uniones hidrógeno.

Además, trabajos llevados a cabo con soportes de titanio, indicaron que puede formarse una unión covalente durante el proceso de adsorción (Messing, 1975).

Con el fin de examinar las tres fuerzas de unión que participan en la inmovilización de enzimas sobre soportes, discutiremos el comportamiento de tres matrices diferentes: colágeno, poro de vidrio controlado y poro de titanio controlado.

La mayor parte de los ensayos que emplean colágeno, han sido efectuados por Vieth y colaboradores. Estos autores dividen sus técnicas de inmovilización en dos procedimientos separados (Venkatasubramanian y col., 1974 y Bernath y Wieth, 1974): complejamiento e impregnación. La impregnación consiste en un simple proceso de adsorción donde la enzima es adsorbida sobre un soporte de colágeno.

Por otra parte Messing (1969), efectuó un estudio acerca de la unión de proteínas a superficies de poro de vidrio controlado. Cuando las membranas de vidrio poroso se empleaban como membranas de diálisis, se observaba una rápida pérdida de proteína en la solución que contenía la membrana; sin embargo, después de algunos días, prácticamente no aparecía proteína en el buffer que rodeaba la membrana. Se emplearon proteínas puras caracterizadas para estudiar espectrofotométricamente la cinética de la inclusión de las mismas en vidrio poroso. La inclusión inicial resultó demasiado rápida como para poder seguirla con cierto grado de exactitud, pero después de transcurridos 20 minutos, la velocidad de inclusión disminuyó considera-

blemente. Los resultados fueron reproducibles y el proceso mostró un comportamiento lineal en función del tiempo (Figura II.1.)

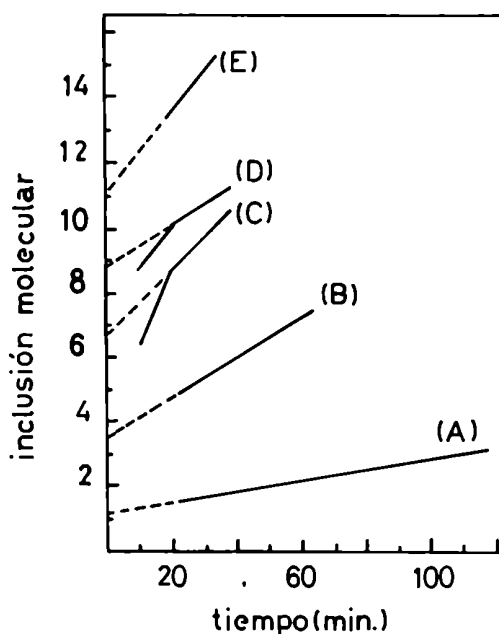


FIGURA II.1.: Inclusión molecular (adsorción) de proteínas modelo en membranas de vidrio poroso. (- -): Extrapolación a tiempo cero. (A): pepsina; (B): inhibidor de la tripsina de soja; (C): ribonucleasa; (D):  $\alpha$ -quimotripsina; (E): citocromo C.

Cuando se graficó la velocidad lineal de inclusión en función del peso molecular de la proteína (Figura II.2.) se observó que la llamada "segunda velocidad de inclusión" era inversamente proporcional al peso molecular.

Además se obtuvieron las magnitudes de las reacciones iniciales de inclusión, extrapolando las líneas rectas de la Figura II.1. a tiempo cero y luego, estos valores extrapolados se graficaron en función del punto isoeléctrico de la molécula proteica (Figura II.3.).

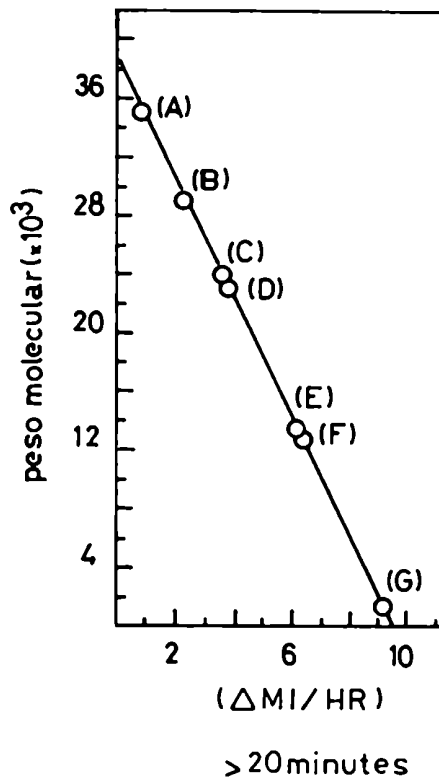


Figura II.2.: Segunda velocidad de inclusión molecular como una función del peso molecular de la proteína.  
 (A) pepsina, (B) ácido carbónico  
 (C) inhibidor de la tripsina de soja,  
 (D) quimotripsina, (E), citocromo c,  
 (F) ribonucleasa, (G) bacitracina.

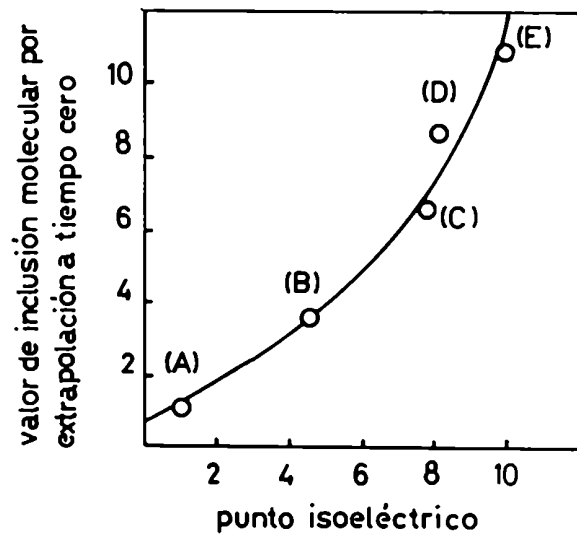


Figura II.3.: Valor de la reacción de inclusión molecular inicial como una función del punto isoeléctrico.  
 (A) pepsina, (B) inhibidor de la tripsina de soja,  
 (C) ribonucleasa  
 (D) quimotripsina,  
 (E) citocromo c.

Estos resultados indican que la inclusión rápida inicial depende de las cargas presentes sobre la superficie de la proteína. En el caso de puntos isoeléctricos mayores, o más electropositivos, las proteínas reaccionan inicialmente en forma más vigorosa con la superficie de vidrio poroso. El grupo predominante en estas moléculas electropositivas es el  $\text{NH}_3^+$ ; esto sugiere que la inclusión inicial involucra la formación de uniones iónicas entre los grupos amino de la proteína y los grupos silanol disociados ( $\text{SiO}^-$ ) del vidrio. Esta conclusión es consistente con los estudios de Holt y Bowcott (1954) acerca de la reacción del ácido silícico con heptadecilamina y proteínas.

Sin embargo, la unión de la proteína al vidrio es tan fuerte que los ácidos fuertes, el hidróxido de amonio o una variedad de buffers de distinta fuerza iónica, no son capaces de eluirla, en forma cuantitativa. Estos hallazgos sugieren que la unión iónica aminosilicato, no debe ser la única involucrada en estos procesos de adsorción.

Las proteínas pueden liberarse del vidrio cuantitativamente empleando soluciones ácidas de urea, pero no con urea sola. Esto está indicando que tanto las uniones aminosilicato como las uniones hidrógeno participan en la adsorción de proteínas al vidrio. Las investigaciones de Weldes (1967) acerca de las interacciones de las proteínas con silicatos metálicos alcalinos, refuerzan la importancia de la participación de uniones hidrógeno.

A diferencia del vidrio, el titanio sufre con facilidad reacciones redox. En un estudio de la glucosa oxidasa y la catalasa inmovilizadas por adsorción sobre titanio poroso, Messing (1974a) observó que la preparación se tornaba violeta-azulada cuando se almacenaba a temperatura ambiente, en agua, y no se utilizaba en forma continua. Cuando se pasaba una solución de glucosa a través de la enzima insolubilizada, el sistema tomaba color amarillo, pero el estacionamiento en agua lo revertía nuevamente al violeta-azulado. Estas observaciones conducen a las siguientes conjeturas: el cambio de color en la superficie del titanio se debe probablemente, a un cambio en el estado de oxidación, como resultado de la transferencia de electrones. En el caso de la glucosa oxidasa, es posible que esta transferencia de electrones esté mediada por el FAD y, en el caso de la catalasa, estarían involucradas las porfirinas conteniendo hierro. El cambio de color puede atribuirse a la formación de ti-

tanio reducido,  $Ti_2O_3$  que es violeta. Este fenómeno de transferencia de electrones, estaría indicando que por lo menos existe una unión parcialmente covalente entre la matriz y la enzima.

De manera que, en el caso de soportes específicos, además de las uniones iónicas y las uniones hidrógeno, puede también encontrarse alguna unión de tipo covalente.

### II.2.3. Factores involucrados en el proceso de adsorción

Hay ciertos factores que deben tenerse en cuenta cuando se lleva a cabo un proceso de adsorción. Aunque las proteínas conjugadas o complejas reaccionan de igual modo que las proteínas simples en lo que respecta a la adsorción, puede tener lugar una reacción adicional cuando el proceso incluye una inmovilización dentro de los poros de un soporte. Por ejemplo puede ocurrir una disociación del componente no proteico. Stinson (1969), ha demostrado que en presencia de vidrio poroso la hemoglobina se disocia de manera que el grupo prostético porfirina, que es más pequeño, se adsorbe a una velocidad considerablemente mayor que la proteína. Eventualmente, el clivaje de una enzima conjugada, puede conducir a la pérdida de la actividad.

Sitio activo: Otro problema que puede presentarse cuando se inmovilizan enzimas por adsorción, es la reacción de un residuo involucrado en el sitio activo de la enzima. Tal es el caso de la inmovilización de la tripsina sobre vidrio poroso, con la participación de un residuo histidina del sitio activo (Messing, 1970).

pH y fuerza iónica: Para la inmovilización de las enzimas por adsorción es importante un riguroso control del pH y de la fuerza iónica. Si la unión es predominantemente iónica con muy poca contribución de la unión hidrógeno, un pequeño cambio en estos parámetros, podría resultar en el intercambio de un ión proteico por otro ión, dando lugar a la desadsorción (Bernath y Wieth, 1974).

El control del pH y la fuerza iónica no es tan crítico en el caso de enzimas unidas covalentemente.

Cantidad de enzima: Un factor importante que tiene influencia sobre la cantidad de enzima adsorbida a un soporte es la concentración de enzima expuesta por unidad de superficie o de peso de la matriz, durante el proceso de inmovilización.

Bernath y Wieth (1974) desarrollaron isoterma de adsorción para la lactasa y lisosima con membranas de colágeno. Para ambas enzimas, la actividad aumenta con el incremento en la concentración de proteína, aproximándose asintóticamente a un valor de saturación a elevadas concentraciones. Los autores opinan que esta aproximación a un valor límite, indicaría que hay un número finito de sitios de unión sobre el colágeno y que diferentes enzimas se unen a la matriz mediante un mecanismo general que involucra interacciones específicas proteína-proteína.

Por otra parte, debe mencionarse que en muchos casos, si los soportes están sobrecargados con enzima, la cantidad de enzima disponible para la reacción está restringida o limitada por la difusión, ya que la reacción ocurre principalmente en las primeras capas de proteína que pueden ser alcanzadas por el sustrato. De este modo, al no poder emplearse la totalidad de la enzima adsorbida, la eficiencia de su utilización estaría disminuída.

Temperatura y tiempo: Ambos parámetros deben tenerse en cuenta en un proceso de adsorción. Debido a que la difusión es un factor de fundamental importancia cuando se insolubiliza una proteína en una matriz porosa, la inmovilización puede completarse en un tiempo corto si la temperatura es elevada. Sin embargo, no es aconsejable trabajar a altas temperaturas ya que es posible que ocurra la desnaturalización proteica. Por lo tanto es importante, en cada caso, establecer una temperatura óptima para un período determinado.

Finalmente, los factores involucrados en la inmovilización por adsorción pueden resumirse como sigue:

- i) concentración y cantidad de enzima en función de la unidad de superficie o peso del soporte.
- ii) efecto de la adsorción sobre la proteína enzimática.
- iii) fuerza iónica
- iv) pH inicial de la reacción de adsorción y pH posterior de aplicación.
- v) temperatura de la reacción de adsorción.
- vi) punto isoeléctrico de la proteína y sitios de adsorción del soporte.

#### II.2.4. Preparación de los soportes para la adsorción

Tres aspectos son importantes cuando se trata de obte-

ner un soporte óptimo para la inmovilización por adsorción: i) acondicionamiento previo de la superficie con respecto al pH; ii) acondicionamiento previo de la superficie con respecto a los cofactores y iii) selección del diámetro de poro óptimo para la insolubilización de la enzima en cuestión.

i) pH: La importancia del acondicionamiento de la superficie con respecto al pH es marcada cuando la enzima es particularmente sensible a variaciones en este parámetro. La sílica de poro controlado tiene una superficie acídica (pH:4) de modo que una enzima que se desnaturaliza en esas condiciones, no puede resistir ese medio. Por lo tanto, en este caso, el soporte debe tratarse previamente con un buffer cuyo pH coincida con el pH óptimo de estabilidad de la proteína.

ii) Cofactores: La mayoría de los soportes unen selectivamente cofactores tales como los iones metálicos. Estos soportes, a su vez, pueden competir con las enzimas que requieren ese tipo de iones para su activación. En tales condiciones, los iones metálicos pueden separarse de los sitios fundamentales de la enzima y unirse al soporte produciendo así una inactivación de la proteína o una disminución en su actividad. Para que esto no ocurra, es conveniente tratar la superficie de los soportes con una solución del ión metálico necesario para el funcionamiento de la enzima.

iii) Diámetro del poro: Este aspecto es fundamental si se selecciona para la inmovilización, por ejemplo, un poro dimensionalmente estable, como los poros de cerámica, o uno flexible, como el de una membrana de colágeno.

En el año 1970, Messing, trabajando con soportes de vidrio poroso, observó que la cantidad de enzima adsorbida no sólo dependía del diámetro del poro, sino también del área superficial. Pero, aunque una matriz posea un área superficial grande, la disponibilidad de esa superficie para la unión está limitada por las aberturas. La bentonita por ejemplo, es un material que cumple con esas características.

En un trabajo reciente se ha desarrollado un procedimiento simple, cuyo objetivo consiste en lograr una unión más efectiva, sobre la base de la relación entre el diámetro del poro y el tamaño molecular. Esta metodología puede emplearse si se conocen las dimensiones de la enzima o del sustrato. Mediante la aplicación de esta técnica se pretende utilizar toda la superficie interna del material poroso para el acople de la enzima, tratando de mantener un área superficial tan grande co-



mo sea posible. Esto significa que se requiere el menor diámetro de poro con una estrecha distribución de poros, para permitir la entrada de la molécula limitante (la enzima, cuando es más grande que el sustrato). Un estudio realizado con la glucosa oxidasa y la catalasa (Messing, 1974b) sugiere que el diámetro de poro óptimo para la inmovilización de una enzima, debe ser aproximadamente 2 veces el del eje mayor de la molécula proteica funcional.

#### II.2.5. Métodos para la inmovilización de enzimas por adsorción

i) Procedimiento estático: es el que requiere mayor tiempo y el menos eficaz de los métodos conocidos. Consiste en colocar al soporte en la solución conteniendo la enzima, sin agitación, y esperar que la enzima difunda hacia la superficie del soporte y penetre en su estructura.

ii) Electrodeposición: es un procedimiento interesante en el cual se coloca al soporte en la proximidad de uno de los electrodos sumergidos en la solución enzimática. Al pasar la corriente, la enzima migra hacia la matriz y se deposita en su superficie. Este método es bastante simple.

iii) Técnica de cargado en columna: es la más empleada para uso comercial. Existen dos métodos que se ubican en esta categoría. Uno es el "cargado por flujo comprimido" en el cual se hace circular la enzima a través de la columna, desde su parte superior hacia la base. El proceso puede llevarse a cabo en una columna con camisa de agua para controlar la temperatura. También es posible adosar una bomba para mantener la velocidad de flujo.

El segundo procedimiento utiliza una columna con cama fluída. En él la enzima se hace circular por la columna desde la base hacia la parte superior y las partículas se mantienen en constante movimiento debido al flujo del fluído. También en este caso pueden controlarse la temperatura y la velocidad de flujo.

Estos métodos ofrecen la ventaja de que no sólo son útiles para cargar la columna con enzima, sino también para lavar la proteína una vez inmovilizada, dentro de la misma columna.

iv) Proceso de mezclado o agitación en batch: es la técnica más comúnmente usada en las preparaciones de laboratorio.



aire u oxígeno).

### II.2.7. Inmovilización por formación de puentes inorgánicos

Esta técnica no puede considerarse como un simple proceso de adsorción; sin embargo la discutiremos en esta sección ya que muchos elementos involucrados en ella, son similares a aquellos que emplean poro de titanio controlado y poro de cerámica controlado.

Emery y col. (1972) y Barker y col. (1971) han desarrollado este procedimiento, que emplea primariamente sales de metales de transición, para unir la enzima al soporte. Los soportes comunmente utilizados para estos fines son: celulosa, nylon, vidrio de borosilicato, vidrio de soda y papel de filtro.  $TiCl_4$ ,  $TiCl_3$ ,  $SnCl_4$ ,  $SnCl_2$ ,  $ZrCl_4$ ,  $VCl_3$ ,  $FeCl_2$ , y  $FeCl_3$  son las sales que se usan para formar la unión metálica entre el soporte y la enzima.

El soporte activado se prepara poniendo en contacto la matriz sólida con una solución de la sal adecuada, durante 5-10 minutos; luego, el complejo se filtra y/o se seca a  $45^\circ C$ . El sólido seco se lava con buffer para remover el exceso de sal que no reaccionó. A continuación se procede a la inmovilización de la enzima mediante la aplicación de las técnicas habituales.

## II.3. Técnicas de atrapamiento de enzimas en geles

### II.3.1. Consideraciones generales

Se han desarrollado una amplia variedad de técnicas para inmovilizar enzimas por atrapamiento.

Como ya se mencionó, este tipo de procedimientos puede dividirse en dos categorías: aquellas técnicas en las cuales el proceso de polimerización causa el atrapamiento de la enzima y aquellas donde la proteína se introduce en un polímero preformado y las reacciones que tienen lugar producen un entrecruzamiento con la matriz.

Para comprender las ventajas que presentan estos sistemas enzimáticos insolubilizados, deben considerarse los siguientes aspectos: i) cantidad de enzima; ii) comportamiento cinético; iii) estabilidad y iv) características del reactor. Aun-

que estos puntos están estrechamente relacionados, pueden discutirse en un sentido general, en forma separada.

i) Cantidad de enzima: no sólo se refiere a la cantidad de enzima atrapada, sino que también tiene en cuenta la fracción de enzima que se pierde por fuga o desnaturalización, durante el proceso de inmovilización. En consecuencia, la preparación puede tener una actividad específica por unidad de peso, menor que la esperada. Además, en algunos casos, la cantidad de enzima que puede atraparse, está limitada por la solubilidad de la misma en la mezcla de reacción.

En general, la eficiencia de atrapamiento es relativamente baja, estando en el orden de 10-100 mg de proteína / gr de gel.

ii) Comportamiento cinético: otros factores que pueden determinar la actividad específica de la enzima insolubilizada incluyen la diferente partición del sustrato entre la fase inmovilizada y el sobrenadante líquido, la lenta difusión del sustrato hacia el sitio activo, los efectos del micromedio tales como el pH local o la fuerza iónica dentro de la matriz y los efectos de partición y difusión de los inhibidores sobre la actividad enzimática. Todos estos factores se agrupan aquí bajo el término "comportamiento cinético".

iii) Estabilidad: la estabilidad de la enzima insolubilizada en lo referente a su uso o almacenamiento, es quizás uno de los parámetros más importantes en la estimación del costo de un proceso de inmovilización. En el caso de enzimas inmovilizadas por atrapamiento, el principal problema que se presenta es que la proteína puede escapar continuamente de la matriz, reduciendo así gradualmente la actividad específica de la preparación y contaminando probablemente el producto,

iv) Características del reactor: este aspecto está estrechamente relacionado con los anteriores en el sentido de que la actividad específica, el comportamiento cinético y la estabilidad son factores cuantitativos que deben considerarse con el fin de establecer las características óptimas del reactor. Además, las propiedades del material soporte determinarán la conveniencia para su uso en un dado reactor; por ejemplo, un material blando o compresible podría originar una presión de goteo demasiado grande en un reactor tubular, obstruyéndolo.

Por otra parte, las enzimas inmovilizadas por atrapamiento, son menos susceptibles al ataque bacteriano y además pueden inmovilizarse fácilmente sistemas multienzimáticos por co-

atrapamiento; también es posible atrapar células enteras.

De todo lo expuesto, resulta evidente que deben considerarse un gran número de factores cuando se realiza un proceso de atrapamiento. No puede esperarse que un procedimiento dado sea perfecto y lógicamente la elección de uno en particular requerirá de un cuidadoso análisis de sus ventajas y desventajas.

Hasta hace poco tiempo, la mayoría de las enzimas se atrapaban en geles de poliacrilamida. Estos geles son demasiado débiles en un sentido mecánico y tienen una red abierta que permite la fuga de la enzima, por lo cual no son muy recomendables. No obstante, las enzimas pueden atraparse mediante una amplia variedad de caminos, obteniéndose preparaciones cuyas propiedades son convenientes según cada uso particular.

### II.3.2. Atrapamiento en geles por polimerización

Para lograr el atrapamiento de una enzima se puede proceder de dos formas diferentes: i) formando una malla polimérica entrecruzada alrededor de la molécula de enzima o ii) colocando una enzima en el interior de un material polimérico, entrecruzando luego las cadenas del polímero.

Bernfeld y Wan (1963) fueron los pioneros en el empleo de este tipo de técnicas. Estos autores disolvieron una o más enzimas (tripsina, ribonucleasa,  $\beta$ -amilasa) en una solución acuosa de N,N'-metilenbisacrilamida (Bis) y luego realizaron la polimerización por radicales libres del monómero entrecruzado, a bajas temperaturas. La elección de este monómero particular es fácil de comprender ya que la preparación de geles hidratados para electroforesis, empleando acrilamida y Bis, es un procedimiento común en el laboratorio. Otros autores, que se ocuparon también del estudio de estas técnicas utilizaron exclusivamente estos dos monómeros (Mosbach y Mosbach, 1966; Wieland y col., 1966; Hicks y Updike, 1974).

Una de las desventajas de la aplicación de estas preparaciones es que los geles de poliacrilamida entrecruzados con Bis, tienen un elevadísimo contenido de agua (80-95%) y en consecuencia son estructuralmente débiles, permitiendo la fuga de algunas enzimas. No obstante, se ha avanzado mucho en el conocimiento de los procesos de atrapamiento de enzimas en geles de poliacrilamida y los resultados pueden aplicarse también a

los casos en que se usan otras preparaciones monómero-polímero, más convenientes.

Hasta el momento, uno de los monómeros que se ha estudiado exhaustivamente, además de los ya mencionados, es el 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) entrecruzado con etilenglicol dimetacrilato (EGDMA).

### II.3.3. Solución polimerizante

Los agentes necesarios para llevar a cabo un proceso de atrapamiento en geles por polimerización son: el monómero, el agente de entrecruzamiento, el iniciador, la enzima y la solución acuosa reguladora (buffer).

Si se usa un monómero polifuncional, como el Bis o EGDMA, el monómero y el agente de entrecruzamiento, son iguales. Algunas preparaciones incluyen además, un sustrato de la enzima u otro compuesto (como por ejemplo la albúmina) para proteger a la misma.

Las polimerizaciones se realizan generalmente en ausencia de oxígeno y a bajas temperaturas (0-25°C) con el fin de evitar la desnaturalización térmica.

Las polimerizaciones involucrando grupos vinilos son exotérmicas y por lo tanto deben llevarse a cabo en forma lenta o muy bien termostatizada, para minimizar el aumento de temperatura.

Cuando finaliza la polimerización, que puede llevar desde 30 minutos a varias horas, el gel hidratado contiene la enzima atrapada, posiblemente enzima no atrapada y también iniciador y monómero no utilizados. La práctica común consiste en cortar el gel en pequeños trozos y lavarlo con un buffer.

Alguno o todos los componentes de la mezcla de polimerización pueden producir la desnaturalización enzimática, mientras está ocurriendo la reacción. Debido a ello, la composición y proporciones relativas de éstos, deben determinarse cuidadosamente.

Se podría esperar que los radicales libres que inician la polimerización, ataquen y desnaturalicen a la enzima. Afortunadamente, este proceso no parece tener lugar, debido probablemente a que la concentración de radicales libres, raras veces es mayor que  $10^{-6}$  M. El componente de mayor cuidado en cuan

to a su efecto sobre la actividad enzimática es, en general, el monómero mismo, razón por la cual se debe tratar de mantener su concentración lo más baja posible. Sin embargo, la cantidad de enzima atrapada y la resistencia del gel, declinan a medida que disminuye la concentración del monómero en la mezcla de atrapamiento. Como consecuencia de estos dos efectos opuestos, la actividad específica de la enzima, pasa por un máximo. Generalmente, la concentración del monómero que se emplea, es de 30-60% de la mezcla de polimerización. Por razones similares, también debe seleccionarse la concentración óptima del agente de entrecruzamiento, la cual normalmente oscila alrededor de un 5% (Figura II.4.)

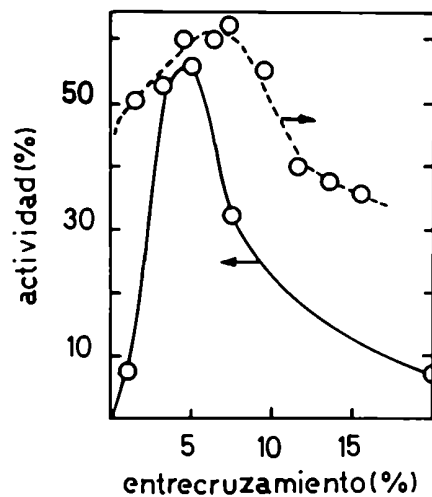


Figura II.4.: Efecto del contenido de agente de entrecruzamiento sobre la actividad de la enzima inmovilizada.  
 (---) glucosa oxidasa en poli(2-hidroxietil metacrilato) con etilenglicol dimetacrilato (resultados no publicados),  
 (—) colinesterasa en poli(acrilamida) con N,N'-metilenbisacrilamida (Degani y Miron, 1970).

En cuanto a la elección del iniciador y su concentración óptima, no puede hablarse en términos generales. Los sistemas llamados redox, tales como el persulfato de potasio y el tetra metiletilendiamina (TEMED), son útiles para trabajar a bajas temperaturas y aparentemente no perjudican a las enzimas, en las concentraciones necesarias para iniciar la polimerización. La iniciación fotoquímica también es practicable a bajas temperaturas.

La cantidad de enzima a disolver en la mezcla de reacción está limitada por su solubilidad. Debido a que dicha mezcla contiene generalmente entre 20 y 50% de monómero, la solubilidad enzimática es menor que en el buffer puro. Esta limitación en la carga máxima que puede emplearse es la más seria en los procesos comerciales. Sin embargo, en aquellos casos en que no es necesario trabajar con grandes cantidades de enzima, las técnicas de atrapamiento en geles son métodos de inmovilización muy sencillos, factibles de llevar a cabo con un esfuerzo preparativo mínimo.

#### II.3.4. Suspensiones polimerizantes

Además de efectuarse polimerizaciones en solución acuosa, como se describió anteriormente, también pueden realizarse en una suspensión polimerizante. En este último caso, la fase acuosa conteniendo el monómero, el iniciador y la enzima, se dispersa en un líquido hidrofóbico. El hidrogel resultante está formado por partículas esféricas cuyo tamaño puede controlarse, en parte, por las condiciones de la reacción de polimerización. La ventaja que ofrecen estas partículas esféricas sobre las irregulares que se forman en solución, es que son más recomendables para el empaquetamiento, en el caso en que se trabaja con reactores tubulares.

La dificultad que se presenta con estas suspensiones polimerizantes, es que deben emplearse detergentes para estabilizar la suspensión y éstos pueden producir la desnaturalización de algunas enzimas.

#### II.3.5. Atrapamiento en geles por entrecruzamiento de polímeros

Cuando se dispersa una enzima en un polímero lineal o en



una solución del mismo y luego se entrecruza este polímero para formar una red insoluble, es esperable que la enzima quede atrapada. Se conocen por lo menos cuatro preparaciones diferentes de este tipo.

Brown y colaboradores (Brown y col., 1968 y Pennington y col., 1968a y b) llevaron a cabo el entrecruzamiento de poli-dimetilsiloxano con octoato de estaño y formaron membranas de siliconas para inmovilizar distintas enzimas. Es difícil establecer el éxito o no de estas experiencias ya que los autores no han publicado todos los datos necesarios para su análisis. Sin embargo, Guilbault y Das (1970) observaron que las condiciones de inmovilización eran por ejemplo demasiado rigurosas para la colinesterasa, dado que en ese caso, la enzima se había inactivado un 80%. Teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico de esta preparación, es probable que la baja actividad resultante fuera debida a una permeabilidad restringida por parte de la membrana, hacia el sustrato que es soluble en agua.

El grupo de Guilbault (Bauman y col., 1965 y Guilbault y Kramer, 1965), ha inmovilizado también una variedad de enzimas en almidón. Estos autores prepararon el gel disolviendo la enzima en una solución de almidón caliente y una vez que el gel estaba frío, lo secaron sobre una almohadilla de poliuretano.

Maeda y col. (1973) emplearon técnicas de radiación  $\gamma$  y de haces de electrones para entrecruzar un polivinil alcohol en solución acuosa conteniendo glucoamilasa o invertasa. En el caso de la radiación  $\gamma$ , no se observaba la fuga de proteína a partir del gel pero se recuperaba muy poca actividad enzimática. La irradiación con haces electrónicos resultó aparentemente más satisfactoria ya que se recuperaba un 50% de la actividad sin que se observara tampoco fuga de proteína. En este tipo de experiencias, el entrecruzamiento se produce debido a que la elevada energía de radiación, da lugar a la formación de radicales libres sobre las cadenas poliméricas, llevando al acoplamiento de unas con otras. Se requiere que la intensidad de la radiación sea lo suficientemente grande como para iniciar la polimerización pero sin causar daño enzimático.

Aunque existe un amplio conocimiento acerca de la formación de geles por mezclado de iones polivalentes con polielectrolitos (Wall y Drenan, 1951; Ikegami e Imai, 1962 y Huang y Jarvis, 1973) se han publicado pocos trabajos que se basan en el uso de esta técnica para la inmovilización de enzimas, en-

tre ellos, podemos citar los de Horvath y Sovak, (1973) y Horvath, (1974).

#### II.3.6. Interpenetración de redes

El grupo de Stegemann (Dinish y col., 1973) ha desarrollado una novedosa técnica de atrapamiento en geles. Ellos aislaron una esterasa de papas por electroforesis en gel de poliacrilamida. Luego cortaron las porciones de gel conteniendo la enzima en discos de 3 mm y a continuación los embebieron en otra mezcla de reacción polimerizante, compuesta por 5-7% de acrilamida y niveles variables de Bis. La concentración óptima de Bis resultó ser del 5%. Esta técnica es de particular valor para la inmovilización de pequeñas cantidades de enzima altamente purificada. La interpenetración de las dos redes de poliacrilamida formadas separadamente, resulta en la producción de una matriz estrechamente cerrada que previene eficazmente la fuga de la proteína.

Una variante de este procedimiento consiste en cambiar la naturaleza del monómero que se emplea para la formación de la segunda red, pudiéndose establecer así un control sobre las propiedades físico-químicas de la matriz.

#### II.3.7. Copolimerización

La finalidad del empleo de más de un monómero y en consecuencia, la introducción de una amplia variedad de grupos funcionales, consiste en tratar de lograr una óptima estructura del gel. En este sentido, el investigador espera ejercer algún tipo de control sobre los efectos del micromedio del gel, sobre la enzima atrapada.

Sin embargo, es importante aclarar que aunque la copolimerización ofrece la oportunidad de controlar el micromedio, la reacción puede ocurrir de un modo tal que rinda un polímero de composición heterogénea. Esta heterogeneidad puede resultar en una separación de fases, originando poros en el gel y aumentando así la probabilidad de fuga proteica.

## II.4. Técnicas de acople covalente

### II.4.1. Consideraciones generales

Como ya se mencionó, las proteínas pueden unirse covalentemente a matrices insolubles en agua, a través de grupos funcionales no involucrados en la actividad biológica. Existen dos técnicas diferentes para lograr dicho acople. Una de ellas consiste en activar el soporte para luego hacerlo reaccionar con los grupos de la proteína. En la otra, se emplea un reactivo acoplante para unir la proteína a la matriz. Una tercera posibilidad sería activar la molécula proteica para su reacción posterior con el soporte.

En esta sección discutiremos acerca de los grupos proteicos disponibles para el acople covalente a diferentes soportes y de algunos de los procedimientos más comunmente utilizados.

### II.4.2. Condiciones para el acople

Luego de la aplicación de cualquiera de las técnicas de unión covalente, es importante que la proteína mantenga su estado conformacional activo. Las moléculas proteicas (enzimas, carriers, receptores, etc.) existen en su forma activa sólo en un pequeño número de conformaciones. La conformación nativa está determinada por la secuencia primaria de aminoácidos. Las uniones involucradas en el mantenimiento de las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria son no covalentes, con excepción de las uniones disulfuro. Estas interacciones no covalentes ocurren a través de uniones salinas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas. Si bien cada una de estas uniones son lábiles individualmente, la suma de un gran número de ellas, conduce a la estabilidad de la estructura final de la proteína. No obstante, la labilidad de las mismas limita las condiciones bajo las cuales una proteína es capaz de mantener su conformación activa. Es por ello que normalmente, la temperatura no debe exceder los 35°C y no es posible emplear soluciones cuya acidez sea superior a pH 3 ó 4, o cuya basicidad supere a la correspondiente a pH 9 ó 10.

Sin embargo, existen excepciones a estas reglas debido a que ciertas proteínas pueden desnaturalizarse reversiblemente

te. De este modo, es factible llevar a cabo el procedimiento de acople bajo condiciones tales que las cadenas polipeptídicas de la proteína estén abiertas y luego, por eliminación de los agentes desnaturizantes, la proteína recupere su conformación normal activa.

#### II.4.3. Grupos proteicos disponibles para la unión covalente

Consideraremos ahora la naturaleza química de los residuos aminoacídicos de las proteínas, que potencialmente pueden participar en una reacción covalente con el soporte.

En la Tabla II.1. se describen once aminoácidos cuyos grupos funcionales son, en principio, suficientemente reactivos como para intervenir en el acople covalente a una matriz. No se encuentran en esta lista los aminoácidos que poseen uniones amida (glutamina y asparagina) y los que tienen residuos hidrocarbonados (glicina, alanina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina y prolina). De los aminoácidos señalados en la Tabla II.1., se sabe que, ni el grupo tioéster de la metionina, ni el hidroxilo de la treonina, están implicados en la unión covalente a un soporte insoluble.

Existen otros dos factores que deben considerarse como posibles determinantes acerca de cuales grupos pueden o no estar involucrados en el acople covalente. Uno de ellos es la concentración relativa de los aminoácidos en la molécula proteica. En la Tabla II.2. se muestra la composición promedio de aminoácidos con residuos activos, de un número dado de proteínas (Dayhoff y Hunt, 1972). Si bien es cierto que cada proteína individual tendrá su composición característica, los valores aquí descritos, pueden emplearse para obtener algunas conclusiones generales en lo referente a los grupos implicados en la unión covalente.

También existe una diferencia en cuanto a la naturaleza hidrofóbica de los distintos residuos aminoacídicos. Un aumento en la hidrofobicidad tendería a incrementar la posibilidad de que un residuo dado se encuentre en el interior de la proteína. En la Tabla II.3. (Tanford, 1962) se proporciona una lista de los cambios en la energía libre ( $\Delta G$  de transferencia) para la transferencia de un residuo desde el agua a etanol 100% (25°), que es la base energética para la internalización de re

Tabla II.1.: Residuos reactivos de las proteínas

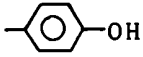
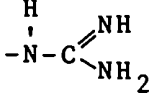

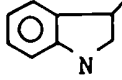
$-\text{NH}_2$	$\epsilon$ -amino de lisina (Lis) y grupo amino N-terminal
$-\text{SH}$	Sulfhidrilo de cisteína (Cis)
$-\text{COOH}$	Carboxilo de aspartato (Asp) y glutamato (Glu) y grupo carboxilo C-terminal
	Fenólico de tirosina (Tir)
	Guanidino de arginina (Arg)
	Imidazol de histidina (His)
$-\text{S}-\text{S}-$	Disulfuro de cistina
	Indol de triptofano (Trp)
$\text{CH}_3-\text{S}-$	Tioéter de metionina (Met)
$-\text{CH}_2-\text{OH}$	Hidroxilo de serina (Ser ) y treonina (Thr)

Tabla II.2.: Composición  
promedio de  
aminoácidos  
con residuos  
reactivos

RESIDUO	%
Ser	7,8
Lis	7
Thr	6,5
Asp	4,8
Glu	4,8
Arg	3,8
Tir	3,4
Cis	3,4
His	2,2
Met	1,6
Trp	1,2

Dayhoff, M. y Hunt, L.  
T. (1972).

siduos. Los residuos reactivos cuyos  $\Delta G$  de transferencia son valores positivos, no se presentan en la tabla. Cuanto más negativo es el  $\Delta G$ , más hidrofóbico es el residuo y por lo tanto existe mayor probabilidad de que se encuentre en el interior de la proteína. Así, es muy posible que los residuos tirosina, metionina, treonina y serina estén más internalizados que otros residuos, disminuyendo de este modo su capacidad para reaccionar.

Tabla II.3.:  $\Delta G$  de transferencia

RESIDUO	$\Delta G$
Tir	- 2,87
Met	- 1,30
Thr	- 0,44
Ser	- 0,04

Tanford, C. (1962)

#### II.4.4. Reactividad de los residuos aminoacídicos

Es imposible comparar exactamente la reactividad de los residuos aminoacídicos, sin especificar la reacción particular en la que intervienen y además, las condiciones de dicha reacción. Sin embargo, se puede comparar el número de reacciones en las que puede participar cada residuo. Means y Feeney (1971)

incluyeron en una lista los números de reacciones posibles que conducían a la modificación de los siguientes residuos: cisteína: 31; lisina: 27; tirosina: 16; histidina: 13; metionina: 7; triptofano: 7; arginina: 6; glutámico y aspártico: 4 y serina y treonina: 0.

La mayor parte de las reacciones mencionadas en esta lista, pueden clasificarse como reacciones de tipo carbonilo con los grupos nucleofílicos de la proteína,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$  y  $-\text{OH}$ . Hay muchos factores de fundamental importancia que son determinantes de la velocidad de las reacciones nucleofílicas. Debido a que las especies reactivas son:  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{S}^-$  y  $-\text{O}^-$ , cuando se trabaja a pH's de aproximadamente 9, la concentración de grupos  $-\text{NH}_2$  será la más elevada y por lo tanto tendrán mayor probabilidad de reaccionar. La reactividad nucleofílica del anión  $-\text{S}^-$  es uno o dos órdenes de magnitud mayor que la correspondiente a los compuestos normales de N y O de basicidad comparable. Sin embargo, la estabilidad de los ésteres que forman estos grupos en las reacciones nucleofílicas varía ampliamente. Los tioésteres son mucho menos estables que los ésteres de oxígeno y estos últimos, a su vez, son menos estables que las aminas sustituidas.

Si se consideran los factores mencionados (concentración relativa, hidrofobicidad y reactividad) se podría decir que aparentemente, la lisina es el residuo que posee mayor probabilidad de acople, seguida por la cisteína, tirosina, histidina, aspártico-glutámico, arginina, triptofano, serina-treonina y metionina.

#### II.4.5. Sitio activo

Además de los factores mencionados anteriormente, debe tenerse en cuenta que la reactividad de un grupo proteico dado, depende de la localización y del medio en el cual el residuo aminoacídico está ubicado. Debido a que las proteínas son moléculas grandes, muchos sitios pueden estar parcialmente incluidos en su estructura y por lo tanto ser relativamente inertes; en cambio, aquellos residuos que estén expuestos al solvente pueden ser más altamente reactivos.

Se sabe desde hace tiempo, que los residuos aminoacídicos de los sitios activos tienen reactividades y propiedades



particulares. Se ha señalado que la conformación proteica así como también la secuencia primaria de aminoácidos son tales, que determinan que los residuos comprometidos en el sitio activo tengan una distribución tridimensional de cargas y un ambiente tan precisos, que la reactividad de estos grupos es muy especial. Así, sólo el residuo serina del sitio activo de ciertas esterasas, es capaz de reaccionar con diisopropilfluorofosfato; los otros grupos serina presentes en la molécula son inactivos frente a este compuesto.

Se sabe además, que los valores de pK de los grupos ionizables del sitio activo son bastante diferentes a los correspondientes a los mismos grupos, presentes en otra parte de la molécula.

Así, dada la reactividad incrementada de estos residuos, cabría preguntarse por qué no son ellos los primeros en reaccionar con el soporte, produciendo entonces proteínas inmovilizadas pero inactivas. Es probable que esto ocurra en algún grado. Si el sitio activo está sobre la superficie de la proteína, la posibilidad de reacción dependerá de la relación entre el área del mismo y la superficie total de la molécula. Debido a que la reacción de acople normalmente está favorecida, es decir, que la interacción entre un residuo reactivo de la proteína y un grupo de la matriz activada, conducirá al acople, el sitio activo no está especialmente favorecido para la reacción. Los sitios activos de las enzimas se encuentran comunmente localizados en un hueco o depresión dentro de la estructura proteica. La entrada al sitio activo y el acceso a los grupos allí presentes dependerá entonces del tamaño, estereoquímica y carga característicos del reactivo. Cuando se produce la inmovilización de los grupos activos sobre un soporte sólido, la geometría que adopta el sistema puede ser un factor de fundamental importancia para el mantenimiento de la actividad de los sitios activos. En aquellos casos en los que la modificación del sitio activo conduce a la pérdida de actividad durante el proceso de inmovilización, es posible que el agregado de un sustrato o un inhibidor competitivo a la mezcla de acople, proteja al sitio activo de la inactivación.

#### II.4.6. Determinación del grupo involucrado en la unión

Para muchos propósitos, no es necesario conocer cuales son los grupos proteicos que están formando parte de la unión covalente. Sin embargo, en algunas circunstancias es importante saber cuántas y cuáles uniones de una molécula proteica están involucradas en el proceso de insolubilización y si los sitios activos y/o regulatorios han sido modificados. Los estudios llevados a cabo en este sentido, pueden comprender ensayos en los cuales las preguntas se responderán en base al comportamiento de las enzimas en micromedios particulares o al comportamiento de las subunidades de la misma.

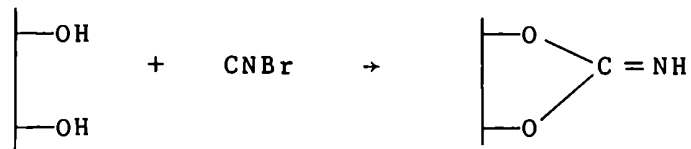
Existen relativamente pocas publicaciones que encaran este problema aunque se han empleado varios métodos para la determinación de los grupos proteicos involucrados. Uno de ellos consiste en llevar a cabo una hidrólisis completa con HCl seguida por un análisis de aminoácidos tanto para la proteína original como para la inmovilizada; en este caso, los residuos involucrados en la unión covalente se deducen en base a la pérdida de residuos aminoacídicos entre ambas determinaciones. Este método tiene la desventaja de que el HCl puede clivar la unión covalente.

Un procedimiento alternativo involucra el uso de métodos analíticos para residuos aminoacídicos específicos. Por ejemplo, los grupos cisteinil se miden fácilmente con ditionitrobenzoato; así, los grupos -SH de la proteína pueden determinarse antes y después de la reacción de acople.

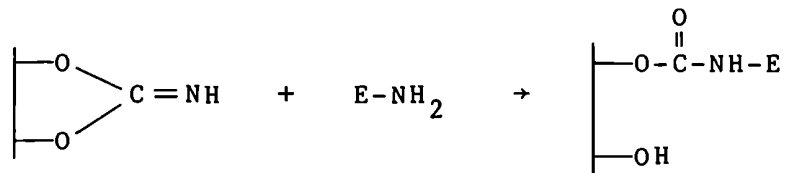
#### II.4.7. Reacciones específicas de acople

##### i) Activación de la Sepharosa con bromuro de cianógeno

Uno de los métodos más comunmente usados para el acople de proteínas a soportes es el de Axén y col. (1967). La reacción de activación de un polisacárido (Sepharosa) con bromuro de cianógeno (CNBr), conduce a la formación de un imidocarbonato de la Sepharosa:



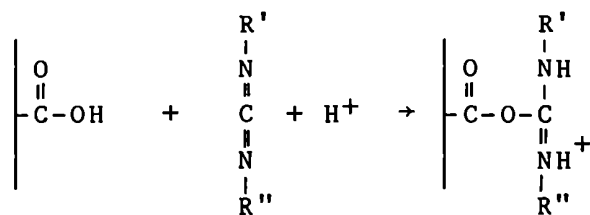
La Sepharosa así activada se acopla luego con un grupo amino de la proteína para producir el derivado inmovilizado:

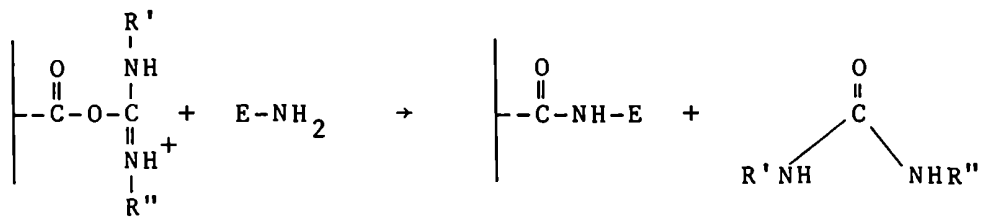


Aparentemente, el acople de la proteína ocurre principalmente a través de los grupos  $\epsilon$ -amino de la lisina y del grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido N-terminal.

## ii) Carbodiimida

La carbodiimida se ha empleado con buenos resultados para la síntesis química de muchos compuestos biológicos. Se ha usado extensivamente en el campo de la bioquímica para la síntesis química de nucleótidos, coenzimas y ácidos nucleicos. Las reacciones ocurren con facilidad a temperatura ambiente y pH neutro y poseen amplia especificidad. La unión de una proteína a un polímero carboxílico tiene lugar de la siguiente manera:

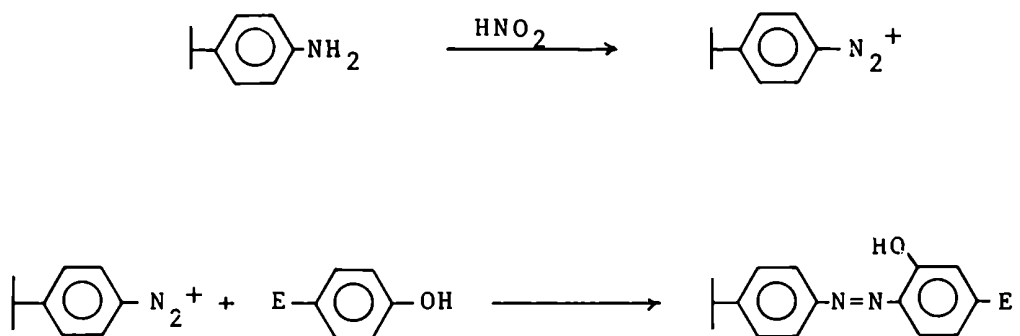




Si el soporte contiene aminas o grupos amino sustituidos, el a cople en presencia de carbodiimidas ocurrirá a través del grupo carboxilo de la protefna. Es de esperar que las carbodiimidas solubles en agua, interactúen con los residuos sulfhidrilo y tirosilo.

### iii) Unión a través de sales de diazonio

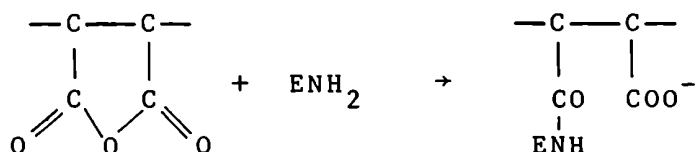
Los compuestos de diazonio reaccionan muy favorablemente con los residuos lisil, tirosil e histidinil y también con los grupos cisteinil, arginil y triptofanil. Cuando se emplea este tipo de técnicas para la insolubilización de enzimas, se procede del siguiente modo: se acopla una amina aromática sustituida a un polímero y luego se diazota la parte amino usando ácido y nitrito de sodio. Luego se agrega la enzima para que ocurra el acople:



Goldman y col.(1971) encontraron que en la inmovilización de varias enzimas proteolíticas, estaban involucrados en la unión grupos tirosil, lisil y arginil.

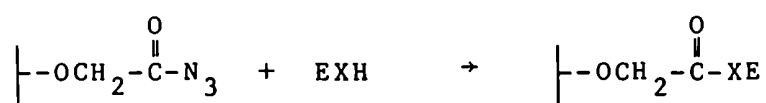
iv) Empleo de soportes conteniendo grupos anhídrido

Los anhídridos reaccionan en forma extremadamente rápida con los residuos lisil, cisteinil, tirosil e histidil. En particular, la reacción con cada uno de los tres últimos grupos es espontánea o fácilmente reversible. Por otra parte, los N-carboxil anhídridos son específicos para los residuos lisina y se han empleado para inmovilizar enzimas mediante un proceso de copolimerización:



v) Unión a materiales conteniendo acilazida activada

En este caso, se procede en primer término a activar la carboximetilcelulosa por esterificación, produciéndose el metiléster correspondiente; este proceso es seguido por una hidrazinólisis para formar la hidrazida. La hidrazida se hace reaccionar con ácido nitroso, obteniéndose así la acilazida. Esta última puede reaccionar posteriormente con grupos nucleofílicos, sulfhidrilos, aminos o hidroxilos, para formar uniones tioéster, amida o éster:



Este método es uno de los más antiguos y el más frecuentemente utilizado para el acople covalente de proteínas a soportes sólidos.

vi) Otros métodos

La celulosa ha sido activada con derivados mono y diclorados de cianógeno. En este caso, la reacción puede tener lu-

gar con los grupos amino de las proteínas.

Además, se han utilizado soportes conteniendo isotiocianatos para el acople covalente de proteínas (Zaborsky, 1973).

II.5. Referencias

- Axén, R.; Porath, J. & Ernback, S. (1967), *Nature (London)* 214, 1302.
- Barker, S.A.; Emery, A.N. & Novais, J.M. (1971), *Process Biochem.* 5, 11.
- Bauman, E.K.; Goodson, L.H.; Guilbault, G.G. & Kramer, D.N. (1965), *Anal. Chem.* 37, 1378.
- Bernath, F.R. & Wieth, W.R. (1974), "Immobilized Enzymes in Food and Microbial Processes" (Olson, A.C. & Cooney, C.L., eds.), Plenum, New York, p. 157.
- Bernfeld, P. & Wan, J. (1963), *Science* 142, 678.
- Brown, H.D.; Patel, A.B. & Chattopadhyay, S.K. (1968), *J. Bio med. Mater. Res.* 2, 231.
- Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; Mori, T. & Matuo, Y. (1972), "Fermentation Technology Today" (Terni, G., ed.), Society of Fermentation Technology, Yamada-Kami, Suita-shi, Osaka, Japan, p. 383.
- Dayhoff, M. & Hunt, L.T. (1972), "Atlas of Protein Sequence and Structure" National Biomedical Res. Fdn. Washington, D.C.
- Degani, Y. & Miron, T. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 212, 362.
- Dinish, K.N.; Shivaram, K.N. & Stegemann, H. (1973), *Fresenius' Z Anal. Chem.* 263, 27.
- Emery, A.N.; Hough, J.S.; Novais, J.M. & Lyons, T.P. (1972), *Chem. Eng. (London)*, p. 71.
- Goldman, R.; Goldstein, L. & Katchalski, E. (1971), "Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports" (Stark, G.R., ed.), Academic Press, New York, p. 1.
- Guilbault, G.G. & Das, J. (1970), *Anal. Biochem.* 33, 341.
- Guilbault, G.G. & Kramer, D.N. (1965), *Anal. Chem.* 37, 1675.
- Hicks, G.P. & Updike, S.J. (1966), *Anal. Chem.* 38, 762; también U.S. Patent N° 3.788.950 (1974).
- Holt, P. & Bowcott, J. (1954), *Biochem. J.* 57, 471.
- Horvath, C. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 358, 164.
- Horvath, C. & Sovak, M. (1973), *Biochim. Biophys. Acta* 298, 850.
- Huang, R.Y.M. & Jarvis, N.R. (1973), *J. Polym. Sci. Polym. Symp.* 41, 117.
- Ikegami, A. & Imai, N. (1962), *J. Polym. Sci.* 56, 133.
- Maeda, H.; Suzuki, H. & Yamauchi, A. (1973), *Biotechnol. Bioeng.* 15, 607; 827.
- Means, G. & Feeney, R.E. (1971), "Chemical Modification of Proteins", Holden-day, San Francisco, California.

- Messing, R.A. (1969), J. Am. Chem. Soc. 91, 2370.
- Messing, R.A. (1970), Enzymologia 38, 370.
- Messing, R.A. (1974a), Biotechnol. Bioeng. 16, 1419.
- Messing, R.A. (1974b), Biotechnol. Bioeng. 16, 897.
- Messing, R.A. (1975), "Immobilized Enzymes for Industrial Reactors" (Messing, R.A., ed.), Academic Press, New York, pag. 95.
- Mosbach, K. & Mosbach, R. (1966), Acta Chem. Scand. 20, 2807.
- Pennington, S.N.; Brown, H.D.; Patel, A.B. y Knowles, C.O. (1968a), Biochim. Biophys. Acta 167, 479.
- Pennington, S.N.; Brown, H.D.; Patel, A.B. & Chattopadhyay, S.K. (1968b), J. Biomed. Mater. Res. 2, 443.
- Stinson, H.R. (1969), J. Biomed. Mater. Res. 3, 583.
- Tanford, C. (1962), J. Am. Chem. Soc. 84, 4240.
- Venkatasubramanian, K.; Sani, R. & Wieth, W.R. (1974), J. Fermentn. Technol. 52, 268.
- Wall, F.T. & Drenan, J.W. (1951), J. Polym. Sci. 7, 83.
- Weldes, H. (1967), Adhes. Age 10, 32.
- Wieland, T.; Determann, H. & Buennig, K. (1966), Z. Naturforsch. Teil. B. 21, 1003.
- Zaborsky, O.R. (1973), "Immobilized Enzymes", Chem. Rubber Publ. Co; Cleveland, Ohio.



## CAPITULO III

### CARACTERISTICAS DE LOS SOPORTES

---

	Página
III.1. Generalidades	210
III.2. Geles de agar y agarosa	211
III.2.1. Propiedades de los geles de agar y agarosa	211
III.3. Referencias	216

### III. CARACTERISTICAS DE LOS SOPORTES

#### III.1. Generalidades

Cuando se seleccionan soportes para ser utilizados en procedimientos de inmovilización de enzimas, deben considerarse los siguientes factores:

i) Sus propiedades mecánicas, tales como rigidez y durabilidad, cuando el gel se somete a agitación mecánica, compresión, etc.

ii) Su forma física ( gránulos, láminas, etc.).

iii) Su resistencia al ataque químico o microbiano.

iv) La hidrofiliidad, manifestada como la tendencia a incorporar agua a su estructura.

v) La posibilidad de obtención de derivados del mismo, que cumplan las condiciones i-iv.

vi) Precio y disponibilidad.

La experiencia indica que la hidrofiliidad es un factor de gran importancia para la preservación de las enzimas en un estado de alta actividad, después de su inmovilización en un soporte sólido. Este factor ubica a los geles hidrofílicos en un lugar de privilegio entre las distintas matrices empleadas para la insolubilización enzimática. Entre los soportes hidrofílicos sintéticos, la poliacrilamida ácida entrecruzada ocupa la posición más importante, en tanto que en la categoría de matrices hidroxílicas son más convenientes los polisacáridos y algunos de sus derivados. Dentro de la última categoría, sólo trataremos en esta sección los geles de agar y dextrano; sin embargo, las técnicas de inmovilización descritas aquí no se restringen a este tipo de matrices, sino que pueden emplearse independientemente de la forma física de los soportes.

Los soportes polisacáridos más importantes son: celulosa, dextrano, almidón y agar. Desde un punto de vista puramente económico, la celulosa y el almidón son los materiales de partida más atractivos para la inmovilización. Sin embargo, poseen ciertas desventajas dentro de las cuales las más serias son la de poseer una estructura macroporosa poco conveniente y la de ser susceptibles al ataque microbiano.

El dextrano en su forma entrecruzada o Sephadex, es superior bajo ciertas condiciones a la celulosa y al almidón ( Porath y Flodin, 1959 y Flodin, 1962) y las enzimas fijadas a

Sephadex exhiben actividades relativas mayores a las unidas a celulosa (Axén y col., 1967). Aparentemente, el micromedio presente en el interior de los geles de Sephadex es menos nocivo para la actividad catalítica que el correspondiente a las regiones microcristalinas de las fibras de celulosa. El almidón es más fácilmente atacable por los microorganismos, que el Sephadex.

Por otra parte, se ha encontrado que las matrices de agarosa son muy convenientes para la preparación de adsorbentes bioespecíficos y que además la elección de soportes de agarosa parcialmente purificada, para aplicaciones técnicas, resulta óptima por razones económicas.

En las siguientes secciones nos detendremos específicamente en el estudio de las propiedades de los geles de agar, agarosa y Sephadex y de los métodos de inmovilización de enzimas a dichos geles, por ser este tema el que concierne de manera particular, al desarrollo de nuestro trabajo.

### III.2. Geles de agar y agarosa

El empleo de geles de agar y agarosa en técnicas electroforéticas y como tamices moleculares fue introducido por Polson (1961) y Hjertén (1964). Posteriormente, se utilizó la agarosa como soporte para la inmovilización de enzimas (Porath y col., 1967). Estos geles se aproximan en muchos aspectos a las matrices sólidas ideales para la unión de proteínas. En una serie de estudios Porath y col. (1971, 1975) y Låås (1972, 1975), realizaron ensayos con el fin de desarrollar técnicas cromatográficas y de inmovilización de proteínas, empleando agar y agarosa. Tales experiencias incluían, por ejemplo, el entrecruzamiento mediante reactivos bifuncionales apropiados, lo cual conduce a un incremento en la resistencia química y en algunos casos, a una mayor rigidez del gel.

#### III.2.1. Propiedades de los geles de agar y agarosa

##### i) Estabilidad mecánica

El agar y el agar fraccionado de baja densidad de carga

(agarosa) forman geles rígidos cuando las soluciones de estos poligalactanos se enfrían a temperaturas inferiores a 45°C. La rigidez no se modifica significativamente por variaciones en la temperatura de enfriamiento o por mezclado con sustancias difundibles; cuando tales sustancias (por ejemplo, 60-70% de sacarosa) se eliminan del gel, se recupera la rigidez original.

El agar de diferentes procedencias puede diferir considerablemente en lo referente a la "fuerza del gel". Esta propiedad se mide como la resistencia del gel a la deformación y el rendimiento, cuando se somete a la acción de diferentes cargas bajo determinadas condiciones. Para una misma concentración de sustancia sólida, en un intervalo de 2 a 6%, los geles más fuertes pueden llegar a ser tres veces más rígidos que los más débiles. La extracción con álcali puede mejorar considerablemente el agar, aumentando la rigidez del mismo.

La solubilidad del agar depende de su calidad. Normalmente es difícil obtener soluciones de agar más concentradas que 6-10% y esto impone el límite superior para la concentración de la matriz en los geles preparados del modo usual. No obstante, se puede preparar agar granular de alta concentración mediante otras técnicas, si se desea incrementar la fuerza del gel. Cuando se prepara agar granular de alta concentración se obtienen geles extremadamente densos, a expensas de una disminución en la permeabilidad. En este caso, las enzimas sólo pueden unirse a las capas más externas de la superficie de la matriz.

Existen otros caminos para aumentar la rigidez. El entrecruzamiento con reactivos bifuncionales con una longitud de cadena adecuada, conduce a un aumento en la fuerza del gel.

## ii) Propiedades estructurales de los geles

Muchas matrices hidrofílicas se contraen o dilatan significativamente, de acuerdo al solvente empleado. Este hecho es particularmente notable cuando se introducen grupos cargados. El intercambio iónico normalmente provoca dilatación a bajas fuerzas iónicas y contracción a altas concentraciones salinas. Estos efectos son mínimos o despreciables para geles hidrofílicos en solventes orgánicos no polares.

Los geles de agar y agarosa difieren de los geles entrecruzados de dextrano, polivinilalcohol o poliacrilamida en su

capacidad para mantener un volumen casi constante, cuando se reemplazan por agua, solventes menos polares. Por ejemplo, es posible retener prácticamente el mismo volumen de cama, desplazando secuencialmente el agua con solventes de polaridad gradualmente decreciente. Esto se debe probablemente a la estabilización de la estructura expandida del gel, por acción de las uniones hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas originadas por la dilatación en el agua, por lo cual, los segmentos de la matriz se asocian con el agua no desplazada.

Los geles de agar se caracterizan por poseer una relación favorable entre la permeabilidad y la densidad de la matriz. A pesar de ello, no han sido usados extensivamente en la inmovilización de enzimas. Los geles cuya concentración en la matriz oscila entre 6 y 10%, pueden utilizarse para enzimas de tamaño molecular moderado (menores que 100.000 daltons y con sustratos de bajo peso molecular). Si se desean velocidades de flujo elevadas puede llevarse a cabo un procedimiento de entre cruzamiento adecuado. Por otra parte, una baja densidad de la matriz es óptima para la formación de complejos enzima-sustrato de tamaño molecular grande.

#### iii) Resistencia química

El agar es extremadamente estable en soluciones acuosas de pH cercano a 3. En presencia de agentes reductores o en ausencia de  $O_2$ , los geles de agar entrecruzados con epíclorohidrina pueden tratarse con soluciones de hasta 30% de hidróxido de sodio, a temperaturas superiores a  $120^\circ C$ , sin destrucción de la matriz. El agar es menos estable en soluciones de ácidos fuertes pero puede tratarse con HCl 1M o ácido acético 50% durante períodos cortos de tiempo. La estabilidad frente a los ácidos es mayor cuando el agar o la agarosa se encuentran entrecruzados.

#### iv) Resistencia biológica

Se ha señalado a menudo, que los polímeros sintéticos son resistentes al ataque bacteriano. Lo mismo es válido para los polisacáridos de agar. La elevada estabilidad de estos últimos se debe probablemente a su estructura molecular única, la cual no se encuentra en los polisacáridos de los organismos terrestres. Las enzimas que degradan el agar (agarasas) se han

hallado sólo en ciertos microbios que viven sobre algas marinas. Las agarasas no son muy eficientes para atacar el agar y no tienen acción significativa sobre el agar entrecruzado.

v) Capacidad para formar derivados primarios

Cada unidad de agarobiosa posee cuatro grupos hidroxilo. En los polisacáridos, el número promedio de hidroxilos es menor debido a la presencia de sustituyentes (sulfato y ácido pirúvico) o en el caso de los geles entrecruzados, a que parte de los oxhidrilos se consumen en la reacción de entrecruzamiento. Se ha observado que la formación de derivados en solución acuosa, nunca se aproxima a los límites teóricos, especialmente cuando las reacciones ocurren en medios de alcalinidad menor que 2M en hidróxido de sodio o potasio. En algunos casos, pueden obtenerse matrices conteniendo 1-1,5 mmoles de sustituyentes muy reactivos por gramo de sustancia seca (imidocarbonato, oxirano, vinilsulfonil).

Las reacciones utilizadas para la formación de derivados de celulosa, almidón, dextrano, etc., se emplean también para la preparación de derivados de agar y viceversa.

En los casos en que sea deseable una alta concentración de grupos hidroxilo en la matriz, es posible introducir azúcares hidroxilados y polifenoles (Porath y Sundberg, 1972).

vi) Capacidad para retener la actividad enzimática

La actividad catalítica de las enzimas puede disminuir luego de su inmovilización, como consecuencia de varios factores:

- modificación del centro activo debido a la sustitución de grupos necesarios para la acción catalítica.

- bloqueo del centro activo lo cual impide la formación del complejo enzima-sustrato.

- cambios conformacionales en la enzima, inducidos por la interacción con los centros de adsorción de la matriz.

El bloqueo de la matriz fue demostrado por Axén y col. (1970) y Axén y Vretblad (1971) para la quimotripsina unida a Sephadex. No existen pruebas rigurosas para la presencia de efectos bloqueantes en agar.

La experiencia acumulada a través de los años indica que existe una marcada influencia de la matriz en lo referente a la

retención de la actividad. Los geles de agar son los que menos interfieren con la función catalítica normal de las enzimas inmovilizadas. La introducción de grupos hidrofóbicos en la matriz, tiende a incrementar la posibilidad de desnaturalización, pero bajo condiciones cuidadosamente controladas, la inmovilización puede estar acompañada satisfactoriamente por "adsorción hidrofóbica".

vii) Consideraciones económicas

El agar crudo resulta económico. Cuando se purifica extensivamente para fines analíticos rinde agarosa de alta calidad; sin embargo esto no es necesario para su utilización a escala industrial en cuyo caso se realiza una simple extracción con álcali.

La preparación de agar granulado es un proceso relativamente costoso que involucra la suspensión en solventes orgánicos y el uso de estabilizantes, que luego deben eliminarse. No obstante, la durabilidad y excelentes propiedades de productos tales como el agar, justifican enormemente su costo.

viii) Conclusiones

El agar y la agarosa aparentemente, proporcionan los micromedios casi ideales para la inmovilización de enzimas. La única desventaja que poseen, desde el punto de vista tecnológico, es su resistencia limitada a la deformación y ruptura. Existen nuevos tipos de geles de agar que son superiores por su mayor rigidez y menor costo.

III.3. Referencias

- Axén, R. & Vretblad, P. (1971), "Protides of the Biological Fluids" (Peeters, H., ed.), Pergamon, Oxford, p. 383.
- Axén, R.; Porath, J. & Ernback, S. (1967), Nature (London) 214, 1302.
- Axén, R.; Myrin, P.A. & Janson, J.C. (1970), Biopolymers 9, 401.
- Flodin, P. (1962), Doctoral Dissertation, University of Uppsala.
- Hjertén, S. (1964), Biochim. Biophys. Acta 79, 393.
- Låås, T. (1972), J. Chromatogr. 66, 347.
- Låås, T. (1975), J. Chromatogr. 111, 373.
- Polson, A. (1961), Biochim. Biophys. Acta 50, 565.
- Porath, J. & Flodin, P. (1959), Nature (London) 183, 1657.
- Porath, J. & Sundberg, L. (1972), Nature (London) New. Biol. 238, 261.
- Porath, J.; Axén, R. & Ernback, S. (1967), Nature (London) 215, 1491.
- Porath, J.; Janson, J.C. & Låås, T. (1971), J. Chromatogr. 60, 167.
- Porath, J.; Låås, T. & Janson, J.C. (1975), J. Chromatogr. 103, 49.



## CAPITULO IV

### METODOS PARA LA INMOVILIZACION DE ENZIMAS A SOPORTES DE SEPHADEX, AGAR Y AGAROSA

---

	Página
IV.1. Clasificación	217
IV.2. Unión covalente	217
IV.2.1. Acople directo	217
IV.2.2. Acople indirecto	226
IV.3. Métodos de adsorción	229
IV.4. Referencias	231

#### IV. MÉTODOS PARA LA INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS A SOPORTES DE SEPHADEX, AGAR Y AGAROSA

##### IV.1. Clasificación

Existen dos métodos posibles para la inmovilización de enzimas en matrices de Sephadex y agar-agarosa: i) Unión covalente y ii) Adsorción. La inclusión es probable bajo ciertas condiciones.

##### IV.2. Unión covalente

Los grupos reactivos pueden incorporarse a la matriz o a la proteína. Ciertos geles formadores de polímeros contienen otros grupos (por ejemplo carboxilo) además de los hidroxilos, los cuales sirven como centros de fijación para la inmovilización de enzimas.

Existen dos rutas principales a seguir cuando se desea inmovilizar una enzima sobre un soporte:

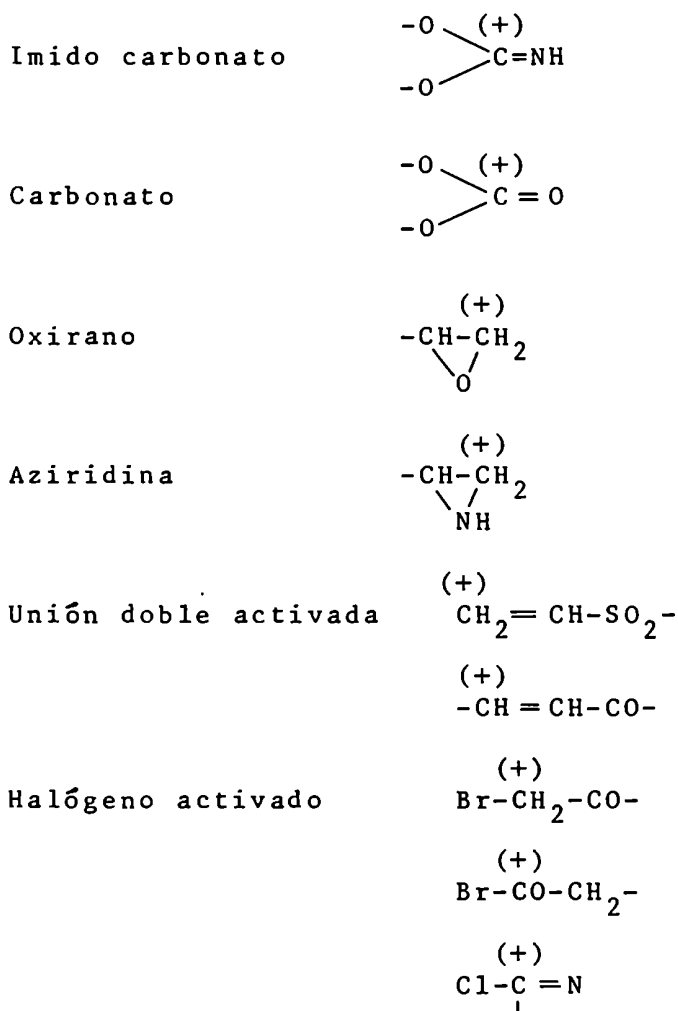
i) la introducción de grupos reactivos en el gel, a través de los hidroxilos de la matriz,

ii) la degradación parcial o conversión de la matriz en una forma más activa.

La alternativa i) se tratará en detalle subdividiéndola a su vez en dos casos: acople directo en dos pasos: activación y acople y acople indirecto en el cual se introduce un grupo de mayor reactividad que el hidroxilo (por ejemplo  $\text{-NH}_2$ ,  $\text{-COOH}$  o  $\text{-SH}$ ).

##### IV.2.1. Acople directo

En este caso, se introduce en la matriz un grupo electrofílico con el fin de lograr que el gel sea más reactivo hacia los restos nucleófilos presentes en la enzima. Los siguientes grupos son particularmente interesantes:

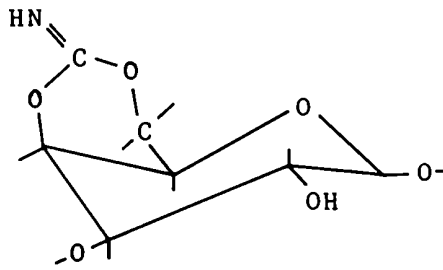


El grupo electrofílico reacciona primariamente con los residuos amino y tiol de la enzima, pero puede también unirse a nucleófilos más débiles tales como hidroxilos fenólicos de la tirosina.

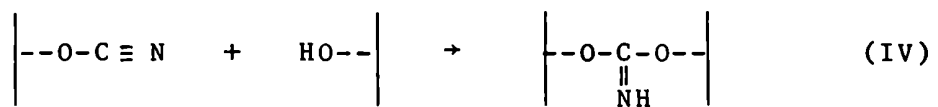
Algunas reacciones como las que involucran bromuro de cianógeno, divinilsulfona y bisoxirano, han sido descritas por Porath (1974) y Parikh y col.(1974).

El problema consiste en encontrar las condiciones óptimas para la introducción de un número máximo de grupos electrofílicos para una dada concentración de reactivo, de modo tal que el producto sea conveniente para el siguiente paso de acople enzimático. Por lo tanto, deben establecerse para cada método de unión y cada enzima, las condiciones óptimas para la activación y el acople subsiguiente. Es bien conocido que cada enzima puede requerir condiciones específicas dependientes de su tamaño molecular, del peso molecular del sustrato y de la

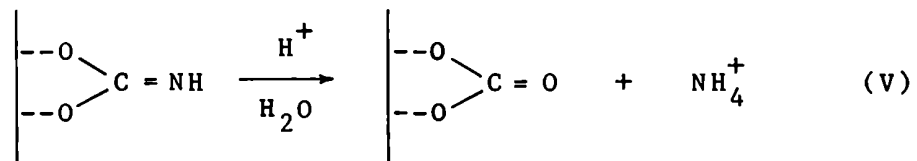




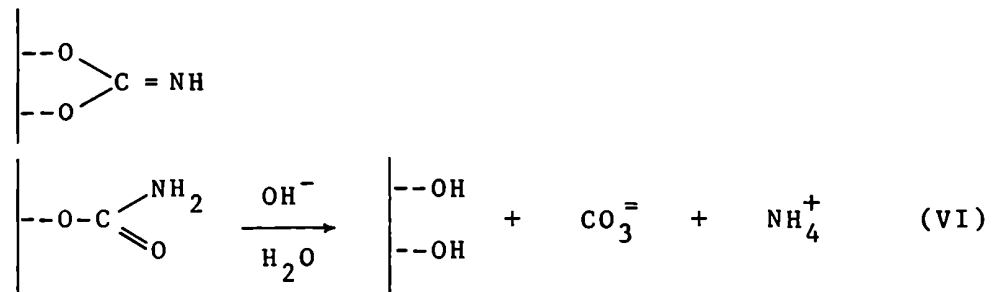
Indudablemente, parte del imidocarbonato está entrecruzado ya que el gel se vuelve insoluble en agua hirviendo:



Además el imidocarbonato puede hidrolizarse a carbonato (V):



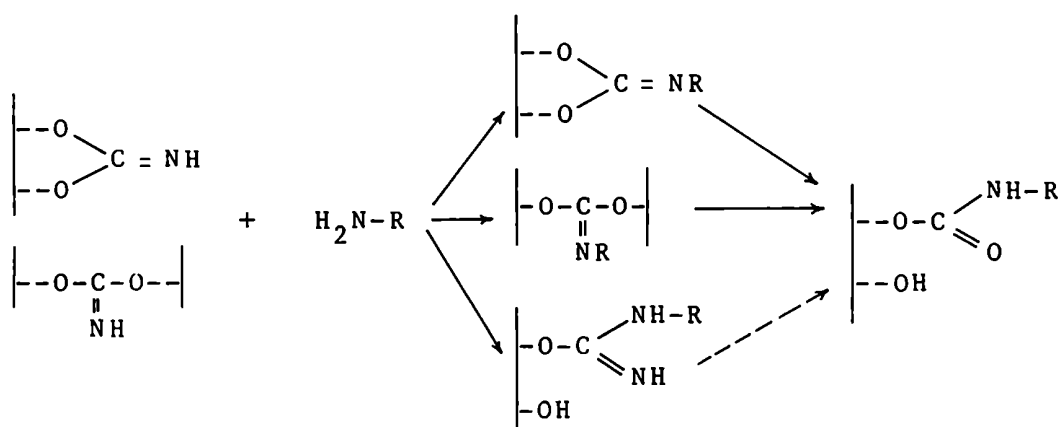
y también es posible que ocurra la regeneración de la matriz original:



Una complicación adicional la constituye la hidrólisis del reactivo con producción de bromuro, cianuro y cianato.

En la mayoría de los casos, existe un consumo de iones hidroxilo durante la reacción, con una concomitante disminución en el pH. Así, la reacción puede seguirse a un pH dado, adicionando álcali constantemente. No obstante, es más conveniente el uso de buffers fuertes tales como fosfato o carbonato. La cantidad de reactivo y la concentración de buffer a emplear dependerá de la densidad del gel.

Una vez activado el soporte, el acople de la enzima ocurre enteramente o por lo menos en forma predominante, a través de los grupos amino libres de la proteína. Se ha encontrado que tienen lugar las siguientes reacciones (Axén y Ernback, 1971):

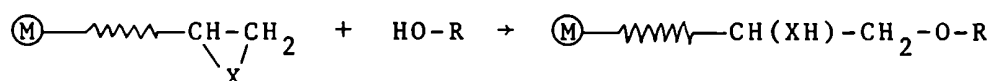
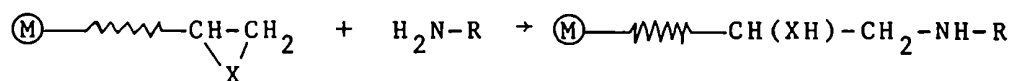
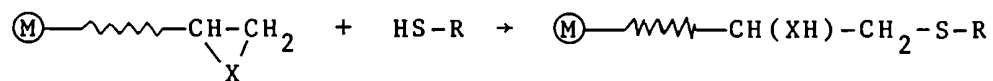


La amina debe estar desprotonada, lo cual indica que la reacción con la proteína ocurre a una velocidad óptima en un intervalo de pH entre 9 y 10. Las velocidades de estas reacciones dependen del pH y supuestamente también del tipo de polímero imidocarbonato (y del contaminante carbonato). Por otra parte, las propiedades del producto final son función de las condiciones del proceso de acople y de los reordenamientos que tienen lugar durante el almacenamiento de la preparación. Algunos derivados son extremadamente estables mientras que otros no. La formación de uniones múltiples entre la enzima y la matriz incrementa notablemente la estabilidad ya que la probabilidad de ruptura de todas las uniones, es mucho menor que la de una unión simple. Este es un argumento a favor del uso de geles imidocarbonato, altamente sustituidos. Sin embargo, un gel de este tipo podría producir enzimas inmovilizadas de baja actividad. Por lo tanto, debe trabajarse en las condiciones más favorables posibles en lo que respecta a ambos factores, la estabilidad y

la reactividad de la enzima a ser acoplada.

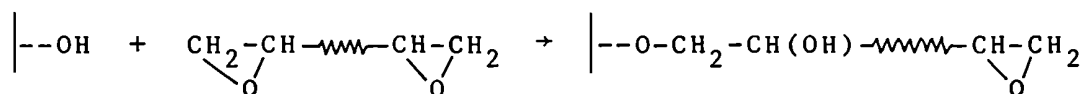
ii) Oxirano

Los sistemas de anillos de tres miembros altamente electrófilos suelen emplearse para la inmovilización de enzimas:

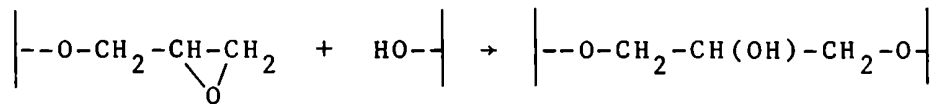


donde X=NH, O o S. Los oxiranos son extremadamente útiles para introducir pequeños ligandos en la agarosa con el fin de producir adsorbentes específicos para afinidad cromatográfica bioespecífica (Porath, 1974 y Sundberg y Porath, 1974). Los geles conteniendo oxirano pueden también acoplar proteínas.

Los grupos oxirano se introducen en muchos polímeros hidrófilos, particularmente en los que contienen oxhidrilos vecinales, por medio de una tosilación seguida por desplazamiento nucleofílico de los grupos tosilo por formación de anillos oxirano unidos. Un procedimiento general más conveniente, que no requiere de la participación de 1,2-dioles, se basa en la reacción específica con bisoxiranos, 1-halo-2-hidroxi o 1-hidroxi-2-halo (halohidrinás).



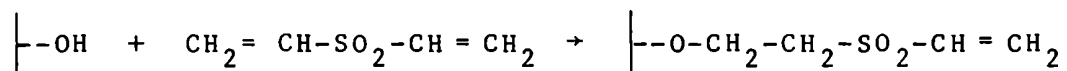
En forma paralela, tiene lugar una reacción lateral de entrecruzamiento:



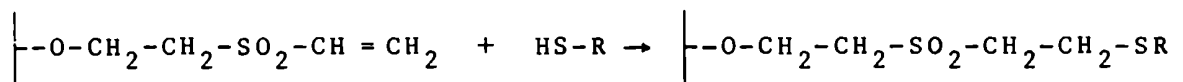
La reactividad hacia los grupos nucleofílicos de las proteínas sigue el orden: SH > NH > OH. El ataque nucleofílico sobre los grupos hidroxilo alifáticos ocurre a pH's fuertemente alcalinos (pH ≈ 11) mientras que los restos amino reaccionan a menor pH y los -SH, aún a pH más bajo (cercano a la neutralidad o levemente menor). Los hidroxilos aromáticos, como los residuos tirosilo, ocupan una posición intermedia entre los hidroxilos alifáticos y los grupos amino. Los residuos guanidino e imidazoles también pueden reaccionar.

### iii) Unión doble activada

-Vinilsulfoniletileneter: los grupos vinilsulfonil se introducen en los polímeros hidroxilados, por tratamiento de los últimos con divinilsulfona en álcali (Porath, 1974):



En este caso, es ventajoso que tenga lugar un entrecruzamiento simultáneo ya que de este modo, la enzima inmovilizada resultante tiene características de flujo superiores a las correspondientes al gel original. Las velocidades de ataque nucleofílico por parte de las enzimas siguen el orden: -SH > -NH > -OH al igual que para el oxirano, pero las reacciones tienen lugar a pH's menores que aquellas, en una unidad. Los grupos tiol participan en la formación de uniones sulfuro lábiles:



Las uniones C-N producidas por acople de los grupos amino libre son más estables:

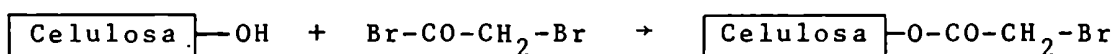




Este método es de fácil aplicación, da elevados rendimientos de acople y se puede emplear en un amplio rango de pH's. Esta reacción ha sido utilizada para el acople de seroalbúmina a Sepharosa 4B y Sephadex G-200.

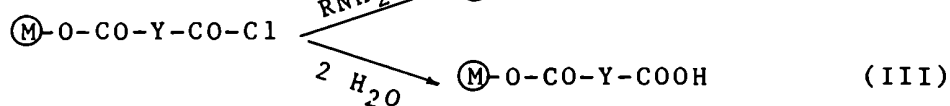
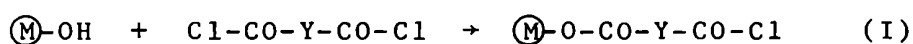
iv) Halógeno activado

Los halógenos altamente reactivos pueden introducirse en los polímeros hidroxílicos para facilitar el acople enzimático. Una de las primeras aplicaciones de estos procedimientos generales, fue llevada a cabo por Jagendorf y col. (1963). La celulosa se convirtió en su derivado bromoacetato:



Los halógenos se activan por la acción de otros grupos, como ser, los hidroxilos de las halohidrinás. La unión de la proteína a la matriz, formada por acople a través del bromoacetato no es muy estable. Los éteres son más convenientes y es posible formarlos luego de la activación con dihalocetonas, tales como dibromoacetona o dibromodiacetil.

También puede efectuarse la inmovilización con dicloruros ácidos dibásicos en cuyo caso es factible una alta sustitución de grupos ácidos en el producto final. Los dicloruros ácidos, como reactivos bifuncionales para la insolubilización de enzimas, ofrecen la posibilidad de obtener geles de agar rígidos, de bajo costo. El principio es el siguiente:



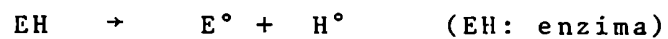
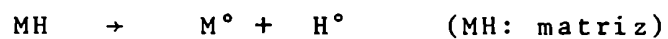
La reacción (I) tiene lugar en un solvente aprótico utilizando una amina terciaria como catalizador. La transferencia del gel a un sistema de solventes acuosos y el subsiguiente acople presentan problemas ya que la reacción (III) compete con la (II).

Debido a que el dicloruro ácido glutárico produce geles de agar extremadamente rígidos como consecuencia de un entrecruzamiento, es de interés intentar la producción de sistemas agar-enzima por medio de estas reacciones.

Los halógenos con estructuras tales como  $\text{Cl}-\overset{\cdot}{\text{C}}=\text{N}-\text{C}$  son también altamente reactivos. Kay y Crook (1967) introdujeron el uso de cloruros ácidos cianúricos para la fijación de enzimas a celulosa.

v) Acople inducido por irradiación

Se han realizado acoples de enzimas a agarosa y dextrano por  $\gamma$ -irradiación de las proteínas en presencia de suspensiones de gel. Tanto en la proteína como en el soporte se producen radicales libres y la interacción radical-radical conduce al acople:



Obviamente este método no es selectivo y puede ocurrir bajo una gran variedad de condiciones. La insensibilidad al pH y a la temperatura es una ventaja, pero el rendimiento de acople bajo y el daño producido por la radiación no favorecen su uso.

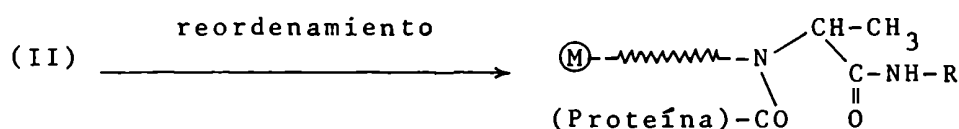
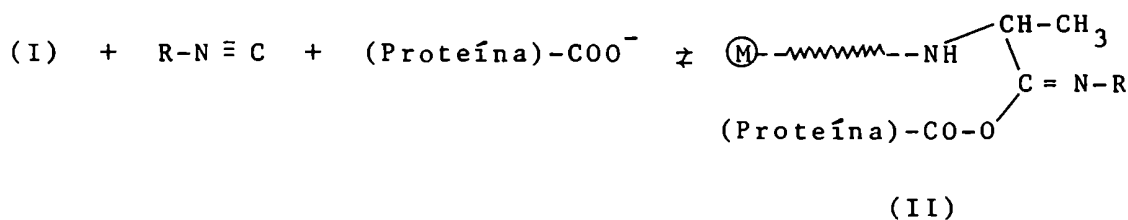
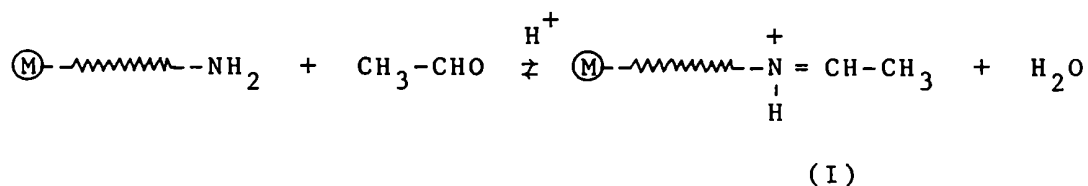
IV.2.2. Acople indirecto

El carácter nucleofílico de los hidroxilos de la Sepharosa, Sephadex, celulosa y otros soportes sólidos similares es tan débil, que muchas veces se requieren condiciones de reacción drásticas para formar sus derivados. La introducción de grupos amino, carboxilo y tiol extiende el campo de reacciones de inmovilización. En los trabajos clásicos de Campbell y col. (1951), Lerman (1953) y Gurvich (1957) se introdujeron grupos aromáticos a través de nitroéteres. La inmovilización se produ



método es particularmente interesante debido a que al menos cuatro grupos funcionales (carboxil, amino, carbonil e isocianuro) participan en las reacciones, conduciendo a un producto final estable (Ugi, 1962). Las reacciones involucran la formación de un ión imonio (base de Schiff); este ión ataca el carbono insaturado de un isocianuro (por ejemplo, ciclohexil isocianuro), en una reacción concertada con carboxilato, formando un intermediario inestable. Este intermediario, mediante una secuencia de reacciones de reordenamiento, forma uniones amida o péptido.

El método del isocianuro puede emplearse además para unir proteínas a polímeros conteniendo grupos carboxilo o amino. Cuando se usa acetaldehído como componente carbonílico, las reacciones involucradas para el caso de matrices conteniendo grupos amino, son las siguientes:



## ii) Intercambio tiol-disulfuro

Brocklehurst y col. (1973) introdujeron un método particularmente atractivo, aplicable en rangos de pH ácidos. El acople ocurre a través del intercambio tiol-disulfuro, de modo que esta técnica produce la unión entre los grupos tiol de las cisteína de la proteína y los grupos tiol de la Sepharosa activada. Las reacciones son las siguientes:



El problema consiste en la selección de X para que las reacciones (I) y (II) favorezcan totalmente la formación del complejo matriz-enzima (M-S-S-E).

#### IV.3. Métodos de adsorción

Los reactores enzimáticos más convenientes se obtienen mediante la inmovilización por adsorción iónica, sobre intercambiadores iónicos de Sephadex. La inmovilización por adsorción ofrece la ventaja de la fácil recarga con enzima fresca, cuando la capacidad de reacción con el sustrato ha descendido por debajo de los niveles tolerables.

La adsorción aromática sobre geles de dextrano entrecruzado fue descubierta al mismo tiempo que el efecto de los tamices moleculares. El comportamiento de sustancias "modelo" sobre Sephadex fue descrito por Porath en 1960 y Gelotte (1960) y en estos trabajos se basaron muchos otros posteriores. La adsorción es demasiado débil como para ser aplicada a la inmovilización de enzimas; sin embargo, si se sustituyen adecuadamente los hidroxilos del gel con grupos hidrofóbicos, la fuerza de adsorción de enzimas aumenta. En muchos casos donde se han introducido grupos hidrofóbicos por aminas alifáticas, vía imidocarbonato, la inmovilización ocurre debido a una adsorción mixta, es decir, adsorción iónica e hidrofóbica. En cambio, cuando se emplean éteres alifáticos neutros, la interacción es sólo de carácter hidrofóbico. Los fenómenos de adsorción de naturaleza más compleja tienen lugar con los éteres aromáticos, donde, además de los efectos hidrofóbicos, participan las interacciones  $\Pi-\pi$  como elementos esenciales en el proceso de adsorción.

No es posible determinar con exactitud los factores que contribuyen a la adsorción de las enzimas o de que modo ellos afectan la actividad y la estabilidad de las enzimas inmovilizadas. En ensayos realizados con estos fines, se han estudiado

los alil y hexil éteres de la Sepharosa 6B como adsorbentes in movilizantes de la  $\gamma$ -amilasa.

#### IV.4. Referencias

- Axén, R. & Ernback, S. (1971), Eur. J. Biochem. 18, 351.
- Axén, R. & Porath, J. (1966), Nature (London) 210, 367.
- Brandt, J.; Andersson, L.O. & Porath, J. (1975), Biochim. Biophys. Acta 386, 196.
- Brocklehurst, K.; Carlsson, J.; Kierstan, M.P.J. & Crook, E. M. (1973), Biochem. J. 133, 573.
- Campbell, D.H.; Lenscher, E. & Lerman, L.S. (1951), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 37, 575.
- Cuatrecasas, P. & Anfinsen, C.B. (1972), "Methods in Enzymology" 22, 31.
- Gelotte, B. (1960), J. Chromatogr. 3, 330.
- Gurvich, A.E. (1957), Biochemistry (USSR) 22, 977.
- Jagendorf, A.T.; Patchornik, A. & Sela, M. (1963), Biochim. Biophys. Acta 78, 516.
- Kay, G. & Crook, E.M. (1967), Nature (London) 216, 514.
- Lerman, L.S. (1953), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 39, 232.
- Parikh, I.; March, S. & Cuatrecasas, P. (1974), "Methods in Enzymology" 34, 77.
- Porath, J. (1960), Biochim. Biophys. Acta 39, 193.
- Porath, J. (1974), "Methods in Enzymology" 34, 13.
- Sundberg, L. & Porath, J. (1974), J. Chromatogr. 90, 87.
- Ugi, I. (1962), Angew. Chem. 74, 9.
- Wilchek, M. & Miron, T. (1974), "Methods in Enzymology" 34, 72.



## CAPITULO V

### INMOVILIZACION DE SUBUNIDADES

---

	Página
V.1. Consideraciones generales	232
V.2. Selección de las condiciones experimentales	232
V.3. Criterios para determinar la presencia de subunidades inmovilizadas	234
V.3.1. Contenido proteico	234
V.3.2. Diferencias en la estabilidad	235
V.3.3. Interacción específica con las subunidades solubles generadas <i>in situ</i>	237
V.3.4. Interacción con las subunidades solubles inactivadas en el sitio activo	238
V.4. Alcances y limitaciones de los procedimientos	239
V.5. Referencias	245

## V. INMOVILIZACION DE SUBUNIDADES

### V.1. Consideraciones generales

El término "enzimas inmovilizadas" está indicando que la libertad de movimiento de las moléculas enzimáticas unidas al soporte, se encuentra restringida. Esta característica permite una gran posibilidad de enfoques en cuanto al estudio de las interacciones moleculares.

Ya desde 1970 se han utilizado derivados inmovilizados como medio para evitar la asociación espontánea entre las subunidades de una proteína oligomérica (Chan, 1970). De este modo se puede llegar a determinar si la subunidad es catalíticamente activa. Si la subunidad inmovilizada es activa, la comparación de sus propiedades enzimáticas con las correspondientes al oligómero inmovilizado, brinda una valiosa información en lo que respecta a los efectos de interacción entre subunidades sobre la función enzimática. Existen muchas enzimas para las cuales no es sencillo obtener tal información salvo que se empleen técnicas especiales; ello se debe a que en estos casos, la estructura oligomérica nativa es considerablemente estable y deben aplicarse condiciones extremas para lograr su disociación. En estas circunstancias, el retorno a las condiciones no disociantes conduce a una reasociación espontánea.

Por otra parte, las formas monoméricas y oligoméricas no pueden compararse, en general, bajo las condiciones normales de ensayo. El presente método es aplicable en tales casos. Un requisito previo para el uso de esta técnica es que la renaturalización ocurra con una buena recuperación de la actividad.

### V.2. Selección de las condiciones experimentales

Se ha encontrado que la Sepharosa 4B es un soporte conveniente para el estudio de subunidades inmovilizadas. La naturaleza hidrofílica y no iónica de su matriz polisacárida permite la formación de derivados cuyas propiedades no se afectan significativamente por la presencia del soporte. Así, los resultados obtenidos con estos derivados son aplicables a veces en condiciones ordinarias, con soluciones reguladoras. La naturaleza altamente porosa de la matriz de Sepharosa facilita la difusión de las macromoléculas hacia el interior y el exterior

del gel, durante la preparación del compuesto insolubilizado. Si se emplean soportes tales que no permitan la entrada de macromoléculas al interior del gel, la inmovilización sólo ocurre en la superficie externa. En tales casos, es mucho más difícil obtener una cantidad suficiente de subunidades unidas por unidad de volumen de gel, evitando que las subunidades estén tan cercanas unas de otras, como para que sea posible la interacción entre subunidades adyacentes. No obstante, la estructura de la matriz de Sepharosa no es completamente rígida y por lo tanto deben evitarse los estacionamientos prolongados de las subunidades inmovilizadas y la incubación a temperaturas relativamente elevadas. La Sepharosa tratada con agentes de entrecruzamiento, como por ejemplo divinilsulfona, proporciona subunidades inmovilizadas más estables (Green y Toms, 1973).

Una característica destacable de este tipo de técnicas es que la forma oligomérica de la enzima se acopla al soporte a través de una o como máximo dos de sus subunidades y la forma monomérica se genera por tratamiento exhaustivo bajo condiciones disociantes. Este método ofrece importantes ventajas si se lo compara con el que involucra el acople directo de la forma monomérica bajo condiciones disociantes. La principal razón consiste en que, los cambios en la estructura terciaria de las subunidades insolubilizadas pueden ser muchas veces inevitables, dependiendo de la severidad de las condiciones disociantes. Aunque estos cambios en la estructura terciaria son normalmente reversibles (este es un requisito previo para la preparación de subunidades inmovilizadas), el acople del monómero en condiciones disociantes hará que los polipéptidos se unan de un modo tal que la recuperación de la estructura correcta sea difícilmente posible. Esto último por lo general se debe a las siguientes causas: i) el acople puede ocurrir a través de una cadena lateral del polipéptido, la cual es esencial para el mantenimiento de la estructura terciaria correcta o ii) el acople puede tener lugar en un punto de la matriz, de tal modo que posteriormente no exista espacio suficiente para que el monómero adquiera la conformación renaturalizada.

Otra desventaja que presenta el método de acople directo del monómero es que los monómeros ya unidos, generalmente no son capaces de reasociarse con subunidades solubles y retornar así a la forma oligomérica original, debido a las causas ya enunciadas (i y ii).

La comparación entre las subunidades unidas y el oligómero inmovilizado en lo que se refiere al contenido proteico y a la estabilidad, puede indicar si realmente las subunidades se han acoplado. En el procedimiento de acople del oligómero y posterior disociación, la habilidad específica del monómero inmovilizado para interactuar con las subunidades solubles, constituye una fuerte evidencia de la existencia de monómeros en el derivado. Estas posibilidades experimentales no son válidas en el caso de acople directo de monómeros.

Es conveniente realizar la inmovilización del oligómero activando primero el soporte y permitiendo luego la unión de la proteína. Este procedimiento evita el riesgo de entrecruzamiento entre moléculas proteicas o subunidades. El método de activación de la Sepharosa con BrCN es bastante recomendable, aunque la unión formada entre la proteína y el soporte puede sufrir un clivaje lento (Kolb y col., 1975).

Con el fin de impedir el acople de oligómeros a Sepharosa a través de más de una subunidad, o la interacción entre subunidades después de su preparación, es necesario limitar la densidad de puntos activados de la matriz. En la práctica, una relación de 1 a 5 mg de BrCN por ml de Sepharosa produce preparaciones aceptables, con baja contaminación para la inmovilización de dímeros. La densidad baja de moléculas acopladas tiene la ventaja adicional de disminuir los efectos característicos de la matriz, tales como el incremento aparente en el  $K_m$ , causado por la velocidad limitada de difusión del sustrato.

### V.3. Criterios para determinar la presencia de subunidades in- mobilizadas

Los criterios que son de utilidad para conocer si luego de la aplicación de un método determinado, las subunidades han sido realmente inmovilizadas, se resumen en la Tabla V.1.

#### V.3.1. Contenido proteico

El contenido proteico del oligómero inmovilizado puede compararse con el de las correspondientes subunidades insolubilizadas preparadas a partir del mismo. Con este propósito se

hidroliza la Sepharosa con HCl 6N y luego se lleva a cabo el análisis de aminoácidos. A partir de los valores para los aminoácidos más estables y de la composición aminoacídica de la proteína, se calcula el contenido proteico. La Tabla V.2. muestra los valores de algunas preparaciones típicas. Se observa que un incremento en el pH o en la relación CNBr : Sepharosa aumentan la cantidad de proteína unida. No obstante, el contenido proteico del monómero inmovilizado se aproxima al valor teóri-co, solamente cuando la relación de CNBr : Sepharosa utilizada para el acople del oligómero es baja. El rendimiento del acople tiende a variar significativamente dependiendo de la natu-raleza de la proteína. Debido a que la Sepharosa de por sí, contiene una pequeña cantidad de aminoácidos (por ejemplo, hasta 3 nmoles de alanina por ml de gel decantado), contenidos proteicos menores que 10 µg/ml no pueden determinarse con su-ficiente exactitud.

#### V.3.2. Diferencias en la estabilidad

En aquellos casos en los que las subunidades inmovilizadas son activas es deseable conocer si las mismas tienen pro-piedades distintas a las correspondientes al oligómero unido. Debido a que la concentración de enzima acoplada en estos derivados es normalmente baja por las razones ya expuestas, la úni-ca herramienta experimental disponible es la medición de la actividad. Pese a esta limitación existe un número considerable de ensayos o métodos a aplicar. En general, si uno quiere dis-tinguir entre las formas oligoméricas y monoméricas de la mis-ma enzima es ampliamente ventajoso el uso de la "concentración umbral para la inactivación" de un desnaturalizante proteico, como por ejemplo, la urea.

La urea es particularmente útil para estos fines debido a su carácter hidrofílico y no-iónico y a que tiene poco efecto sobre la actividad hasta que se alcanza una concentración crí-tica, a la cual comienza el desdoblamiento del polipéptido. El proceso de desdoblamiento requiere la unión simultánea de un número dado de moléculas de urea y en consecuencia, es altamente cooperativo. Así, la inactivación ocurre de tal modo que resulta aguda a una concentración crítica. Cuando una enzima existe normalmente en una forma oligomérica, las interacciones en

la superficie de la subunidad, deben contribuir a la estabilidad de la estructura total. Además, es probable que se requiera una mayor concentración de urea para la inactivación del oligómero que para la del monómero. La presencia de una superficie expuesta adicional en el monómero, sobre la cual se pueden unir más moléculas de urea, es probablemente la causa de su mayor inestabilidad.

Para la aldolasa tetramérica de músculo de conejo, la concentración de urea necesaria para provocar un 50% de inactivación de su monómero inmovilizado es 1 a 1,5M menor que el valor correspondiente para el tetrámero insolubilizado. Así, es posible seleccionar una concentración de urea intermedia (por ejemplo, 2,3M) a la cual el oligómero no está sensiblemente afectado, mientras que el monómero está inactivado (Tabla V.3.). Esta inactivación preferencial del monómero de la aldolasa se encontró también para los monómeros solubles formados como intermediarios durante la renaturalización (Chan y col, 1973a) y para los monómeros estabilizados por tratamiento químico durante la renaturalización (Chan y col., 1974). La correlación entre las propiedades de los monómeros insolubilizados y en solución provee una buena indicación de que dichas propiedades no han sido modificadas en forma inconveniente por el acople a la matriz de Sepharosa. Sin embargo, se han observado algunas diferencias; por ejemplo, el monómero inmovilizado de la aldolasa retiene un 22% de su actividad normal en urea 2,3M, mientras que el monómero soluble se inactiva completamente a esa concentración (Chan y col., 1973a y 1974). La actividad residual en urea 2,3M es probablemente el reflejo de la heterogeneidad de la preparación del monómero inmovilizado. Así, dependiendo de la relación BrCN : Sepharosa utilizada, podrían formarse algunos dímeros a partir de dos subunidades adyacentes originalmente unidas a la matriz. Resulta interesante que inmediatamente después de la preparación, las subunidades inmovilizadas de la aldolasa se inactivan completamente por tratamiento con urea 2,3M y la pérdida parcial de la sensibilidad frente a la urea ocurre gradualmente.

Aunque las interacciones que conducen a la formación de dímeros son absolutamente posibles, parece inconcebible que el reordenamiento preciso de subunidades necesario para la reasociación en un tetrámero, tenga lugar a través de cuatro subunidades originalmente unidas a la matriz en puntos que se encuen

tran bastante separados unos de otros. La conversión gradual y parcial en una forma más estable, no necesariamente debe atribuirse a la reasociación sino que también puede explicarse como debido a las interacciones no covalentes entre la matriz de Sepharosa y las cadenas laterales aminoacídicas de la superficie de las subunidades. Así, algunas subunidades parecen estar colocadas dentro de una cavidad formada por el movimiento de la matriz de Sepharosa. Las uniones no covalentes adicionales pueden conferir el mismo tipo de estabilización pero en este caso ya no se requiere la estereoespecificidad y la alineación altamente precisa.

Los monómeros inmovilizados de la transaldolasa de levadura también son más sensibles a la urea (Chan y col., 1973b) encontrándose el umbral de inactivación a una concentración de urea 2M menor que la correspondiente al oligómero inmovilizado (Tabla V.3.).

Otra diferencia significativa existente entre las formas oligomérica y monomérica de las enzimas descritas en la Tabla V.3. es el umbral de inactivación cuando se incrementa el pH. La inactivación del monómero inmovilizado ocurre a pH 9 para la transaldolasa de levadura (Chan y col., 1973b) y a pH 10 para la aldolasa de músculo (Tabla V.3.) (Chan y Mawer, 1972).

### V.3.3. Interacción específica con las subunidades solubles generadas *in situ*

Otro criterio valioso para determinar la existencia de monómeros inmovilizados se basa en la capacidad que poseen estos últimos para captar subunidades solubles. El procedimiento llevado a cabo con este propósito es el siguiente: en primer lugar se desnaturaliza y disocia una muestra de la enzima nativa por tratamiento con cloruro de guanidina 6M. Luego se toma una pequeña alícuota de la enzima desnaturalizada y se diluye en una gran cantidad de buffer conteniendo las subunidades inmovilizadas. Es esperable en primera instancia que como el cloruro de guanidina está diluído, la enzima desnaturalizada recupere su estructura original dando monómeros solubles. Estos monómeros solubles pueden reasociarse con los monómeros inmovilizados o entre ellos mismos. Con el fin de aumentar la primera probabilidad, conviene agregar la enzima desnaturalizada en pe

queñas cantidades, con intervalos de tiempo de 5 a 10 minutos entre cada adición. Debe señalarse que durante este proceso las subunidades inmovilizadas se encuentran bajo condiciones no desnaturalizantes. Además, llevando a cabo una experiencia control, puede demostrarse que si se usa el oligómero inmovilizado, en lugar del monómero, no se produce aumento en la actividad. También se puede comprobar que el monómero inmovilizado es incapaz de captar enzima oligomérica nativa, agregada al sistema.

La naturaleza altamente específica de la interacción entre el derivado de Sepharosa y los monómeros solubles generados *in situ*, sugiere que los monómeros insolubilizados están presentes en el derivado. Este tipo de evidencias se han encontrado para la aldolasa de músculo de conejo y para la transaldolasa de levadura (Chan y col., 1973b y Chan, 1973). Otra prueba de la naturaleza específica de la interacción entre los monómeros inmovilizados y los solubles proviene del hecho de que el aumento en la actividad de los monómeros unidos durante este proceso, alcanza una meseta cuyo nivel no es significativamente menor que el correspondiente a la actividad original de la forma oligomérica insolubilizada. Este resultado indica que cada uno de los monómeros inmovilizados, es capaz de recobrar el número de subunidades necesarias para regenerar la estructura cuaternaria original (Batlle y col., 1978).

Las propiedades de la enzima inmovilizada renaturalizada, deberían ser iguales a las del oligómero original. Esto se ha observado para la aldolasa de músculo, para la transaldolasa de levadura (Chan y col., 1973b y Chan, 1973) y para el ALA-Dehidrasa de hígado bovino (Batlle y col., 1978).

#### V.3.4. Interacción con las subunidades solubles inactivadas en el sitio activo

Si las subunidades inmovilizadas son inactivas, obviamente su presencia no puede demostrarse con los métodos que involucran la inactivación diferencial (por ejemplo, incrementando la concentración de urea). En estos casos, la técnica discutida anteriormente, o sea la que se basa en la capacidad de las subunidades inmovilizadas, para captar subunidades solubles, tiene una importancia crucial. Aunque la recuperación de la actividad resultante de tales interacciones, indica la presencia



de las subunidades inmovilizadas, no es demostrable inequívocamente que estas interacciones son esenciales para la actividad catalítica. Las subunidades insolubilizadas pueden ser inactivas debido, por ejemplo, a que una cadena lateral aminoacídica esencial para la actividad, se haya modificado durante el proceso de acople a la matriz de Sepharosa. Las subunidades solubles pueden inactivarse experimentalmente, por modificación del sitio activo. Si la adición de subunidades inactivas modificadas (producidas por renaturalización de la enzima modificada desnaturalizada) a las subunidades inactivas inmovilizadas, da lugar a una recuperación significativa de la actividad, se debe concluir que las subunidades inmovilizadas eran inactivas a causa de la inexistencia de interacciones entre las mismas y no por modificación de algún grupo esencial durante el proceso de acople al soporte. Se han llevado a cabo estudios de este tipo con los monómeros inmovilizados inactivos de la glicógeno fosforilasa (Feldman y col., 1972).

#### V.4. Alcances y limitaciones de los procedimientos

Las técnicas descritas anteriormente ayudan en general a decidir si la forma monomérica de una enzima es catalíticamente activa. Este aspecto es de importancia significativa debido a la existencia de numerosas enzimas oligoméricas formadas por subunidades idénticas. Muchas de estas enzimas cumplen estrictamente la cinética de Michaelis Menten lo cual está indicando una falta de cooperatividad entre los sitios activos. En estos casos, no hay una razón muy obvia acerca de la necesidad de la existencia de una estructura cuaternaria.

Si las subunidades inmovilizadas resultan ser activas, es posible obtener considerable información acerca de los efectos de las interacciones entre subunidades.

Ya se han discutido los efectos estabilizantes (por ejemplo, hacia la urea) y el cambio en el pK de los residuos del sitio activo. Las posibles diferencias entre la forma oligomérica y la subunidad en sus velocidades de inactivación debido a modificaciones químicas, pueden llegar a ser particularmente interesantes para las enzimas que presentan una reactividad de mitad de sitios (Levitzki, 1974) (por ejemplo, la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa) y para las cuales es posible preparar subunidades activas (en este caso, el dímero) (Na-

gradova y col., 1974). Si se conoce que la enzima oligomérica presenta cooperatividad en la unión del sustrato, el estudio de los monómeros inmovilizados (si son activos) puede demostrar los efectos directos de las interacciones entre subunidades, en el comportamiento cooperativo. Además, en aquellos casos donde un activador o un inhibidor producen disociación o agregación, el uso de derivados inmovilizados permite distinguir si el cambio en la actividad se debe a una variación en la estructura cuaternaria o si éstos son simplemente dos efectos coexistentes pero independientes del ligando.

Hasta el momento, sólo hemos considerado enzimas con subunidades idénticas. En el caso de enzimas formadas por subunidades diferentes, dichas subunidades pueden separarse bajo condiciones disociantes y estudiar la actividad catalítica en cada una de ellas. No obstante, si las condiciones del ensayo son distintas a las empleadas durante la disociación, es probable que las subunidades se reasocien entre ellas. Por ejemplo, cuando se separan las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la triptofano sintetasa, la subunidad  $\beta$  tiende a existir como  $\beta_2$  y así, para saber si  $\beta$  es activa deben emplearse técnicas especiales tales como las de subunidades inmovilizadas. Los derivados conteniendo solamente una parte de la estructura cuaternaria nativa (por ejemplo, un dímero inmovilizado  $\alpha\beta$  de una proteína tetramérica  $\alpha_2\beta_2$ ), también puede estudiarse empleando las técnicas de inmovilización descriptas. Así, se ha analizado el comportamiento de un complejo formado por subunidades no idénticas de la aspartato transcarbamilasa (Chan, 1974).

Una de las limitaciones principales de este tipo de procedimientos es que sólo pueden realizarse escasos estudios físicoquímicos de los monómeros inmovilizados. El estado particulado de la enzima unida impide el exámen de sus propiedades hidrodinámicas. Las técnicas espectroscópicas no son aplicables debido a los efectos de dispersión de la luz producidos por las partículas de gel y también por el muy bajo contenido proteico presente en los derivados. Otro problema experimental del método se debe a la naturaleza heterogénea de las moléculas inmovilizadas. Los puntos de acople sobre la matriz no tienen idénticos micromedios y la unión puede ocurrir con una de las muchas cadenas laterales de la superficie proteica. Esta heterogeneidad está además acompañada por pequeñas cantidades de dímeros contaminantes (dependiendo de la relación BrCN : Sepha

rosa) y por la falta de rigidez absoluta de la matriz de Sepharosa. Sin embargo, la correlación de resultados de los estudios en solución con los correspondientes a los derivados insolubilizados, indican que pueden obtenerse conclusiones confiables en lo referente a las interacciones entre subunidades, empleando derivados inmovilizados.

Tabla V.1.: Criterios para determinar la presencia de subunidades inmovilizadas

Criterios	Tipo de subunidad inmovilizada para la cual el test es aplicable	Resultados esperados si las subunidades están presentes
Contenido proteico	Activo o inactivo	= $1/n \times$ contenido proteico del oligómero inmovilizado (n= número de subunidades)
Estabilidad a los desnaturalizantes	Activo	Inactivación a baja concentración del desnaturalizante
Estabilidad al calor o a la proteólisis	Activo	Inactivación puede ocurrir a una velocidad diferente
Magnitud de la modificación química (*)	Activo o inactivo	Posible modificación de algunos residuos previamente tapados
Velocidad del cambio químico	Activo	Inactivación puede ocurrir a una velocidad diferente
Interacción con subunidades solubles	Activo o inactivo	Aumento de actividad hasta un nivel próximo a la actividad original del oligómero inmovilizado; propiedades del producto son las de la forma oligomérica.
Interacción con subunidades solubles inactivadas en el sitio activo	Activo  Inactivo sin interacción entre subunidades Inactivo por modificación del residuo esencial durante la inmovilización	No se producen cambios en la actividad si las subunidades actúan independientemente, propiedades del producto son las de la forma oligomérica. Aparición de actividad.  Desaparición de actividad

(\*) Puede ser determinado únicamente cuando la inmovilización es reversible y el producto modificado puede ser liberado del soporte.

Tabla V.2.: Efecto de las condiciones de acople sobre el contenido proteico de derivados inmovilizados

Enzima	Cantidad de BrCN para la activación (mg/ml Sepharosa)	pH de acoplamiento	CONTENIDO PROTEICO			
			Oligómero Inmovilizado		Monómero Inmovilizado	
			µg/ml	%	µg/ml	%
Aldolasa de músculo de conejo (tetramero)	1,0	8,0	96,8	100	24,0	24,8
	2,5	8,0	166	100	45,7	27,5
	5,0	8,0	206	100	63	30,6
	1,0	9,0	810	100	218	26,9
Transaldolasa de levadura (dímero)	5,0	8,5	25,5	100	16,5	64,6

Tabla V.3.: Diferencias en las propiedades de los oligómeros y monómeros inmovilizados

Enzima	Condición para la distinción entre oligómero/monómero	Velocidad, actividad bajo condiciones especiales/actividad en el ensayo normal			
		Oligómero inmovilizado	Monómero inmovilizado	Oligómero soluble	Monómero soluble
Aldolasa de músculo de conejo	Urea 2,3 M pH 10 Guanidina HCl 0,45	0,90	0,22	0,85	0
		1,03	0,20	0,90	0
		0,62	0,20	0,50	NT
Transaldolasa de levadura	Urea 1,5 M pH 9	0,80	0,15	0,75	
		0,68	0,10	0,52	

NT: no testeado

## V.5. Referencias

- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978), *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Chan, W.W.C. (1970), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1198.
- Chan, W.W.C. (1973), *Can. J. Biochem.* 51, 1240.
- Chan, W.W.C. (1974), *FEBS lett.* 44, 178.
- Chan, W.W.C. & Mawer, H.M. (1972), *Arch. Biochem. Biophys.* 149, 136.
- Chan, W.W.C.; Mort, J.S.; Chong, D.K.K. & Mac Donald, P.D.M. (1973a), *J. Biol. Chem.* 248, 2778.
- Chan, W.W.C.; Schutt, H. & Brand, K. (1973b), *Eur. J. Biochem.* 40, 533.
- Chan, W.W.C.; Kaiser, C.; Salvo, J.M. & Lawford, G.R. (1974), *J. Mol. Biol.* 87, 847.
- Feldman, K.; Zeisel, H. & Helmreich, E. (1972), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 2278.
- Green, N.M. & Toms, E.J. (1973), *Biochem. J.* 133, 687.
- Kolb, H.J.; Renner, R.; Hepp, K.D.; Weiss, L. & Wieland, O. H. (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 248.
- Levitzki, A. (1974), *J. Mol. Biol.* 90, 451.
- Nagradova, N.K.; Golovina, T.O. & Mevkh, A.T. (1974), *FEBS lett.* 49, 242.

C



## CAPITULO I

### BACTERIAS FOTOSINTETICAS

---

	Página
I.1. Aspectos generales	246
I.2. Taxonomía	247
I.2.1. Orden Rhodospirillales	247
I.2.1.1. Rhodospirillineae	247
I.2.1.11. Familia Chromatiaceae	247
I.2.1.12. Familia Rhodospirillaceae	248
I.3. Bacterioclorofila	252
I.3.1. Propiedades	252
I.3.2. Biosíntesis	253
I.4. Referencias	255

## I. BACTERIAS FOTOSINTÉTICAS

### I.1. Aspectos generales

Las bacterias fotosintéticas constituyen un grupo fascinante de microorganismos, cuyos miembros desempeñan un papel sumamente importante en la naturaleza.

Estos procariotas son capaces de utilizar la luz como fuente de energía, llevando a cabo una fotosíntesis en condiciones anaeróbicas y sin liberación de oxígeno.

Las bacterias fotótrofas, a diferencia de las plantas verdes, no pueden utilizar el agua como dador de electrones, si no que dependen de dadores de hidrógeno fuertemente reducidos; así, los electrones para la generación de dicho poder reductor, derivan de sustancias inorgánicas u orgánicas del medio ambiente.

Numerosas bacterias fotosintéticas son capaces de crecer en forma completamente autótrofa, empleando  $\text{CO}_2$  como fuente de carbono y  $\text{SH}_2$  o  $\text{H}_2$  como reductores. También es posible el desarrollo fotoheterotrófico, siendo en este caso los compuestos orgánicos las fuentes de carbono.

Las bacterias fotótrofas habitan las zonas anaeróbicas de numerosos ambientes acuáticos, desde suelos húmedos o fangosos, zanjas y charcos hasta lagunas, lagos, ríos, manantiales sulfurosos y habitats marinos.

Forman a menudo floraciones de color salmón a rojo oscuro, recubriendo el lodo y el material vegetal en vías de descomposición.

Debemos recordar que la producción fotosintética de oxígeno sólo ocurre en las capas superficiales de lagos y océanos, donde los microorganismos disponen de luz. La materia orgánica que no se consume en dichos estratos, es descompuesta en las profundidades por organismos aerobios facultativos. Una vez agotado el oxígeno, las capas profundas se transforman en anaerobias, restringiéndose el crecimiento a bacterias anaeróbicas y especies microaerofílicas y variando el metabolismo de respiratorio a fermentativo, con consecuencias fundamentales para el ciclo del carbono.

## I.2. Taxonomía

### I.2.1. Orden Rhodospirillales

Este orden comprende los microorganismos que contienen bacterioclorofilas (Bcl's) y pigmentos carotenoides, que se encuentran localizados en sistemas membranosos internos, continuos a la membrana citoplasmática o en vesículas características (*chlorobium vesicles*).

Su metabolismo fotosintético difiere del de las Cianobacterias y plantas verdes, dado que ocurre bajo condiciones anaeróbicas y sin producción de oxígeno (Pfenning y Trüper, 1971 a, 1974; Trüper, 1976).

El orden Rhodospirillales incluye los subórdenes Rhodospirillineae (bacterias fotosintéticas que poseen Bcl's a ó b) y Chlorobiineae (microorganismos fotótrofos que contienen Bcl's c, d ó e y pequeñas cantidades de Bcl a).

Nos referiremos únicamente al suborden Rhodospirillineae por cuanto la bacteria empleada en nuestro trabajo, pertenece al mismo y en particular al género *Rhodopseudomonas*.

#### I.2.1.1. Rhodospirillineae

##### I.2.1.1.1. Familia Chromatiaceae

Esta familia comprende las bacterias fotosintéticas purpúreas (Pfenning y Trüper, 1971 b), las cuales llevan a cabo una fotosíntesis anoxigénica. En la misma, el sulfuro se oxida a sulfato acumulándose el azufre en forma intracelular, excepto en el género *Ectothiorhodospira*, que produce depósitos externos de dicho compuesto.

Existen especies que pueden crecer a concentraciones de cloruro de sodio cercanas a la saturación, como por ejemplo *Ectothiorhodospira halophila*, mientras que *Ectothiorhodospira mobilis*, *Chromatium buderii* y *Chr. gracile* requieren concentraciones salinas moderadas. *Thiocapsa pfennigii* es la única especie que contiene Bcl b, en tanto que todas las demás poseen Bcl a. Además, su sistema membranoso intracitoplasmático tiene la forma de un manojo de tubos, mientras que las otras especies, excepto *Ectothiorhodospira*, presentan vesículas membranosas. En las *Ectothiorhodospira*, las membranas intracitoplasmáticas se

encuentran formando una pila de discos (tilacoides).

Las propiedades generales de las 24 especies de Chromatiaceae se describen en la Tabla I.1.

Como se puede observar, el color de la suspensión celular varía, dependiendo del tipo de carotenoides presentes. Así, las cepas con pigmentos de la serie de spirilloxantina presentan una coloración anaranjado-marrón a marrón-rojizo o rojo; los de la serie de okenona originan un color rojo púrpura mientras que las suspensiones púrpura-violeta provienen de la presencia de carotenoides de la serie del rhodopinal.

En cuanto a la división celular, ésta ocurre por fisión binaria. Algunos miembros forman agregados celulares característicos (Tabla I.1.), los cuales dependen de las condiciones de crecimiento. (concentración de sulfuro, intensidad luminosa, pH, salinidad, temperatura, presión de oxígeno, etc.). Así, existen especies que crecen como una única célula mientras otras forman agregados no móviles o racimos de formas y tamaños variables.

La mayoría de las especies de esta familia son estrictamente anaeróbicas, excepto *Thiocapsa roseopersicina*, que puede crecer en oscuridad y en condiciones microaerofílicas.

Todas las cepas pueden fotoasimilar sustratos orgánicos simples, tales como piruvato y acetato. Tanto *Thiospirillum jensenense*, *Chr. okenii*, *Chr. weissei*, *Chr. warmingii* y *Chr. buderi* como *Amoebobacter roseus* y *Ectothiorhodospira mobilis* requieren vitamina B<sub>12</sub> para su crecimiento.

#### I.2.1.12. Familia Rhodospirillaceae

Las bacterias purpúreas no sulfúreas son incapaces de oxidar el azufre a sulfato, aunque pueden oxidar el sulfuro a sulfato, sin acumulación de S°. Estos microorganismos son fotótrofos facultativos, ya que pueden crecer aeróbicamente en la oscuridad o en forma anaeróbica a la luz ; sin embargo, algunas especies son capaces de desarrollarse también anaeróbicamente en oscuridad, empleando el metabolismo fermentativo.

Dado que el oxígeno inhibe la síntesis de Bcl y carotenoides, todos los cultivos crecidos en oscuridad y en aerobiosis son incoloros. En estas condiciones, las membranas fotosintéticas se reducen considerablemente, llegando a no ser visibles.

Tabla I.1.: Propiedades de las Chromatiaceae

ESPECIES	FORMA CELULAR ANCHO/LONG (μ)	MOTILIDAD	LIMO	AGREGADOS CELULARES	VACUOLAS GASEOSAS	COLOR DE LA SUSPENSION CELULAR
<i>Amoebobacter</i> <i>pendens</i> <i>roseus</i>	Esfera-1,5-2,5 Esfera-2,0-3,0		+ +		+ +	Rosa-rojo Rosa-rojo
<i>Chromatium</i> <i>budaxi</i>	De varilla-3,5-4,5/ /4,5-9		-			Púrpura-violeta
<i>gracile</i>	De varilla-1,0-1,3/2-6		+			Marrón-rojo
<i>minus</i>	De varilla-2,0/2,5-6		-			Púrpura-rojo
<i>minutissimum</i>	De varilla-1,0-1,2/2,0		-			Marrón-rojo
<i>obeni</i>	De varilla-4,5-6,0/8-15		-			Púrpura-rojo
<i>vinosum</i>	De varilla-2,0/2,5-6		-			Marrón-rojo
<i>volascens</i>	De varilla-2,0/2,5-6		-			Púrpura-violeta
<i>waxmngii</i>	De varilla-3,5-4,0/5-11		-			Púrpura-violeta
<i>weissae</i>	De varilla-3,5-4,0/5-11		-			Púrpura-rojo
<i>Ectothiothodospira</i> <i>halophila</i>	Espiralada-0,8/5,0		-			Rojo
<i>mobilis</i>	Espiralada-0,7-1/2-2,6		-			Marrón-rojo
<i>shaposhnikovii</i>	Espiralada-0,8-0,9/ /1,5-2,5		-			Marrón-rojo
<i>Lamprocyatis</i> <i>roseopersicina</i>	Esfera-3,0/3,5		-	- racimos		Púrpura
<i>Thiocapsa</i> <i>pfennigii</i> <i>roseopersicina</i>	Esfera-1,2-1,5 Esfera-1,2-3,0		- +	- -		Anaranjado-marrón Rosa-rojo
<i>Thiocystis</i> <i>gelatinosa</i> <i>violacea</i>	Esfera-3,0 Esfera-2,5-3,0		+ +	- racimos		Púrpura-rojo Púrpura-violeta
<i>Thiodictyon</i> <i>bacillosum</i> <i>elegans</i>	De varilla-1,5-2,0/3-6 De varilla-1,5-2,0/3-8		- -	- racimos mallas		Púrpura-violeta Púrpura-violeta
<i>Thiopedia</i> <i>rosea</i>	Ovoidea-1,0-2,0/1,2/2,5		-	- plaquetas		Púrpura-violeta
<i>Thiosarcina</i> <i>rosea</i>	Esfera-2,0-3,0		+	- paquetes		Rosa-rojo
<i>Thiospirillum</i> <i>jenense</i>	Espiral-2,5-4,5/30-40	+	-	-		Anaranjado-marrón

Los datos fueron recogidos de Mandel y col. (1971) y Pfenning y Trüper (1971 a, d; 1974).

Tabla I.2.: Propiedades de las Rhodospirillaceae

ESPECIES	FORMA CELULAR ANCHO/LARGO(μ)	S. M. I.	COLOR CULTIVO ANAEROBICO	FACTORES DE CRECIMIENTO REQUERIDOS
<i>Rhodocycclus purpureus</i>	Circular 0,6-0,7/2,7-5	Tubular	Púrpura-violeta	Vit. B <sub>12</sub> + PABA + Biotina
<i>Rhodomicrobium vannielii</i>	Ovoidea 1,0-1,2/2-2,8	Lamelar	Anaranjado-marrón	Ninguno
<i>Rhodopseudomonas acidophila</i>	De varilla 1,0-1,3/2-5	Lamelar	Rojo-púrpura o anaranjado-marrón	Ninguno
<i>capsulata</i>	De varilla/Esfera 0,5-1,2/2-2,5	Vesicular	Amarillo a marrón	Tiamina ± Biotina ± Niacina
<i>gelatinosa</i>	De varilla 0,4-0,5/1-2	Tubular	Amarillo-marrón a rosado	Biotina + Tiamina
<i>globiformis pauculus</i>	Esfera; 1,6-1,8 De varilla 0,6-0,9/1,2-2	Vesicular Lamelar	Púrpura-rojo Rojo-marrón	Biotina + PABA PABA ± Biotina
<i>sphaeroides</i>	Esfera/ovoidea 0,7/2-2,5	Vesicular	Verde-marrón a marrón	Biotina + Tiamina + Niacina
<i>sulfidophila</i>	De varilla/Esfera 0,6-0,9/0,9-2,0	Vesicular	Amarillo amarro-nado a rojo	Biotina + Tiamina + PABA
<i>sulfovivida</i>	De varilla 0,5-0,9/1,2-2	Lamelar	Verde oliva	Biotina + Piridoxina + PABA
<i>vivida</i>	De varilla 0,6-0,9/1,2-2	Lamelar	Verde	PABA + Biotina
<i>Rhodospirillum glutinum</i>	Espiralada 0,5-0,7/3,5	Sacos apilados	Marrón	PABA
<i>molischianum</i>	Espiralada 0,7-1,0/5-8	Sacos apilados	Marrón	Aminoácidos
<i>Rhodospirillum photometricum</i>	Espiralada 1,2-1,7/7-10	Sacos apilados	Marrón	Extracto de levadura
<i>rubrum</i>	Espiralada 0,8-1,0/7-10	Vesicular	Rojo	Biotina
<i>tenuis</i>	Espiralada 0,3-0,5/3-6	Tubular	Púrpura-Violeta o marrón-anaranjado	Ninguno

Los datos fueron recogidos de van Niel (1944), Maroc y col. (1968), Man del y col. (1971), Pfennig y Trüper (1971 d, 1974), Hansen y Veldkamp (1973), Pfennig (1974) y Keppen y Gorkenko (1975). S.M.I.: Sistema membrano intracitoplasmático.

En la Tabla I.2. se hallan descriptas algunas propiedades de 16 especies de Rhodospirillaceae. Así, se puede observar que la mayoría de los miembros de esta familia necesitan factores de crecimiento para su desarrollo. Además, los cultivos anaeróbicos presentan colores característicos, los cuales dependen de la presencia de Bcl a ó b y de carotenoides de las series spirilloxantina, spheroidenona o rhodopinal.

Existen cepas que utilizan el sulfuro como dador de electrones, pero sólomente a bajas concentraciones del mismo, ya que las cantidades de sulfuro toleradas por las Chromatiaceae y Chlorobiaceae son tóxicas para esta familia.

En cuanto a la división celular, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rp. viridis*, *Rp. acidofila*, *Rp. sulfoviridis* y *Rhodomicrobium vannielii*, se reproducen por brotación; todas las demás lo hacen por fisión binaria. En las tres primeras especies antes nombradas, la célula hija se desarrolla en un extremo del tubo de división. Este a su vez, se origina en la célula madre, en el polo opuesto al que posee el flagelo. En *Rp. sulfoviridis*, las células hijas aparecen directamente a partir de la madre, sin formación de ningún tubo de división. En *Rhodomicrobium vannielii*, los tubos de división crecen en ambos polos de la célula materna, siendo en este caso, más largos y ramificados, lo cual permite la formación de mallas extensas.

#### - *Rhodopseudomonas palustris*

Se puede encontrar una descripción detallada de este microorganismo en el Manual de Bergey (Pfennig y Trüper, 1974) y referida en particular al interés de este trabajo en la Tesis de Doctorado de la Dra. A. A. Juknat de Geralnik (1983).

*Rp. palustris* tiene forma de bastón o varilla. El tamaño varía aún para la misma cepa, lo cual depende de la edad del cultivo y la composición del medio. Las células pueden medir de 0,6 a 0,9 por 1,2 a 2,0  $\mu$  (Tabla I.2.), alcanzando un tamaño de 10  $\mu$  y una forma irregular en medios orgánicos complejos.

La existencia de un flagelo polar, permite en cultivos viejos, la unión de las células formando rosetas y racimos.

La producción de pigmentos (Bcl a y carotenoides) depende también del medio de crecimiento empleado. En presencia de malonato, tiosulfato y glicerol el desarrollo es pobre y la to-

nalidad del cultivo rosa pálido mientras que los medios que contienen ácidos grasos dan origen a cultivos amarronados. Los carotenoides presentes en estos microorganismos corresponden a la serie spirilloxantinas: licopeno, rhodopina y spirilloxantina.

*Rp. palustris* es una bacteria fotoorganotrófica y aeróbica facultativa. Puede crecer en medios minerales conteniendo sustratos orgánicos simples y bicarbonato, suplementados con p-aminobenzoato como factor de crecimiento. Existen algunas cepas que requieren también biotina. Los rangos de pH y temperaturas óptimos para el desarrollo son 5,5-8,5 y 30-37 °C respectivamente.

Los sustratos utilizados como fuente de carbono (fotoasimilados) o donores de electrones fotosintéticos son: alcoholes, ácidos grasos, ácidos C<sub>4</sub>-dicarboxílicos, aminoácidos, benzoato.

Como fuente de nitrógeno utilizan sales de amonio.

Los materiales de reserva están constituidos por polisacáridos, poli-β-hidroxibutirato.

### I.3. Bacterioclorofila

#### I.3.1. Propiedades

Como ya se mencionó, las porfirinas son los pigmentos de la vida. Seleccionados por la evolución biológica, estos tetrapirroles poseen una estructura adecuada para la fotosíntesis y la conversión de energía.

Las propiedades de estos pigmentos se hallan generalmente resumidas en trabajos relacionados con las Clorofilas (Cl's): Rabinowitch (1945, 1951, 1956), Smith y Benítez (1955), Vernon y Seely (1966), Gurenovich y col. (1968).

Como sucede con las Cl's, la Bcl se aísla usualmente con una molécula de agua unida al magnesio. El color azul de las soluciones de estos pigmentos se debe a una banda de absorción bastante débil, cercana a 590 nm y a la cola correspondiente a la transición a 760 nm.

La bacterioclorofila es una molécula sumamente inestable. Esta inestabilidad se debe a la rápida foto y autooxidación del pigmento en solución diluida, especialmente en metanol. En soluciones concentradas de dietiléter, suele ser bastante estable.

Por otra parte, la Bcl es muy resistente a la pérdida



del magnesio para formar Bacteriofeofitina (Bft). El orden de estabilidad creciente para los quelatos con magnesio es el siguiente: porfirina < clorina < bacterioclorina. La Bft es mucho más estable a la luz que la Bcl; también es menos soluble y se la puede obtener más fácilmente en forma microcristalina.

Además de la Bcl a (Figura I.1.) existen otros pigmentos característicos en las bacterias fotosintéticas. Jensen y col. (1964) informaron acerca de sus espectros y propiedades. La estructura de la Bcl b es la misma que la de la Bcl a, salvo el reemplazo del etilo por un grupo etiliden (Scheer y col., 1974).

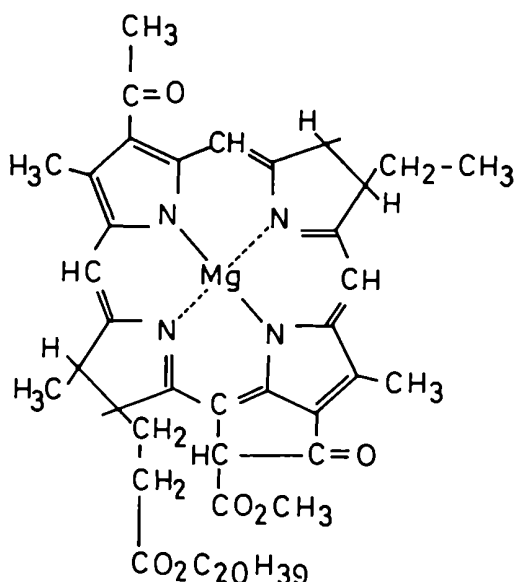


Figura I.1.: Estructura de la Bcl a.

Las Bcl's pueden aislarse mediante técnicas de extracción y cromatografía (Strain y Svec, 1965).

### I.3.2. Biosíntesis

La biosíntesis de la Bcl es un ejemplo excelente de como una molécula altamente compleja, se puede sintetizar a partir de precursores muy simples (Figura II.1. parte A). Una gran par

te de los conocimientos acerca de este camino biosintético se debe a los trabajos de June Lascelles (1964).

Las distintas cadenas laterales presentes en la Bcl provienen de los residuos acetato y propionato originales de la uroporfirina III (Figura III.1., parte A). Estos se transforman en grupos metilos y vinilos por decarboxilación y posterior decarboxilación oxidativa, respectivamente. Uno de estos grupos vinilo se reduce a etilo, mientras que el otro se convierte en un grupo acetilo (Figura I.1.). Una serie de reacciones complejas llevan a la formación del quinto anillo, el cual contiene los grupos carbonilo, carbometoxi y metileno. Mauzerall (1976) ha propuesto una serie de mecanismos para explicar la función de este quinto anillo, en la Cl a.

Finalmente, se incorpora el grupo fitilo o geranil-geranilo (Katz y col., 1972) los cuales refuerzan fuertemente las propiedades hidrofóbicas de la molécula. Hasta el momento, se considera que la síntesis de la Cl precede a la de Bcl.

#### I.4. Referencias

- Gurenovich, G.P.; Sevchenko, A.N. & Solvev, K.N. (1968), "Spectroscopy of chlorophyll and related compounds", Atomic Energy Commission Translation 7199, Chemistry, Technical Information Division, 4500.
- Hansen, T.A. & Veldkamp, H. (1973), Arch. Microbiol. 92, 45.
- Jensen, A.; Aasmusdrud, O. & Einhjellen, K.E. (1964), Biochim. Biophys. Acta 88, 466.
- Juknat de Geralnik, A.A. (1983), Tesis de Doctorado (U.B.A.).
- Katz, J.J.; Strain, H.H.; Harkness, A.L.; Studier, M.H.; Svec, W.A.; Janson, T.R. & Cope, B.T. (1972), J. Am. Chem. Soc. 94, 7938.
- Keppen, O.I. & Gorkenko, U.M. (1975), Mikrobiologiya 44, 258.
- Lascelles, J. (1964), "Tetrapyrrole Biosynthesis and its Regulation", Benjamin, New York.
- Mandel, M.; Leadbetter, E.R.; Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 222.
- Maroc, J.; De Klerk, H. & Kamen, M.D. (1968), Biochim. Biophys. Acta 162, 621.
- Mauzerall, D. (1976), Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B. 273, 287.
- Pfennig, N. (1974), Arch. Microbiol. 100, 197.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 a), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 17.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 b), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 15.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 c), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 11.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1971 d), Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 19.
- Pfennig, N. & Trüper, H.G. (1974), "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8th ed. (Buchanan, R.E. & Gibbons N.E., eds.), The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 24.
- Rabinowitch, E.I. (1945), "Chemistry of Photosynthesis, Chemosynthesis and Related Processes *in vitro* and *in vivo*", Vol. I of Photosynthesis, Interscience, New York.
- Rabinowitch, E.I. (1951), "Spectroscopy and Fluorescence of Photosynthetic Pigments; Kinetics of Photosynthesis", vol II Part 1, of Photosynthesis, Interscience, New York.

- Rabinowitch, E.I. (1956), "Kinetics of Photosynthesis", addenda to Vol. I. y Vol. II, Part 1, vol II, Part 2 of Photosynthesis, Interscience, New York.
- Scheer, H.; Svec, W.A.; Cope, B.T.; Studier, M.H.; Scott, R.G. & Katz, J.J. (1974), J. Am. Chem. Soc. 96, 3714.
- Smith, J.H.C. & Benitez, A. (1955), "Modern Methods of Plant Analysis" (Paech, K. y Tracey, M.V., eds.), Springer-Verlag, Berlín, Vol IV, p. 142.
- Strain, H.H. & Svec, W.A. (1966), "The Chlorophylls" (Vernon, L.P. & Seely, G.R., eds.), Academic Press, New York, p. 21.
- Trüper, H.G. (1976), Int. J. Syst. Bacteriol. 26, 74.
- van Niel, C.B. (1944), Bacteriol. Rev. 8, 1.
- Vernon, L.P. & Seely, G.R. (eds.) (1966), "The Chlorophylls", Academic Press, New York.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

BIOSINTESIS DE UROPORFIRINOGENOS NATURALES.  
INTERACCIONES ENZIMATICAS EN LA FORMACION DEL MACROCICLO

por:

MONICA LIDIA KOTLER

DIRECTOR: Dra. Alcira M. del C. Batlle  
CONSEJERO: Dra. Alcira M. del C. Batlle

Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias  
(CIPYP). Departamento de Química Biológica. Facultad de  
Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas  
(CONICET)

Tesis presentada para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

1 9 8 8

2 158  
E. 2.

# **MATERIALES Y METODOS**

## MATERIALES Y METODOS

---

	Página
A. MATERIALES	257
B. METODOS	259
I. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	259
I.1. Fuente enzimática	259
I.2. Cultivo y crecimiento	259
I.3. Determinación de la relación entre el peso seco y la absorbancia	260
I.4. Extracción de la proteína enzimática	261
I.5. Sistema standard de incubación	262
I.5.1. Deaminasa soluble	262
I.5.2. Deaminasa insolubilizada	262
I.6. Separación de la proteína y productos de reacción	262
I.6.1. Deaminasa soluble	262
I.6.2. Deaminasa insolubilizada	263
I.7. Unidad enzimática	263
II. Hígado bovino	264
II.1. Fuente enzimática	264
II.2. Obtención de las enzimas purificadas	264
II.2.1. Purificación de la Deaminasa	264
II.2.2. Purificación de la Isomerasa	265
II.2.3. Purificación de la PBG-asa	265
II.3. Sistema standard de incubación	266
II.3.1. Deaminasa soluble	266
II.3.2. Deaminasa insolubilizada	266
II.3.3. Porfobilinogenasa	266
II.4. Separación de la proteína y productos de la reacción	267

	Página
II.4.1.    Deaminasa y PBG-asa solubles	267
II.4.2.    Deaminasa y PBG-asa insolubilizadas	267
II.5.    Unidad enzimática	267
III. Actividad enzimática, porfirinas y tipos isoméricos, pesos moleculares, inmovilización de enzimas	268
III.1. Determinación de la actividad enzimática	268
III.1.1. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas en medio ácido	268
III.1.2. Determinación del PBG	268
III.1.3. Determinación del contenido proteico	269
III.1.3.1. Método de Warburg y Christian	269
III.1.3.2. Método de Lowry	269
III.1.3.3. Método de Lowry modificado	270
III.1.3.4. Método de Bradford	270
III.2. Determinación del tipo isomérico y de las porfirinas formadas	271
III.2.1. Fraccionamiento y determinación de las porfirinas formada en las incubaciones	271
III.2.2. Determinación del tipo isomérico y las porfirinas formadas	271
III.3. Determinación del Peso Molecular (PM)	272
III.4. Técnicas para la inmovilización de enzimas	274
III.4.1. Activación de la Sepharosa 4B	274
III.4.2. Inmovilización de enzimas	276
III.4.2.1. Preparación de la Deaminasa inmovilizada	276
III.4.2.2. Preparación de la PBG-asa inmovilizada	276
C. REFERENCIAS	277



## A. MATERIALES

- Porfobilinógeno: El PBG se obtuvo enzimáticamente de acuerdo con la metodología descrita por Sancovich y col. (1970) a partir de ALA-D de hígado bovino y ALA (Sigma Chemical Co., USA).
- Peptona y extracto de levadura: La peptona y el extracto de levadura fueron marca Difco.
- Sulfato de amonio: Proveniente de Merck AG-Darmstadt, Alemania y de grado analítico. Se empleó como droga sólida calculándose los gramos a agregar para alcanzar un determinado porcentaje, mediante el nomograma correspondiente.
- Bromuro de cianógeno: El bromuro de cianógeno utilizado fue de Hoppe, Lab. Hoch.
- Geles de Sephadex y Sepharosa: Se emplearon los geles de Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia.
- Acido tricloroacético: Proveniente de Merck AG-Darmstadt, Alemania. La concentración se expresa como peso de ácido en gramos por 100 ml de solución.

Los solventes empleados en las cromatografías fueron de grado analítico o para uso espectrofotométrico. Los demás reactivos y solventes usados fueron también de grado P.A., provenientes de distintas fuentes comerciales.

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua desionizada y bidestilada.

### Equipos utilizados

Para la sonicación del tejido se empleó un equipo Soni-prep 150 (MSE).

Las centrifugaciones se realizaron en centrífugas refrigeradas International B<sub>20</sub> y Sorvall RC-5B.

Las determinaciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en espectrofotómetros Beckman modelos DB y 35 y Metrolab

RC 325 BD.

Las mediciones de pH se efectuaron en un Termo-pHmetro modelo TPX.

Las soluciones proteicas se concentraron en un equipo A micon empleando una membrana del tipo PM 10.

Las cromatografías para la caracterización y determinación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizaron en un cromatógrafo líquido de alta presión (HPLC) Varian modelo 5000, equipado con un inyector con loop (capacidad 10  $\mu$ l). La detección de las porfirinas a 404 nm fue efectuada con un detector de longitud de onda variable Varian modelo 50. El registro gráfico se obtuvo mediante un registrador Varian modelo 9176 y la integración de las áreas de cada pico de absorbancia se llevó a cabo mediante un integrador Varian modelo CDS 111 L. En este caso los solventes utilizados fueron de grado HPLC.

Las mediciones de radioactividad se llevaron a cabo en un contador de centelleo líquido Mark III, Tracor Analytic.

## B. METODOS

### I. *Rhodospseudomonas palustris*

#### I.1. Fuente enzimática

Se utilizó una cepa salvaje perteneciente a la colección de la cátedra de Microbiología e Inmunología (FCEN - UBA).

#### I.2. Cultivo y crecimiento

Las bacterias se hicieron crecer en el medio de Cohen-Bazire y col. (1957), modificado por la adición de peptona y extracto de levadura.

Para la preparación del medio se utilizaron tres soluciones cuya composición se detalla a continuación:

- Solución 1: Buffer fosfato de potasio 0,5 M pH 6,8

- <u>Solución 2</u> : Acido D-L-málico	134,0	g
Acido L(+)-glutámico	50,0	g
Acetato de sodio	50,0	g
Cloruro de amonio	50,0	g

Se ajusta el pH a 6,8 con NaOH (lentejas) y se lleva a un volumen final de 1 litro con agua destilada.

- <u>Solución 3</u> : EDTA disódico.2 H <sub>2</sub> O	12,8	g
MgSO <sub>4</sub>	14,5	g
CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	3,67	g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4 H <sub>2</sub> O	9,3	mg
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	99,0	mg
Acido nicotínico	50,0	mg
Clorhidrato de tiamina	25,0	mg
Biotina	1,0	mg
Metal "44"	50,0	ml

En primer lugar se disuelve el EDTA-disódico y se ajusta el pH a 6,8 con NaOH 10 M. La solución final de toda la mezcla se lleva a un volumen de 1 litro con agua destilada, controlándose el pH.

<u>Metal "44"</u> : EDTA disódico.2 H <sub>2</sub> O	2,9	g
ZnSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	10,95	g (2,5 g Zn)
FeSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	5,00	g (1 g Fe)

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,54 g (500 mg Mn)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,392 g (100 mg Cu)
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,248 g (50 mg Co)
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	0,177 g (2 mg B)

Se agregan unas gotas de ácido sulfúrico para retardar la precipitación y se lleva a 1 litro con agua destilada.

Para preparar 1 litro de medio se mezclan las soluciones en la siguiente relación:

- 40 ml solución 1
- 20 ml solución 2
- 20 ml solución 3

Se adiciona 1 g de extracto de levadura y 1 g de peptona y se lleva a 1 litro con agua destilada, controlándose el pH final.

Se esteriliza con vapor a 1,5 atm durante 15 minutos. Al autoclavarse se forma un precipitado considerable, que luego se redissuelve cuando el medio se enfría.

Para el mantenimiento de la cepa se utilizaron células crecidas a la luz sembradas por punción en tubos de agar (1%), conteniendo extracto de levadura (1%).

El crecimiento en medio líquido se efectuó en tubos de 30 ml, a partir de punciones del sólido, los cuales se transfieren luego a erlenmeyers de 125 ml. De esta forma se obtiene una cantidad suficiente de inóculo para repicar a erlenmeyers de 1 litro. El desarrollo se realizó a 30 °C durante aproximadamente 72 horas, en semianaerobiosis y bajo una intensidad luminosa de 900 ftc.

Las células se cosecharon por centrifugación a 12.000xg durante 10 minutos y se lavaron una vez con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8; almacenándolas a -20 °C hasta el momento de su uso.

### I.3. Determinación de la relación entre el peso seco y la absorbancia

Las células cosechadas y lavadas se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8.

Partiendo de diferentes resuspensiones bacterianas las cuales poseían distintos valores de absorbancia a 680 nm, se tomaron alícuotas que se secaron en estufa a 85 °C durante una

noche en vidrios de reloj previamente tarados (De Moss y Bard, 1957). En todos los casos se descontó el peso de las sales del buffer.

La curva de calibración obtenida (Figura I.1.) es una recta que corresponde a la ecuación:

$$\text{peso seco (mg/ml)} = 0,66 \times A_{680} \times \text{dilución}$$

#### I.4. Extracción de la proteína enzimática

Las células se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 hasta obtener una lectura de absorbancia de 0,500 a 680 nm (aproximadamente 60 mg/ml).

Una vez resuspendidas las células, se sonicó durante 60 segundos a una intensidad de 14  $\mu$ , en volúmenes de 10 ml. A continuación se efectuó una dilución 1:3 con el mismo buffer, obteniéndose de este modo la fracción Homogenato (H). Por centrifugación del H a 27,000xg durante 60 minutos se separaron las fracciones Sobrenadante (S) y Pellet (P).

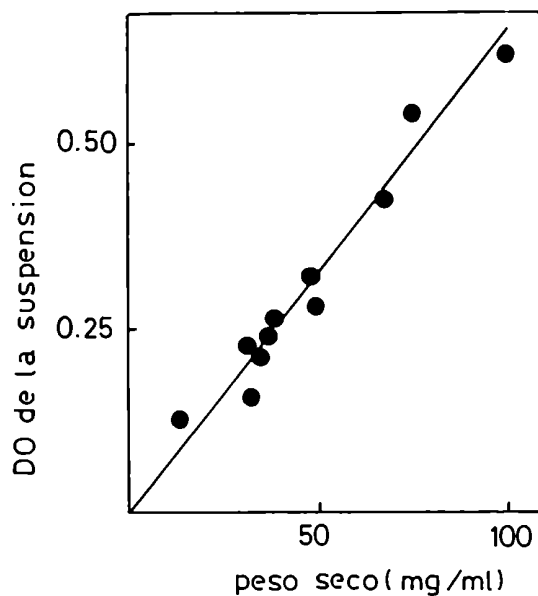


Figura I.1.: Curva de calibración que permite relacionar la absorbancia con el peso seco.

## I.5. Sistema standard de incubación

### I.5.1. Deaminasa soluble

El sistema standard de incubación contenía 50  $\mu$ l de fracción enzimática, 45  $\mu$ g de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 hasta completar un volumen final de 1,5 ml.

Se incubó a 37 °C, en oscuridad, con agitación continua y aerobiosis, durante 30 minutos, salvo se indique lo contrario.

Se efectuaron blancos de actividad enzimática, los cuales contenían sólo PBG y buffer. Así, todos los datos de actividad fueron corregidos considerando las porfirinas formadas y el PBG consumido no enzimáticamente.

### I.5.2. Deaminasa insolubilizada

Para la medición de la actividad de la enzima inmovilizada, el sistema standard de incubación fue el siguiente: 0,2 ml de Sepharosa-enzima (resuspendidos en 0,2 ml de buffer), 90  $\mu$ g de PBG y un volumen adecuado de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 suficiente para completar 3 ml.

Se incubó durante 30 minutos en aerobiosis, oscuridad, a 37 °C y con agitación mecánica vigorosa para evitar que el gel decante.

En todas las experiencias se realizaron blancos conteniendo los mismos componentes que las mezclas de reacción, excepto que la preparación enzimática fue reemplazada por igual volumen de buffer Tris-HCl. Estos blancos se incubaron en idénticas condiciones que el resto de las fracciones.

## I.6. Separación de la proteína y productos de la reacción

### I.6.1. Deaminasa soluble

Una vez finalizada la incubación se precipitó la proteína por agregado de un volumen adecuado de TCA 10% para alcanzar una concentración final de 5%. Se dejaron oxidar los porfirinógenos formados a porfirinas iluminando la mezcla con luz blanca

durante 20 minutos. El precipitado se filtró a través de papel plegado, lavándose 3 veces con 1 ml de TCA 5% cada vez.

Los filtrados se reunieron determinándose en los mismos las porfirinas totales formadas y el sustrato remanente.

#### I.6.2. Deaminasa insolubilizada

Luego de la incubación la mezcla se enfrió a 0 °C y se centrifugó a 4.000xg durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante y se lo trató con TCA 10% hasta una concentración final de 5%. La Sepharosa-enzima se lavó 5 veces con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8; los sobrenadantes de cada lavado se recogieron separadamente y se trataron de igual forma que el original. Posteriormente, las soluciones ácidas se iluminaron con luz blanca y se determinó su contenido en porfirinas y PBG.

#### I.7. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de porfirina/30 minutos o de consumir 1 nmol de PBG/30 minutos, bajo las condiciones experimentales antes descriptas.

La actividad específica se expresa entonces como nmoles porfirinas formadas/30 minutos por mg proteína o nmoles PBG consumido/30 minutos por mg proteína.

## II. HIGADO BOVINO

### II.1. Fuente enzimática

Se utilizó hígado bovino proveniente de animales recién faenados provisto por el Frigorífico Cocarsa S.A. guardado a -20 °C.

### II.2. Obtención de las enzimas purificadas

#### II.2.1. Purificación de la Deaminasa

Para la obtención de la Deaminasa y la Isomerasa purificadas de hígado bovino se siguió la metodología de Sancovich y col. (1969) con las modificaciones indicadas:

Etapa 1: Aproximadamente 100 g de hígado vacuno que se encontraba en las condiciones detalladas en II.1., se cortaron en pequeños trozos y se lavaron con solución fisiológica (NaCl 0,9%) con el objeto de eliminar la sangre del tejido. Luego los trozos se secaron sobre papel de filtro y se homogeneizaron en solución de sacarosa 0,25 M en relación 10% peso/volumen. Se obtuvo así la fracción Homogenato.

Etapa 2: Sobrenadante: Por centrifugación del homogenato a 11.000xg durante 30 minutos se obtuvo un precipitado o pellet que se descartó y el correspondiente Sobrenadante.

Etapa 3: Sobrenadante de pH 5: El sobrenadante de la etapa anterior se llevó a pH 5 con ácido acético glacial el cual se agregó gota a gota con constante agitación y se dejó en frío agitando durante 20 minutos. En estas condiciones se formó un precipitado proteico que se separó por centrifugación a 11.000xg durante 30 minutos obteniéndose el Sobrenadante de pH 5.

Etapa 4: Fracción 45-70% de sulfato de amonio: El sobrenadante de pH 5 se empleó como fuente de enzima. Para ello se lo llevó a 45% de saturación con sulfato de amonio por agregado lento y en frío de la sal finamente molida, evitando la formación de espuma. Durante este proceso se mantuvo el pH neutro por adición de NH<sub>3</sub> (c). Luego de 40 minutos de agitación se realizó una centrifugación a 11.000xg durante 10 minutos y el precipitado se descartó. El sobrenadante se llevó a 70% de saturación con sulfato de amonio teniendo en cuenta las precauciones antes indicadas. Nuevamente se centrifugó 10 minutos a 11.000xg; en este caso se descartó el sobrenadante y se continuó trabajando con el precipi



rado.

Etapa 5: Sobrenadante de calentamiento: El precipitado proteico obtenido en la etapa anterior se resuspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (gr) (volumen de cama = 100 ml;  $\phi_i = 2$  cm; largo de la columna: 50 cm). El eluido de esta columna se calentó en baño de agua a 65-70 °C durante 20 minutos. Transcurrido este tiempo la mezcla se enfrió rápidamente introduciendo el recipiente que contenía la solución proteica en un baño de hielo. Luego de una centrifugación de 20 minutos a 11.000xg se obtuvo un precipitado que se descartó y el sobrenadante resultante se llevó a 70% de saturación con sulfato de amonio obteniéndose un nuevo precipitado.

Etapa 6: Pasaje a través de una columna de Sephadex G-100: La fracción proteica proveniente de la etapa anterior se resuspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se pasó a través de una columna de Sephadex G-100 equilibrada con el mismo buffer.

De esta forma se obtuvo una fracción purificada 300 veces que produjo un 100% de uroporfirinógeno I.

#### II.2.2. Purificación de la Isomerasa

Se procedió en la forma indicada para la purificación de la Deaminasa hasta la etapa 4 inclusive. Luego, el sobrenadante proveniente de la centrifugación de la fracción 45-70% se llevó a 90% de saturación con sulfato de amonio; se centrifugó a 11.000xg durante 20 minutos y el precipitado resultante (70-90%) se utilizó como fuente de Isomerasa. Esta fracción incubada en presencia de Deaminasa (5° etapa de purificación) rindió entre 90 y 100% de porfirinas de tipo isomérico III.

#### II.2.3. Purificación de la PBG-asa

Se siguió la metodología de Sancovich y col. (1969) excluyendo la etapa de tratamiento con gel de fosfato de calcio y el pasaje final por Sephadex G-100. En estas condiciones se obtuvo una fracción purificada 180 veces la cual produjo 100% de porfirinas de tipo isomérico III.

### II.3. Sistema standard de incubación

#### II.3.1. Deaminasa soluble

Se procedió según la metodología descrita por Sancovich y col. (1969) disminuyendo el volumen total de los incubados a 2 ml para la determinación de la actividad de la enzima soluble. A menos que se indique lo contrario el sistema de incubación contenía 1 ml de enzima y 50  $\mu$ g de PBG en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4, NaCl 0,6 M:MgCl<sub>2</sub> 0,12 M (1:1) en la relación 0,2 ml/ml de incubado y fue llevado a 2 ml finales con el buffer mencionado.

Las condiciones de incubación fueron: aerobiosis, oscuridad, 37 °C y 2 horas con agitación mecánica, salvo se especifique lo contrario.

#### II.3.2. Deaminasa insolubilizada

Para las determinaciones de actividad de la enzima inmovilizada se empleó el mismo sistema standard que en el caso de la Deaminasa soluble con la diferencia de que el volumen de Sepharosa-enzima utilizado fue de 2 ml, manteniéndose en forma proporcional la relación de todos los demás componentes de la mezcla. Fue necesario mantener una buena agitación durante todo el período de incubación para evitar la decantación de la Sepharosa-enzima, asegurando de ese modo un buen contacto entre el gel y el sustrato PBG.

#### II.3.3. Porfobilinogenasa

Se siguió la metodología descrita por Sancovich y col. (1969) con las mismas modificaciones introducidas para la Deaminasa, tanto soluble como inmovilizada.

En todos los casos (Deaminasa y PBG-asa soluble o insoluble) se efectuaron blancos de actividad enzimática los cuales contenían sólo PBG y buffer.

#### II.4. Separación de la proteína y productos de la reacción

##### II.4.1. Deaminasa y PBG-asa solubles

Finalizada la incubación se precipitó la proteína por agregado de un volumen adecuado de HCl (c) tal que su concentración final fuese 5%. Posteriormente la mezcla se iluminó por espacio de 20 minutos con el fin de oxidar los porfirinógenos a porfirinas. El precipitado se filtró a través de papel plegado lavándose 3 veces con 1 ml de HCl 5% cada vez. Las porfirinas totales formadas y el PBG remanente se determinaron en el filtrado ácido.

##### II.4.2. Deaminasa y PBG-asa insolubilizadas

Se procedió en forma análoga al caso de la Deaminasa inmovilizada de *Rp. palustris* con la diferencia de que los sobrenadantes se trataron con HCl (c) hasta una concentración final de 5% y que el buffer empleado en los lavados de la Sepharosa-enzima fue Tris-HCl 0,05 M pH 7,4.

#### II.5. Unidad enzimática

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima capaz de sintetizar 1 nmol de porfirinas/2 horas o de consumir 1 nmol de PBG/2 horas, bajo las condiciones experimentales standard.

La actividad específica se expresa entonces como nmoles porfirinas formadas/2 horas por mg de proteína o nmoles PBG consumido/2 horas por mg proteína.

### III. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA, PORFIRINAS Y TIPOS ISOMÉRICOS, PESOS MOLECULARES, INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

#### III.1. Determinación de la actividad enzimática

##### III.1.1. Estimación espectrofotométrica de las porfirinas en medio ácido

La cantidad total de porfirinas formadas durante la incubación se determinó espectrofotométricamente en la solución ácida (Rimington, 1960).

Se leyó la densidad óptica a 380 nm, 430 nm y en el máximo de la banda de Soret (400-410 nm) ( $A_{max}$ ), calculándose la cantidad de porfirinas formadas empleando la fórmula corregida de Rimington y Sveinsson (1950);

$$\text{nmoles de porfirinas} = (2 A_{max} - (A_{380} + A_{430})) \times f \times v$$

donde  $v$  es el volumen de la solución,  $f$  un factor cuyo valor corresponde a 1,008 para la uroporfirina en solución de HCl 5% y  $A$  las absorbancias leídas a las longitudes de onda indicadas en los subíndices.

##### III.1.2. Determinación del PBG

El método de determinación de PBG (Moore y Labbe, 1964) se basa en su reacción con el p-dimetil-aminobenzaldehído (PDAMB) en medio ácido (reactivo de Ehrlich), para dar un compuesto rojizo. El reactivo está compuesto por una mezcla de PDAMB (2 g) en HCl (c) (25 ml) y AcOH (gl) (75 ml) y su ventaja radica en el hecho de que es muy estable durante largo tiempo si se lo conserva en frío y oscuridad.

Cookson y Rimington (1954) han establecido que la relación entre las concentraciones del aldehído y del ácido fuerte influyen en la velocidad de la reacción, en tanto que la concentración de ácido acético influye en el desarrollo de la intensidad de color.

### III.1.3. Determinación del contenido proteico

#### III.1.3.1. Método de Warburg y Christian

Las lecturas de densidad óptica realizadas a 280 nm dan normalmente una medida rápida y sensible del contenido proteico en ausencia de sustancias interferentes. Frecuentemente este no es el caso en preparaciones enzimáticas donde suelen estar presentes ácidos nucleicos que presentan una fuerte banda de absorción al U.V. Warburg y Christian (1941) eliminaron la interferencia de los ácidos nucleicos determinando la absorción a 260 y 280 nm de mezclas conocidas de proteínas y ácidos nucleicos y calculando los coeficientes de extinción correspondientes.

El contenido proteico se calculó empleando la ecuación de Kalckar (1947):

$$\text{mg proteína/ml} = (1,45 \times A_{280} - 0,74 \times A_{260}) \times \text{dilución}$$

Esta expresión da resultados comparables a los de Lowry cuando el contenido de ácidos nucleicos es bajo. Por esta causa, en nuestras experiencias se utilizó este método sólo en aquellos casos en que fue necesario estimar, en forma rápida, la cantidad de proteína presente.

#### III.1.3.2. Método de Lowry

Cuando se trabajó con preparaciones enzimáticas disueltas en buffer fosfato, la concentración proteica se determinó siguiendo la metodología de Lowry y col. (1951) que consiste en lo siguiente: a 0,4 ml de una dilución apropiada de la proteína se le agregan 2 ml de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en  $\text{NaOH}$  0,1N:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,5% en tartrato de sodio y potasio 1% (20:0,4 v/v). Se mezcla y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Luego se le añaden 0,2 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluído adecuadamente con agua; se agita rápidamente y se deja desarrollar el color azul característico del complejo formado. Luego de 30 minutos se lee la absorbancia a 660 nm y se calcula la cantidad de proteína aplicando la expresión:

$$\text{mg proteína/ml} = A_{660} \times f \times \text{dilución}$$

### III.1.3.3. Método de Lowry modificado

Con el fin de cuantificar en forma correcta el contenido proteico de extractos crudos se introdujeron algunas modificaciones a la técnica original de Lowry y col. (1951).

Se coloca 0,1 ml del extracto proteico en un tubo apropiado y se lo seca al vacío en un recipiente conteniendo una atmósfera deshidratante constituida por  $H_2SO_4$  (c) (30 ml) y un tubo de Pyrex con lentes de hidróxido de sodio. Para acelerar el proceso de secado se sumerge el recipiente en un baño de agua a 80 °C. Los vapores ácidos se neutralizan colocando un intermediario conteniendo lentes de hidróxido de sodio. La proteína seca se resuspende en NaOH 0,6 M y la mezcla se calienta en baño de agua a 40-50 °C durante 30 minutos. Luego se mezclan 0,4 ml de una dilución apropiada de esta solución proteica con 2 ml de una mezcla de composición similar a la descrita en el ítem anterior, pero sin NaOH. El resto de la metodología es idéntica a la detallada en el punto III.1.3.2.

### III.1.3.4. Método de Bradford

El método de Lowry y col. (1951) se halla sujeto a interferencias tales como iones potasio, iones magnesio, Tris, carbohidratos y reactivos de grupos tioles. Por esta causa, el contenido proteico de preparaciones enzimáticas en buffer Tris-HCl se determinó empleando la metodología de Bradford (1976).

A 0,1 ml de una dilución apropiada de la proteína en buffer Tris-HCl se le agregan 2,5 ml de una solución compuesta por 0,01 % (p/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7% (p/v) de etanol (95%) y 8,5% (p/v) de ácido fosfórico 85%. Se deja reaccionar y se mide la absorbancia a 595 nm luego de transcurridos 10 minutos, contra un blanco preparado con 0,1 ml de buffer apropiado y 2,5 ml del reactivo. El color se mantiene por espacio de 60 minutos.

La cantidad de proteína se calcula aplicando la expresión

$$\text{mg proteína/ml} = A_{595} \times f \times \text{dilución}$$

La curva de calibración se realizó empleando albúmina bo

vina como standard.

### III.2. Determinación del tipo isomérico y de las porfirinas formadas

#### III.2.1. Fraccionamiento y determinación de las porfirinas formadas en las incubaciones

Se siguió la metodología descrita por Batlle y Grinstein, 1964 que consiste en evaporar a sequedad en vacío, la solución ácida desproteínizada proveniente de la incubación y disolver el residuo en una mezcla de esterificación  $H_2SO_4:CH_3OH$  (5% v/v). Se deja en oscuridad a temperatura ambiente durante 24/36 horas.

La extracción y determinación cuantitativa de las porfirinas esterificadas se realizó según la técnica de Batlle y Grinstein (1962). Las porfirinas esterificadas se extrajeron con cloroformo lavándose con exceso de agua hasta acidez negativa. La emulsión formada ocasionalmente se destruyó mediante un lavado con NaCl 7%. La solución clorofórmica se filtró a través de papel plegado embebido en el mismo solvente y la cantidad total de porfirinas esterificadas presentes en el filtrado se determinó aplicando la siguiente expresión:

$$\mu\text{g porfirinas} = (2 A_{\text{max}} - (A_{380} + A_{430})) \times 2,721 \times v$$

donde:

v = volumen de la solución

2,721 = factor calculado para la uroporfirina esterificada (Cornford y Benson, 1963).

#### III.2.2. Determinación del tipo isomérico y las porfirinas formadas

La solución clorofórmica donde se midieron las porfirinas totales esterificadas se llevó a sequedad en baño de agua a 100 °C. El residuo se disolvió en un pequeño volumen de cloroformo de manera de obtener una concentración de 5-10  $\mu\text{g/ml}$ . Seguidamente, las porfirinas esterificadas se filtraron a través

de un filtro Millipore de 0,22  $\mu$ .

Para la separación de los ésteres metálicos de las porfirinas formadas se emplearon las condiciones propuestas por Polo y col. (1983):

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (55:45 v/v)
- Flujo: 2 ml/minuto
- Presión: 42-50 atm
- Tiempo de retención: 2 a 8 minutos
- Volumen de muestra inyectado: 10  $\mu$ l

En estas determinaciones se utilizó una columna rellena con Spherisorb S5W de Spectra-Physics ( $l = 25$  cm;  $\phi_i = 4,6$  mm) (Figura III.1.).

La determinación del tipo isomérico de las uroporfirinas esterificadas se llevó a cabo según la metodología de Polo y col. (resultados no publicados) empleando las siguientes condiciones:

- Solventes: acetato de etilo:n-hexano (40:60 v/v)
- Flujo: 1 ml/minuto
- Presión: 25 atm
- Tiempo de retención: 13 a 14,5 min
- Volumen de muestra inyectado: 10  $\mu$ l

En este caso se utilizó una columna Spherisorb S5W (Spectra-Physics) con relleno de sílica de 5  $\mu$ , provista de pre-columna con relleno de sílica de 10  $\mu$  SI 10 de Varian (Figura III.2.).

### III.3. Determinación del Peso Molecular (PM)

La determinación de los pesos moleculares de las proteínas se realizó empleando la técnica de filtración en geles que constituye un método rápido y sencillo para tales efectos.

El armado de las columnas así como el tratamiento previo de los geles fue el descrito por Batlle (1968). Se emplearon geles de dextrano (Sephadex), calculándose el PM según la metodología de Andrews (1964, 1965).

En el caso de proteínas globulares las determinaciones están afectadas por un error aproximado del 10%. Las causas de error más comunes son las diferencias de formas entre proteínas, la correcta determinación del volumen de elución y las diferencias de densidad de las soluciones proteicas.



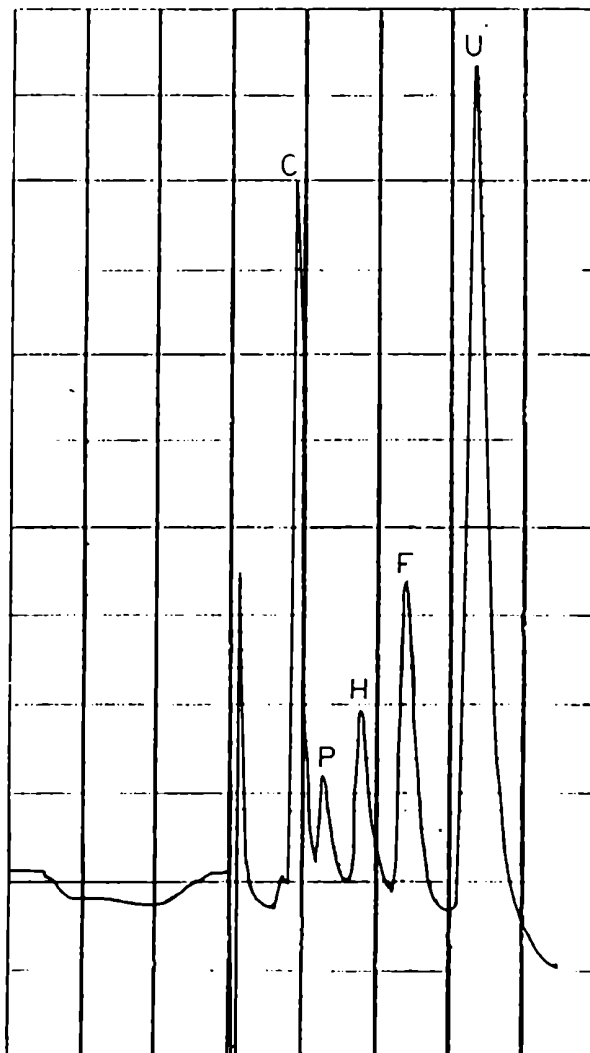


Figura III.1.: Cromatograma de separación de porfirinas esterificadas.

La calibración de las columnas se realizó con proteínas de peso molecular conocido graficándose  $V_e/V_o$  (siendo  $V_e$  = volumen de elución) en función del logaritmo del peso molecular. Se obtienen así curvas de calibración como la que se representa en la Figura III.3.

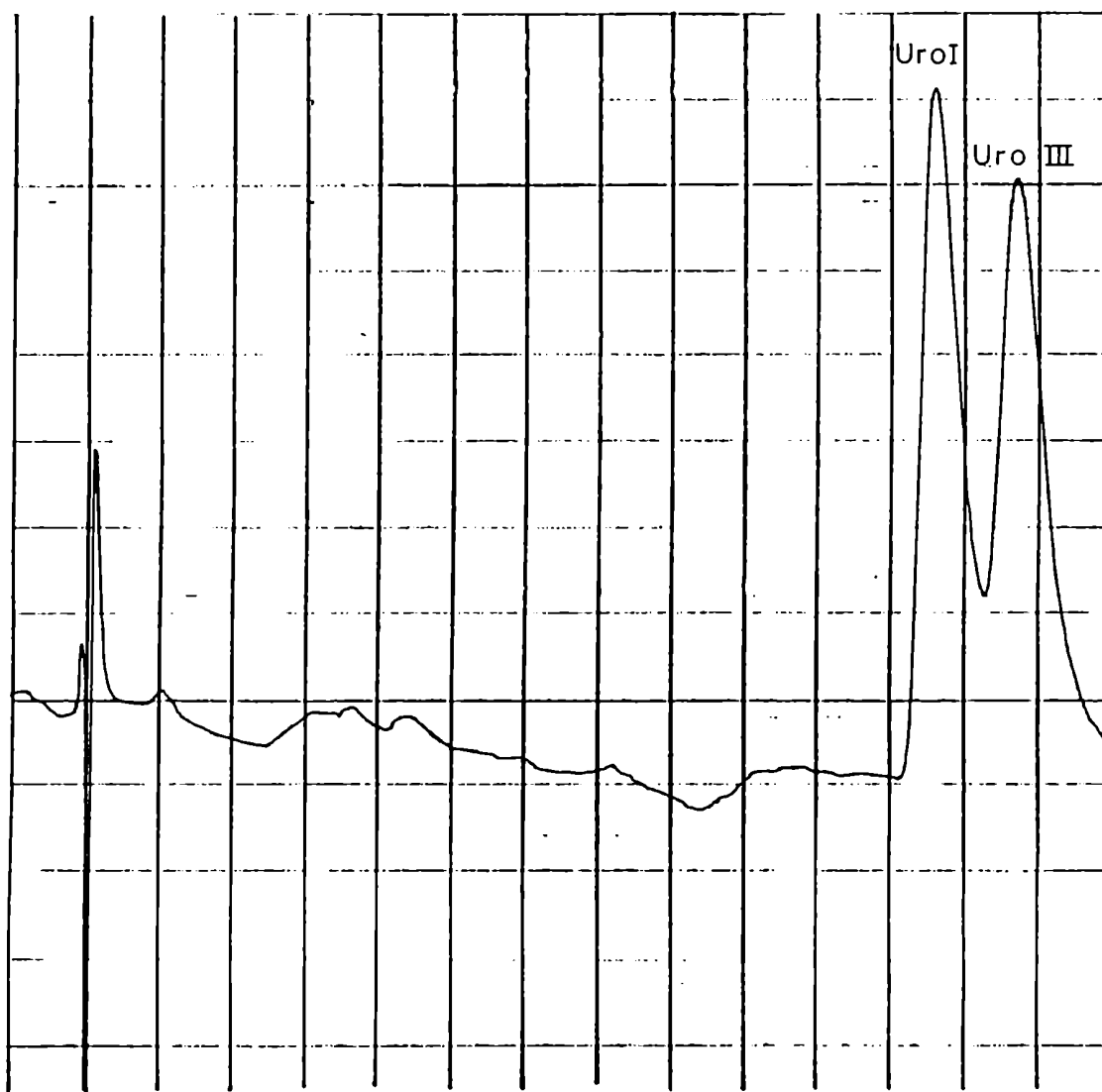


Figura III.2.: Cromatograma de separación de uroporfirinas esterificadas

#### III.4. Técnicas para la inmovilización de enzimas

##### III.4.1. Activación de la Sepharosa 4B

La Sepharosa 4B fue activada con bromuro de cianógeno (BrCN) siguiendo el procedimiento de Cuatrecasas (1970) que básicamente consiste en lo siguiente: un determinado volumen de

Sepharosa decantada se mezcla con igual volumen de agua fría, colocándose el recipiente en un baño de hielo. A la Sepharosa así resuspendida se le añade BrCN y se agita constantemente. La relación de mg de BrCN por ml de gel decantado empleada varió según el caso particular y se indicará en la parte de Resultados. Con el fin de mantener el pH alrededor de  $11 \pm 0,5$  (rango de pH óptimo para la reacción de activación) se agrega NaOH 5 M. La reacción se completa una vez que el BrCN se ha disuelto totalmente, condiciones bajo las cuales el pH se estabiliza.

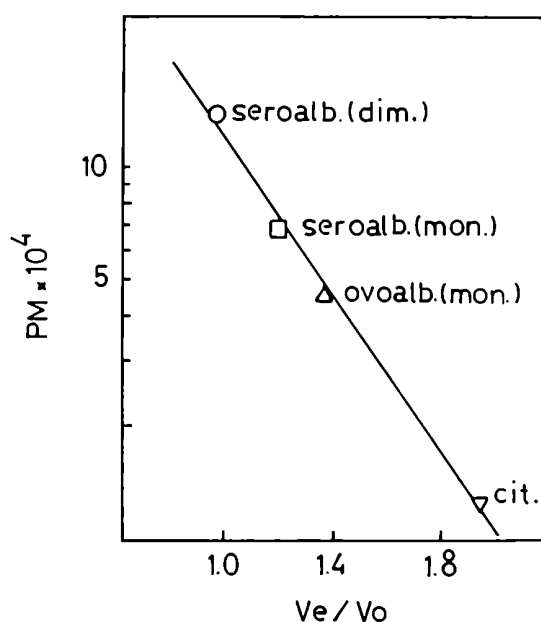


Figura III.3.: Curva de calibración para la determinación de PM, empleando una columna de Sephadex G-100.

La Sepharosa activada se vierte sobre un Buchner frío y se lava con 20 volúmenes de buffer bicarbonato 0,1 M pH 9,8 aplicando vacío suave para evitar que el gel se seque. Esta operación debe realizarse en un período de 2 a 5 minutos.

El gel así activado sirve como punto de partida para la inmovilización de enzimas como también para la preparación de adsorbentes biospecíficos de la enzima, por unión covalente de

su sustrato, ya sea directamente a la matriz o a través de brazos de distinta longitud.

#### III.4.2. Inmovilización de enzimas

##### III.4.2.1. Preparación de la Deaminasa inmovilizada

La Sepharosa activada fue resuspendida en igual volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 y se le agregó la solución de enzima en el mismo buffer (1 ml de enzima/ml de gel) en frío, lentamente y con agitación constante. La concentración de la proteína empleada fue de 7-8 mg/ml para la Deaminasa de *Rp. palustris* y de 20-30 mg/ml para la Deaminasa de hígado bovino. Luego se permitió el acoplamiento dejando la mezcla a 4 °C, con suave pero continúa agitación por espacio de 15 horas 30 minutos y de 12-14 horas para las enzimas de *Rp. palustris* e hígado bovino respectivamente.

Como de costumbre, se mantuvo paralelamente una preparación de la enzima en solución, en idénticas condiciones mecánicas.

Luego de transcurrido el tiempo de acoplamiento se procedió al lavado de la enzima insolubilizada, para lo cual se la empaquetó en una columna que se lavó posteriormente con buffer hasta elución negativa de proteínas. Ocasionalmente, en especial cuando se trabajó con volúmenes grandes, la enzima insolubilizada se lavó en batch.

La concentración de proteína unida a la matriz se determinó por diferencia entre la cantidad total empleada para el acople y la cantidad presente en los lavados.

##### III.4.2.2. Preparación de la PBG-asa inmovilizada

La PBG-asa insolubilizada de hígado bovino se obtuvo siguiendo la metodología de Rossetti y col. (1976). En este caso la relación ml de enzima:ml de Sepharosa decantada fue de 0,5:1 (20-40 mg de proteína/ml) y el tiempo de acople fue de 15 horas.

### C. REFERENCIAS

- Andrews, P. (1964), *Biochem. J.* 91, 222.
- Andrews, P. (1965), *Biochem. J.* 96, 595.
- Batlle, A.M. del C. (1968), *Ciencia e Investigación* 24 (6), 242.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1962), *Latin-Am. Meeting Chem.*, 8th, Buenos Aires, Abstr, p. 107.
- Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1964), *Biochim. Biophys. Acta* 82, 1.
- Bradford, M.M. (1976), *Analytical Biochem.* 72, 248.
- Cohen-Bazire, G; Sistrom, W.R. & Stanier, R.Y. (1957), *J. Cell Comp. Physiol.* 49, 25.
- Cookson, G.H. & Rimington, C. (1954), *Biochem. J.* 57, 476.
- Cornford, P.A.D. & Benson, A. (1963), *J. Chromatog.* 10, 141.
- Cuatrecasas, P.J. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 3059.
- De Moss, R.D. & Bard, R.C. (1957), "Manual of Microbiological Methods" , Society of American Bacteriologists (Pelczar, M.J.; Chairman), Mc Graw-Hill Co. Inc., New York, p. 169.
- Kalckar, H.M. (1947), *J. Biol. Chem.* 167, 461.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951), *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- Moore, D. & Labbe, R. (1964), *Clin. Chem.* 10, 1105.
- Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, J.M.; Altuna, C. & Magnin, P.H. (1983), *Prensa Med. Arg.* 70, 433.
- Polo, C.F.; Schoua, E. & Batlle, A.M. del C. (resultados no publicados).
- Rimington, C. (1960), *Biochem. J.* 75, 260.
- Rimington, C. & Sveinsson, S.L. (1950), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 2, 209.
- Rossetti, M.V.; Parera, V.E. & Batlle, A.M. del C. (1976), *Acta Physiol. Lationam.* 26, 371.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1970), "Methods in Enzymology" (Tabor, H. y Tabor, C.W., eds.) Academic Press, New York, vol. 17, p.220.
- Warburg, O. & Christian, W. (1941), *Biochem. Z.* 310, 384.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

## CAPITULO I

### AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA DEAMINASA DE *Rp. palustris*

	Página
I.1. Aspectos generales	278
I.2. Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento y medición de la actividad	279
I.2.1. Curva de crecimiento en función de los días de desarrollo	279
I.2.2. Efecto del tiempo y la intensidad de sonicación	280
I.2.3. Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas	283
I.2.4. Tiempo de incubación	284
I.2.5. Saturación por sustrato	284
I.2.6. Influencia de la cantidad de proteína enzimática	288
I.2.7. Curva de sustrato	290
I.2.8. pH óptimo de la reacción	292
I.3. Purificación de la enzima y determinación de su peso molecular	293
I.3.1. Purificación	293
I.3.2. Peso molecular	294
I.4. Propiedades de la enzima	296
I.4.1. Cinética de la reacción	296
I.4.2. Efecto de iones	299
I.4.2.1. Efecto de los iones magnesio	300
I.4.2.2. Efecto del anión fosfato	305
I.4.2.3. Efecto del ión amonio	312
I.5. Referencias	325

## I. AISLAMIENTO Y PROPIEDADES DE LA DEAMINASA DE *Rp. palustris*

### I.1. Aspectos generales

Como ya se señaló, el grupo de Jordan (Burton y col., 1979; Jordan y Seehra, 1979; Jordan y col., 1979; Scott y col., 1979, 1980; Jordan y Berry, 1980, 1981; Seehra y Jordan, 1980; Berry y Jordan, 1981; Evans y col., 1986 a, b) ha efectuado ex ten sos estudios acerca del mecanismo de acción de la Deaminasa proveniente de la bacteria fotosintética *Rp. spheroides*. A esta misma familia pertenece *Rp. palustris*, en la cual hasta el momento, la escasa información con que se cuenta acerca de las enzimas involucradas en el camino biosintético de los tetrapirroles, está limitada a investigaciones de nuestro laboratorio sobre el ALA-S (Viale, 1978; Viale y col., 1980 a, b, 1987), la Uro-Dcasa (Koopmann y col., 1986; Koopmann y Batlle, 1987) y la PBG-asa (Juknat, 1983). Estos hechos motivaron nuestro interés por el estudio de la Deaminasa de *Rp. palustris*, enzima que co mo ya mencionáramos forma parte del complejo enzimático de la PBG-asa y convierte PBG en uroporfirinógeno I.

Lógicamente, los primeros ensayos efectuados tuvieron co mo objeto determinar las condiciones más convenientes para detectar, extraer y medir la actividad enzimática en esta fuente. En este sentido, cabe mencionar que han resultado de suma utili dad los datos obtenidos por Juknat (1983) en los que nos hemos basado en algunas ocasiones y a los cuales haremos referencia.

Todos los datos aquí presentados corresponden o bien a promedios de ensayos repetidos, o bien a valores obtenidos en experiencias típicas y siempre cada cifra proviene de duplicados o triplicados. Los resultados son entonces perfectamente reproducibles.

Salvo se indique lo contrario, todas las operaciones se llevaron a cabo a una temperatura de 4-6 °C.

Las actividades enzimáticas se determinaron en base a la cantidad de producto(s) formado(s) y también en base a la canti dad de PBG consumido. En algunos casos se informarán ambos valo res y en otros sólo los primeros haciendo mención en el texto a cerca de los segundos.



## I.2. Determinación de las condiciones óptimas para el aislamiento y medición de la actividad

### I.2.1. Curva de crecimiento en función de los días de desarrollo

El crecimiento bacteriano puede definirse en términos de la masa del material celular o del número de células. Estos dos parámetros se mantienen proporcionales durante la fase estacionaria pero su relación puede variar con las condiciones de crecimiento. En los estudios bioquímicos, la concentración de una enzima o de un compuesto se refiere generalmente a la masa bacteriana en tanto que para los estudios genéticos o de infección es más conveniente el empleo del número de células.

La masa celular se puede determinar en forma directa en función del peso seco o indirectamente, por ejemplo, en base al contenido de nitrógeno. No obstante, el parámetro más frecuentemente utilizado es la turbidez ya que en este caso, una rápida medición espectrofotométrica permite conocer la densidad del cultivo y seguir las distintas fases del crecimiento bacteriano. En nuestro caso se empleó como medida de turbidez la densidad óptica a 680 nm obteniéndose la curva que se ilustra en la Figura I.1.

Bajo condiciones nutricionales adecuadas las curvas de crecimiento bacteriano exhiben tres fases clásicas: la fase lag, la exponencial y la estacionaria. Evidentemente el comportamiento observado en nuestro caso está de acuerdo con estas características.

Cabe mencionar que en nuestro laboratorio (Juknat, 1983) se ha medido la actividad de PBG-asa de *Rp. palustris* en función de los días de desarrollo. Se observó que el aumento en la cantidad de producto formado era lento y lineal y que recién después de las 60 horas de crecimiento, cuando las células ya se encontraban en fase estacionaria este incremento era más importante.

Teniendo en cuenta nuestros resultados y los hallazgos de Juknat (1983) se decidió cosechar el tejido al finalizar la fase exponencial (72 horas) para evitar la acumulación de algún producto metabólico tóxico y/o el agotamiento de algún nutriente esencial.

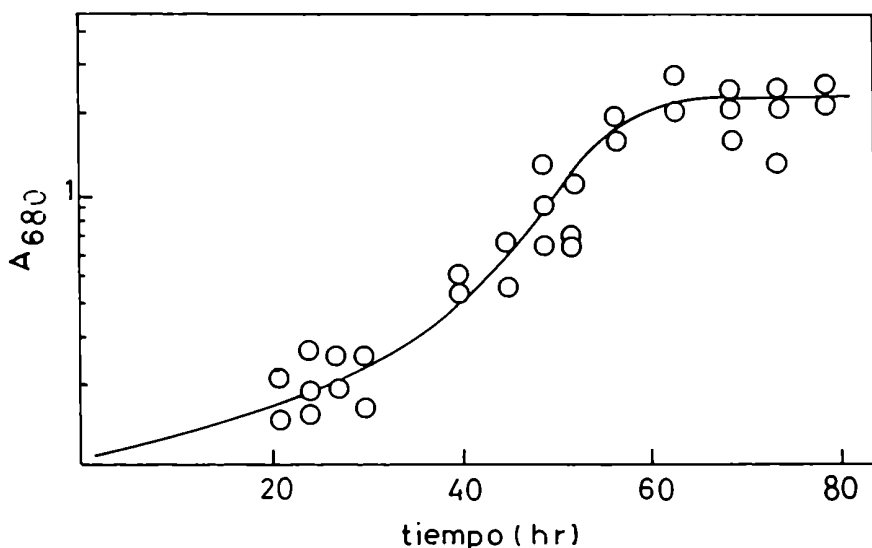


Figura I.1.: Curva de crecimiento en función de los días de desarrollo. La obtención de la fracción Sobrenadante es la descrita en Materiales y Métodos.

#### I.2.2. Efecto del tiempo y la intensidad de sonicación

Es conocido que la técnica de homogeneización por ultrasonido permite obtener en algunos casos, preparaciones enzimáticas activas. Para la PBG-asa de *Rp. palustris* esta técnica había resultado la más conveniente para extraer la proteína enzimática en comparación con la homogeneización mecánica en un Potter-Elvehjeem (Juknat, 1983). En consecuencia, se decidió analizar los efectos de la sonicación durante intervalos variables de tiempo y a diferentes intensidades. Con este fin se sonicaron volúmenes iguales de la fracción Homogenato durante períodos de 15, 30, 60, 90 y 120 segundos a 8, 14 y 22  $\mu$  de intensidad. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura I.2.

Como era de esperar, la cantidad de proteína liberada aumenta con el tiempo de sonicación y la intensidad aplicada (Figura I.2.A)

Los mayores valores de actividad específica en función de las porfirinas formadas se obtienen luego de 60 y 90 segun-

dos de sonicación para las intensidades de 14 y 8  $\mu$  respectivamente (Figura I.2.B).

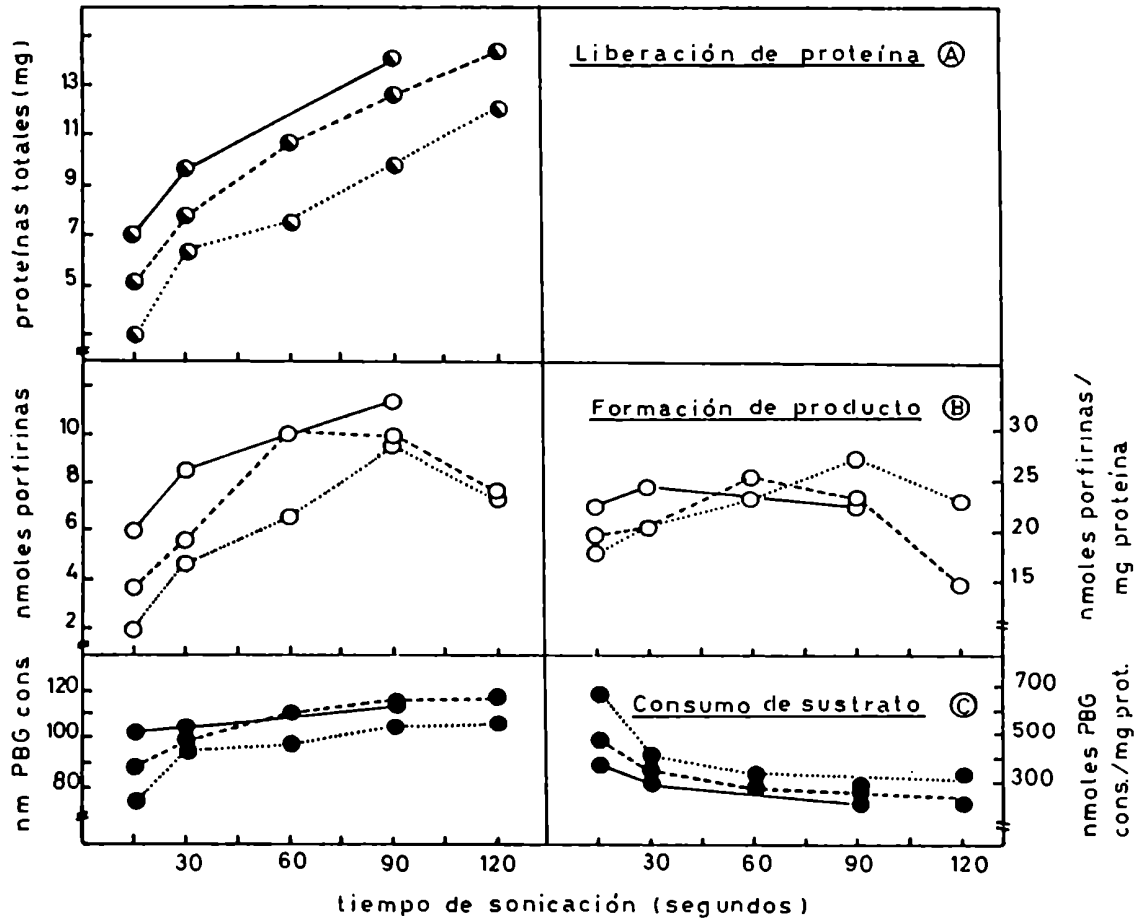


Figura I.2.: Efecto del tiempo y la intensidad de sonicación sobre la liberación de proteína (A), la formación de porfirinas (B) y el consumo de sustrato (C). El sistema de incubación contenía 60  $\mu$ g de PBG y 0,2 ml de fracción enzimática, ambos en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 60 minutos, en aerobiosis y oscuridad, con agitación continua. La actividad enzimática se midió en la fracción Sobrenadante obtenida como se detalla en Materiales y Métodos. Las muestras se sometieron a los tiempos de sonicación indicados y a diferentes intensidades: (.....) 8  $\mu$ , (-----) 14  $\mu$ , (——) 22  $\mu$ .

El consumo de sustrato aumenta sólo ligeramente con la intensidad de manera que cuando se calculan las actividades específicas correspondientes, se aprecia una disminución de las mismas (Figura I.2.C).

Con respecto al tipo de porfirinas e isómeros producidos por las distintas fracciones no se observaron cambios significativos (Tabla I.1.).

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió emplear 60 segundos y 14  $\mu$  como condiciones óptimas de sonicación.

Tabla I.1.: Efecto del tiempo y la intensidad de sonicación sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas

Int( $\mu$ )-t(seg)	Suburo (%)	Uro I (%)	Uro III (%)	Firia (%)	Hexa (%)	Penta (%)	Copro (%)
8 - 15			no	registra			
8 - 30			no	registra			
8 - 60	2	34	48	3	1	3	9
8 - 90	2	41	54	3	-	-	-
8 - 120	8	45	42	3	-	-	2
14 - 15			no	registra			
14 - 30	6	39	55	-	-	-	-
14 - 60	10	36	50	3	-	-	1
14 - 90	8	31	59	-	-	-	2
14 - 120	9	33	55	3	-	-	-
22 - 15	-	41	49	4	-	2	4
22 - 30		41	52	-	-	-	3
22 - 60	-	43	51	6	-	-	-
22 - 90	7	34	50	5	-	-	4

Las cromatografías se realizaron según el método cuantitativo de Poloy col. (1983 y resultados no publicados).

### I.2.3. Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas

Uno de los procedimientos más frecuentemente empleados para la purificación de la Deaminasa consiste en someter a un proceso de calentamiento preparaciones del complejo de la PBG-asa. Debido a que la Isomerasa es termolábil y la Deaminasa termoestable, se separa así fácilmente esta última por inactivación de la primera.

Con el fin de obtener una preparación de Deaminasa muy activa y libre de Isomerasa se llevó a cabo una experiencia en la cual, en primer lugar, se sometió la fracción Sobrenadante de 27.000xg a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio separándose la proteína que precipita en un rango de 35-55% de saturación. Prácticamente el total de la proteína enzimática se concentra en esta fracción lográndose además de una significativa purificación, una disminución del 50% de uroporfirinógeno III con respecto a la etapa anterior (Juknat, 1983).

Luego, la fracción 35-55% se resuspendió en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (gr) (volumen de cama = 110 ml;  $\phi_i = 2$  cm; longitud de la columna = 50 cm). Posteriormente la fracción 35-55% desalada se calentó a distintas temperaturas, con agitación constante y durante intervalos variables como se indica en la Figura I.3. Concluido cada período, las preparaciones se enfriaron inmediatamente en baño de hielo y se centrifugaron a 13.000xg durante 20 minutos, separándose la proteína precipitada. La actividad enzimática se determinó en el sobrenadante al que denominamos Sobrenadante de calentamiento.

Se observa que por efectos del calentamiento las proteínas totales disminuyen, en mayor proporción a tiempos y temperaturas mayores. Es importante destacar que ya a la menor temperatura estudiada (55 °C) se apreció una notable activación del sistema. A 60 °C esta activación es mayor aún alcanzando el máximo luego de 20 minutos de calentamiento.

En cuanto al tipo de porfirinas formadas, resulta sorprendente que aún para altas temperaturas y prolongados períodos de calentamiento, no se haya destruido completamente la Decarboxilasa, que en la mayoría de las fuentes estudiadas también es lábil al tratamiento con calor.

De acuerdo con estos resultados se consideró que un ca-

lentamiento a 65 °C durante 5 minutos eran el tiempo y la temperatura más convenientes para lograr una mayor inactivación de la Isomerasa. En estas condiciones si bien la actividad específica es algo inferior a la obtenida calentando a 60 °C y 20 minutos, el porcentaje de tipo I formado es más favorable.

En estudios posteriores y salvo se indique lo contrario las experiencias se llevarán a cabo empleando la fracción Sobrenadante de calentamiento obtenida según se ha descrito.

#### I.2.4. Tiempo de incubación

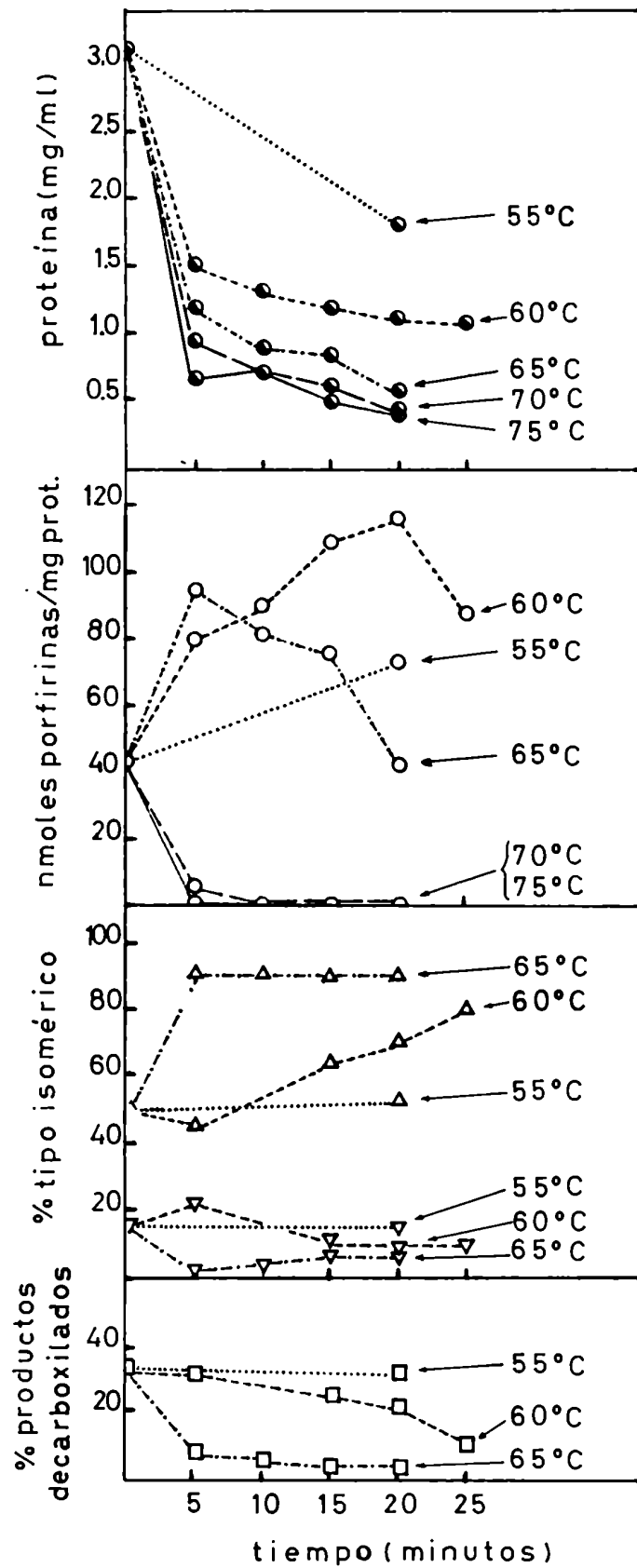
En los ensayos iniciales descritos se ha empleado como tiempo de incubación 60 minutos. Sin embargo, dada la elevada actividad de la Deaminasa de nuestra fuente y con el fin de optimizar las condiciones experimentales se estudió más en detalle el efecto de este parámetro sobre la actividad enzimática.

En la Figura I.4. se observa que expresando la velocidad de la reacción en función de las porfirinas totales formadas o en base a su actividad específica, existe un incremento lineal con el tiempo por lo menos hasta los 60 minutos. De acuerdo con estos datos se decidió emplear 30 minutos como tiempo standard ya que en ese período se biosintetiza suficiente cantidad de porfirinas como para poder realizar un estudio completo de los productos formados.

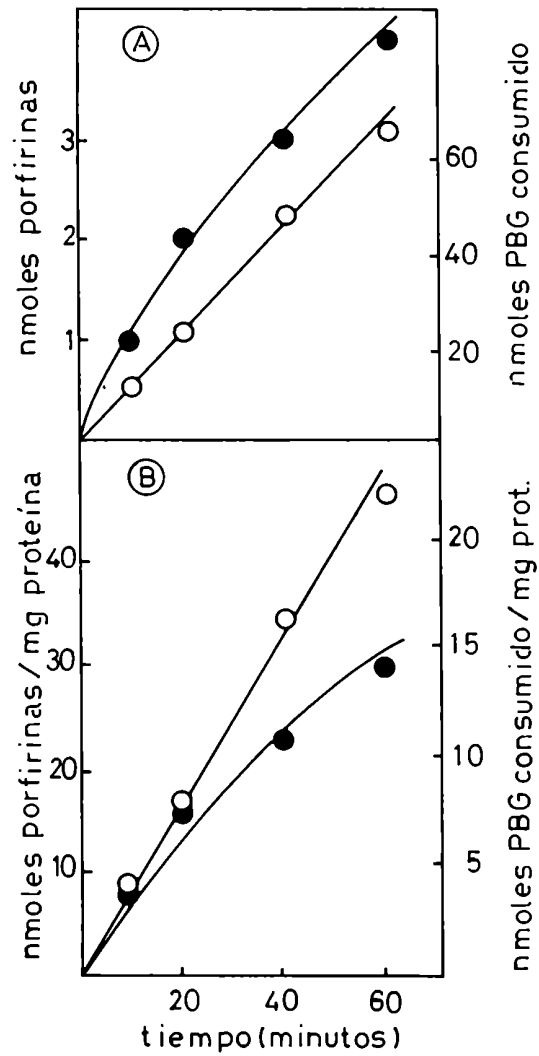
Las curvas obtenidas para el caso del sustrato consumido y su correspondiente actividad específica no mostraron un comportamiento lineal. Si bien la actividad específica aumenta con el tiempo de incubación para todos los puntos estudiados, parecería tender a una meseta a tiempos mayores indicando que no habría consumo adicional de sustrato a intervalos más prolongados.

#### I.2.5. Saturación por sustrato

Hasta el momento se había empleado una concentración de PBG del orden de 177  $\mu\text{M}$  (60  $\mu\text{g}$  en un volumen final de 1,5 ml) en las mezclas de incubación. Se decidió entonces realizar una curva de saturación por sustrato con el fin de determinar la concentración óptima de PBG a emplear en las incubaciones.



**Figura 1.3.:** Efecto de la temperatura y el tiempo de calentamiento sobre el tipo isomérico y las porfirinas formadas. El sistema de incubación contiene 0,2 ml de fracción enzimática y 60  $\mu$ g de PBG en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 60 minutos siendo el resto de las condiciones las standard. ( $\Delta$ ) Tipo isomérico I; ( $\nabla$ ) tipo isomérico III.



**Figura I.4.:** Efecto del tiempo de incubación. El sistema de incubación contenía 0,1 ml de fracción enzimática y 60  $\mu$ g de PBG en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. La fracción enzimática empleada fue el Sobrenadante de ca-lentamiento. El a-nálisis del tipo isomérico de las fracciones reveló un 90% de tipo isomérico I.  
 (○) Porphirinas;  
 (●) PBG



En la Figura 1.5. se encuentran graficadas las actividades específicas correspondientes al producto formado y al sustrato consumido. Como ya fuera observado con la Deaminasa de otras fuentes (Sancovich y col., 1969 a; Frydman y Frydman, 1970; Llambías y col., 1971; Frydman y Feinstein, 1974; Williams y col., 1981; Farmer y Hollebone, 1984), la curva de formación de porfirinas resultó Michaeliana. Más adelante nos ocuparemos en detalle de la cinética de esta reacción.

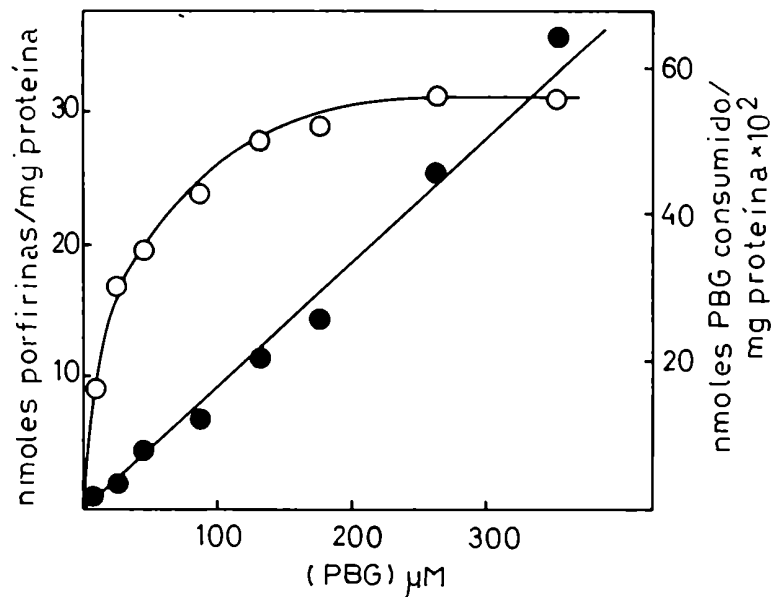


Figura 1.5.: Saturación por sustrato.

El sistema de incubación contenía 0,1 ml de fracción enzimática en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 y cantidades variables de una solución de PBG en el mismo buffer. Se incubó durante 30 minutos siendo el resto de las condiciones las standard. La fracción enzimática empleada fue el Sobrenadante de calentamiento.  
 (○) nmol de porfirinas formadas/mg de proteína; (●) nmol de PBG consumido/mg de proteína.

La curva de consumo de sustrato muestra un comportamiento lineal al aumentar la concentración de PBG en la mezcla de incubación, sin llegar a la saturación.

En base a estos datos se decidió continuar empleando una

concentración de sustrato de 177  $\mu\text{M}$ .

Sería lógico suponer que en las reacciones de síntesis de porfirinas a partir de PBG debería existir una relación estequiométrica de 4 moles de PBG por 1 de porfirinógeno. Sin embargo, no se ha observado este comportamiento con la PBG-asa de callos de soya (Llambías, 1971) y *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) y tampoco para la misma enzima proveniente de *Rp. palustris* (Juknat, 1983). Esta última empleó un exceso de tres veces la cantidad de PBG para las primeras concentraciones de sustrato estudiadas (correspondientes a la zona sigmoidea de la curva de saturación); luego entre 40 y 130  $\mu\text{M}$ , hasta llegar a la zona de saturación, consumió el doble de PBG por cada mol de porfirinógeno formado y finalmente la relación aumentó en forma lineal hasta aproximadamente 450  $\mu\text{M}$ .

En el caso de la Deaminasa de *Rp. palustris* (Tabla I.2. y Figura I.6.) se emplea un exceso de aproximadamente 5 veces la cantidad de PBG para las concentraciones 8,85 y 26,55  $\mu\text{M}$  de sustrato y luego la relación aumenta hasta 354  $\mu\text{M}$  siendo R mucho mayor que para el caso de la PBG-asa (Juknat, 1983).

Estos resultados estarían de acuerdo con la hipótesis de Battersby y col. (1983) según la cual la Deaminasa de *E. gracilis* es inhibida por su propio producto, el hidroximetilbilano. En presencia de Isomerasa este efecto se ve atenuado debido a la utilización, por parte de la enzima, del HMB, sustrato de la misma. Esto explicaría entonces la diferencia en el parámetro R observada al comparar la PBG-asa y Deaminasa de *Rp. palustris*.

#### I.2.6. Influencia de la cantidad de proteína enzimática

Con el objeto de optimizar aún más las condiciones para la medición de la actividad enzimática de la Deaminasa, se estudió entonces la influencia de la cantidad de proteína sobre la actividad (Figura I.7.). Nuevamente se empleó como fracción enzimática el Sobrenadante de calentamiento.

En la Figura I.7.A se observa que los nmoles de porfirinas totales formadas aumentan linealmente con cantidades de proteína crecientes; sin embargo, con el PBG consumido no sucede lo mismo, alcanza un máximo y luego no se consume más sustrato si bien todavía queda alrededor de un 40% remanente. Este hecho está de acuerdo con lo discutido en el ítem anterior acerca de

la ausencia de una relación estequiométrica entre el sustrato consumido y el producto formado y se ha encontrado también utilizando la PBG-asa de *Euglena gracilis* (Rossetti, 1978) y la de *Rp. palustris* (Juknat, 1983).

Tabla I.2.: Estequiometría de la reacción de conversión de PBG en porfirinas para la Deaminasa de *Rp. palustris*

PBG AGREGADO			PBG CONSUMIDO		PORFIRINAS FORMADAS		P.
µg	nmoles	µM	µg	nmoles	nmoles		t/r **
					Teóricos*	Reales	
3	13,27	8,85	2,55	11,28	2,82	0,58	4,86
9	39,82	26,55	4,96	21,95	5,49	1,08	5,08
15	66,37	44,25	11,53	51,02	12,76	1,27	10,05
30	132,72	88,50	17,55	77,65	19,41	1,54	12,60
45	199,12	132,74	29,34	129,82	32,45	1,80	18,03
60	265,49	177,00	37,02	163,81	40,95	1,87	21,90
90	398,23	265,49	65,47	289,69	72,42	2,04	35,50
120	530,97	353,98	92,35	408,63	102,16	2,00	51,08

(\*) Calculado en base al PBG consumido

(\*\*) relación = nmoles porfirinas teóricas/nmoles porfirinas reales.

Podría suceder entonces que ya para el volumen de enzima de 50 µl (0,077 mg de proteína) se hubiera utilizado el máximo de cantidad de PBG disponible agregado, para la formación de los intermediarios polipirrólicos. De esta forma, un aumento adicional de proteína enzimática no llevaría a un aumento adicional en el consumo de PBG dado que éste ya habría sido totalmente utilizado, aunque sí sería necesaria para llevar adelante la ciclación de los polipirrimetanos y final formación de los uroporfirinógenos que es lo que se observa experimentalmente.

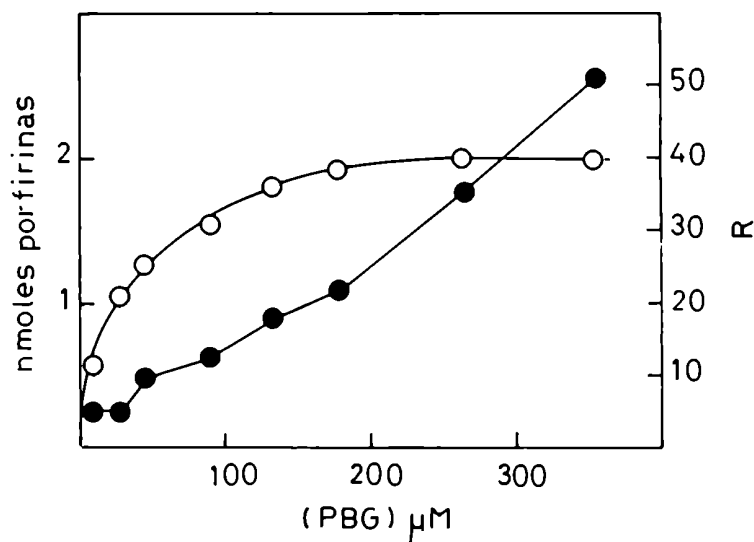


Figura I.6.: Curva de saturación por sustrato.  
 R: relación entre la cantidad de porfirinas obtenidas teóricas y experimentalmente  
 R: nmoles porfirinas teóricas/nmoles porfirinas experimentales (●)

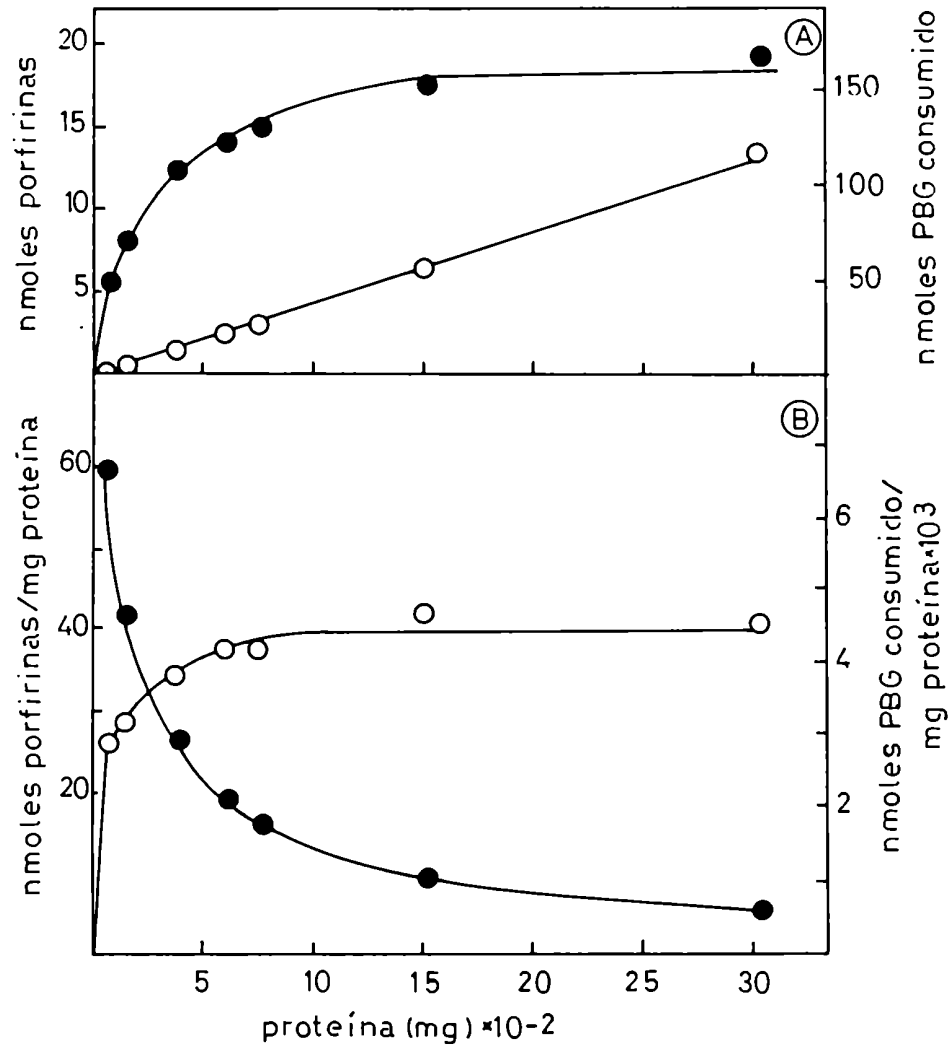
Los gráficos correspondientes a las actividades específicas en función de las porfirinas formadas y del PBG consumido están de acuerdo con lo ya discutido (Figura I.7.B). Vemos que la actividad específica en función del producto formado aumenta hasta un máximo para 0,077 mg de proteína, para luego permanecer constante; en cambio, cuando se la expresa en función del sustrato consumido, decrece hasta un valor determinado y luego no se altera por mayor adición de proteína.

En base a los resultados obtenidos se decidió emplear 50  $\mu\text{l}$  (aproximadamente 0,08 mg de proteína) como volumen de fracción enzimática.

#### I.2.7. Curva de sustrato

Una vez seleccionado el volumen de 50  $\mu\text{l}$  (0,08 mg de proteína) como el más conveniente para la medición de la actividad

de la Deaminasa de *Rp. palustris*, se planteó la necesidad de re-examinar el comportamiento del sistema en base a la presencia de cantidades variables de sustrato, es decir, obtener una nueva curva de saturación utilizando dicha cantidad de enzima.



**Figura I.7.:** Efecto de la cantidad de proteína enzimática.  
 El sistema de incubación contenía 60  $\mu$ g de PBG y fracción enzimática disueltos en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. El tiempo de incubación fue de 30 minutos. La concentración de la fracción enzimática empleada fue 1,54 mg/ml.  
 (○) porfirinas totales formadas  
 (●) PBG consumido

Como era de esperar, los perfiles obtenidos fueron similares a los de la Figura I.5. (Figura I.8.)

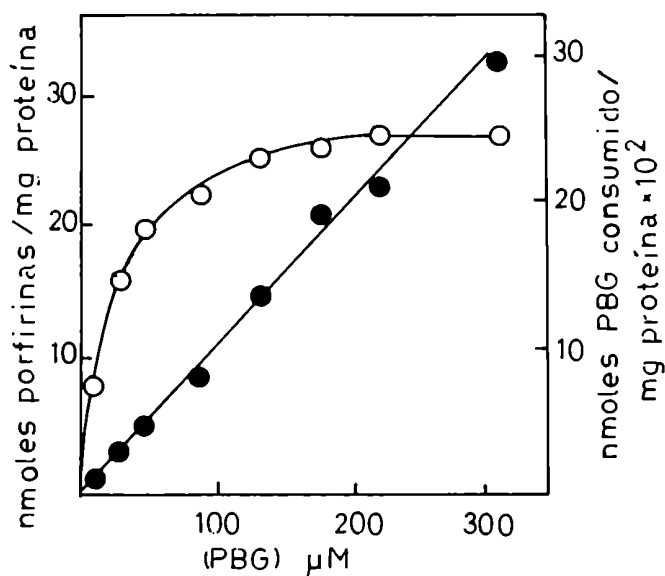


Figura I.8.: Curva de sustrato  
Se incubó en las condiciones standard con cantidades de PBG variables.  
(○) nmoles porfirinas formadas/mg proteína  
(●) nmoles PBG consumido/mg proteína

Finalmente, de acuerdo con estos datos se resolvió reducir la concentración de PBG a 133 µM, manteniendo el resto de las variables según se ha indicado.

#### I.2.8. pH óptimo de la reacción

En la mayoría de las fuentes estudiadas el pH óptimo para la reacción de formación de uroporfirinógenos a partir de PBG, se encuentra en la zona neutra.

Empleando células frescas de *Rp. palustris* se prepararon suspensiones en distintos buffers de concentración 0,05 M y a varios pH's a partir de las cuales se obtuvieron posteriormente, siguiendo el procedimiento de rutina, las diferentes fracciones

Sobrenadante de calentamiento que fueron utilizadas como fuente de Deaminasa.

Los buffer's y pH's utilizados fueron los siguientes: buffer fosfato de sodio 0,05 M pH's 6,0; 6,5; 7,0; 7,4 y 7,8; buffer Tris-HCl 0,05 M pH's 7,4; 7,8; 8,0; 8,4; 8,7 y 8,9 y buffer glicina-NaOH 0,05 M pH's 9,1; 9,4; 10,0 y 10,6.

En la Figura I.9.A se observa que la reacción que lleva a la síntesis de porfirinas tiene un pH óptimo que se encuentra en un rango de 7,6-7,8 descendiendo la actividad bruscamente para pH's extremos.

Si la actividad enzimática se mide en función del PBG consumido, el rango de pH óptimo es algo más amplio, ubicándose entre 7,4 y 7,8 (Figura I.9.B).

Por otra parte, notemos que empleando buffer fosfato la actividad resultó mayor que con buffer Tris-HCl y para el caso del buffer glicina-NaOH no se detectó formación de porfirinas, aunque sí consumo de sustrato, pero siempre en niveles muy bajos.

De acuerdo con estos datos se decidió emplear buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 tanto para la extracción de la proteína como para la medición de la actividad enzimática.

### I.3. Purificación de la enzima y determinación de su peso molecular

#### I.3.1. Purificación

Los ensayos preliminares que se llevaron a cabo para obtener una fracción purificada de Deaminasa, ya fueron considerados en las secciones I.2.2. y I.2.3.

Describiremos ahora la secuencia de pasos finalmente establecida (Tabla I.3.):

- Etapa 1: Homogenato: Se preparó según se detalla en Métodos. Las células se resuspendieron en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 y la dilución se efectuó en el mismo buffer.
- Etapa 2: Sobrenadante de 27.000xg: por centrifugación del Homogenato a 27.000xg durante 60 minutos se separó el sobrenadante, al que denominamos Sobrenadante de 27.000xg y el Pellet inactivo (Juknat, 1983) que se descartó.

- Etapa 3: Fraccionamiento con sulfato de amonio: el sobrenadante de la etapa anterior se trató con sulfato de amonio sólido, hasta un 35% de saturación. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se llevó hasta 55% de saturación. Durante todo el proceso el pH se mantuvo neutro por agregado de amoníaco (c). Luego de 40 minutos de agitación, se centrifugó 10 minutos a 10.000xg. De este modo se obtuvo la fracción 35-55%.
- Etapa 4: Sobrenadante de calentamiento: el precipitado proveniente de la etapa anterior se resuspendió en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 y se desaló por pasaje a través de una columna de Sephadex G-25 (gr). El eluido se calentó a 65 °C durante 5 minutos y luego se enfrió inmediatamente en hielo. Por centrifugación a 13.000xg durante 20 minutos se obtuvo la fracción Sobrenadante de calentamiento. Este sobrenadante se llevó a 55% de saturación con sulfato de amonio en las condiciones usuales, se centrifugó a 10.000xg 10 minutos y se guardó el precipitado obtenido a -20 °C.
- Etapa 5: Cromatografía en Sephadex G-100: el precipitado proteico salino proveniente de la etapa 4, se disolvió en el menor volumen de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 y se sembró en una columna de Sephadex G-100 (2,5 x 57 cm).

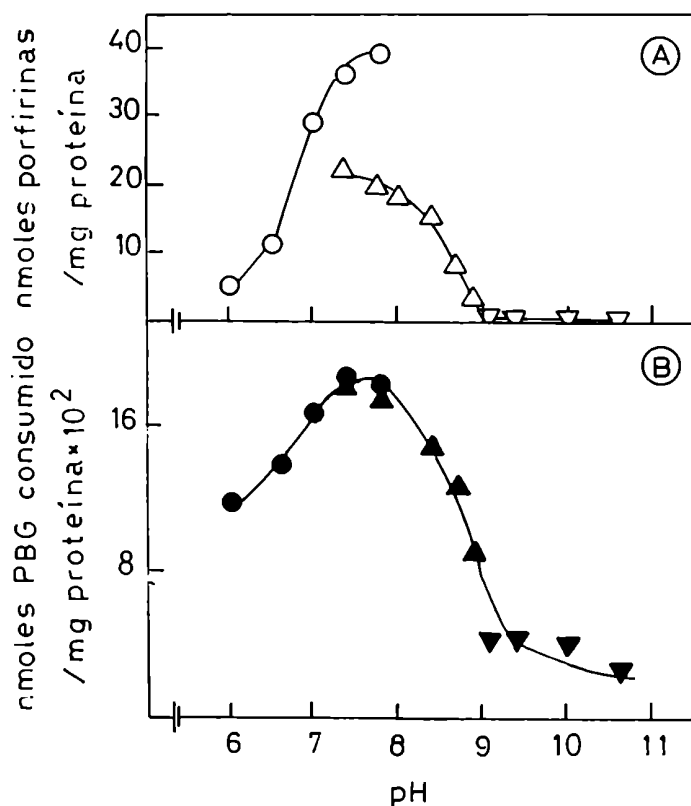
Se obtuvo finalmente una fracción muy activa de Deaminasa purificada 72 veces la cual es significativamente satisfactoria si se tiene en cuenta la fuente empleada (Tabla I.3.). Las etapas que producen mayor purificación son la centrifugación a 27.000xg y el pasaje a través de la columna de Sephadex G-100.

Llama la atención el aumento apreciable en las unidades totales al pasar de la fracción Homogenato (H) al Sobrenadante de 27.000xg (S). Se puede pensar que este hecho podría tener alguna relación con la existencia de un factor regulador de la actividad de la PBG-asa, ya encontrado en *E. gracilis* (Juknat y col., 1981). Sin embargo, Juknat (1983) investigó esta posibilidad trabajando con la fracción Sobrenadante de *Rp. palustris* y no logró demostrar su presencia en esta fuente.

### I.3.2. Peso molecular

La Figura I.10. muestra el perfil típico de elución proteica y de actividad en la columna de Sephadex G-100 (Etapa 5).





**Figura 1.9.:** Determinación del pH óptimo. El sistema de incubación contenía: 50  $\mu$ l de fracción enzimática y 45  $\mu$ g de PBG, ambos en solución del buffer correspondiente, en un volumen final de 1,5 ml. El resto de las condiciones fueron las standard y las indicadas en el texto. (O, ●) Buffer fosfato de sodio 0,05 M; ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) buffer Tris-HCl 0,05 M; ( $\nabla$ ,  $\blacktriangledown$ ) buffer glicina-NaOH 0,05 M. Actividad específica: (a) en función de las porfirinas formadas (O,  $\Delta$ ,  $\nabla$ ), (B) en función del PBG consumido (●,  $\blacktriangle$ ,  $\blacktriangledown$ ).

El PM calculado en base a la actividad específica expresada en función de las porfirinas formadas fue de  $74.000 \pm 7.400$  y coincide exactamente con el obtenido teniendo en cuenta la actividad expresada en función del sustrato consumido.

Este PM de 74.000 correspondiente a la deaminasa de *Rp. palustris* es aproximadamente el doble del valor determinado, en general, para la enzima de otras fuentes que, como ya mencionamos, es del orden de 40.000 (Batlle y Rossetti, 1977). Hasta el momento, este es el primer caso en que se encuentra un peso molecular tan elevado para esta enzima; esto podría deberse a que en este tejido la Deaminasa se presenta como un oligómero, resul

tante de la asociación de 2 ó 4 subunidades. En este sentido, es importante mencionar que Juknat (1983) observó que el perfil de elución de actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris* en una columna de Sephadex G-100 presentaba una banda principal (I) que eluía después del mayor pico proteico y luego una banda menor (II). A la banda I correspondió un PM de  $115.000 \pm 11.500$  en tanto que para la banda II el PM resultó ser de  $50.000 \pm 5.000$ . Estos resultados indicarían que posiblemente, también la PBG-asa se presente en esta fuente como un oligómero en el cual se encuentran asociadas 2 ó 4 subunidades del protómero de la PBG-asa (Rossetti y col., 1980; Juknat, 1983).

Tabla I.3.: Purificación de la Deaminasa

	PROTEINAS TOTALES (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA	UNIDADES TOTALES	GRADO DE PURIFICACION		PORFIRINAS FORMADAS		
				Respecto etapa anterior	Total	% Uro I	% Uro III	% Prod. de decarb.
Homogenato	2.028,6	4,62	1.860,0	1	1		40	60
Sobrenadante	627,2	19,40	2.415,6	4,27	4,27			58
35-55% de sulfato de amonio	228,0	22,70	1.007,4	1,17	4,92	46		
Sobrenadante calentamiento	55,9	80,40	869,8	3,54	17,42	90		
Eluido de Sephadex G-100		333,33		4,15	72,21	100		0

El sistema de incubación contenía 0,2 ml de fracción enzimática y 60 µg de PBG en solución de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 60 minutos, el resto de las condiciones fueron las standard.

#### I.4. Propiedades de la enzima

##### I.4.1. Cinética de la reacción

Ya habíamos observado al determinar la curva de saturación por sustrato, que la cinética de la Deaminasa de *Rp. palustris* seguía un perfil hiperbólico cuando se consideraba la formación de producto. En función del sustrato consumido, el comportamiento resultó lineal (Figura I.5.). Esta cinética michaeliana

asociada a la formación de porfirinógenos se confirma mediante la representación gráfica de Eadie (Figura I.11.) o bien con los gráficos de dobles recíprocas (Figuras I.12. y I.13.) y del cálculo del coeficiente  $n$  de Hill (Tabla I.4.)

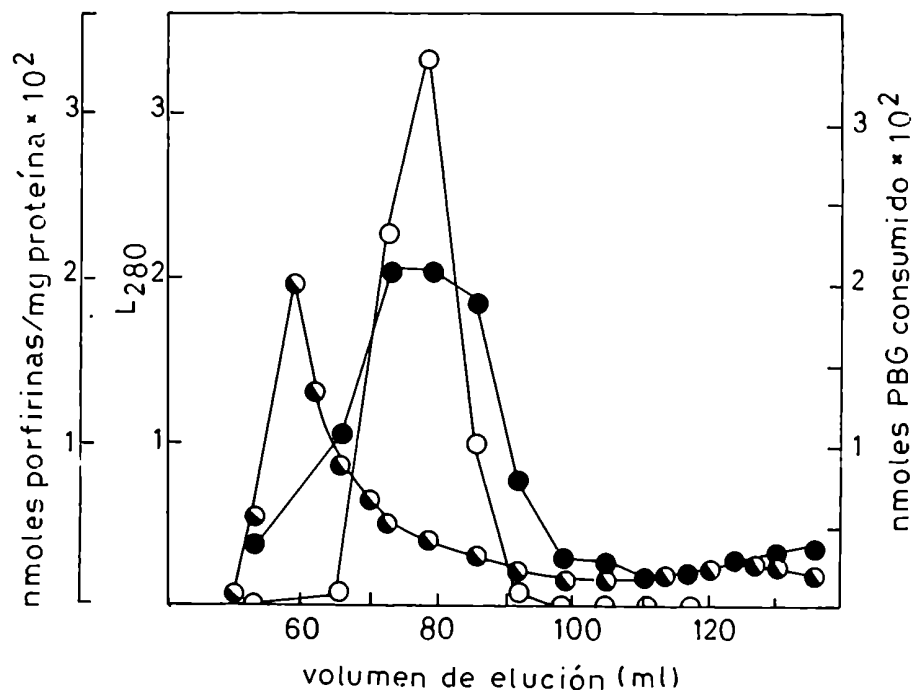


Figura I.10.: Determinación del Peso Molecular.  
Las condiciones de incubación son las descriptas en la leyenda de la Tabla I.3.  
(○) nmoles porfirinas/mg proteína;  
(●) nmoles PBG consumido; (●)  $A_{280}$

Los gráficos de Lineweaver-Burk resultaron lineales tanto para la velocidad expresada en función de las porfirinas formadas como del PBG consumido. También en ambos casos el valor calculado para el  $n$  de Hill fue 1.

En la Tabla I.4. se encuentran los valores de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ . El  $K_m$  correspondiente a la formación de porfirinas está dentro del orden de los encontrados para la Deaminasa de otras fuentes; en cambio, en lo que se refiere al consumo de sustrato, las constantes cinéticas calculadas son lla mativamente elevadas, hecho ya observado para la PBG-asa de es

ta misma fuente (Juknat, 1983).

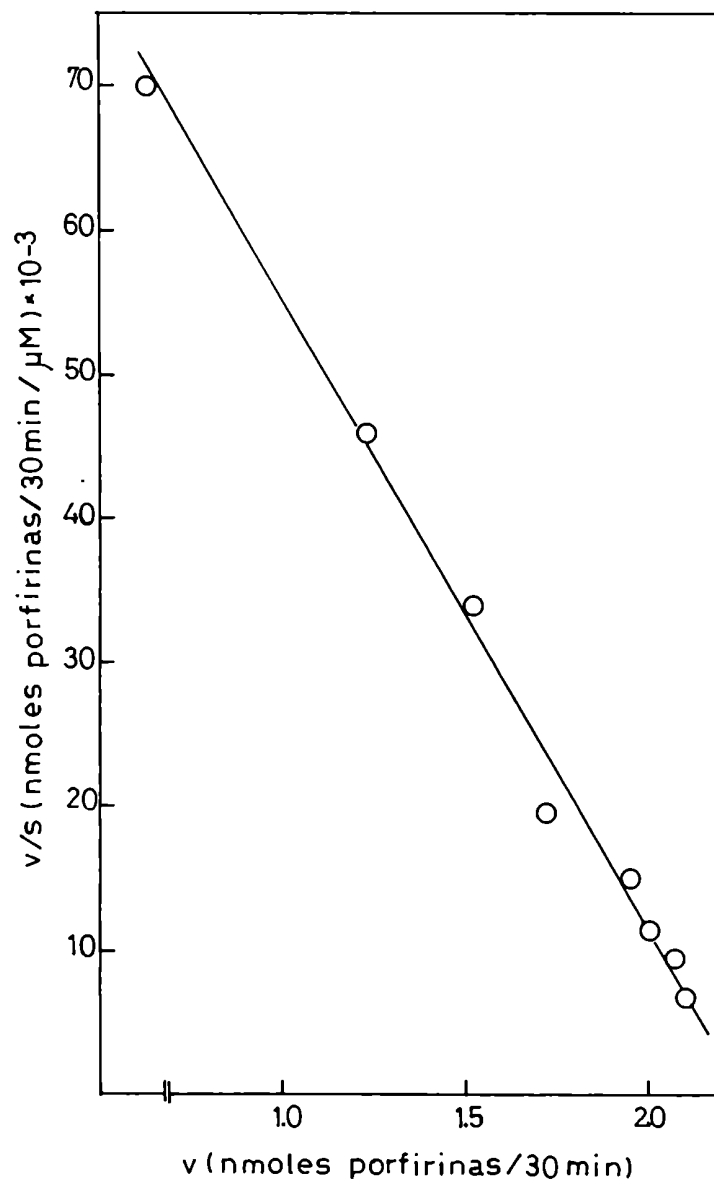


Figura I.11.: Gráfico de Eadie.

Podemos concluir entonces que la velocidad de formación de porfirinógenos de tipo I sigue una cinética michaeliana siendo el  $n$  igual a 1. Por el contrario, la PBG-asa de *Rp. palustris* muestra un perfil sigmoideo cuando la velocidad se mide en función de las porfirinas formadas, siendo el  $n$  igual a 2 (Juknat, 1983). Un comportamiento similar se ha observado con las enzimas de hígado bovino y eritrocitos de ave (Sancovich y col., 1969 a; Llambías y col., 1971). En consecuencia podríamos

postular que dado que no existen efectos cooperativos en la reacción catalizada por la Deaminasa, dichos efectos observados para la PBG-asa se podrían atribuir al componente Isomerasa. Es posible que existan dos sitios, uno sobre cada entidad proteica de manera que por ejemplo la entrada de la primer molécula de PBG, así como las siguientes, ocurriera sobre la Deaminasa y la etapa final de isomerización y ciclación transcurriera sobre la Isomerasa.

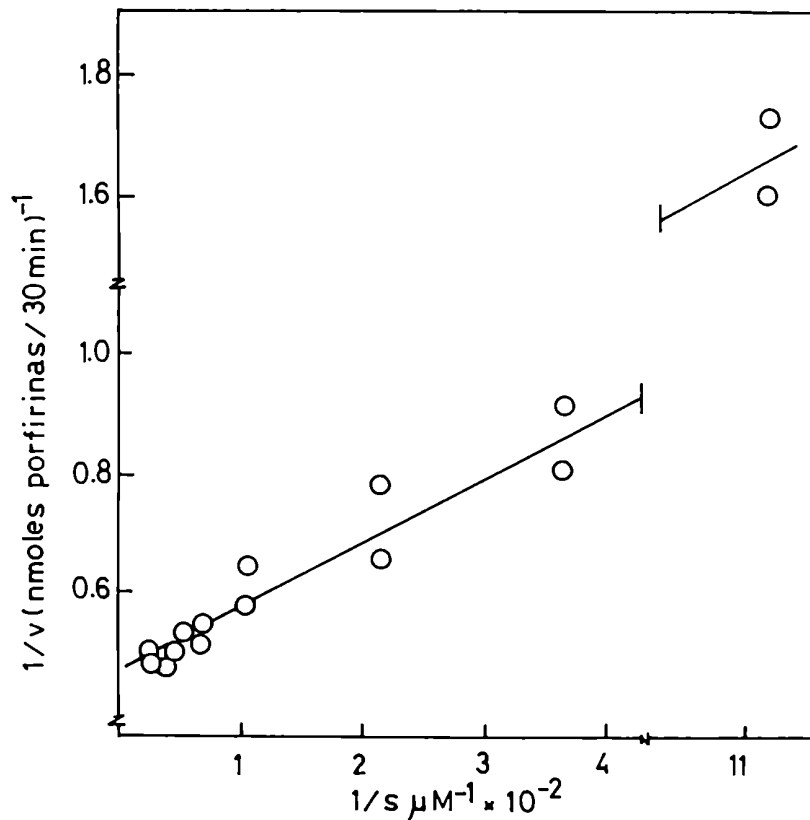


Figura I.12.: Gráfico de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) para la velocidad medida en función de la formación de porfirinas.

#### I.4.2. Efecto de iones

En vista de los importantes resultados obtenidos por

Juknat (1983) en cuanto al efecto de los iones magnesio, fosfato y amonio sobre la actividad de la PBG-asa de *Rp. palustris*, resultó de interés estudiar la acción de los mismos sobre la Deaminasa de esta fuente para determinar su posible efecto inhibitorio o estimulante, su influencia sobre la cinética de la reacción y, eventualmente, para confirmar las hipótesis formuladas por Juknat (1983) acerca del tipo de respuesta que nuestra enzima mostraría frente a tales iones.

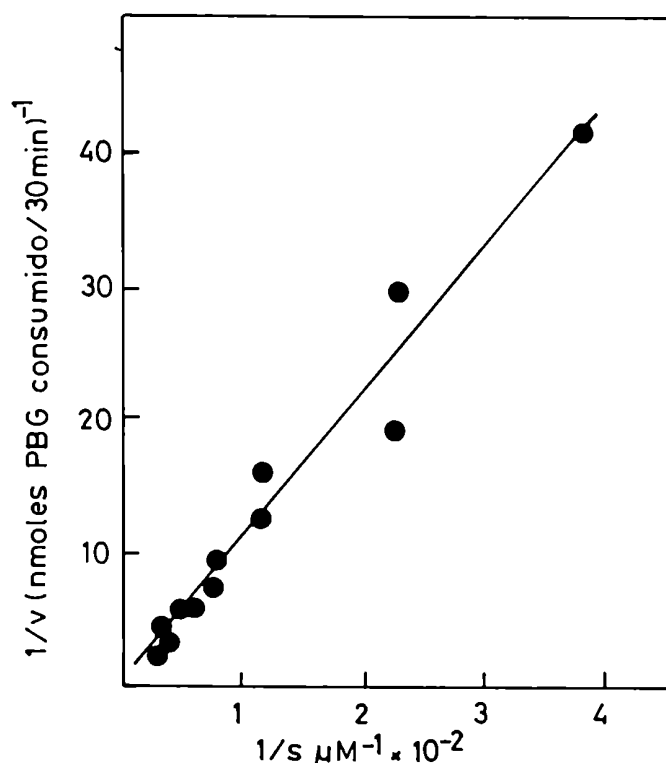


Figura I.13.: Gráfico de las dobles recíprocas (Lineweaver-Burk) para la velocidad medida en función del consumo de PBG.

#### I.4.2.1. Efecto de los iones magnesio

Es conocido que la presencia de concentraciones entre 1 y 10 mM de iones magnesio producen una activación de la PBG-asa de callos de soya (Llambías, 1971), de eritrocitos de ave (Llambías y Batlle, 1971 a) y de hígado bovino (Sancovich, 1972) dando lugar además, a una formación aumentada del isómero III. Más tarde, Clement y col. (1982) confirmaron estos hallazgos con la

enzima de hígado de rata. En todas estas fuentes el magnesio a concentraciones mayores que 25 mM muestra un efecto inhibitorio sobre la formación de porfirinas y el consumo de PBG por parte de la PBG-asa. También a 10 mM el magnesio activó la deaminasa de hígado bovino (Sancovich y col., 1976) inhibiendo su actividad a concentraciones mayores.

Tabla I.4.: Constantes cinéticas

PARAMETROS	Km ( $\mu\text{M}$ )	Vmax (nmoles/30 min)	n
Porfirinas formadas	21,99	2,09	1
PBG consumido	$2 \times 10^3$	$2,24 \times 10^3$	1

Las constantes Km y V max fueron calculadas en base a los resultados representados en las Figuras I.12. y I.13.. Los coeficientes de Hill (n) se hallaron de las pendientes de los gráficos de  $\log (v/V_{\text{max}}-v)$  en función del  $\log (\text{PBG})$ .

En nuestro caso se probaron concentraciones de magnesio (bajo la forma de cloruro) en un rango de 0,5 a 100 mM, a concentraciones variables de PBG (entre 25 y 500  $\mu\text{M}$ ).

Teniendo en cuenta la velocidad de formación de porfirinas (Figura I.14.) se observó nuevamente y para todos los casos la clásica cinética de Michaelis-Menten, obteniéndose inhibición por sustrato para las mayores concentraciones de  $\text{Mg}^{++}$  ensayadas (50 y 100 mM) que, por otra parte, mostraron un marcado efecto inhibitorio.

Si representamos la velocidad de formación de porfirinas (Figura I.15.) o el porcentaje de activación (Figura I.16.) en función de la concentración de magnesio, podemos visualizar en forma directa que para bajas concentraciones del catión y para PBG 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ , el magnesio ejerce un efecto activante que alcanza hasta un 26% a 25  $\mu\text{M}$  de PBG. Concentraciones crecientes

del catión producen inhibición la cual es más marcada a medida que aumenta la concentración de PBG, llegando a ser total (100% de inhibición) para 100 mM de magnesio y 500  $\mu$ M de PBG.

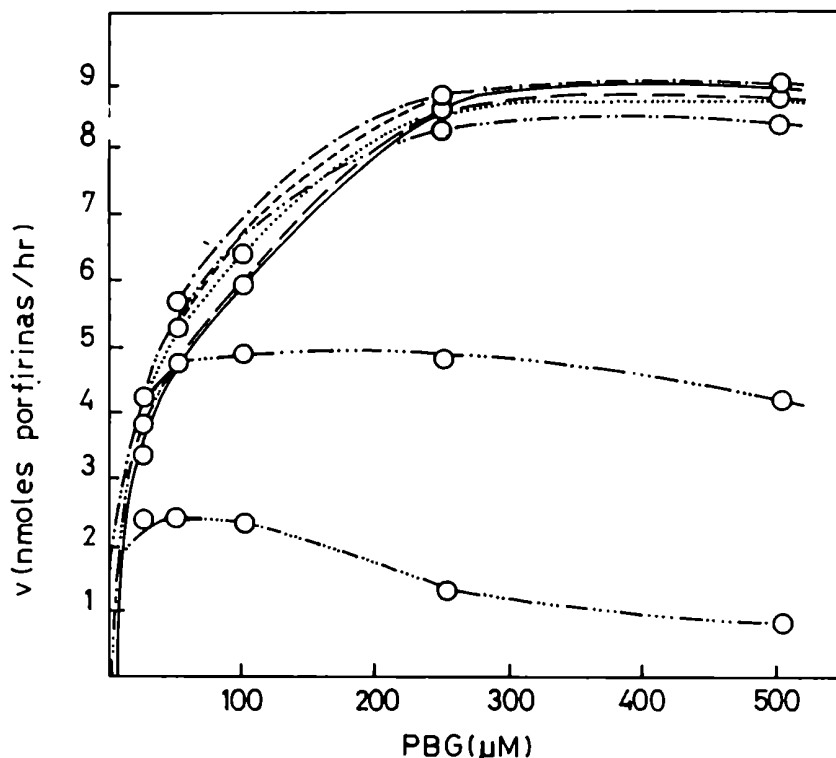
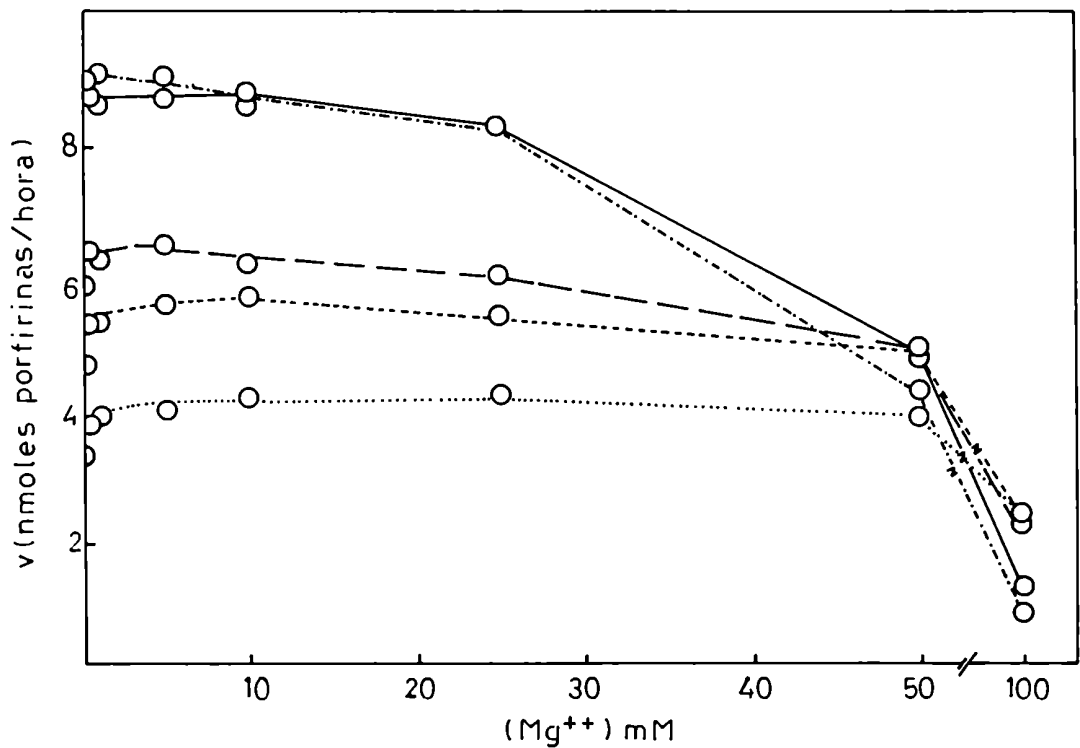


Figura I.14.: Efecto de concentraciones variables de PBG sobre la velocidad de formación de porfirinas en ausencia y presencia de distintas concentraciones de magnesio. (—) Sin agregado de magnesio, (.....) 0,5 mM magnesio, (----) 1 mM magnesio, (— —) 5 mM magnesio, (-.-.-) 10 mM magnesio, (-.-.-.-) 25 mM magnesio, (-.-.-.-) 50 mM magnesio, (-.-.-.-) 100 mM magnesio.

Los gráficos de las dobles recíprocas (Figura I.17.) confirman el comportamiento michaeliano y la ya mencionada inhibición por sustrato. Se observa además una disminución en la velocidad máxima a medida que se incrementa la concentración de magnesio en tanto que la afinidad de la enzima por el sustrato PBG se ve aumentada (Tabla inserta). Como era de esperar el  $n$  de Hill resultó ser igual a 1 en todos los casos.





**Figura I.15.:** Efecto de concentraciones variables de magnesio sobre la velocidad de formación de porfirinas. (... ) 25  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 50  $\mu\text{M}$  PBG, (— —) 100  $\mu\text{M}$  PBG, (——) 250  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 500  $\mu\text{M}$  PBG.

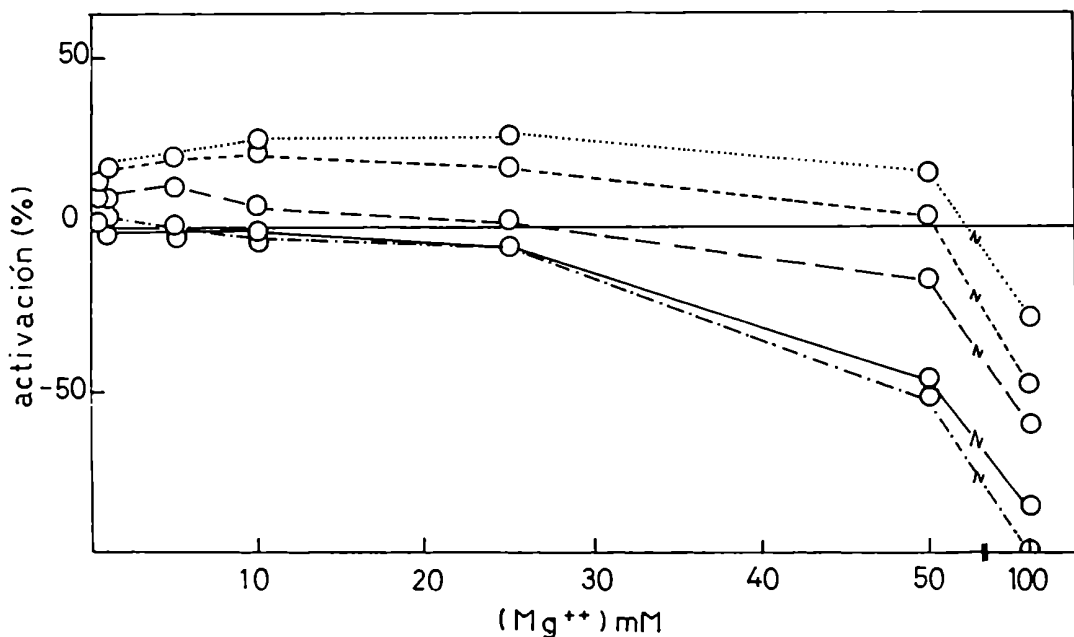
Si graficamos la inversa de la velocidad en función de la concentración de magnesio (Figura I.18.) se obtienen una serie de curvas que confirman los efectos mixtos discutidos anteriormente (activación e inhibición).

Podemos concluir entonces que el catión magnesio se comporta como activador e inhibidor a bajas y altas concentraciones respectivamente, dependiendo la presencia y magnitud de estos efectos, de la concentración de PBG. Además, en ninguno de los casos estudiados el magnesio modifica el comportamiento michaeliano de la Deaminasa.

Los perfiles obtenidos expresando la velocidad en función del consumo de sustrato estuvieron de acuerdo con el comportamiento sugerido, de manera que no los presentaremos.

A esta altura resulta de interés mencionar los resultados obtenidos con la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat, 1983). La acción del magnesio sobre esta enzima es también bastante

compleja. A baja concentración de sustrato, el magnesio puede, a determinadas concentraciones activar la síntesis total de porfirinas, estimulando ligeramente la serie III. A concentraciones más altas de PBG, por arriba de 50 mM de magnesio, este catión siempre inhibe a la enzima, disminuyendo significativamente la síntesis de porfirinas tipo III. Existen además cambios en el comportamiento cinético, reduciéndose el n de Hill de 2 a 1. Vemos entonces que tanto para la PBG-asa como para la Deaminasa de esta fuente, la acción estimulante del magnesio se manifiesta a ciertas concentraciones del metal y aparentemente cuando las enzimas no están totalmente saturadas con su sustrato. Asimismo es evidente que el magnesio actúa sobre el complejo de la PBG-asa, tanto a nivel de Deaminasa como de Isomerasa.



**Figura I.16.:** Porcentaje de activación (respecto a las porfirinas formadas) en función de la concentración de magnesio.  
 (···) 25 μM PBG, (----) 50 μM PBG, (—) 100 μM PBG, (—) 250 μM PBG, (---) 500 μM PBG.

El comportamiento de la Deaminasa de *Rp. palustris* frente a los iones magnesio estaría de acuerdo con la hipótesis de Juknat (1983) según la cual "el magnesio debería actuar sobre di

ferentes sitios, existiendo además una cierta interacción con el sustrato y la posibilidad de que el metal y el PBG tengan un lugar de unión independiente sobre la proteína. A concentraciones relativamente bajas de ambos, cada uno parecería funcionar de manera tal que se lograra el ordenamiento estructural óptimo para la actividad propuesta por Llambías, 1971; Sancovich, 1972 y Batlle y Rossetti, 1977. Sin embargo, por aumento de la concentración de cualquiera de ellos, se destruiría ese equilibrio ideal; tal vez el magnesio ocupara o bloqueara el sitio del PBG tanto sobre la Deaminasa como sobre la Isomerasa. Eventualmente el magnesio podría disociar a esta última del complejo, con la consecuente disminución de las porfirinas de tipo III. Otra alternativa adicional sería que el magnesio impidiera la liberación del TPM producto de la Deaminasa y sustrato de la Isomerasa, lo que se traduciría también en una disminución en la formación total de porfirinas, y en un menor consumo de PBG, al quedar menos enzima libre disponible para nuevas polimerizaciones del sustrato. Es muy factible que el patrón resultante observado experimentalmente sea entonces una suma de las distintas inhibiciones o efectos individuales sobre los dos componentes del complejo PBG-asa".

#### I.4.2.2. Efecto del anión fosfato

La PBG-asa de *Rp. palustris* presentó una interesante respuesta frente al anión fosfato, cuando se estudió el efecto del mismo a concentraciones finales de 10, 50 y 100 mM empleando concentraciones variables de sustrato (Juknat, 1983). Dichos iones ejercen una acción muy particular sobre esta enzima ya que disminuyen la síntesis total de porfirinas sin modificar la cinética (se conserva el n de Hill igual a 2, para la menor concentración ensayada) ni el tipo isomérico. También inhiben el consumo de PBG sin alterar el comportamiento michaeliano aunque sí los correspondientes parámetros cinéticos. Estos hallazgos llevaron a postular que, aceptando que el sustrato de la Isomerasa es el bilano lineal no isomerizado hidroximetilbilano, producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG, entonces el fosfato tendría una acción selectiva sobre esta enzima y no ejercería ningún efecto sobre la Isomerasa.

Teniendo en cuenta estas consideraciones resultó intere-

sante determinar si este anión es un efector de la Deaminasa aislada. Para ello, en una primera experiencia, se incubaron cantidades variables de fosfato (como sal monosódica) manteniendo constante la concentración de sustrato (Figura I.19.).

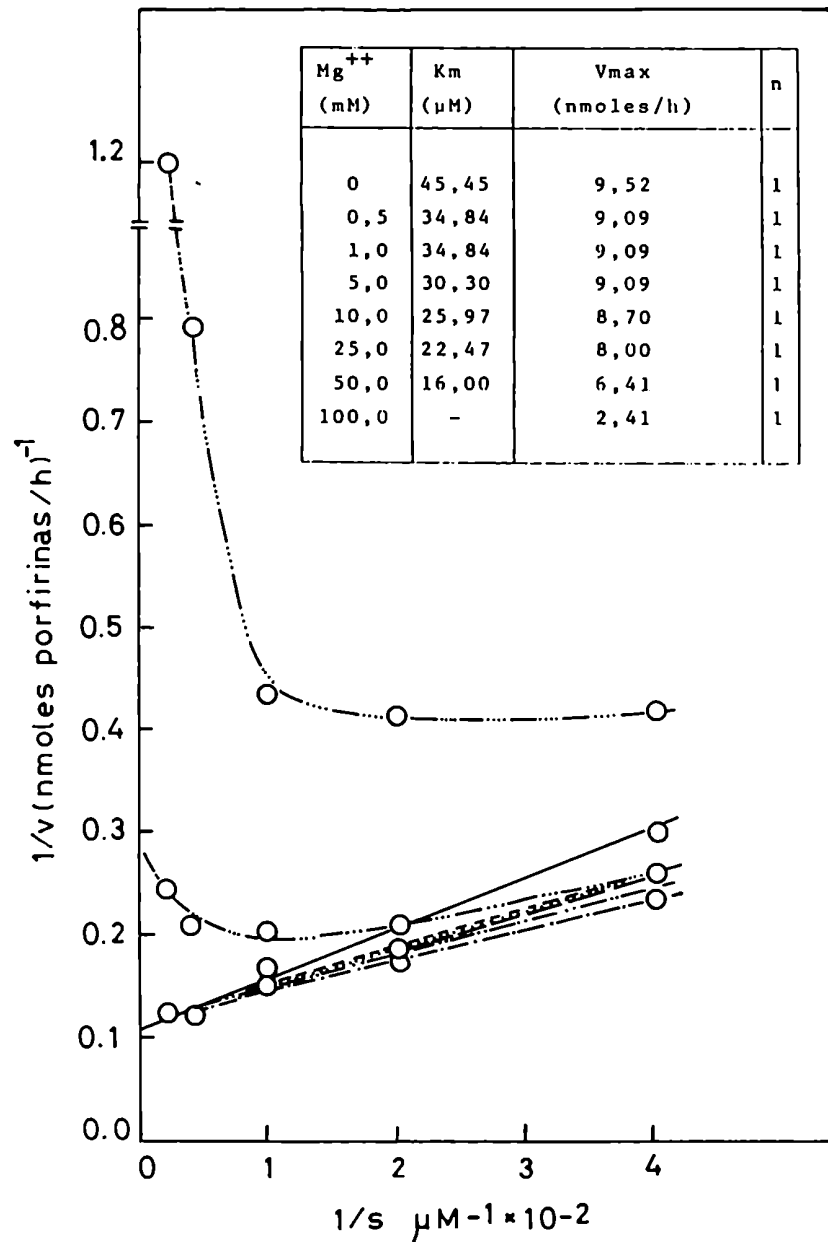
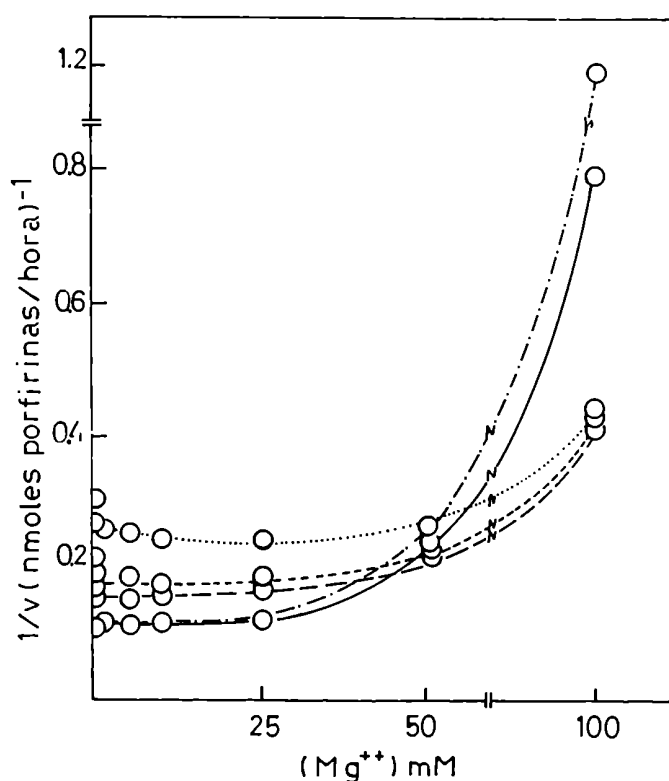


Figura I.17.: Gráfico de las dobles recíprocas para la velocidad de formación de porfirinas.  
 (—) Sin agregado de inhibidor, (....) 0,5 mM magnesio, (----) 1 mM magnesio, (— —) 5 mM magnesio, (-.-.-) 10 mM magnesio, (-.-.-.-) 25 mM magnesio, (-.-.-.-) 50 mM magnesio, (-.-.-.-) 100 mM magnesio.



**Figura I.18.:** Efecto de concentraciones variables de magnesio sobre la inversa de la velocidad de formación de porfirinas.  
 (...) 25 μM PBG, (----) 50 μM PBG, (—) 100 μM PBG, (—) 250 μM PBG, (----) 500 μM PBG.

Como era de esperar el fosfato inhibió la formación de producto siendo este efecto muy marcado a 150 mM donde produjo un 97% de inhibición en tanto que para la misma concentración de inhibidor el consumo de sustrato disminuyó un 67% con respecto al control.

Con el fin de obtener mayor información acerca de la influencia de este ión sobre la actividad de la Deaminasa, se resolvió llevar a cabo un estudio más completo. Para ello se midió la actividad de la enzima en presencia de cantidades variables de inhibidor (1-50 mM) y frente a diferentes concentraciones de sustrato (0-310 μM).

Si analizamos la velocidad de formación de porfirinas

(Figura I.20.) observamos que la presencia de cantidades crecientes de fosfato disminuye la formación de producto pero sin alterar la cinética. Esta respuesta se confirma cuando se efectúa el gráfico de doubles recíprocas (Figura I.21.) y a través del valor del  $n$  de Hill que se mantuvo igual a 1 para todas las concentraciones de inhibidor ensayadas. La representación de Eadie resultó lineal de acuerdo a lo esperado para este tipo de cinética (Figura I.22.)

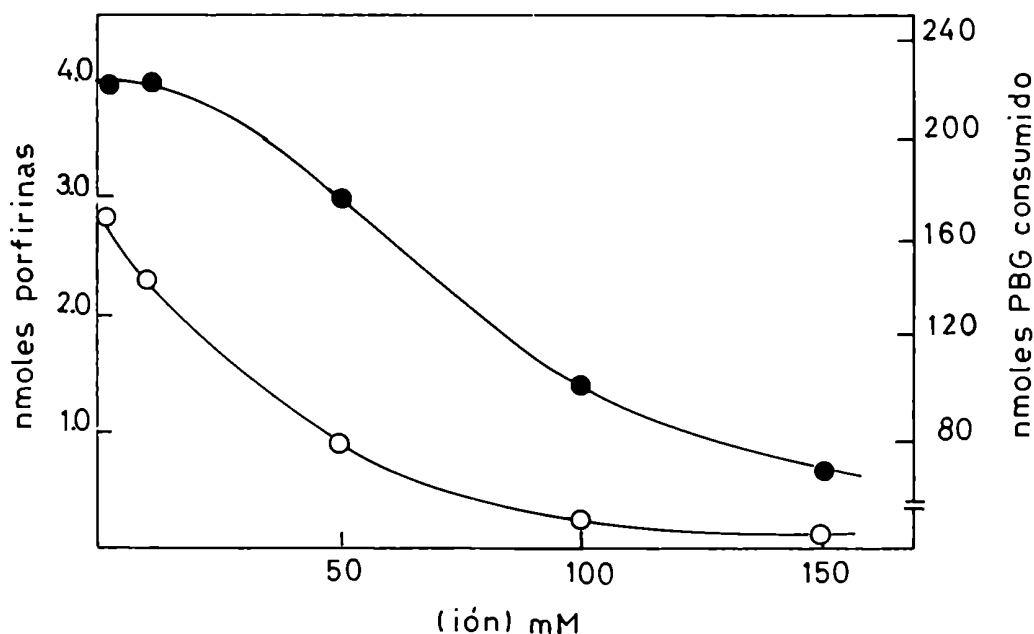


Figura I.19.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la formación de porfirinas (○) y el consumo de sustrato (●).

El efecto inhibitorio del ión fosfato se aprecia más claramente si se representa la velocidad de formación de porfirinas en función de la concentración del inhibidor (Figura I.23.). Se observa además que dicho efecto inhibitorio es menos marcado cuando se aumenta la concentración de sustrato. Las mismas conclusiones pueden obtenerse en base al análisis de la Figura I.24.

Es importante señalar que a las concentraciones más bajas estudiadas (1 y 10 mM) el fosfato actúa como un inhibidor incompetitivo (Figura I.21.). Este tipo de inhibición no es co-

mún cuando se estudian reacciones donde interviene un sólo sustrato. Sin embargo, en la reacción catalizada por la Deaminasa se ponen en juego 4 moléculas de PBG y por lo tanto, en este caso, los efectos cinéticos ejercidos por inhibidores pueden llegar a ser más complejos que para el modelo de un sólo sustrato. Además, Juknat (1983) también encontró una inhibición incompetitiva de la PBG-asa de *Rp. palustris* a bajas concentraciones de fosfato, cuando midió la velocidad en función del consumo de sustrato.

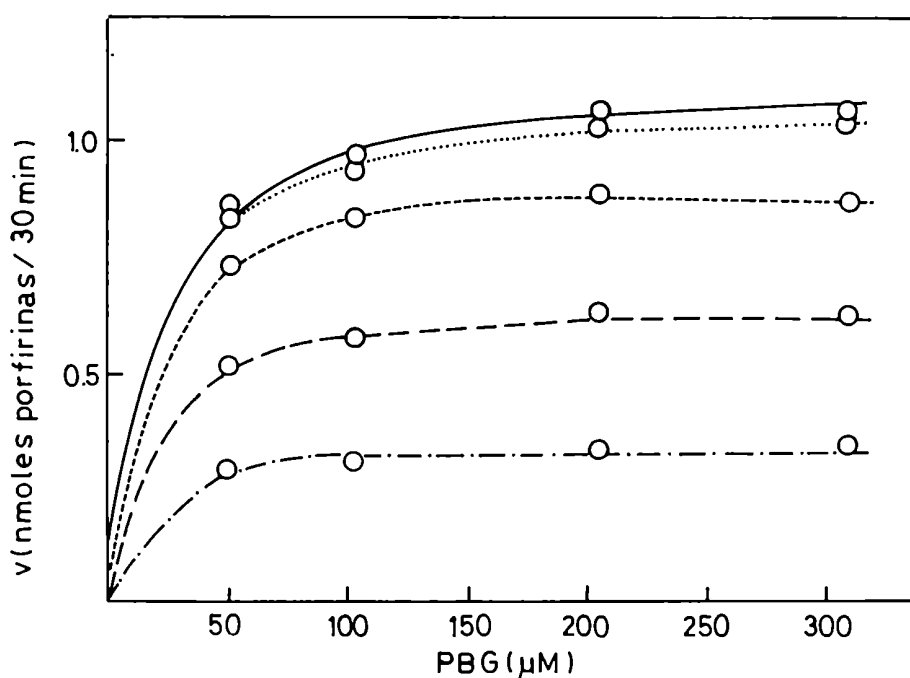


Figura I.20.: Efecto de distintas concentraciones de fosfato sobre la velocidad de formación de porfirinas.  
 (—) sin agregado de inhibidor,  
 (...) 1 mM, (---) 10 mM, (— —) 25 mM, (-·-·-) 50 mM.

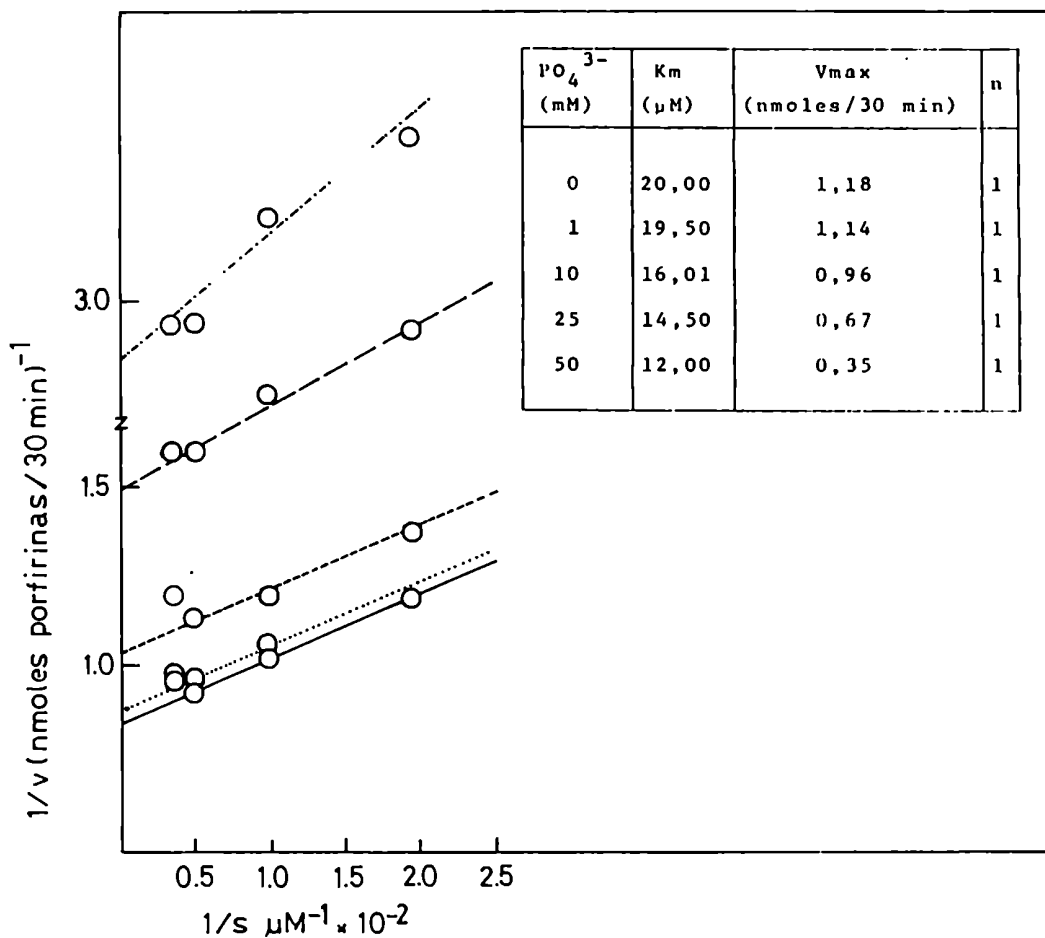


Figura I.21.: Gráfico de dobles recíprocas en presencia de distintas concentraciones de fosfato considerando la velocidad de formación de porfirinas.  
 (—) Sin agregado de inhibidor,  
 (...) 1 mM, (---) 10 mM, (— —) 25 mM, (----) 50 mM.

Si analizamos ahora las curvas de saturación en base al PBG consumido (Figura I.25.) y los correspondientes gráficos de dobles recíprocas (Figura I.26.) observamos que tampoco en este caso se modificó el comportamiento michaeliano para ninguna de las concentraciones ensayadas, siendo el n de Hill igual a 1. Los iones fosfato actuaron en esta oportunidad como inhibidores



no-competitivos. También en este caso el consumo de sustrato disminuye para concentraciones crecientes de inhibidor pero el efecto inhibitorio es menos marcado a mayores concentraciones de PBG (Figuras I.27. y I.28.).

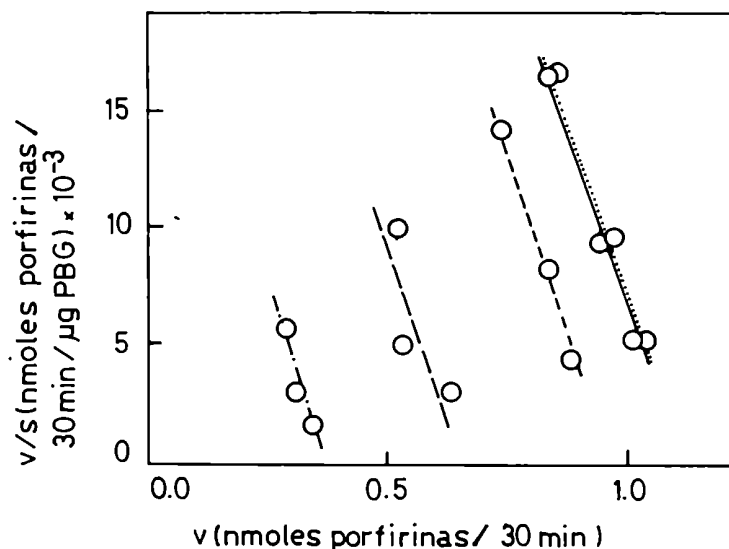


Figura I.22.: Representación de Eadie para la velocidad de formación de porfirinas. (—) Sin agregado de inhibidor, (...) 1 mM fosfato, (---) 10 mM fosfato, (— · —) 25 mM, (--- · ---) 50 mM.

A esta altura es importante recordar que Battle y Rossetti (1977) habían postulado que, en la unión del PBG a la Deaminasa son importantes ciertos grupos cargados positivamente, posiblemente restos ε-amino, imidazólicos o guanidinos (Pollack y Russell, 1978). Según los primeros autores, dichos grupos servirían como sitios de reconocimiento del PBG a través de sus cadenas de acetato y propionato y si tenemos en cuenta que este tipo de residuos se encuentran en el sitio activo de una serie de enzimas cuyos sustratos también contienen grupos carboxilato o fosfato (Riordan, 1973; Riordan y col., 1977) podemos considerar posible que, en nuestro caso, el anión fosfato podría actuar neutralizando parcial o totalmente estas posiciones. De ser así entonces, podría ocurrir que el PBG no se uniera en forma co-

recta o favorable al sitio activo de la Deaminasa, no pudiendo se condensar con otras moléculas de sustrato, disminuyendo así su consumo. Como resultado quedaría menor cantidad total de enzima disponible para la formación de los intermediarios y su posterior isomerización y ciclación por parte de la Isomerasa, según lo propuso Juknat (1983).

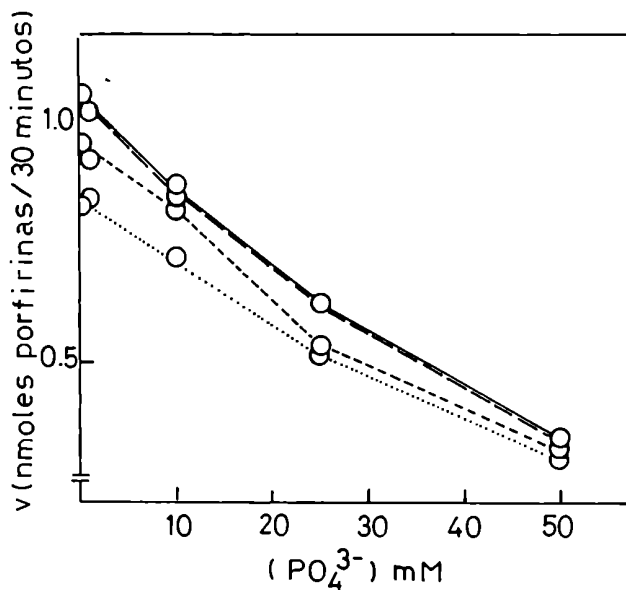


Figura I.23.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la velocidad de formación de porfirinas.  
 (...) 51  $\mu$ M PBG, (---) 102  $\mu$ M PBG, (— —) 205  $\mu$ M, (——) 310  $\mu$ M PBG.

#### I.4.2.3. Efecto del ión amonio

Los iones amonio, así como también la hidroxilamina han sido utilizados en muchos casos como inhibidores de la Deaminasa (Pluscec y Bogorad, 1970; Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973). Estos son de gran utilidad cuando se desea provocar la acumulación de intermediarios polipirrólicos en la

reacción de polimerización del PBG en porfirinas.

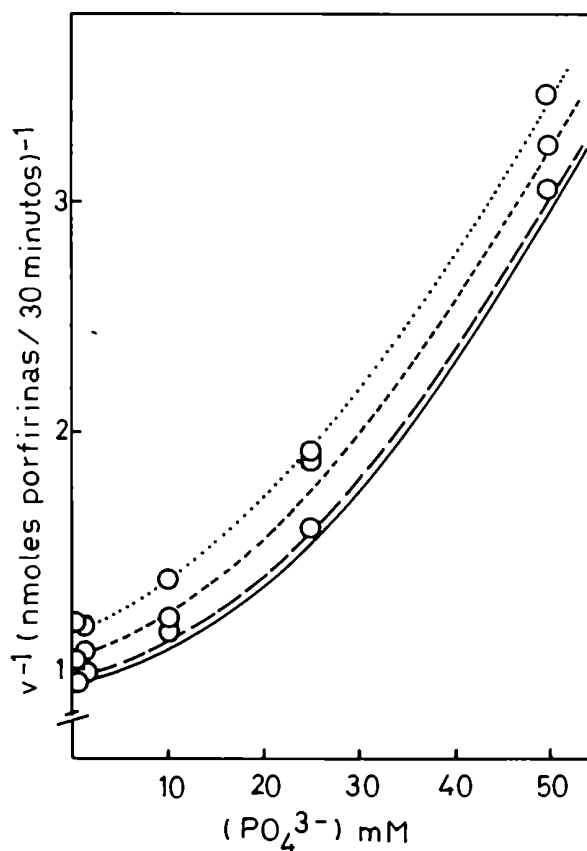


Figura I.24.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la inversa de la velocidad de formación de porfirinas.  
(...) 51 µM PBG,  
(---) 102 µM PBG,  
(— —) 205 µM PBG,  
(——) 310 µM PBG.

En general, los iones amonio actúan modificando la etapa de ciclación e isomerización, afectando fundamentalmente la cantidad total y/o el tipo isomérico de las porfirinas formadas, en tanto que no afectan el consumo de sustrato o lo hacen en mucho menor grado.

Debemos recordar, además los importantes resultados obtenidos por Juknat (1983) quien estudió el efecto de estos iones sobre el sistema enzimático PBG-asa de *Rp. palustris*. En esta fuente el amonio disminuye la cantidad total de porfirinas for-

madas a concentraciones crecientes de inhibidor y sustrato, modificando sólo ligeramente la cinética cooperativa de la reacción (el n de Hill varió de 2 a 1,6 para concentraciones de amonio entre 0 y 150 mM). Respecto al tipo isomérico, la acción inhibitoria sobre la Isomerasa disminuye al aumentar la concentración de sustrato, evidenciándose una interacción competitiva entre el PBG y el amonio en tanto que, a ciertas concentraciones de sustrato e inhibidor, parece estimularse una mayor formación del isómero III a expensas del tipo I. El amonio no afecta en cambio el consumo de PBG ni la cinética michaeliana de la reacción cuando la velocidad se mide en función del consumo de sustrato (n de Hill = 1).

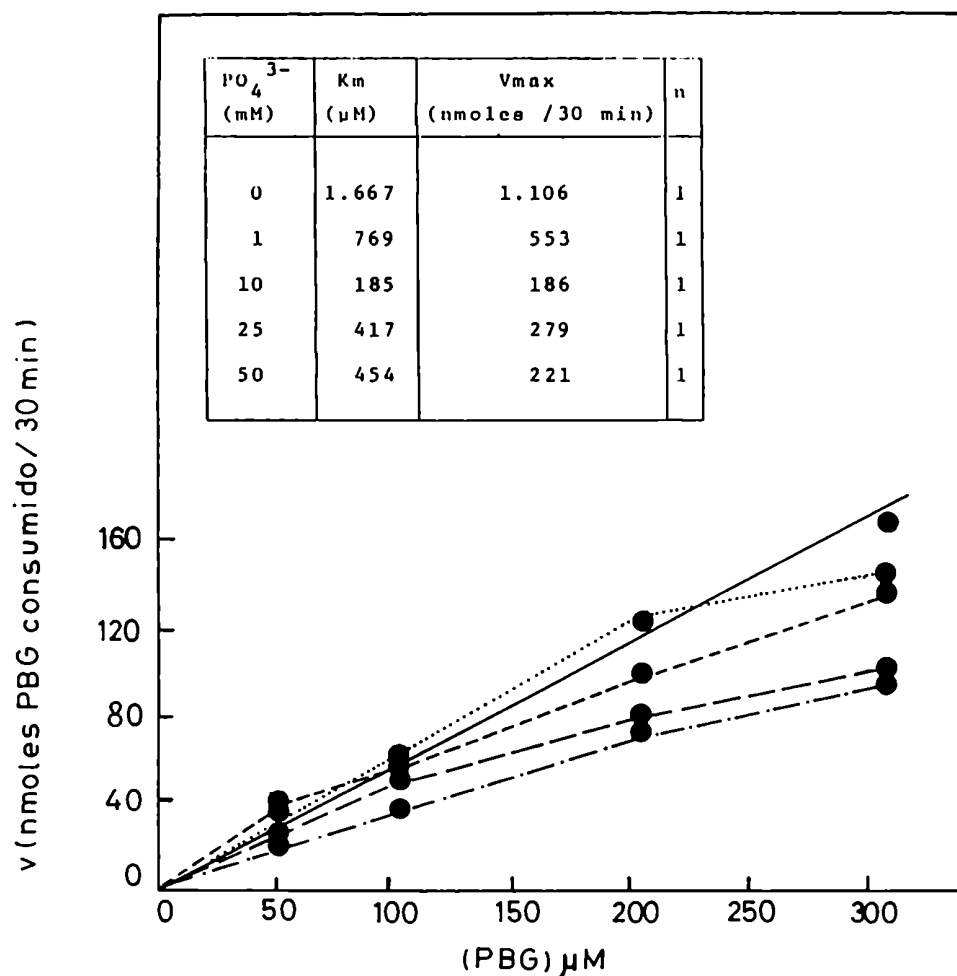
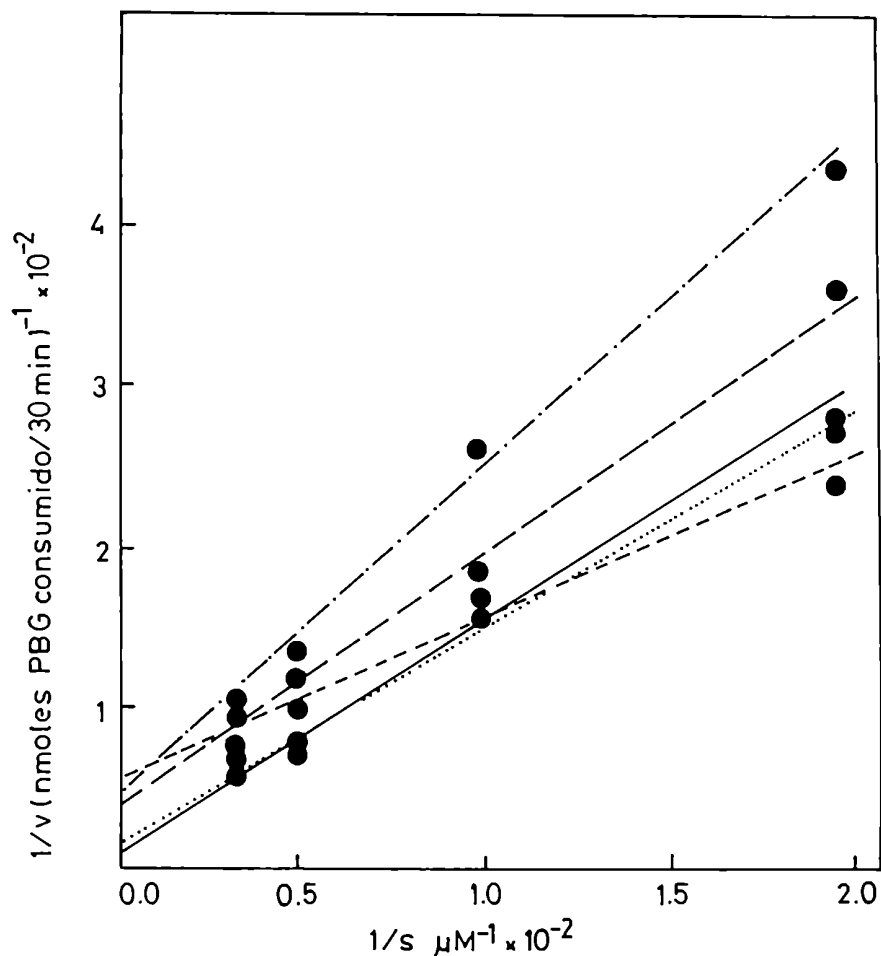


Figura I.25.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la curva de saturación de sustrato cuando la velocidad se mide en función del consumo de PBG.  
 (—) Sin agregado de inhibidor, (....) 1 mM, (----) 10 mM, (— —) 25 mM, (----) 50 mM.



**Figura I.26.:** Gráfico de Lineweaver-Burk para la velocidad medida en función del consumo de sustrato.  
 (—) Sin agregado de inhibidor,  
 (....) 1 mM fosfato, (----) 10 mM fosfato, (— —) 25 mM fosfato,  
 (-.-.-) 50 mM fosfato.

En vista de la valiosa información recopilada acerca del efecto de los iones amonio sobre las enzimas del complejo de la PBG-asa, a la cual podemos agregar los trabajos de Bogorad (1963), Sancovich y col. (1969 a y b), Llambías y Batlle (1971 a y b), Frydman y Feinstein (1974), resultó de interés estudiar la acción del amonio sobre la Deaminasa de *Rp. palustris*.

Con este objetivo, y como en el caso de los iones fosfato, se llevó a cabo un ensayo previo en el cual se estudió el comportamiento de la enzima frente a cantidades crecientes de amonio (en forma de cloruro), a una concentración de PBG de

206  $\mu\text{M}$  (Figuras I.29. y I.30.).

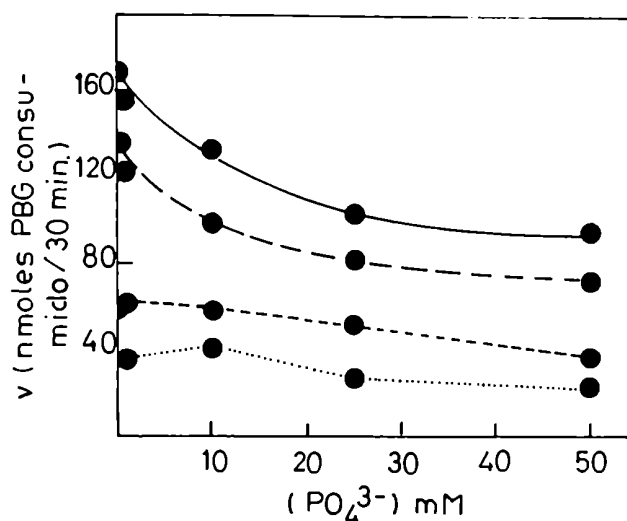


Figura I.27.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la velocidad de consumo de sustrato. ( $\cdots$ ) 51  $\mu\text{M}$  PBG, ( $----$ ) 102  $\mu\text{M}$  PBG, ( $—$ ) 205  $\mu\text{M}$  PBG, ( $————$ ) 310  $\mu\text{M}$  PBG.

Se observa que ya a valores de 10 mM de amonio ocurre una inhibición significativa en la síntesis de porfirinas (16%) la cual aumenta con la concentración del ión, llegando a un valor de 56% para 150 mM de amonio. El consumo de PBG en cambio, no se vió alterado.

Teniendo en cuenta que en forma general y según lo observado en el caso del fosfato, el efecto de los iones sobre el comportamiento de nuestra enzima depende de la concentración de sustrato, se decidió ampliar la experiencia anterior estudiando la acción del amonio 1, 10, 50 y 100 mM, a concentraciones variables de sustrato (0-310  $\mu\text{M}$ ).

En la Figura I.31. se encuentran graficadas las velocidades de formación de porfirinas en función del consumo de sustrato, para distintas concentraciones de amonio. Vemos que si bien cantidades crecientes del ión resultaron inhibitorias en grado correspondiente, la enzima exhibió un comportamiento michaeliano tanto en ausencia del inhibidor, como en su presencia. Las mis-

mas conclusiones pueden obtenerse del análisis de los gráficos de dobles recíprocas (Figura I.32.), del valor del coeficiente de Hill (inset) y de la representación de Eadie (Figura I.33.).

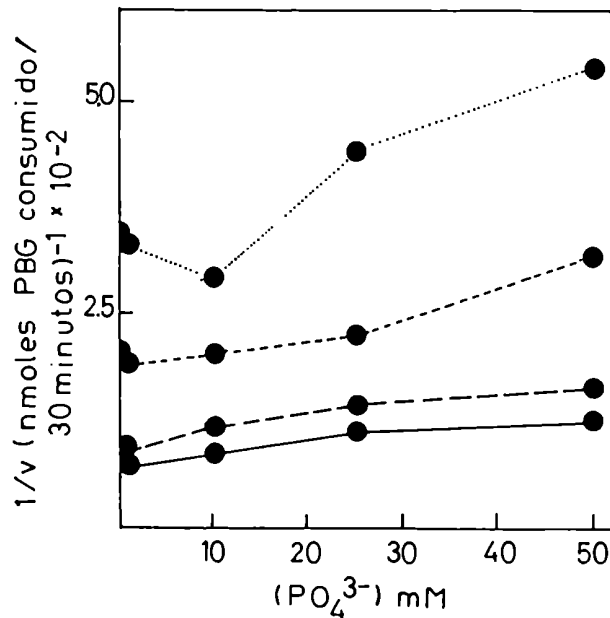


Figura I.28.: Efecto de concentraciones variables de fosfato sobre la inversa de la velocidad de consumo de sustrato.  
 (···) 51 µM PBG, (----) 102 µM PBG, (---) 205 µM PBG, (—) 310 µM PBG.

Como era de esperar en base a lo discutido anteriormente, el efecto inhibitorio ejercido por el catión amonio es más marcado cuanto menor es la concentración de sustrato siendo la máxima inhibición lograda, del orden de 57% para amonio 100 mM y 51 µM de PBG (Figuras I.34. y I.35.).

Puede observarse en la Figura I.32. que el ion amonio se comporta como un inhibidor no-competitivo disminuyendo los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$ . Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Sancovich y col. (1969 a) y Llambías y col. (1971).

La forma de las curvas de la Figura I.36. es la esperada si se tienen en cuenta los efectos discutidos anteriormente.

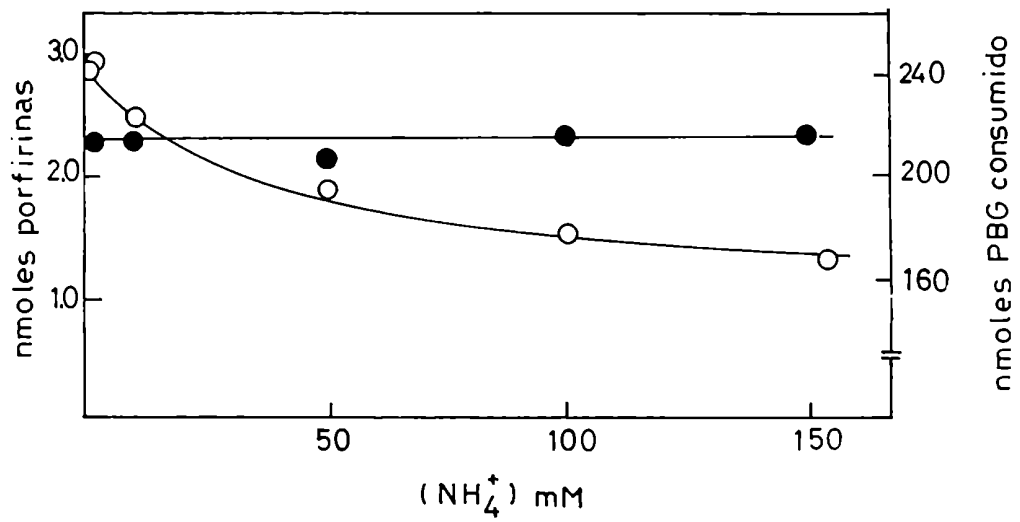


Figura I.29.: Efecto de los iones amonio sobre la actividad de la Deaminasa en función de las porfirinas formadas (○) y del PBG consumido (●).

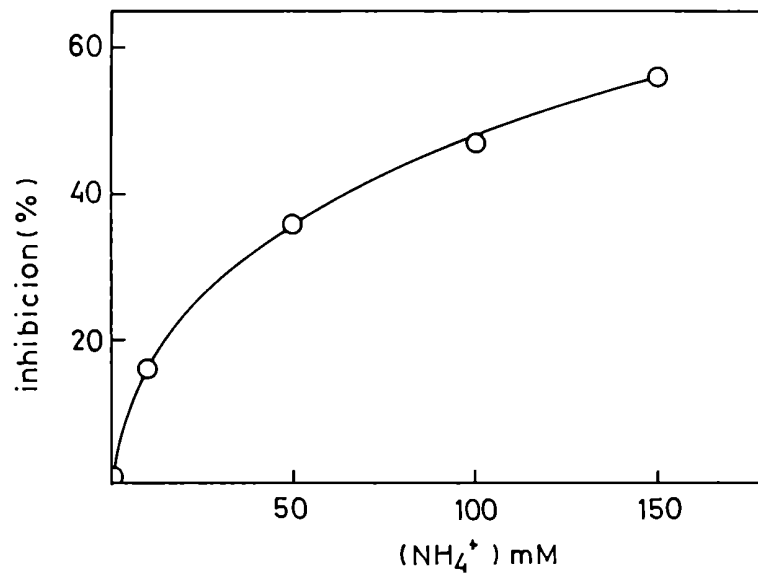


Figura I.30.: Porcentaje de inhibición (en base a las porfirinas formadas) en función de la concentración de amonio.



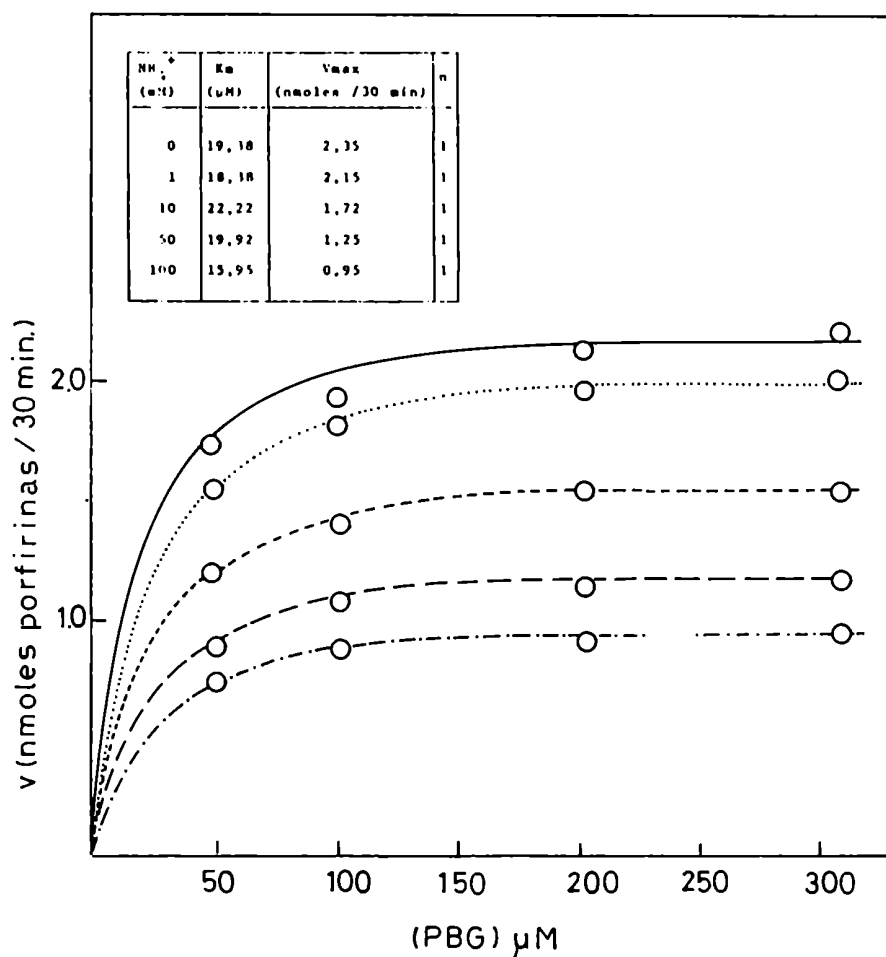
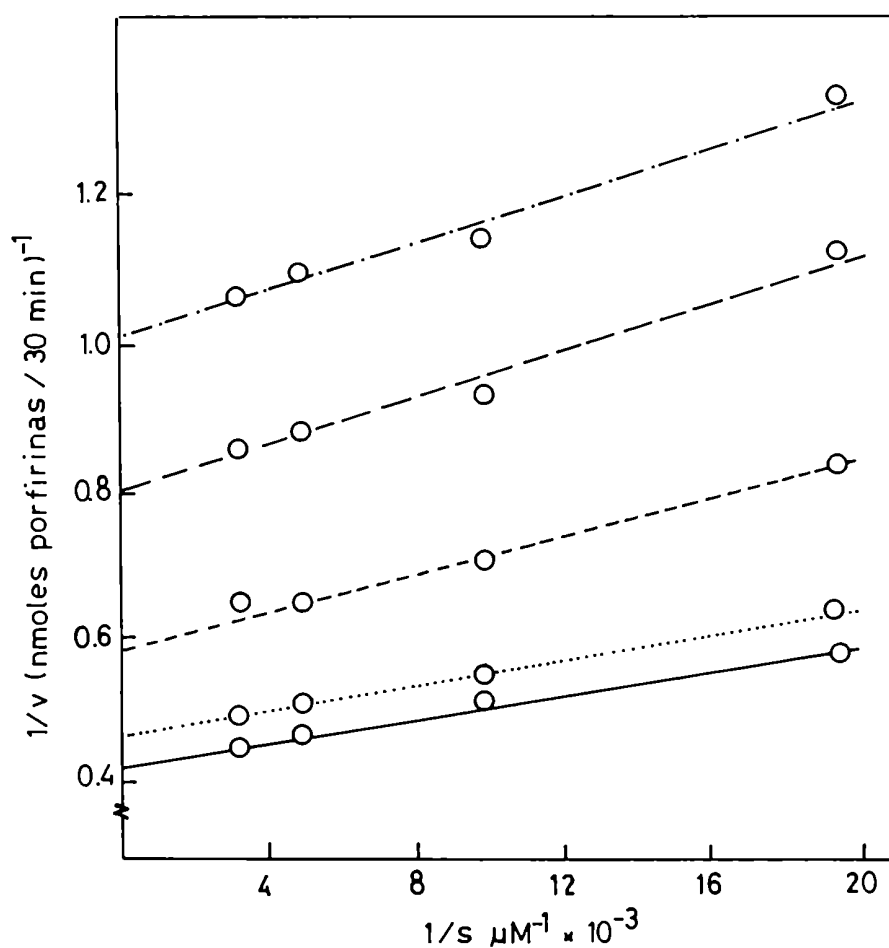


Figura I.31.: Efecto de concentraciones variables de PBG sobre la velocidad de formación de porfirinas en ausencia y presencia de distintas concentraciones de amonio.  
 (—) Sin agregado de inhibidor, (... ) 1 mM, (----) 10 mM, (— —) 50 mM, (-----) 100 mM.

El análisis de los perfiles cinéticos correspondientes al consumo de sustrato resulta más sencillo. El amonio no afecta el consumo de PBG ni el comportamiento cinético de la enzima (Figura I.37.). Estos efectos se observan claramente en la Figura I.38.) donde vemos que la velocidad de la reacción medida en función del consumo de sustrato aumenta con la concentración del mismo pero se mantiene constante para todas las concentraciones de amonio ensayadas.



**Figura I.32.:** Representación de Lineweaver-Burk para la velocidad de formación de porfirinas a concentraciones variables de amonio.  
 (—) Sin agregado de inhibidor,  
 (...) 1 mM, (----) 10 mM, (— —) 50 mM, (-·-·-) 100 mM.

Cuando se efectuaron los gráficos de dobles recíprocas (Figura I.39.) se obtuvieron líneas rectas prácticamente coincidentes y por lo tanto no hubo variaciones en los valores de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$ . El coeficiente  $n$  de Hill resultó igual a 1 para todos los casos. Estos mismos resultados se reportaron para la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat, 1983).

En base a estas observaciones podemos concluir que el amonio ejerce un efecto inhibitorio sobre la actividad de la Deaminasa de *Rp. palustris* en lo que se refiere a la formación de

porfirinas, pero no afecta el consumo de PBG para una concentración constante del catión, como así tampoco la cinética michaeliana de la reacción, de acuerdo con el comportamiento de esta misma enzima frente al amonio, observado en hígado de vaca (Sancovich y col., 1969, a).

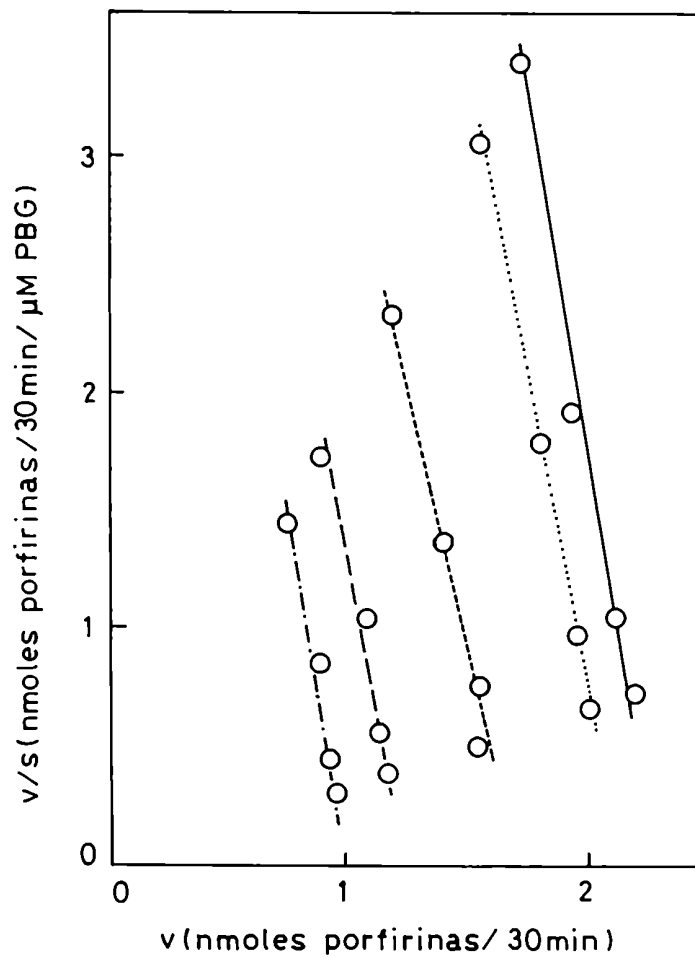
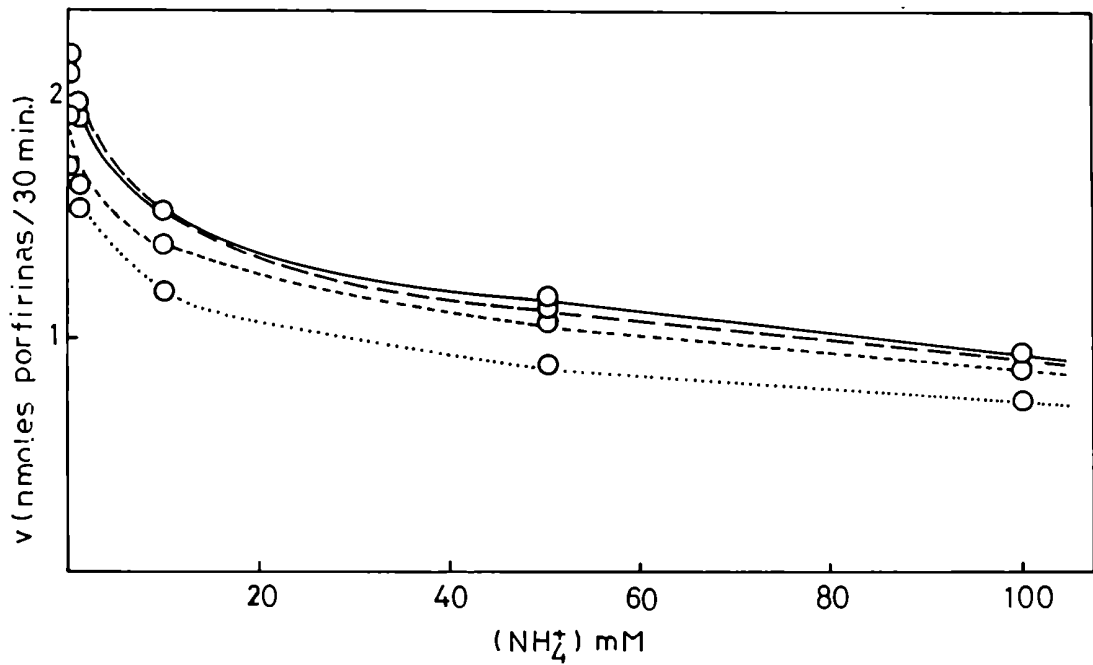
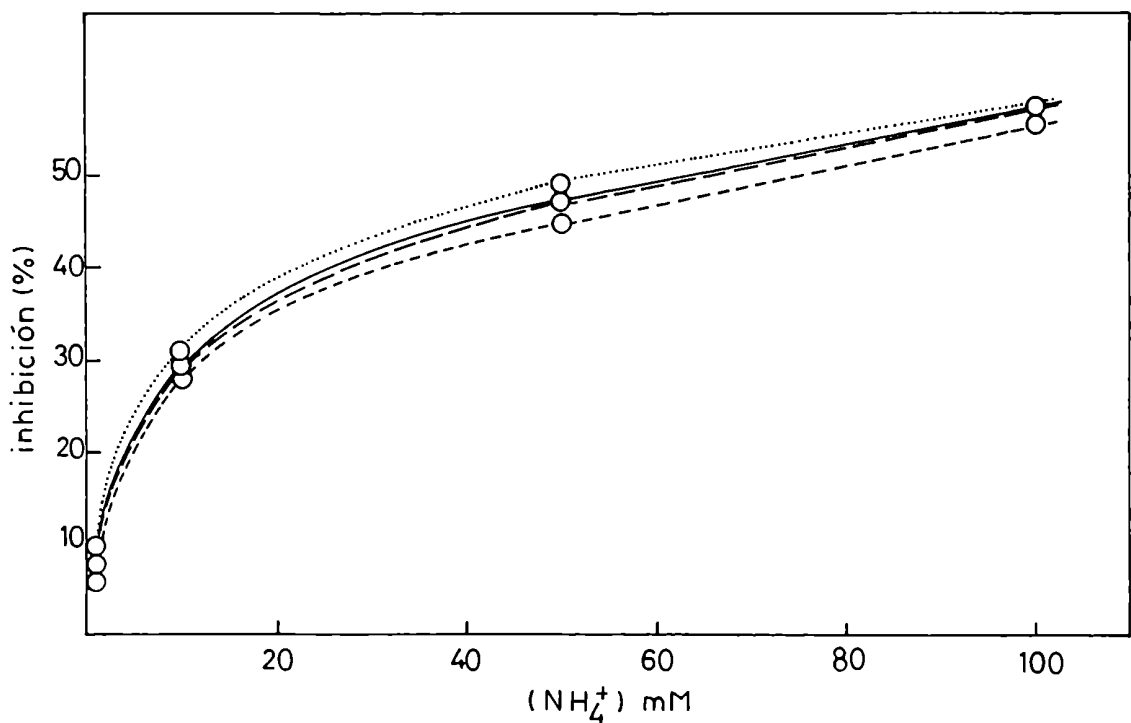


Figura 1.33.: Representación de Eadie para la velocidad de formación de porfirinas a concentraciones variables de amonio.  
 (—) Sin agregado de inhibidor, (... ) 1 mM, (- - -) 10 mM, (— —) 50 mM, (-.-.-) 100 mM.



**Figura I.34.:** Efecto de concentraciones variables de amonio sobre la velocidad de formación de porfirinas a distintas concentraciones de sustrato. (.....) 51  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 102  $\mu\text{M}$  PBG, (— —) 205  $\mu\text{M}$  PBG, (——) 310  $\mu\text{M}$  PBG.



**Figura I.35.:** Porcentaje de inhibición de la velocidad de formación de porfirinas en función de la concentración de amonio. (.....) 51  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 102  $\mu\text{M}$  PBG, (— —) 205  $\mu\text{M}$  PBG, (——) 310  $\mu\text{M}$  PBG.

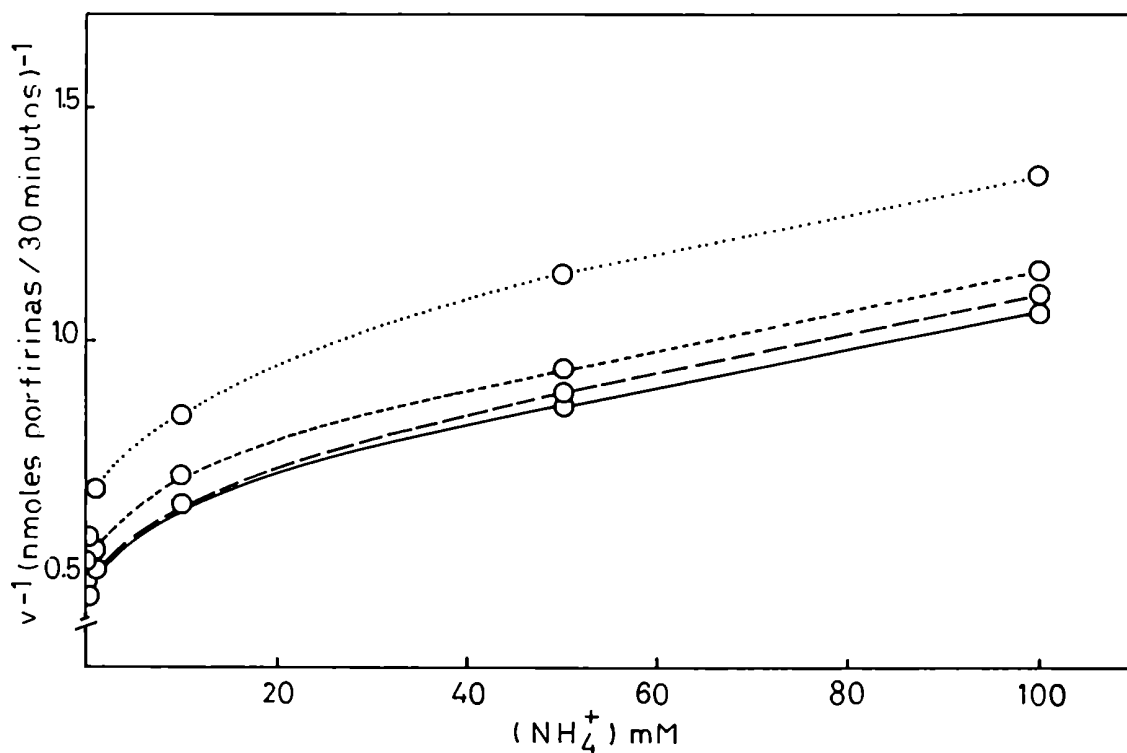


Figura I.36.: Efecto de concentraciones variables de amonio sobre la inversa de la velocidad de formación de porfirinas.  
 (.....) 51  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 102  $\mu\text{M}$  PBG, (— —) 205  $\mu\text{M}$  PBG, (——) 310  $\mu\text{M}$  PBG

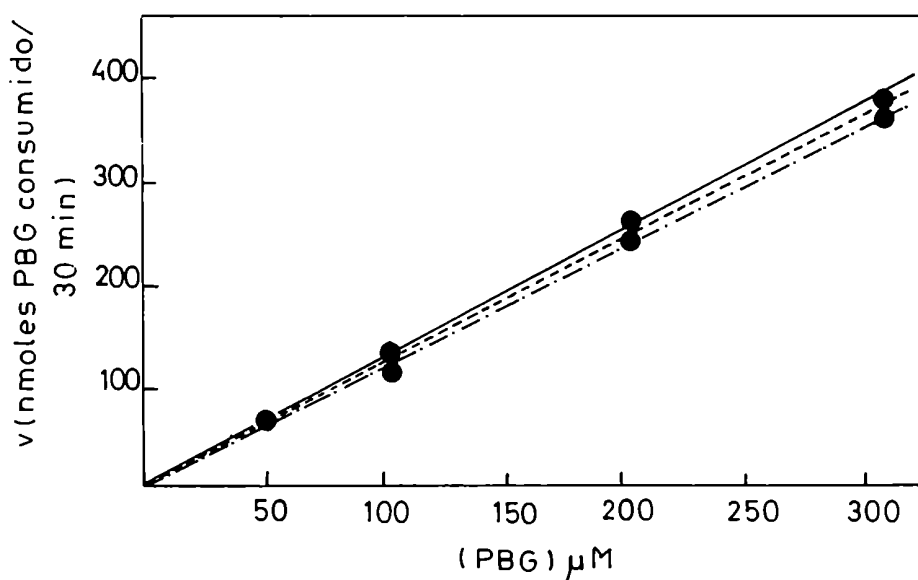


Figura I.37.: Efecto de concentraciones variables de PBG sobre la velocidad de consumo de sustrato a distintas concentraciones de amonio.  
 (.....) Sin agregado de inhibidor, (.....) 1 mM, (----) 10 mM, (— —) 50 mM, (-----) 100 mM.

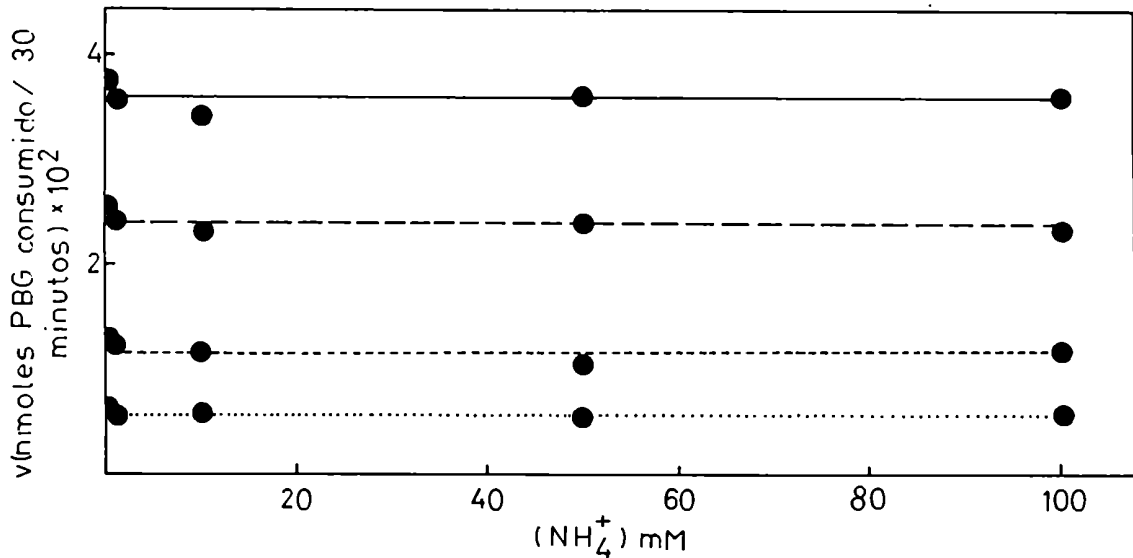


Figura I.38.: Efecto de concentraciones variables de amonio sobre la velocidad de consumo de sustrato. (.....) 51  $\mu\text{M}$  PBG, (----) 102  $\mu\text{M}$  PBG, (— · —) 205  $\mu\text{M}$  PBG, (——) 310  $\mu\text{M}$  PBG.

Estos datos se ajustan al modelo propuesto por Juknat (1983) según el cual "el inhibidor actuaría a nivel de la ciclación e isomerización de las porfirinas. Dado que no modifica la velocidad de consumo de PBG, pero disminuye la formación de producto, de acuerdo con las ideas más recientes acerca de que el sustrato de la Isomerasa es el TPM lineal producto de la acción de la Deaminasa (Jordan y Berry, 1980; Battersby y col., 1979), el amonio no tendría ningún sitio de unión sobre la Deaminasa, pero como disminuye la cantidad total de porfirinas formadas, debe haber menor cantidad de TPM disponible para su posterior ciclación a Uro I o isomerización y ciclación a Uro III. Esto podría deberse a una reacción directa del amonio con los intermediarios di y tripirrólicos nacientes, formando un derivado básico con los mismos que se liberaría de la Deaminasa, como lo demostraron Davies y Neuberger (1973) al estudiar la acción del amonio y otras bases nitrogenadas sobre la Deaminasa aislada. Se sabe además, que estos intermediarios libres son sustratos pobres de las enzimas (Rossetti y col., 1977). Como resultado final de todo este proceso, la cantidad total de porfirinas disminuye. En conclusión, el amonio no actúa directamente sobre

la Deaminasa sino que atraparía y liberaría al medio intermedios polipirrólicos, reduciendo la concentración de TPM unido a la enzima".

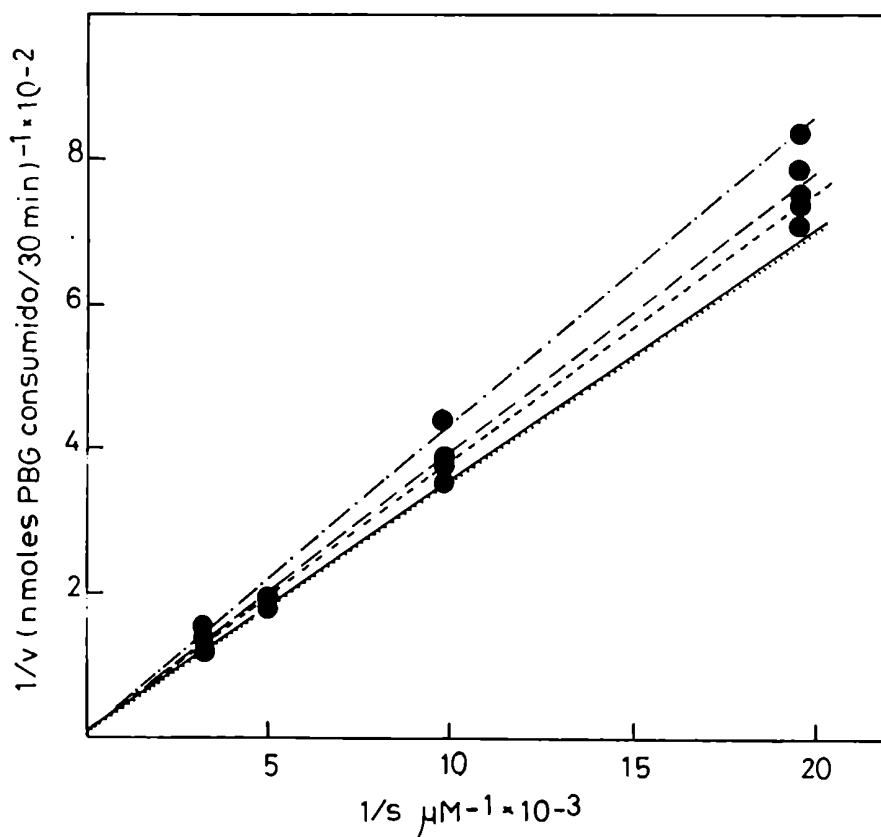


Figura I.39.: Gráfico de Lineweaver-Burk para la velocidad medida en función del consumo de sustrato.  
 (—) Sin agregado de inhibidor,  
 (....) 1 mM amonio, (----) 10 mM amonio,  
 (— —) 50 mM amonio,  
 (-.-.-) 100 mM amonio.

### I.5. Referencias

- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Matcham, G.W.J. & Mc Donald, E. (1979), *J.C. S. Chem. Comm.*, 1155.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Hart, G.; Matcham, G.W.J. & Pandey, P.S. (1983), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3041.
- Berry, A. & Jordan, P.M. (1981), *Biochem. Soc. Trans.* 9 (3), 231.
- Bogorad, L. (1963), *Ann. N.Y.Acad.Sci.* 104, 676.
- Burton, G.; Fagerness, P.E.; Hosozawa, S.; Jordan, P.M. & Scott, A.I. (1979), *J. C. S. Chem. Comm*, 202.
- Clement, R.P.; Kohashi, M. & Piper, W. (1982), *Arch. Biochem. Biophys.* 214 (2), 657.
- Davies, R. & Neuberger, A. (1973), *Biochem. J.* 133, 471.
- Evans, J.N.S.; Davies, R.C.; Boyd, A.S.; Ichinose, I.; Mackenzie, N.E.; Scott, A.I. & Baxter, R.L. (1986 a) *Biochemistry* 25, 896.
- Evans, J.N.S.; Burton, G.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1986 b), *Biochemistry* 25, 905.
- Farmer, D.J. & Hollebone, B.R. (1984), *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 49.
- Frydman, R.B. & Feinstein, G. (1974), *Biochim. Biophys. Acta* 350, 358.
- Frydman, R.B. & Frydman, B. (1970), *Arch. Biochem. Biophys.* 136, 193.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1980), *FEBS lett.* 112 (1), 86.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981), *Biochem. J.* 195, 177.
- Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1979), *FEBS lett.* 104 (2), 364.
- Jordan, P.M.; Burton, G.; Nordlov, H.; Schneider, M.; Pryde, L. & Scott, A.I. (1979), *J.C.S.Chem. Comm.*, 204.
- Juknat, A A. (1983), Tesis de Doctorado (UBA).
- Juknat de Geralnik, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981), *Int. J. Biochem.* 13 (3), 343.
- Koopmann, G.E. & Batlle, A.M. del C. (1987), *Int. J. Biochem.* 4, 373.
- Koopmann, G.E.; Juknat de Geralnik, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1986), *Int. J. Biochem.* 18, 935.
- Llambías, E.B.C. (1971), Tesis de Doctorado (UBA).



- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a), Biochim. Biophys. Acta 227; 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), Biochem. J. 121, 327.
- Llambías, E.B.C.; Locascio, G. & Batlle, A.M. del C. (1971), Anal. Asoc. Quím. Arg. 59, 271.
- Pluscec, J. & Bogorad, L. (1970), Biochemistry 9, 4736.
- Pollack, S.E. & Russell, C.S. (1978), FEBS lett. 90 (1), 47.
- Polo, C.F.; Stella, A.M.; Wider, E.A.; Batlle, A.M. del C.; Lenczner, J.M.; Altuna, C. & Magnin, P.H. (1983), Prensa Med. Arg. 70, 433.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972), Biochemistry 11, 904.
- Riordan, J.F. (1973), Biochemistry 12, 3915.
- Riordan, J.F.; Mc Elvany, R.D. & Borders, C.L. Jr. (1977), Science 195, 884.
- Rossetti, M.V. (1978), Tesis de Doctorado (UBA).
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977), Int. J. Biochem. 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat de Geralnik, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 761.
- Sancovich, H.A. (1972), Tesis de Doctorado (UBA).
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 a), FEBS lett. 3, 223.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969 b), Biochim. Biophys. Acta 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976), Acta Physiol. Latinoam. 26 (5), 376.
- Scott, A.I.; Burton, G. & Fagerness, P.E. (1979), J. C.S. Chem. Comm., 199.
- Scott, A.I.; Burton, G.; Jordan, P.M.; Matsumoto, H.; Fagerness, P.E. & Pryde, L.M. (1980), J.C.S. Chem. Comm., 384.
- Seehra, J.S. & Jordan, P.M. (1980), J. Am. Chem. Soc. 102, 6841.
- Viale, A.A. (1978), Tesis de Doctorado (UBA).
- Viale, A.A.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980 a), Int. J. Biochem. 12, 729.
- Viale, A.A.; Lorenti, A.S.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1980 b), Revista Argentina de Microbiología 12 (1), 1.

- Viale, A.A.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1987), Int. J. Biochem. 19, 379.
- Williams, D.C.; Morgan, G.S.; Mc Donald, E. & Battersby, A.R. (1981), Biochem. J. 193, 301.

## CAPITULO II

### INMOVILIZACION DE LA DEAMINASA

---

	Página
II.1. <i>Rhodopseudomonas palustris</i>	329
II.1.1. Consideraciones generales	329
II.1.2. Selección de las condiciones óptimas para la inmovilización de la Deaminasa	330
II.1.2.1. Cantidad óptima de bromuro de cianógeno para la activación de la Sepharosa	331
II.1.2.2. Cantidad óptima de enzima para el acople	332
II.1.2.3. Cinética de la reacción de acople	335
II.1.3. Selección de las condiciones óptimas de incubación para la Deaminasa inmovilizada	335
II.1.3.1. Tiempo de incubación	336
II.1.3.2. Efecto de la cantidad de proteína	338
II.1.3.3. Saturación por sustrato	340
II.1.3.4. pH óptimo de la reacción	342
II.1.4. Estudio comparativo de algunas propiedades de la Deaminasa insolubilizada y soluble	343
II.1.4.1. Uso repetido	343
II.1.4.2. Estabilidad de la Deaminasa frente al estacionamiento	343
II.1.4.3. Efecto de la temperatura	345
II.2. Hígado bovino	347
II.2.1. Consideraciones generales	347
II.2.2. Unión de la enzima al gel activado	348
II.2.3. Estabilidad de la Deaminasa inmovilizada	349
II.2.3.1. Estabilidad mecánica	349
II.2.3.2. Estabilidad frente al estacionamiento	349

	Página
II.2.3.3. Estabilidad térmica	350
II.2.4. Uso repetido	351
II.2.5. pH óptimo	353
II.3. Referencias	356

## II. INMOVILIZACION DE LA DEAMINASA

### II.1. Rhodopseudomonas palustris

#### II.1.1. Consideraciones generales

Durante muchos años nuestro laboratorio se ha interesado en el estudio de la biosíntesis de porfirinas con particular énfasis en los mecanismos de acción de las enzimas involucradas (Batlle, 1973) y en el empleo de enzimas y ligandos inmovilizados de componentes del camino tetrapirrólico (Wider de Xifra y col., 1972, 1978; Wider de Xifra y Batlle, 1973, 1976, 1978; Rossetti y col., 1976; Stella y col., 1977; Stella y Batlle, 1977, 1978; Batlle y col., 1978 a, b; Bustos, 1983; Stafforini y col., resultados no publicados).

Como ya se mencionó, la succinil CoA sintetasa cataliza la formación de Suc.CoA a partir de succinato, un nucleótido trifosfato y CoA. Empleando la Suc.CoA-S soluble e insolubilizada y ATP inmovilizado, Wider de Xifra y col. (1972) y Wider de Xifra y Batlle (1973, 1976) han descrito el primer caso de aplicación de un sistema enzima-soporte al estudio del mecanismo de acción de una enzima involucrada en el camino biosintético del hemo.

El ALA-S, que cataliza la reacción de formación de ALA, se caracteriza por su significativa inestabilidad luego de su extracción a partir de la mayoría de las fuentes estudiadas y por ser normalmente una enzima mitocondrial. En base a ello, nosotros consideramos que dentro de la célula el ALA-S funciona mientras se encuentra unida o asociada a componentes celulares que le confieren una estructura óptima. Cuando la proteína se separa de este ensamble natural, se transforma en una enzima muy lábil. En este caso, una alternativa práctica para el estudio del ALA-S en condiciones probablemente semejantes a aquellas en las cuales la enzima funciona *in vivo*, consistió en unir a la misma a una matriz artificial (Wider de Xifra y col., 1978).

Por otra parte y contando con la posibilidad de obtener grandes cantidades de enzima altamente purificada, Stella y col. (1977) estudiaron las condiciones óptimas para la unión del ALA-D a un soporte sólido y las propiedades de la enzima inmovilizada, empleándola para la obtención de PBG a partir de

su sustrato ALA y la enzima insolubilizada, con la ventaja de poder emplear varias veces el ALA-D, a diferencia del método usual en el cual debe prepararse la enzima cada vez que se biosintetiza el pirrol. Estos trabajos preliminares permitieron posteriormente investigar la relación existente entre la estructura cuaternaria del ALA-D de hígado bovino y su actividad, empleando el método descrito por Chan (1970). El ALA-D nativa se unió a Sepharosa a través de 2 subunidades y las subunidades no-unidas covalentemente se disociaron con urea. Se estudiaron las propiedades de las subunidades aisladas bajo diferentes condiciones y se llevaron a cabo experiencias de reasociación y re-hibridización (Batlle y col., 1978 a).

Rossetti y col. (1976) inmovilizaron la PBG-asa purificada de hígado de vaca; determinaron las condiciones óptimas para la unión de la enzima a un soporte de Sepharosa y para la medición de la actividad catalítica, con el fin de investigar si existía o no una asociación y/o interacción entre los componentes del complejo.

Sobre la base de las consideraciones mencionadas, se llevaron a cabo experiencias tendientes a seleccionar las condiciones más apropiadas para el acople de la deaminasa de *Rp. palustris* a un soporte de Sepharosa 4B y para la medición de la actividad de la enzima una vez insolubilizada. Teniendo en cuenta además que mediante el proceso de inmovilización es posible modificar, en cierto grado, varias propiedades de la enzima tales como  $K_m$ , comportamiento de la actividad frente al pH, estabilidad, etc., se efectuó un estudio comparativo de las propiedades de la deaminasa soluble e insolubilizada.

La obtención de una fracción de deaminasa inmovilizada era necesaria además para realizar las experiencias planeadas con intermediarios de la biosíntesis de uroporfirinógenos y los estudios de la estructura cuaternaria de la enzima.

#### II.1.2. Selección de las condiciones óptimas para la inmovilización de la deaminasa

Como ya se mencionó, las proteínas pueden unirse covalentemente a ciertas matrices sólidas, a través de determinados grupos funcionales, los cuales obviamente no deben estar involucrados en la actividad biológica. La técnica empleada en el

presente trabajo consiste en activar el soporte (Sepharosa 4B) introduciendo en él un grupo electrofílico, con el fin de lograr que el gel sea más reactivo hacia los restos nucleófilos presentes en la enzima.

El problema se basa en encontrar las condiciones adecuadas para la introducción del número óptimo de grupos electrofílicos, para una dada concentración de reactivo (BrCN), de modo tal que el producto resultante sea el más conveniente para el siguiente paso de acople enzimático. Es bien conocido que cada enzima puede requerir condiciones específicas dependientes tanto de su tamaño molecular como del sustrato y de la naturaleza y densidad de la matriz. Por lo tanto, necesariamente deben establecerse las condiciones óptimas para la activación del soporte y el acople subsiguiente de la enzima.

#### II.1.2.1. Cantidad óptima de bromuro de cianógeno para la activación de la Sepharosa

Teniendo en cuenta los principios mencionados anteriormente, se determinó en primer lugar cuál era la concentración óptima de BrCN (expresada como mg de BrCN/ml de gel decantado) necesaria para la activación de la Sepharosa 4B. Con este fin se activaron fracciones de 2 ml de gel con concentraciones variables de BrCN (10, 50, 100 y 200 mg de BrCN/ml de Sepharosa); posteriormente cada fracción fue resuspendida en 2 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 y puesta en contacto con 2 ml de una solución enzimática conteniendo aproximadamente 10 mg de proteína/ml, para permitir el acople.

Los resultados obtenidos se ilustran en las Figuras II.1. A y B.

Se observa (Figura II.1.A) que la actividad enzimática expresada en función de las porfirinas formadas aumenta con la cantidad de BrCN alcanzándose un plateau cuando la concentración del mismo es de 100 mg/ml de Sepharosa. La curva de actividad calculada en base al consumo de sustrato muestra el mismo comportamiento.

En cuanto al porcentaje de proteína unida al gel de Sepharosa (Figura II.1.B) los valores obtenidos fueron 25 y 37% para los dos primeros puntos ensayados (10 y 50 mg de BrCN/ml de Sepharosa), alcanzándose un plateau para 100 mg de BrCN/ml de

gel al cual correspondió un 67 % de unión proteica. El mismo perfil se obtuvo cuando la cantidad de proteína unida se expresó en base a los mg acoplados por ml de Sepharosa.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió emplear para la activación del soporte, 100 mg de BrCN por ml de Sepharosa ya que en esas condiciones se obtiene el mayor rendimiento de acople en lo referente a la cantidad de proteína enzimática unida y a su actividad.

#### II.1.2.2. Cantidad óptima de enzima para el acople

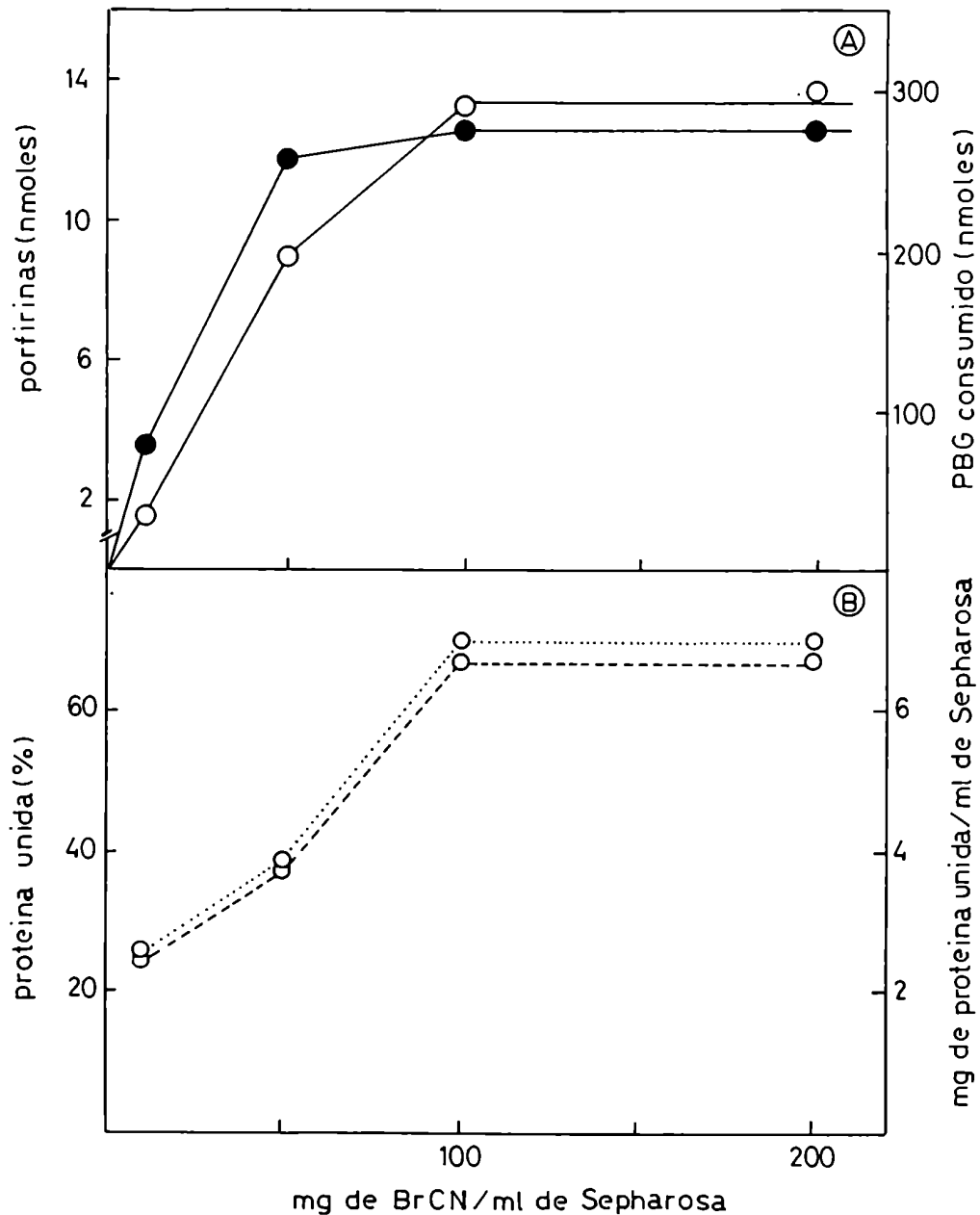
Otro aspecto de considerable interés, cuando se trata de optimizar las condiciones de inmovilización, consiste en determinar la cantidad inicial de enzima a agregar a la Sepharosa activada, a fin de obtener el máximo rendimiento de acople.

Para realizar este estudio, se acoplaron fracciones de Sepharosa activada, con concentraciones variables de enzima (entre 1 y 8,2 mg de proteína/ml de Sepharosa) como se indica en la Figura II.2.

Se observa (Figura II.2.A) que la cantidad de proteína unida (en mg por ml de gel) aumenta linealmente a medida que se incrementa la concentración inicial de la misma en tanto que el porcentaje de unión tiende a un plateau para valores en un rango de 7 - 8 mg de proteína/ml de Sepharosa. Cabe notar que para concentraciones iniciales de enzima de 5,7 y 8,2 mg/ml correspondieron porcentajes de unión de aproximadamente igual orden: 64,7 y 66,7 % respectivamente.

La actividad enzimática expresada en función del producto total formado (Figura II.2.B) aumenta con el agregado de concentraciones iniciales crecientes de proteína mientras que el consumo de sustrato, en cambio, exhibe un comportamiento de tipo hiperbólico; esto se debe a que ya con la menor concentración de enzima ensayada hubo un rápido y prácticamente total consumo de PBG. Por lo tanto, debe tenerse en cuenta, que debido a la falta de sustrato, es posible que la actividad real de las distintas fracciones no sea la calculada; esto explicaría, por otra parte, el descenso en la actividad específica expresada en función del PBG consumido (Figura II.2.C).





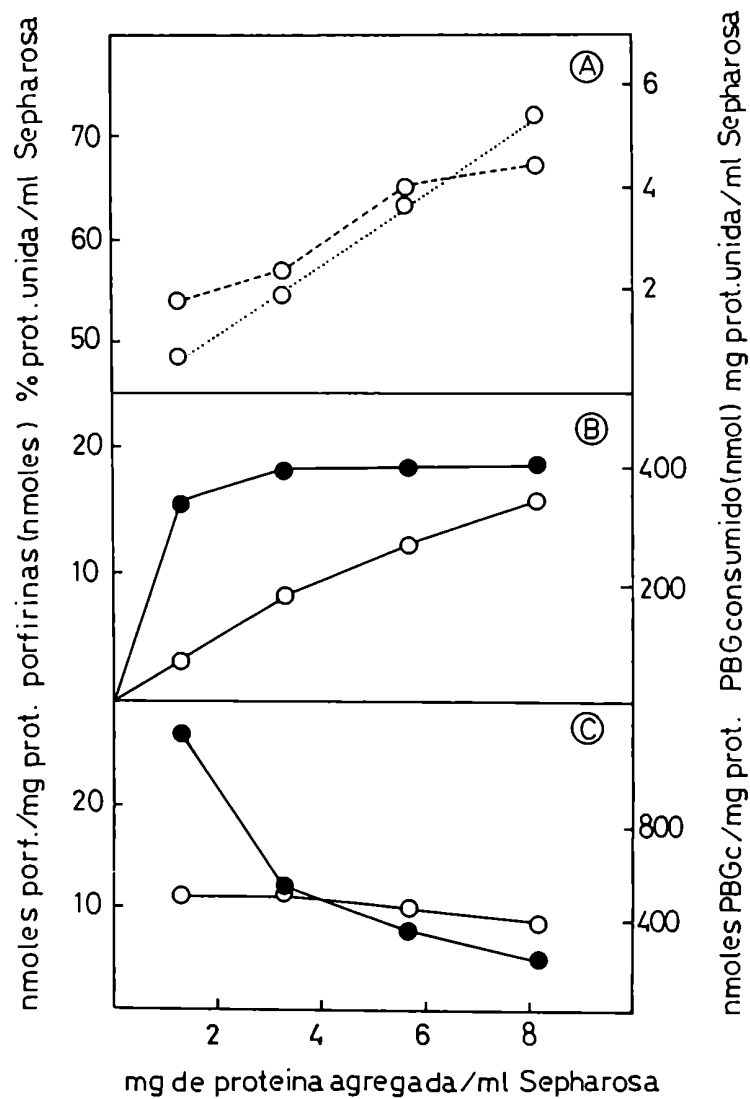
**Figura II.1.: Cantidad óptima de BrCN**

El sistema de incubación contenía 90  $\mu\text{g}$  de PBG y 0,4 ml de fracción enzimática en un volumen final de 3 ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 30 minutos en aerobiosis, oscuridad, a 37 °C y con agitación mecánica vigorosa.

La concentración de la solución enzimática (sobrenadante de calentamiento) empleada para el acople fue de 10,29 mg/ml. El tiempo de acople fue de 15 horas 30 minutos.

(A) Actividad: (○) porfirinas formadas, (●) PBG consumido;

(B) Proteína unida: (○) mg/ml de Sepharosa, (○) %/ml de Sepharosa.



**Figura II.2.:** Cantidad óptima de enzima para el acople. El sistema de incubación contenía 90  $\mu$ g de PBG y 0,4 ml de fracción enzimática en un volumen final de 3 ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 30 minutos en las condiciones detalladas en Métodos. La activación de la Sepharosa 4B se llevó a cabo empleando la relación 100 mg de BrCN/ml de gel. El tiempo de acople fue de 15 horas 30 minutos. (A) Proteína unida: (—○—) mg/ml de Sepharosa, (---○---) %/ml de Sepharosa; (B) Actividad: (○) porfirinas formadas, (●) PBG consumido; (C) Actividad específica: (○) porfirinas formadas, (●) PBG consumido.

En base a estos resultados se decidió continuar con nuestros estudios empleando para el acople 7-8 mg de proteína/ml de Sepharosa, ya que en estas condiciones se obtiene una enzima insolubilizada de alta actividad, con un rendimiento de acople elevado y reproducible.

#### II.1.2.3. Cinética de la reacción de acople

Otra variable que influye significativamente tanto en el rendimiento de acople como en la actividad remanente de la enzima inmovilizada, es el tiempo empleado en la reacción de unión de la proteína al soporte.

Teniendo en cuenta estos conceptos, se diseñó una experiencia para estudiar la cinética del proceso de acople. Para ello se mantuvieron en contacto cantidades fijas de Sepharosa activada y enzima, durante tiempos variables (entre 2 y 22 horas) (Figura II.3.).

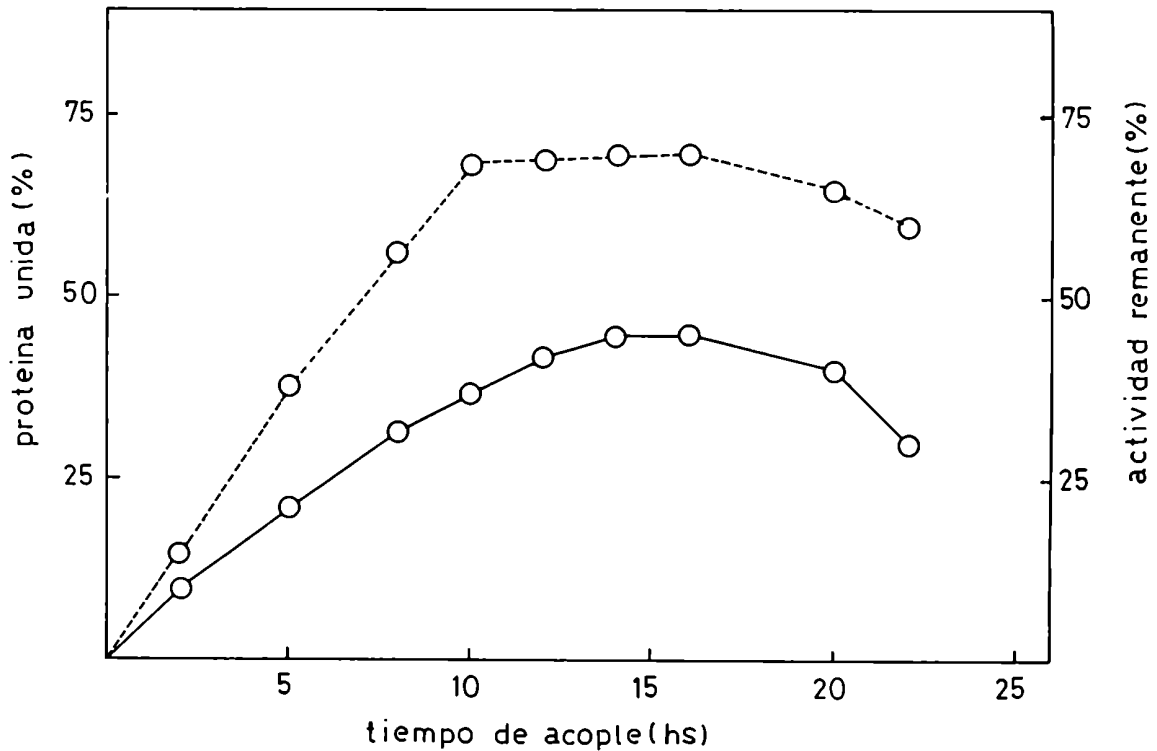
Si se tiene en cuenta la proteína unida, el óptimo porcentaje (70 %) correspondió a un tiempo de acople de 10 a 16 horas.

La curva de rendimiento de acople de la deaminasa, expresada como actividad retenida por el complejo enzima-Sepharosa, presenta un máximo de alrededor de 45 % entre 14 y 16 horas.

En base a los resultados obtenidos se adoptó como tiempo standard un lapso de 15 horas 30 minutos, que era el que se venía empleando hasta el momento.

#### II.1.3. Selección de las condiciones óptimas de incubación para la deaminasa inmovilizada

Con el fin de establecer el sistema standard de incubación para medir la actividad de la deaminasa insolubilizada, se efectuaron ensayos tendientes a seleccionar el tiempo, concentración de enzima y de sustrato y pH óptimos para la incubación de la misma. En estas experiencias se empleó enzima inmovilizada en las condiciones establecidas previamente.



**Figura II.3.:** Cinética de la reacción de acople. El sistema de incubación contenía 90  $\mu$ g de PBG y 0,4 ml de fracción enzimática en un volumen final de 3 ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se incubó durante 30 minutos en las condiciones detalladas en Métodos. La activación de la Sepharosa 4B se llevó a cabo empleando la relación 100 mg de BrCN/ml de gel. Para el acople se utilizó una relación de 8 mg proteína agregada/ml de Sepharosa activada. (-----) proteína unida (%); (—) actividad remanente (%).

#### II.1.3.1. Tiempo de incubación

En los ensayos iniciales se empleó como tiempo de incubación 30 minutos; para establecer si correspondía o no al óptimo, se decidió estudiar en detalle el efecto de esta variable sobre

la actividad enzimática.

Para llevar a cabo esta experiencia se incubaron fracciones de enzima insolubilizada durante intervalos variables entre 2 y 45 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II.4.

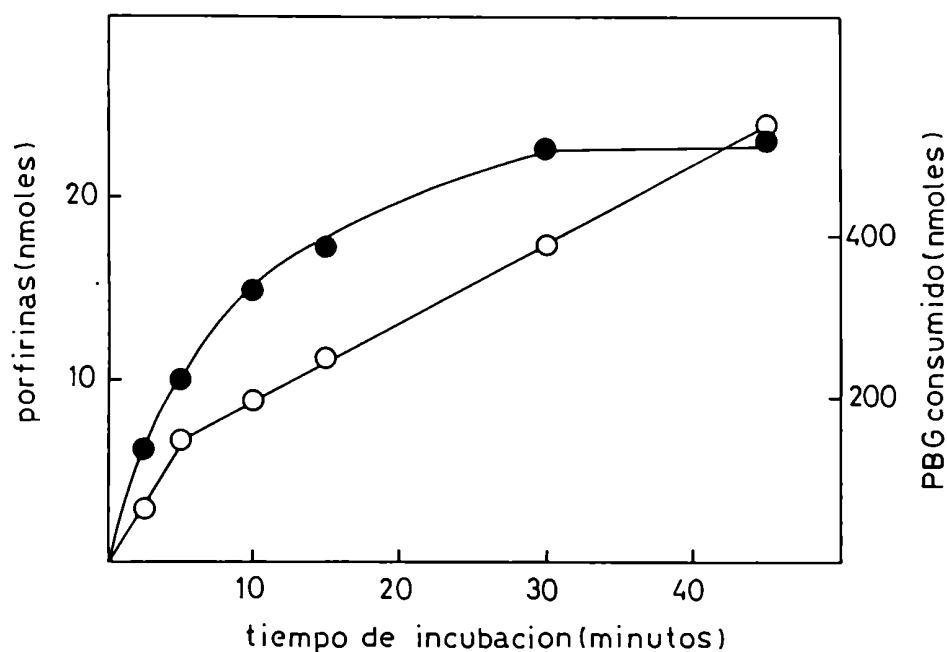


Figura II.4.: Tiempo de incubación.  
El sistema de incubación contenía 0,4 ml de enzima insolubilizada y 150  $\mu$ g de PBG en un volumen final de 3 ml en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8. Se indican los tiempos de incubación en sayados, el resto de las condiciones fueron las standard. La concentración de la fracción enzimática empleada fue de 3,30 mg/ml.  
(○) Porfirinas formadas, (●) PBG consumido.

Se observa que, si se consideran las porfirinas totales formadas, existe un aumento lineal de las mismas al incrementarse el período de incubación, para todos los puntos estudiados. Luego de sólo 5 minutos de incubación se biosintetiza suficiente cantidad de producto como para poder realizar una caracterización completa de los mismos; no obstante se decidió emplear

30 minutos como tiempo de incubación a fin de reducir posteriormente la cantidad de enzima en el sistema.

Por otra parte, es importante notar que aún para tiempos muy cortos, la actividad es significativamente alta.

La curva obtenida para el consumo de sustrato resultó ser hiperbólica, no existiendo consumo adicional del mismo luego de los 30 minutos de incubación, cuando aún quedaba un 22% de sustrato remanente.

Obviamente, los perfiles correspondientes a las actividades específicas en función del tiempo fueron similares a los ilustrados en la Figura II.4. (no se muestran).

#### II.1.3.2. Efecto de la cantidad de proteína

Ya desde las experiencias iniciales resultó evidente que la actividad de la deaminasa inmovilizada de *Rp. palustris* era notablemente alta y hasta este momento se había empleado aproximadamente 1 mg de proteína por ensayo. Para ajustar aún más las condiciones se estudió la influencia de la cantidad de proteína sobre la actividad, incubándose para ello cantidades variables de enzima inmovilizada. Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura II.5.

En la Figura II.5.A se observa que los nmoles de porfirinas totales formadas aumentan en forma lineal a medida que se incrementa la cantidad de enzima presente. En cambio, el consumo de sustrato muestra un comportamiento hiperbólico alcanzando un plateau para 1,32 mg de proteína, quedando aún un 13 % de PBG remanente.

Como era de esperar, la actividad específica expresada en función del producto formado resultó ser constante y aproximadamente igual a 13 nmoles/mg de proteína en tanto que la correspondiente al consumo de PBG, disminuyó para todos los puntos estudiados.

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió reducir la cantidad de proteína empleada a 0,6 mg dado que en esas condiciones los nmoles de producto formado son apreciablemente elevados y suficientes como para su completa caracterización.

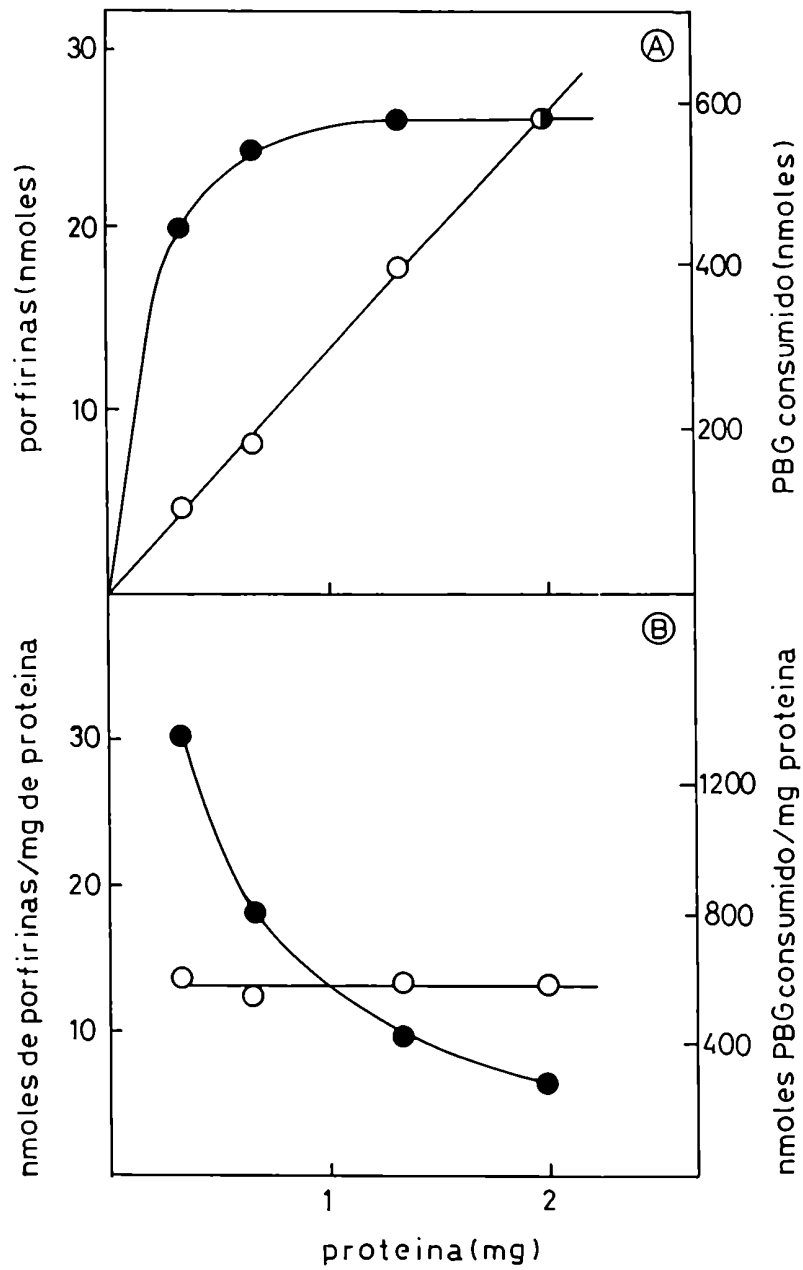


Figura II.5.: Efecto de la cantidad de proteina.

El sistema de incubación con tenía 150  $\mu$ g de PBG disueltos en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8; fracción enzimática y un volumen del mismo buffer suficiente para completar 3 ml. El tiempo de incubación fue de 30 minutos y las condiciones las standard. La concentración de la solución original de enzima empleada fue de 3,30 mg/ml, en sayándose fracciones de la misma conteniendo 0,33; 0,66; 1,32; y 1,98 mg de proteina. (A) Actividad total, (B) Actividad específica; (O) porfirinas formadas, (●) PBG consumido.

### II.1.3.3. Saturación por sustrato

Con el fin de determinar la concentración óptima de sustrato a emplear en el sistema standard, se llevaron a cabo incubaciones con concentraciones variables de PBG, ampliando el rango en la zona de baja concentración para obtener alguna información acerca del comportamiento cinético de la enzima.

En las Figuras II.6.A y B se encuentran graficados la cantidad de producto formado y de PBG consumido en función de la concentración de sustrato. Se obtuvieron iguales perfiles para las gráficas correspondientes a las actividades específicas (no se muestran).

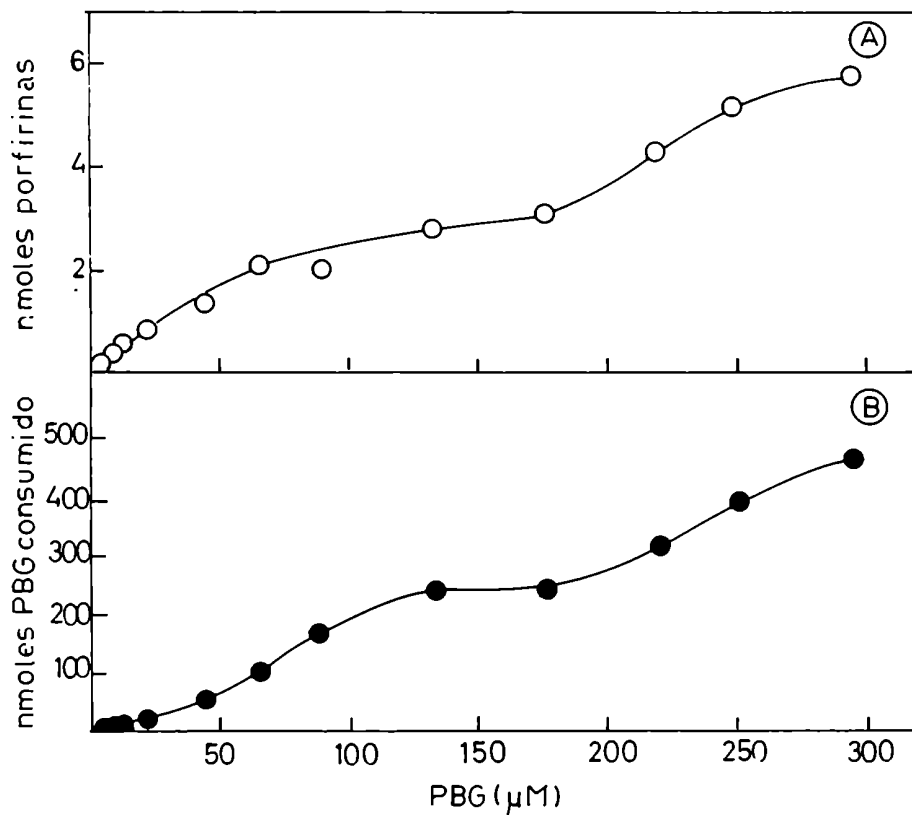
A diferencia de los resultados obtenidos anteriormente con la enzima soluble (Kotler y col., 1987) que presentaba un comportamiento michaeliano para la formación de porfirinas, en este caso, la curva resultó bifásica (Figura II.6.A). En la zona de bajas concentraciones de sustrato es hiperbólica llegando a un plateau entre 133 y 177  $\mu\text{M}$  de PBG. A partir de ese punto se observa nuevamente un aumento con perfil hiperbólico del producto formado, con una tendencia a alcanzar un plateau a concentraciones superiores a 300  $\mu\text{M}$ .

Se obtuvo una respuesta similar cuando se graficó el PBG consumido vs. concentración de sustrato (Figura II.6.B); la enzima soluble, en cambio, había mostrado un comportamiento lineal en el mismo rango (Kotler y col., 1987).

Estas características estarían indicando que cuando la enzima se inmoviliza se pondría en evidencia la probable existencia de sitios catalíticos que se saturarían a distintas concentraciones de sustrato. En relación a esto es importante mencionar que el peso molecular calculado para la deaminasa de *Rp. palustris* resultó ser de  $74.000 \pm 7.400$  (Kotler y col., 1987), o sea, aproximadamente el doble del valor determinado, en general, para la deaminasa de otras fuentes (Rossetti y col., 1980). En base a ello se ha propuesto que ese peso molecular elevado podría deberse a que en *Rp. palustris* la deaminasa se presenta como un oligómero resultante de la asociación de dos monómeros de peso molecular 40.000, o aún cuatro de 20.000. Estos resultados estarían apoyando nuestra hipótesis de la existencia de dos sitios catalíticos, los cuales se ubicarían entonces, en distintas subunidades. Por último, teniendo en cuenta que la estructura conformacional de las enzimas puede variar como consecuencia



del proceso de inmovilización, podríamos pensar, como ya indicáramos, que la estructura que adopta la deaminasa insolubilizada es tal que hace posible que se manifieste la presencia de dos sitios (curva bifásica) en tanto que no ocurriría lo mismo con la deaminasa soluble (curva michaeliana).



**Figura II.6.:** Saturación por sustrato.  
 El sistema de incubación contenía: PBG; 0,2 ml de Sepharosa-Deaminasa y un volumen de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 suficiente para completar 3 ml. Se incubó durante 30 minutos en las condiciones standard. La concentración de la fracción enzimática empleada fue de 3,30 mg/ml.  
 (A) porfirinas formadas (○)  
 (B) PBG consumido (●)

En base a estos datos se decidió emplear, en adelante, una concentración de PBG de 133  $\mu\text{M}$ .

#### II.1.3.4. pH óptimo de la reacción

Se ha observado frecuentemente que como consecuencia del proceso de inmovilización se produce un desplazamiento del pH óptimo de las reacciones catalizadas por enzimas, hacia las zonas ácida o alcalina (Goldman y col., 1971).

En el caso de la deaminasa insolubilizada de *Rp. palustris* (Figura II.7.), el rango de pH óptimo para la formación de porfirinas resultó ser 7,4 - 7,8. Los mismos resultados se obtuvieron cuando la actividad se midió en función del consumo de sustrato.

Los perfiles de pH para las enzimas solubles e insolubilizada fueron muy similares y se puede decir que también respondieron dentro del mismo rango de pH óptimo (7,6 - 7,8 para la deaminasa soluble).

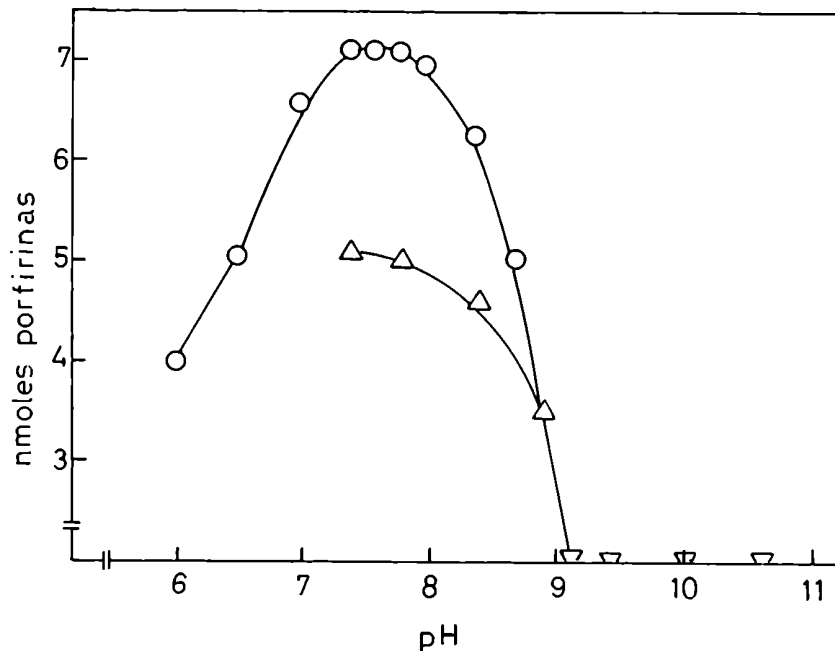


Figura II.7.: pH óptimo.

Se prepararon en la forma habitual suspensiones de Sepharosa-enzima en los buffers y a los pH's indicados. El sistema de incubación empleado fue el standard salvo que en cada caso se utilizó el buffer correspondiente.

(○) Buffer fosfato de sodio 0,05 M; (△) Buffer Tris-HCl 0,05 M; (▽) Buffer glicina-hidróxido de sodio 0,05 M.

En base a los resultados obtenidos se decidió emplear buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4-7,8 en las incubaciones.

#### II.1.4. Estudio comparativo de algunas propiedades de la deaminasa insolubilizada y soluble

##### II.1.4.1. Uso repetido

La inmovilización de una enzima no sólo aumenta generalmente su estabilidad sino que además hace posible el uso de una misma preparación repetidas veces. De esta forma pueden llevarse a cabo un mayor número de determinaciones de actividad que las que podrían realizarse con la misma cantidad de enzima en solución. Se decidió entonces estudiar la variación de la actividad de la deaminasa insolubilizada de *Rp. palustris* en función de su uso repetido. Para ello, una vez determinada la actividad, se reincubó la misma enzima varias veces en idénticas condiciones, evitando arrastrar Sepharosa-enzima cuando se extraían los sobrenadantes conteniendo el producto de la reacción. Los resultados obtenidos se ilustran en la Tabla II.1.

Los datos muestran que aún luego de ser incubada 6 veces, la deaminasa inmovilizada retuvo una actividad apreciable, en esas condiciones se formaron 1,02 nmoles de porfirinas, lo cual representa el 30 % de la actividad inicial.

De acuerdo con estos resultados concluimos que la deaminasa insolubilizada de *Rp. palustris* puede usarse hasta 6 veces consecutivas, conservando aún una actividad apreciable.

##### II.1.4.2. Estabilidad de la deaminasa frente al estacionamiento

Como se mencionó anteriormente, por lo general las enzimas inmovilizadas son muy estables al estacionamiento por tiempos prolongados, cuando se las almacena en condiciones adecuadas. Para estudiar este comportamiento en forma comparativa, se midieron a varios intervalos las actividades de la deaminasa soluble e insoluble, mantenidas a 4 °C.

La deaminasa soluble (Figura II.8.), exhibe una elevada actividad y además una significativa estabilidad. Luego de 10 días de estacionamiento presentaba una actividad remanente del 50 %; inactivándose en forma total después de 22 días.

Tabla II.1.: Uso repetido

NUMERO DE VECES	ACTIVIDAD		
	Total (nmoles porf)	Específica (nmoles porf/mg prot)	Remanente (%)
0	3,37	5,11	100
1	2,26	3,43	67
2	1,98	3,00	59
3	2,01	3,05	60
4	1,63	2,47	48
5	1,31	1,99	39
6	1,02	1,55	30

Para la inmovilización y medición de la actividad de la enzima se procedió según se detalla en Métodos. Luego de haber incubado por primera vez, la Sepharosa-enzima se lavó 3 veces con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4-7,8 y se incubó nuevamente. Este procedimiento se repitió el número de veces indicado, siempre con la misma preparación de enzima insolubilizada y dentro de un lapso no superior a 3 días. Durante ese tiempo, la fracción enzimática se mantuvo a 4 °C. La concentración proteica de la preparación utilizada fue de 3,30 mg/ml.

Para la enzima inmovilizada se observa que aún luego de 35 días retiene aproximadamente un 90 % de su actividad. Los resultados obtenidos demuestran que en este caso la técnica de inmovilización es un método sumamente útil para aumentar la estabilidad de la enzima.

Recordemos aquí que la inmovilización de una enzima en un soporte insoluble la protege de los ataques microbianos, autólisis y agregación. Además, la formación de múltiples uniones entre la enzima y el soporte le confieren a ésta una menor movilidad, con lo cual, una vez obtenida una preparación activa, al estar restringidos los cambios conformacionales, es posible conservar la actividad biológica por más tiempo.

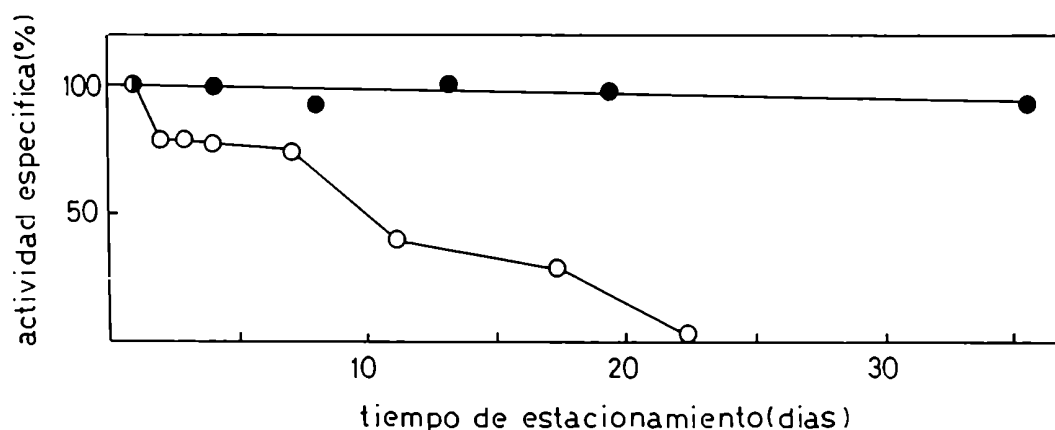


Figura II.8.: Estabilidad de la deaminasa frente al estacionamiento.

El sistema de incubación empleado para la enzima soluble (○) contenía: 50  $\mu$ l de fracción enzimática (1,26 mg de proteína/ml), 45  $\mu$ g de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 todo en un volumen final de 1,5 ml.

El sistema de incubación de la enzima insoluble (●) contenía: 0,4 ml de Sepharosa-enzima (3,30 mg prot/ml de Sepharosa), 90  $\mu$ g de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4-7,8 hasta completar un volumen final de 3 ml.

Se incubó 30 minutos en las condiciones standard.

Las preparaciones enzimáticas se mantuvieron en solución (fracción sobrenadante de calentamiento) o suspensión (insoluble) a 4 °C en heladera y se tomaron muestras a los tiempos indicados para medir su actividad.

#### II.1.4.3. Efecto de la temperatura

Hasta el momento, los datos disponibles acerca de la estabilidad térmica de las enzimas insolubles indican que la unión de una enzima a un soporte sólido resulta en un aumento de la misma (Hornby y col., 1966), aunque también existen casos en que la estabilidad térmica disminuye como consecuencia de la inmovilización (Cresswell y Sanderson, 1970).

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la deaminasa insolubilizada, se calentaron fracciones de esta última a diferentes temperaturas (entre 30 y 80 °C) durante 15 minutos. Paralelamente se llevó a cabo la misma experiencia utilizando la enzima en solución.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla II.2.

Tabla II.2.: Efecto de la temperatura

T (°C)	DEAMINASA SOLUBLE				DEAMINASA INSOLUBLE			
	Prot. (mg/ml)	Porf. (nmoles)	A.E.	A.E. (%)	Prot. (mg/ml)	Porf. (nmoles)	A.E.	A.E. (%)
Control	0,60	0,610	10,19	100	3,53	5,31	7,52	100
30	0,57	0,670	11,75	115	3,53	5,32	7,53	100
40	0,56	0,590	10,53	103	3,53	4,79	6,78	90
50	0,55	0,570	10,36	102	3,53	5,50	7,79	103
60	0,52	0,420	7,99	78	3,53	5,70	8,07	107
70	0,29	0,004	0,14	1,4	3,53	2,42	3,43	45
80	0,24	0	0	0	3,53	0,14	0,20	2,6

Las preparaciones de deaminasa soluble e insolubilizada fueron calentadas a las temperaturas indicadas durante 15 minutos; finalizado este período se enfriaron inmediatamente colocándolas en baño de hielo. En el caso de la deaminasa soluble, las fracciones se centrifugaron a 14.000xg durante 20 minutos, descartándose el precipitado proteico.

Para la deaminasa insolubilizadase empleó el sistema de incubación detallado en Materiales y Métodos. Cuando se trabajó con la enzima soluble, el sistema de incubación contenía: 65,5 µg de PBG y 0,1 ml de fracción enzimática (sobrenadante de calentamiento) ambos en solución de buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 y un volumen del mismo buffer suficiente para completar 1,5 ml. Se incubó durante 30 minutos en las condiciones standard.

El porcentaje de actividad específica (A.E.) se calculó tomando como 100 % la actividad específica correspondiente al control sin calentar.

En este caso particular, se observa que tanto la deaminasa soluble como la insolubilizada son significativamente estables frente a los efectos de la temperatura. Estos resultados eran los esperados en base a la conocida termoestabilidad de esta enzima.

El calentamiento a 60 °C durante 15 minutos, sólo disminuyó en un 20 % la actividad de la enzima soluble. No obstante, la enzima inmovilizada resultó ser más estable que la soluble ya que el tratamiento a 60 °C durante 15 minutos no alteró su capacidad catalítica y aún a los 70 °C mantiene un 45 % de su actividad inicial.

## II.2. Hígado bovino

### II.2.1. Consideraciones generales

Estudios realizados con la PBG-asa de callos de soya (Llambías y Batlle, 1971) habían sugerido la presencia de grupos cargados positivamente en la deaminasa (posiblemente residuos  $\alpha$  ó  $\epsilon$ -amino) que estarían involucrados en la unión del sutrato a la enzima.

Trabajos previos efectuados con la PBG-asa de hígado bovino (Sancovich, Ferramola, Batlle y Grinstein, resultados no publicados) mostraron que el tratamiento de la enzima con 2-metoxi-5-nitrotrona, un agente específico para la modificación química de grupos amino libres de proteínas, inhibía a la PBG-asa. No obstante, a 10 mM de nitrotrona, la enzima retenía aún entre un 60 - 70 % de su actividad. Esto llevó a pensar que, de alguna manera, los residuos amino del sitio activo, se encontraban protegidos.

Posteriormente, Rossetti y col. (1976) basándose en estos hallazgos, lograron unir covalentemente a un soporte de Sepharosa, la PBG-asa purificada de hígado bovino.

En el presente trabajo se llevaron a cabo ensayos tendientes a seleccionar las condiciones óptimas para el acople de la deaminasa purificada de hígado bovino, a un soporte de Sepharosa 4B. Cabe señalar que los estudios efectuados en este sentido tuvieron como objeto lograr una preparación apropiada para ser empleada eventualmente en la obtención de los posibles intermediarios polipirrólicos.

Por otra parte, una vez obtenida la fracción de deamina sa insolubilizada se procedió al estudio de algunas de sus propiedades.

### II.2.2. Unión de la enzima al gel activado

Se encontró que, en cuanto al grado de entrecruzamiento y la cantidad de enzima necesaria para el acople, las condiciones óptimas fueron 200 mg de BrCN por ml de Sepharosa decantada y una concentración de 20 mg de proteína/ml en la relación 1 ml de enzima/ml de gel activado.

La reacción de acople se llevó a cabo en presencia de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 8 y a una temperatura de 4 °C.

Estos resultados fueron similares a los hallados para la PBG-asa de igual fuente (Rossetti y col., 1976) con excepción del tiempo de acoplamiento (Figura II.9.).

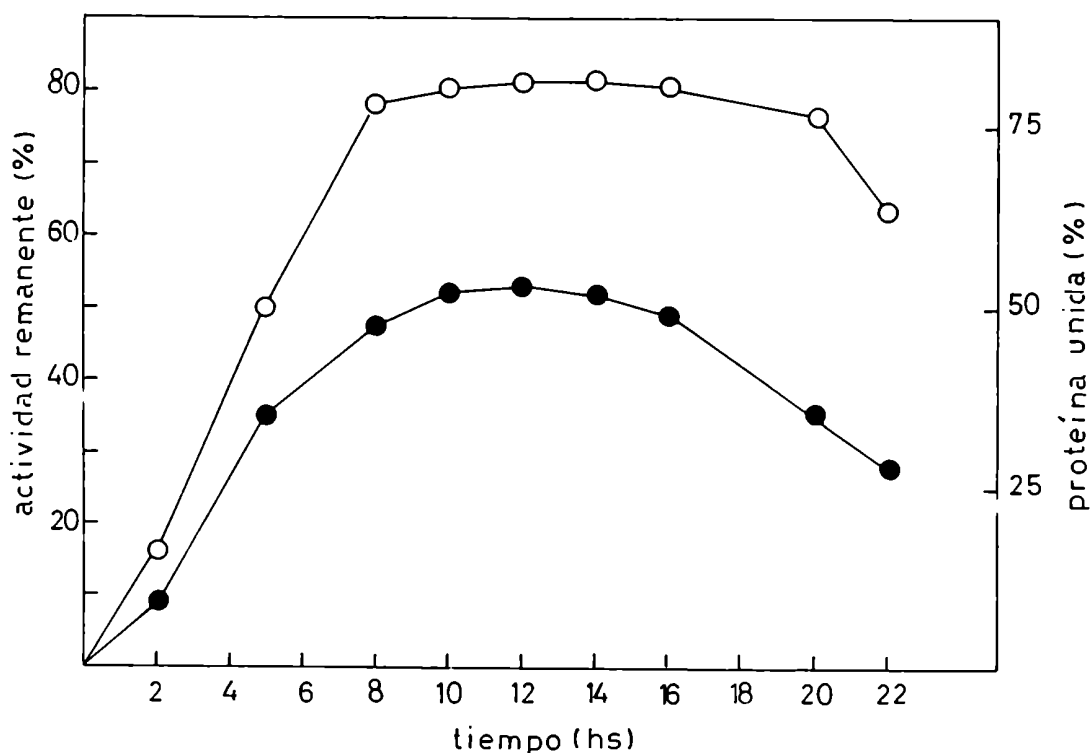


Figura II.9.: Cinética de la reacción de acople. Como fuente de enzima se empleó la fracción Sobrenadante de calentamiento correspondiente al sistema de purificación detallado en Materiales y Métodos. La activación de la Sepharosa 4B se llevó a cabo empleando la relación 200 mg de BrCN/ml de gel. Para el acople se utilizó una relación de 20 mg de proteína/ml de Sepharosa activada. (○) Proteína unida; (●) actividad remanente.



Considerando la proteína unida, el tiempo de acople más conveniente fue de 8 - 16 horas, al cual corresponde aproximadamente un 80 % de unión.

El rendimiento de acople de la deaminasa en cuanto a la actividad retenida por el complejo enzima-Sepharosa, fue asimismo significativamente alto (50 %) observándose el máximo entre 10 y 14 horas.

En base a los resultados obtenidos se adoptó como standard un período de 12 horas para el acoplamiento.

### II.2.3. Estabilidad de la deaminasa inmovilizada

#### II.2.3.1. Estabilidad mecánica

Con el fin de estudiar la posible influencia del proceso de inmovilización sobre la actividad de la deaminasa, se realizaron controles conteniendo deaminasa soluble y Sepharosa no activada los cuales fueron tratados en las mismas condiciones mecánicas que las correspondientes a la reacción de acople.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla II.3., así como también los encontrados para la PBG-asa de la misma fuente (Rossetti y col., 1976).

Se observa que aún siendo el tratamiento suave, la enzima soluble se inactiva alrededor de un 30 % por efectos del proceso en sí. En el caso de la PBG-asa el porcentaje de inactivación resultó ser del 20 % obteniéndose una mayor recuperación de la actividad de la enzima insoluble, que en el caso de la deaminasa (61 y 52 % respectivamente).

#### II.2.3.2. Estabilidad frente al estacionamiento

Se estudió también el efecto del estacionamiento de una suspensión de enzima inmovilizada, en buffer Tris-HCl, mantenida a 4 °C, a lo largo del tiempo (Figura II.10.).

Se observa que la deaminasa inmovilizada de hígado bovino es significativamente estable en estas condiciones. Hasta las tres primeras semanas conserva aproximadamente un 95% de actividad y aún luego de dos meses apenas ha perdido un 25 % de la actividad inicial.

En cambio, una suspensión de Sepharosa-PBG-asa pierde un

40 % de su actividad después de una semana de estacionamiento, luego disminuye en forma lenta hasta las tres semanas (65 % de la actividad original) y finalmente se recupera en las dos semanas siguientes (Rossetti y col., 1976). Lógicamente, en este caso, ocurre una inactivación específica de la isomerasa ya que a las 4 semanas de estacionamiento, el 80 % de las uroporfirinas formadas por la enzima insolubilizada, resultó ser Uro I.

Tabla II.3.: Variación de la actividad específica de la enzima soluble e insoluble durante el acople.

ENZIMA	ENZIMA SOLUBLE			ENZIMA INSOLUBLE	
	A.E.		Actividad remanente (%)	A.E.	Actividad remanente (%)
	Antes	Después		Inicial	
PBG-asa	0,220	0,174	79	0,134	61
Deaminasa	0,600	0,420	70	0,309	52

Los sistemas de incubación fueron los standard. A.E. se expresa en nmoles/h.mg

#### II.2.3.3. Estabilidad térmica

Para estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la deaminasa soluble e insolubilizada se llevaron a cabo dos experiencias. En la primera de ellas se preincubaron las enzimas a diferentes temperaturas, por espacio de 60 minutos (Figura II.11.) y luego se midió la actividad en las condiciones standard.

Como era de esperar, la enzima inmovilizada resultó ser más estable que la soluble, efecto que se hace más marcado a 60 °C. No obstante, ambas presentaron el máximo de actividad a la temperatura de 40 °C.

En una segunda experiencia se midió la actividad de las enzimas soluble e insolubilizada luego de preincubarlas a 40 °C

durante tiempos variables (entre 30 y 120 minutos) (Figura II.12.).

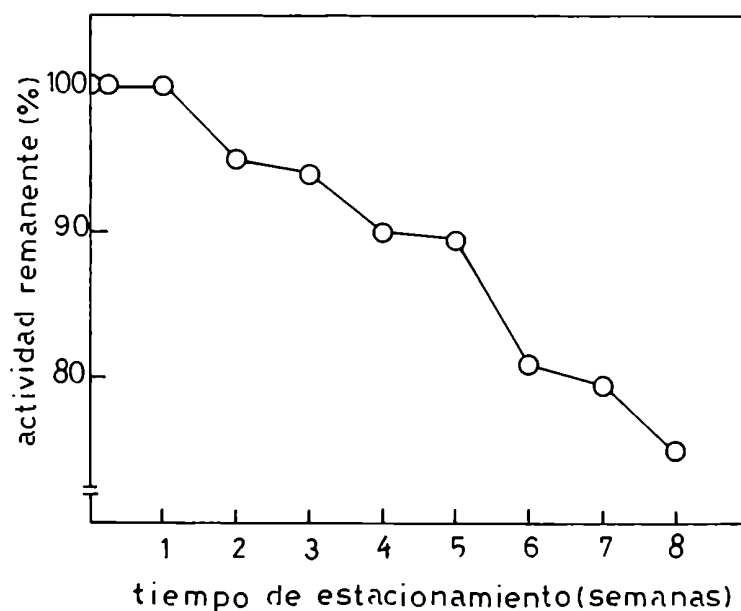


Figura II.10.: Estabilidad frente al estacionamiento.

Se incubó en las condiciones standard. La preparación enzimática se mantuvo en suspensión, a 4 °C en heladera y se tomaron muestras a los tiempos indicados, para medir su actividad.

Como era de esperar, la deaminasa inmovilizada resultó ser más estable frente al tratamiento reteniendo aproximadamente un 95% de actividad luego de 120 minutos de calentamiento. En las mismas condiciones, la enzima soluble se inactivó un 20 %.

#### II.2.4. Uso repetido

Se estudió el uso repetido de una preparación de deaminasa-Sepharosa (Figura II.13.).

Se observa que una misma preparación de enzima inmovilizada puede emplearse hasta 5 veces sin prácticamente pérdida de

su actividad específica, luego ésta decae lentamente, con una retención del 85 % después de 8 veces de uso consecutivo.

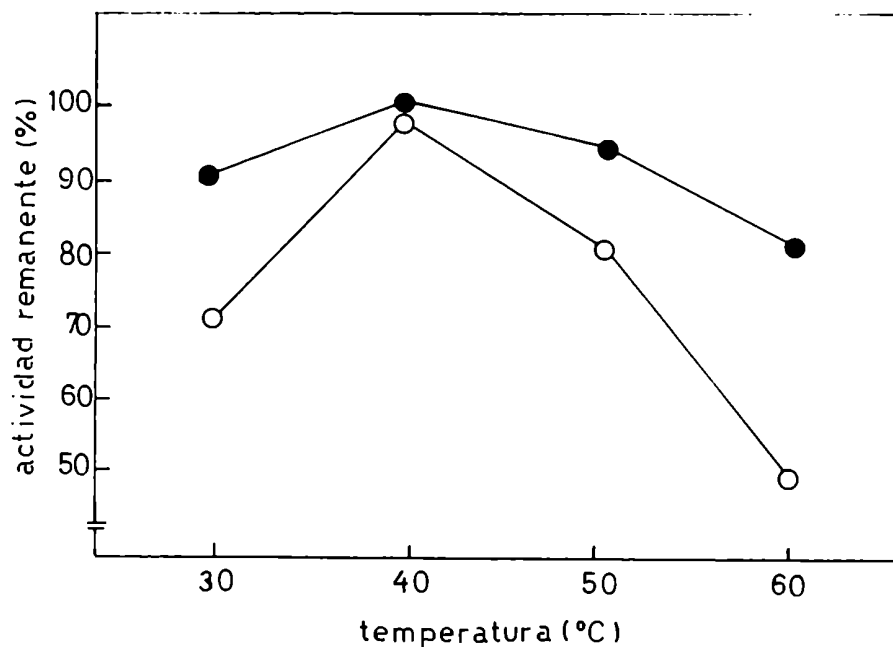


Figura II.11.: Efecto de diferentes temperaturas sobre la estabilidad de la deaminasa soluble (○) e insolubilizada (●). Las preparaciones se incubaron durante 60 minutos a las temperaturas indicadas luego de lo cual se enfriaron inmediatamente en baño de hielo. Se midió la actividad según se indica en Métodos y se la expresó como porcentaje de la actividad de una muestra control sin calentar.

Debemos mencionar que la deaminasa inmovilizada de hígado bovino mantiene su capacidad catalítica, luego del uso repetido, en un porcentaje apreciablemente mayor que la misma enzima de *Rp. palustris*, para la cual se había observado una inactivación del 70 % luego de 6 veces de uso (Item II.1.4.1.).

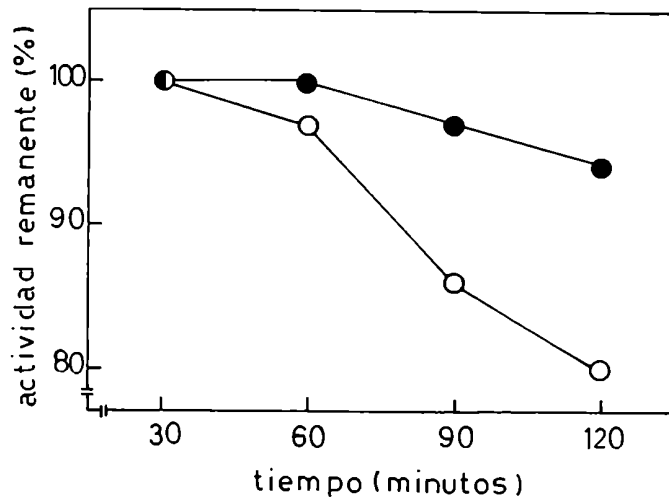


Figura II.12.: Efecto del tiempo de calentamiento previo a 40 °C sobre la actividad de la deaminasa soluble (○) e insolubilizada (●). Las preparaciones enzimáticas se incubaron a 40 °C durante los tiempos indicados; una vez finalizado cada período, las muestras se enfriaron en baño de hielo y luego se midió la actividad enzimática según se detalla en Métodos. Las actividades se expresaron como porcentaje de la actividad de muestras control idénticas a las preparaciones empleadas excepto que se mantuvieron a 4 °C durante los intervalos de tiempo ensayados.

#### II.2.5. pH óptimo

El pH óptimo de la deaminasa inmovilizada de hígado de vaca se determinó en un rango de 6,0 a 9,0 y resultó estar alrededor de 7,2 - 7,6 (Figura II.14.). No se encontraron

variaciones muy significativas en cuanto al mismo, en comparación con el correspondiente al de la enzima soluble que fue de 7,4 (Sancovich, 1972).

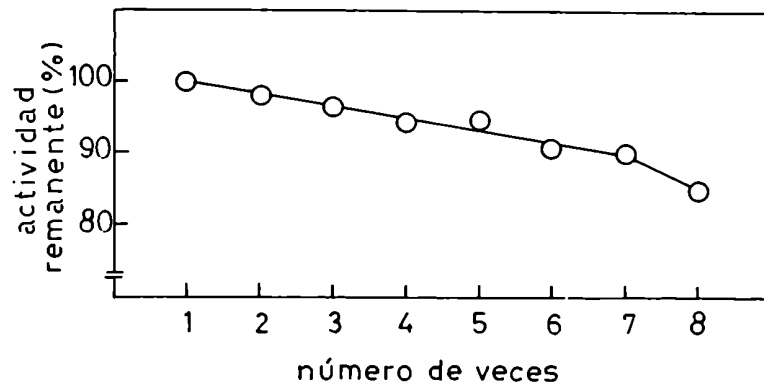


Figura II.13.: Uso repetido.

La actividad de la enzima inmovilizada se determinó según se detalla en Métodos. Luego la Sepharosa-enzima se lavó 3 veces con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 y se incubó nuevamente. Este procedimiento se repitió el número de veces indicado, siempre con la misma preparación de enzima insolubilizada y durante un período no superior a 4 días. Durante ese tiempo, la fracción enzimática se mantuvo a 4 °C.

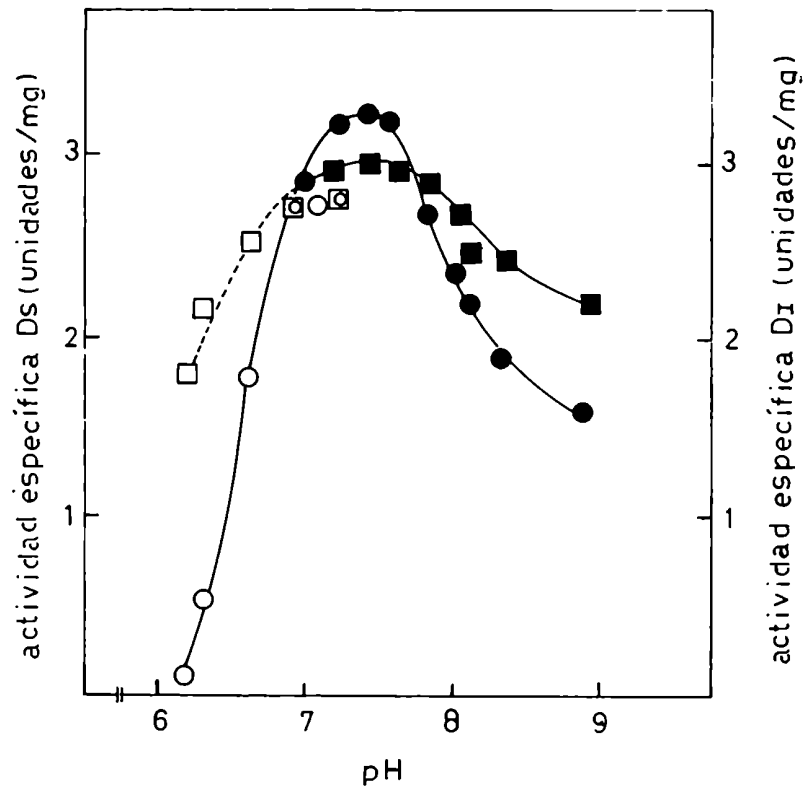


Figura II.14.: pH óptimo.

Para la deaminasa soluble se emplearon 0,5 mg de enzima correspondiente a la fracción Sobrenadante de calentamiento (Sancovich, 1972) en buffer fosfato de sodio 0,067 M (○) y Tris-HCl 0,05 M (●). Cuando se trabajó con la enzima insolubilizada, se prepararon en la forma habitual suspensiones de Sepharosa-enzima (fracción Sobrenadante de calentamiento) en buffer fosfato de sodio 0,05 M (□) y Tris-HCl 0,05 M (■). La actividad se midió empleando las condiciones standard.

### II.3. Referencias

- Batlle, A.M. del C. (1973), *Int. J. Biochem.* 4, 425.
- Batlle, A.M. del C.; Stella, A.M.; Ferramola, A.M.; Sopena, Y.; Wider de Xifra, E.A. & Sancovich, H.A. (1978 a), *Int. J. Biochem.* 9, 401.
- Batlle, A.M. del C.; Wider de Xifra, E.A. & Stella, A.M. (1978 b), *Int. J. Biochem.* 9, 407.
- Bustos, N.L; Stella, A.M.; Wider, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1983), *Int. J. Biochem.* 15, 447.
- Chan, W.W.C. (1970), *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 41, 1198.
- Cresswell, P. & Sanderson, A.R. (1970), *Biochem. J.* 119, 447
- Goldman, R.; Goldstein, L. & Katchalski, E. (1971), "Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports", (Stark, G. R., ed.) Academic Press, New York, p.1.
- Hornby, W.E.; Lilly, M.D. & Crook, E.M. (1966), *Biochem. J.* 98, 420.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987), *Comp. Biochem. Physiol.* 87 B (3), 601.
- Llabrés, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971), *Biochem. J.* 121, 327.
- Rossetti, M.V.; Parera, V.E. & Batlle, A.M. del C. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 371.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Sancovich, H.A. (1972), Tesis de Doctorado (UBA).
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 353.
- Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1978), *Plant Sci. Lett.* 11, 87.
- Stella, A.M.; Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Molec. Cell Biochem.* 16 (2-3), 97.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1973) *Enzyme* 16, 128.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1976), "Porphyrin in Human Diseases", (Doss, M., Ed.) Karger Basel, p. 25.
- Wider de Xifra, E.A. & Batlle, A.M. del C. (1978), *Biochim. Biophys. Acta* 523, 245.
- Wider de Xifra, E.A.; Mendiara, S.N. & Batlle, A.M. del C. (1972), *FEBS Lett.* 27, 275.
- Wider de Xifra, E.A.; Stella, A.M. & Batlle, A.M. del C. (1978) *Plant Sci. Lett.* 11, 93.



ESTRUCTURA CUATERNARIA

---

	Página
III.1. Efecto de la urea sobre el equilibrio de asociación-disociación	357
III.2. Efecto de la urea sobre la Deaminasa de <i>Rp. palustris</i>	358
III.2.1. Efecto de la urea sobre la Deaminasa soluble	358
III.2.2. Efecto de la urea sobre la Deaminasa insolubilizada	361
III.3. Efecto de la urea sobre la Deaminasa de hígado bovino	363
III.4. Referencias	367

### III. ESTRUCTURA CUATERNARIA

#### III.1. Efecto de la urea sobre el equilibrio de asociación-disociación

Existe una amplia variedad de reactivos capaces de actuar sobre la asociación o disociación de las moléculas. Los efectos de dilución, de concentración de protones y de electrolitos se conocen hace ya mucho tiempo. El mercaptoetanol y compuestos similares, que actúan sobre el equilibrio  $-SH \leftrightarrow -S-S-$  han sido de gran utilidad en este tipo de estudios. Se ha demostrado que en ciertos casos, coenzimas, esteroides, hidrocarburos, alcoholes de cadena larga, agentes quelantes y varios polielectrolitos, incluyendo proteínas, afectan el equilibrio de asociación-disociación. En este sentido, los agentes que parecen ser más efectivos y que pueden causar al menos la producción transitoria de subunidades de cadena simple son: urea, sales de guanidina y detergentes.

Hace más de 50 años, Burk y Greenberg (1930) emplearon urea con el fin de desarrollar un método para la determinación de pesos moleculares de proteínas insolubles en el punto isoeléctrico. El trabajo de estos autores confirmó observaciones entonces recientes, de que la hemoglobina y otras proteínas se disociaban en unidades de pesos moleculares menores. Se señaló en ese momento que esos hallazgos estaban demostrando "el desdoblamiento de la molécula proteica en la desnaturalización". Se pensó que la urea, en primer lugar desnaturalizaba la proteína y que este proceso era seguido por desdoblamiento. Sin embargo, el descubrimiento de que la pepsina retenía actividad en urea 4 M (Steinhardt, 1938) condujo a una modificación de dichos conceptos. Numerosas evidencias obtenidas posteriormente señalaron la posible reversibilidad de la desnaturalización como así también la reversibilidad de la disociación.

En cuanto a la acción de la urea, se ha sugerido que se encuentran involucrados cambios en los valores de pK de los grupos disociables (Burk y Greenberg, 1930) y formas múltiples de resonancia (Greenstein, 1938). Se ha propuesto también la formación de uniones hidrógeno intermoleculares entre la urea y las uniones peptídicas expuestas (Simpson y Kauzmann, 1953). Un estudio de la estabilidad de las uniones hidrógeno inter-peptídicas en solución acuosa (Schellman, 1955) ha conducido a pensar que las regiones random de la proteína se ven estabilizadas por

unión de la urea a sitios requeridos para la unión hidrógeno en la hélice; no obstante existen evidencias en contra de esta hipótesis (Mc Kenzie y col., 1955; Echols y Anderegg, 1960). Investigaciones efectuadas con compuestos modelo en solución de urea no están de acuerdo con el hecho de que la urea facilita la ruptura de las uniones hidrógeno en proteínas (Levy y Magoulas, 1961, 1962); es más, se ha observado (Klotz y Franzen, 1960), que la unión  $\text{>N-H.O=C}$  no es muy estable en modelos de amidas. Bruning y Holtzer (1961) y Whitney y Tanford (1962) intentaron demostrar, utilizando también compuestos modelo, un efecto de la urea sobre uniones hidrofóbicas. Por otra parte, en un estudio sobre la acción de más de 100 agentes desnaturantes sobre la seroalbúmina bovina y la ovoalbúmina (Gordon y Jencks, 1961, 1963; Jencks, 1963) no se pudo desarrollar ningún mecanismo de acción que avalara la hipótesis de una simple ruptura de una unión hidrógeno. En este último caso no sólo no se obtuvieron evidencias concluyentes de que una unión hidrofóbica estuviera involucrada sino que además el comportamiento de las dos proteínas difería y no se podía proponer un modelo simple.

Independientemente de que la acción primaria de la urea sea o no una ruptura competitiva de uniones hidrógeno, el empleo de este concepto como hipótesis de trabajo ha sido muy útil. Por ejemplo, se ha demostrado (Boeri y Rippa, 1961) que la urea puede disociar el complejo enzima flavocitocromo  $b_2$  en una hemoproteína, una flavina y un polinucleótido.

La acción de la urea sobre las enzimas varía ampliamente. Algunas enzimas tales como papaína y carboxipeptidasa son activas en urea 8 M. Muchas, como la quimotripsina, parecen ser inactivadas irreversiblemente por urea 8 M. Otras, como la ribonucleasa (Nelson y Hummel, 1962) y la tripsina (Cole y Kincade, 1961) se inactivan reversiblemente.

### III.2. Efecto de la urea sobre la deaminasa de *Rp. palustris*

#### III.2.1. Efecto de la urea sobre la deaminasa soluble

Como ya hemos mencionado, aparentemente, la deaminasa de *Rp. palustris* se comporta como una enzima oligomérica, compuesta por dos o cuatro subunidades.

Por otra parte, experiencias realizadas con la misma en-

zima de hígado de cerdo (Fumagalli, resultados no publicados) indicaron que agentes tales como la urea y la guanidina eran inhibitorios. En base a estos hallazgos se decidió determinar si la urea ejerce algún efecto sobre la actividad de nuestra enzima y de ser así, observar si la acción de dicho compuesto se debe a una posible disociación de la proteína de peso molecular 74.000 en subunidades, como ocurre con otras enzimas (Batlle y col., 1978).

Para ello se estudió el efecto de concentraciones variables de urea sobre la actividad de la deaminasa (fracción sobrenadante de calentamiento). Las concentraciones usadas fueron 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 y 3,0 M. Los resultados obtenidos se encuentran graficados en la Figura III.1.

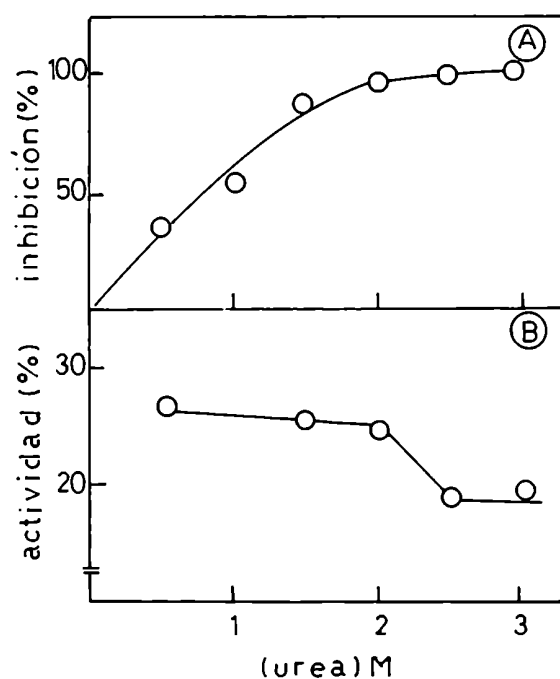


Figura III.1.: Efecto de la urea sobre la actividad de la deaminasa (A) y su reversión (B). El sistema de incubación contenía: 0,15 ml de fracción enzimática, 45  $\mu$ g de PNC y urea 7 M en un volumen adecuado para alcanzar la molaridad deseada. Todos los componentes se encontraban disueltos en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 el cual se usó también para completar el volumen final del sistema a 1,5 ml. Las condiciones de incubación fueron: aerobiosis, oscuridad, 37 °C y 30 minutos. Los porcentajes de inhibición y actividad se calcularon en base a la actividad específica en función del producto formado, teniendo en cuenta los controles.

Se observa (Figura III.1A), como era de esperar, que concentraciones crecientes de urea producen una inactivación de la enzima que llega al 50% a 1,0 M y alcanza una meseta alrededor de 2 M con una inhibición total.

A continuación, con el fin de estudiar la posible reversión de este efecto, se preincubó durante 10 minutos la enzima en contacto con urea, de modo tal que las concentraciones finales de la última resultaran las mismas que en el ensayo anterior. Posteriormente, se realizó una diálisis contra buffer fosfato de sodio 5 mM pH 7,6-7,8 por espacio de 20 horas, con el fin de eliminar la urea del medio. En la fracción enzimática libre de urea, se midió la actividad en la forma usual.

Al eliminar entonces la urea del sistema (Figura III.1B) la máxima recuperación lograda fue de sólo un 25% a las concentraciones más bajas de urea empleadas (entre 0,5 y 2 M); por ariba de 2 M la reactivación no superó el 20%.

Estos resultados son muy llamativos y están indicando que, aparentemente tendría lugar, en todos los casos, una inactivación irreversible de la enzima, del orden de 75-80%, aún a bajas concentraciones de urea. Es probable que este reactivo produzca una disociación de la deaminasa de *Rp. palustris* en 4 subunidades de peso molecular 20.000, pero que al eliminar el agente disociante, estas subunidades no logren reasociarse en la misma forma existente en el oligómero nativo. Luego del tratamiento con bajas o altas concentraciones de urea, apenas se recupera un 25% o un poco menos de la actividad original, de modo que también podríamos pensar que dicha actividad corresponde a una sola subunidad. Si esto último es cierto, también constituiría una evidencia indirecta de que la estructura molecular mínima con actividad catalítica sería entonces la de la subunidad o monómero de peso molecular 20.000, lo cual estaría de acuerdo con el modelo teórico experimental propuesto por nuestro laboratorio (Rossetti y col., 1980).

Recordemos que en el caso de la reconstitución de enzimas oligoméricas después de su disociación con agentes desnaturalizantes, el proceso implica una recuperación de la estructura tridimensional y una reasociación. En cambio, con las enzimas monoméricas, sólo ocurre el primer proceso, es decir una desnaturalización-renaturalización. Con la deaminasa de *Rp. pa*lustris estaríamos en el primer caso; probablemente haya ocurrido la renaturalización pero es claro que no tuvo lugar la

reasociación esperada.

### III.2.2. Efecto de la urea sobre la deaminasa insolubilizada

Cuando se trata de estudiar la relación existente entre la estructura cuaternaria de una enzima oligomérica y su actividad, resulta de interés conocer si las subunidades individuales de esta proteína son activas o si es necesaria su asociación para la expresión de la actividad enzimática. Uno de los métodos utilizados con este propósito consiste en unir la enzima a una matriz a través de una o dos subunidades y luego, remover las uniones no covalentes por acción de un reactivo adecuado como ser la urea. Así, se pueden estudiar las propiedades de las subunidades inmovilizadas aisladas bajo condiciones tales que no sea posible la reasociación. Además, este método puede emplearse para investigar la reasociación e hibridización de las subunidades unidas con subunidades solubles. En nuestro laboratorio se ha aplicado con éxito este tipo de técnica (Batlle y col., 1978; Fukuda, Stafforini y Batlle, resultados no publicados).

Teniendo en cuenta estas consideraciones y con el fin de completar las experiencias anteriores, resultó interesante investigar los efectos de concentraciones variables de urea y su reversión sobre la deaminasa insolubilizada de *Rp. palustris*, con el objeto de obtener mayores evidencias acerca de la posible disociación de la enzima, e intentar su reasociación, mediante la interacción de la subunidad inmovilizada con subunidades solubles.

Para ello, en una primera experiencia, se preincubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, la deaminasa inmovilizada (empleando para la activación de la Sepharosa la relación 200 mg de bromuro de cianógeno/ml de gel) con urea 3 M. Finalizado el período de preincubación, la mezcla se empaquetó en una columna de 1,5 cm x 10 cm y luego se recogió el eluido que denominamos E. La Sepharosa-deaminasa tratada con urea se lavó en columna con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,8 hasta eliminar totalmente el agente disociante; los lavados se identificaron como L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> y L<sub>3</sub>. Tanto el eluido E como los lavados se dializaron durante 20 horas (a 4 °C) contra buffer fosfato de sodio 5 mM pH 7,8 y en los dializados se midió actividad en

función de la formación de producto y consumo de sustrato y contenido proteico. La columna conteniendo la Sepharosa-deaminasa libre de urea se desarmó y se incubó el gel para medir su actividad.

Los resultados obtenidos se detallan en la Tabla III.1.

Tabla III.1.: Efecto de urea 3 M sobre la deaminasa insolubilizada sobre Sepharosa activada con 200 mg de BrCN/ml gel.

FRACCION	ACTIVIDAD		ACTIVIDAD ESPECIFICA		PROTEINAS
	Porfirinas (nmoles)	PBG cons. ( $\mu$ g)	Porfirinas (nmoles/mg)	PBG cons. ( $\mu$ g/mg)	
Seph-D					
s/urea	61,78	84,24	19,46	26,55	5,29 mg/ml Seph.
tratada	30,84	47,97	9,73	18,45	5,13 mg/ml Seph.
E	0	5,04	0	315 (*)	0,40 mg totales
E (con <u>u</u> rea)	0		0		-
L <sub>1</sub>	0	5,51	0	367 (*)	0,16 mg totales
L <sub>2</sub>	0	4,91	0	327 (*)	0,20 mg totales
L <sub>3</sub>	0	4,86	0	374 (*)	0,17 mg totales

(\*) Actividades específicas elevadas por efecto del bajo contenido proteico

En el caso de la enzima insoluble el sistema de incubación contenía: 0,6 ml de Sepharosa-deaminasa, 60  $\mu$ g de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,8 suficiente para completar un volumen final de 2 ml.

El sistema de incubación de las fracciones solubles contenía: 0,2 ml de fracción enzimática, 60  $\mu$ g de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,8 en un volumen adecuado para completar 1,5 ml.

En ambos casos el tiempo de incubación fue de 60 minutos.

Se observa que la urea 3 M inhibe en forma irreversible la actividad de la deaminasa inmovilizada, aproximadamente en un 50 %. El análisis de los datos indica que este efecto no es debido a una disociación de la enzima en subunidades, ya que sólo se recuperan 0,95 mg de proteínas totales en el eluido E y los lavados, que pueden representar la liberación, a partir del gel, de proteínas que se encontraban impurificando a la deaminasa.

La enzima insolubilizada resultó ser más estable que la soluble frente a la acción de la urea ya que, para la misma concentración del agente disociante se obtuvo para la deaminasa soluble una recuperación de aproximadamente 20%.

Estos datos nos condujeron a pensar que la ausencia de efectos disociantes podía deberse a que la unión de la enzima al soporte de Sepharosa ocurriera a través de un número de puntos tales que la disociación no fuera posible. Por esta causa se decidió repetir la experiencia, esta vez empleando una relación de 50 mg de BrCN/ml de gel para la activación de la Sepharosa (Tabla III.2.).

Se obtuvieron resultados análogos a la experiencia ante

Concluimos entonces que es muy probable, que aún disminuyendo el número de puntos de acople de la proteína al gel de acuerdo a la disposición estructural de las subunidades, dos o más de ellas se unan rápida y simultáneamente a la matriz. El tratamiento con urea, lleva a la inactivación por desnaturalización parcialmente reversible de la deaminasa, pero no logra disociar las subunidades, dado que ahora se encuentran asociadas entre sí, además por enlaces covalentes con el soporte de Sepharosa.

### III.3. Efecto de la urea sobre la deaminasa de hígado bovino

Teniendo en cuenta que el tamaño molecular de la deaminasa de hígado bovino es la mitad del correspondiente a la enzima de *Rp. palustris*, y que no existía tampoco información alguna en cuanto al comportamiento de la deaminasa de ese tejido frente a agentes como la urea, se decidió entonces estudiar el efecto de concentraciones variables de este compuesto sobre la



actividad de la deaminasa purificada y además, de existir alguno, si el mismo era reversible.

Tabla III.2.: Efecto de urea 3 M sobre la deaminasa insolubilizada sobre Sepharosa activada con 50 mg de BrCN/ml gel

FRACCION	ACTIVIDAD	ACTIVIDAD ESPECIFICA	PROTEINAS
	Porfirinas (nmoles)	Porfirinas (nmoles/mg)	
Seph-D s/urea	3,09	12,15	2,54 mg/ml Seph.
Seph-D tratada	1,63	6,52	2,51 mg/ml Seph.
E	0	0	0,00 mg totales
E (con urea)	0	0	
L <sub>1</sub>	0	0	0,01 mg totales
L <sub>2</sub>	0	0	0,06 mg totales
L <sub>3</sub>	0	0	0,06 mg totales

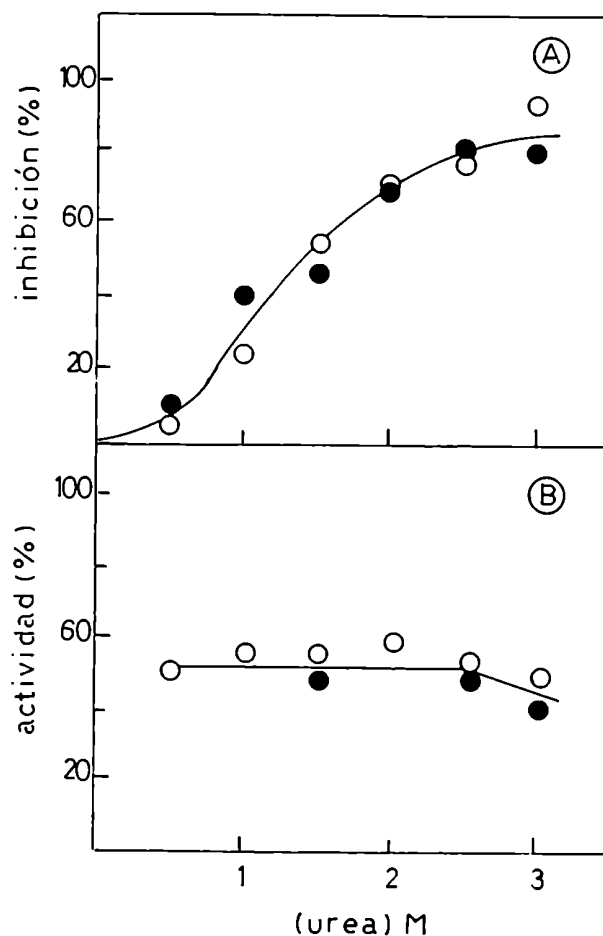
En el caso de la enzima insoluble el sistema de incubación contenía 0,1 ml de Sepharosa-deaminasa, 90 µg de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,8 suficiente para completar un volumen de 3 ml. El tiempo de incubación fue de 30 minutos.

El sistema de incubación de las fracciones solubles contenía: 0,2 ml de fracción enzimática, 60 µg de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,8 en un volumen adecuado para completar 1,5 ml. El tiempo de incubación fue de 60 minutos.

Se encontró (Figura III.2A) que concentraciones crecientes de urea producen una inactivación de la enzima que llega al 50 % a 1,5 M y alcanza una meseta alrededor de 2,5 M, con una inhibición casi total.

Al eliminar la urea del sistema (Figura III.2B), aún cuando su inactivación inicial había sido muy baja, en todos los casos, la actividad de la enzima tratada con urea, resultó la

mitad de la correspondiente al control. Estos datos, especialmente a las menores concentraciones de urea (0,5 M y 1,0 M) son llamativos pero desde ya, están indicando una vez más que la reversibilidad del efecto de la urea es solamente parcial y que su acción parece haber sido la de una desnaturalización irreversible. Resultados similares se obtuvieron empleando la deaminasa insolubilizada de la misma fuente. Podemos decir en consecuencia que en el caso particular de la deaminasa de hígado bovino, aparentemente la urea actuaría inactivando por desnaturalización a una proteína probablemente monomérica; si bien no se descarta la posibilidad de una disociación en subunidades que al eliminar la urea no puedan reasociarse y reconstituir la estructura nativa de la enzima.



**Figura III.2.:** Efecto de la urea sobre la actividad de la deaminasa (A) y su reversión (B). El sistema de incubación empleado fue el siguiente: 0,5 ml de fracción enzimática, 50  $\mu$ g de PBG, urea 7 M en un volumen adecuado para alcanzar la molaridad deseada y 0,4 ml de mezcla NaCl/MgCl<sub>2</sub>. La enzima, el PBG y la urea se disolvieron en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 el cual se usó también para completar el volumen final del sistema a 2 ml. El tiempo de incubación fue de 4 horas. Para los estudios de renaturalización se preincubó durante 10 minutos la enzima en contacto con urea, de modo tal que las concentraciones finales de la última resultaran las mismas que en el caso anterior (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 M). Posteriormente se realizó una diálisis contra buffer Tris-HCl 5 mM pH 7,4 por espacio de 20 horas con el fin de eliminar la urea del medio. En la fracción enzimática libre de urea se midió la actividad en la forma usual. Se empleó la fracción correspondiente al eluido de la columna de Sephadex G-100 del esquema de purificación detallado en Materiales y Métodos. Los porcentajes de inhibición y actividad se calcularon en base a la actividad específica en función del producto formado, teniendo en cuenta los controles.

#### III.4. Referencias

- Battle, A.M. del C.; Wider, E.A. & Stella, A.M. (1978),  
Int. J. Biochem. 9, 407.
- Boeri, E. & Rippa, M. (1961), Arch. Biochem. Biophys. 94, 336.
- Bruning, W. & Holtzer, A. (1961), J. Am. Chem. Soc. 83, 4865.
- Burk, N.F. & Greenberg, D.M. (1930), J. Biol. Chem. 87, 197.
- Cole, R.D. & Kincade, J.M. Jr. (1961), J. Biol. Chem. 236,  
2443.
- Echols, G.H. & Anderegg, J.W. (1960), J. Am. Chem. Soc. 82,  
5085.
- Gordon, J.A. & Jencks, W.P. (1961), Fed. Proc. 20, 377.
- Gordon, J.A. & Jencks, W.P. (1963) Biochemistry 2, 47.
- Greenstein, J.P. (1938), J. Biol. Chem. 125, 501.
- Jencks, W.P. (1963), en Adv. Protein Chem. 18, 123.
- Klotz, I.M. & Franzen, J.S. (1960), J. Am. Chem. Soc. 82, 5241.
- Levy, M. & Magoulas, J. (1961), Fed. Proc. 20, 381.
- Levy, M. & Magoulas, J. (1962), Fed. Proc. 21, 405.
- Mc Kenzie, H.A.; Smith, M.B. & Wake, R.G. (1955) Nature 176,  
738.
- Nelson, C.A. & Hummel, J.P. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1567.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.  
& Battle, A.M. del C. (1980) Int. J. Biochem. 12, 761.
- Russell, C.S. & Rockwell, P. (1980), FEBS lett. 116 (2), 99.
- Schellman, J.A. (1955), Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg,  
Ser. chim. 29, 230.
- Simpson, R.B. & Kauzman, W. (1953), J. Am. Chem. Soc. 75,  
5139.
- Steinhardt, J. (1938), J. Biol. Chem. 123, 543.
- Whitney, P.L. & Tanford, C. (1962), J. Biol. Chem. 237, PC  
1735.

## CAPITULO IV

### FORMACION DE INTERMEDIARIOS

---

	Página
IV.1. Formación de intermediarios a partir de la Deaminasa inmovilizada de hígado bovino	368
IV.2. Obtención de intermediarios a partir de Deaminasa inmovilizada de <i>Rp. palustris</i>	376
IV.3. Acción de la Isomerasa sobre el intermediario tetrapirrilmetano y sobre la Deaminasa	378
IV.4. Referencias	390

#### IV. FORMACION DE INTERMEDIARIOS

##### IV.1. Formación de intermediarios a partir de la Deaminasa inmovilizada de hígado bovino

Teniendo en cuenta las evidencias experimentales acerca de la formación de intermediarios polipirrólicos durante la ciclotetramerización enzimática del PBG en urogenos, obtenidos empleando los sistemas enzimáticos de la Deaminasa y de la PBG-asa de callos de soya (Llambías y Batlle, 1970; Stella y col., 1971) y fundamentalmente de *E.gracilis* (Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1977), y la demostración de que el producto de la acción de la Deaminasa sobre el PBG, identificado como un hidroximetilbilano es el sustrato de la Isomerasa, resultó de interés establecer las condiciones experimentales para que una preparación de Deaminasa purificada a partir de hígado de vaca e insolubilizada sobre Sepharosa formara intermediarios polipirrólicos; ya que en estudios previos llevados a cabo con la forma soluble de la Deaminasa y la PBG-asa de esa fuente, no se habían detectado ni aislado intermediarios de esta naturaleza (Stella y col., 1971).

Con este propósito se realizaron los siguientes ensayos: Por una parte se incubaron 2 ml de Sepharosa-Deaminasa (14,5 mg de proteína/ml de gel decantado) con 75 µg de PBG (332 nmoles) disuelto en buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4; 1 ml de mezcla de cloruro de sodio-cloruro de magnesio (0,6 M: 0,12 M; 1:1,v/v) llevados a un volumen final de 5 ml con el buffer mencionado. El sistema se incubó en oscuridad, aerobiosis, 37 °C y con agitación constante durante períodos variables de tiempo: 10, 20, 30, 60 y 90 minutos. Transcurridos esos intervalos se enfriaron las mezclas a 0 °C, y rápidamente se separaron por centrifugación (10 minutos, 6.000 rpm a 4 °C) los correspondientes sobrenadantes que denominaremos S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>, S<sub>4</sub> y S<sub>5</sub> respectivamente, a los tiempos indicados. Del volumen total resultante para cada sobrenadante (3 ml cada uno), fracciones de 0,5 ml se incubaron según se describirá a continuación; y en el remanente se determinaron las porfirinas formadas y el PBG consumido; los datos obtenidos son los señalados como sistemas 1 al 5 de la Tabla IV.1. Los sistemas 8 al 12 consistieron en 0,5 ml de cada sobrenadante, llevados a un volumen final de 3 ml con el buffer usual. Del 13 al 17, 0,5 ml de cada sobrenadante se incubaron con

un ml de una preparación de Deaminasa soluble de la misma fuente (6 mg proteína/ml) en un volumen final de 3 ml. Del 18 al 22 0,5 ml de cada sobrenadante se incubaron con 54  $\mu$ g de PBG y del 23 al 27, 0,5 ml de cada sobrenadante se incubaron con 1 ml de Deaminasa soluble y 54  $\mu$ g de PBG, siempre en un volumen final de 3 ml.

Por otra parte los precipitados obtenidos luego de la centrifugación, que correspondían a la Sepharosa-Deaminasa, se incubaron (2 ml de cada uno) sin agregado (Sistema 29 - 33), con 1 ml de Deaminasa soluble (34 - 38); con 75  $\mu$ g de PBG (39 - 43) y con 1 ml de Deaminasa soluble y 75  $\mu$ g de PBG (sistema 44 - 48), todos en un volumen final de 5 ml.

Además se hicieron los controles de actividad con la Deaminasa-Sepharosa (sistema 6), la Deaminasa soluble (sistema 7) y la mezcla Deaminasa insolubilizada + Deaminasa soluble (sistema 28).

Los sistemas 6 al 48 se incubaron en las mismas condiciones que el 1 al 5, excepto que el tiempo fue de 2 horas.

En experiencias previas empleando la Deaminasa soluble de hígado de vaca se había obtenido una relación completamente lineal entre la formación de porfirinas y el tiempo de incubación, no observándose el lag que había caracterizado al comportamiento de la enzima de callos de soya y de *E.gracilis*, y dentro del cual fue posible detectar y aislar intermediarios polipirrólicos (Llambías y Batlle, 1970; Stella y col., 1971; Rossetti y Batlle, 1977; Rossetti y col., 1977). La experiencia similar que se realizó con la enzima unida a Sepharosa, nos reveló (Tabla IV.1., sistemas 1 - 5) y Figura IV.1.A) la existencia de un corto lag, dentro de los 10 primeros minutos, teniendo en cuenta las porfirinas formadas. A partir de ese momento, apreciamos que la relación síntesis de porfirinas: tiempo de incubación es lineal. En cuanto al sustrato, ya a los 10 minutos hay un rápido consumo, superior al 60 %, luego esta reacción es más lenta y llega al 75 % a los 90 minutos. Es notable entonces la falta de estequiometría, hecho que ya hemos observado con anterioridad (Rossetti, 1978; Kotler y col., 1987 a); además de la muy baja producción de porfirinas. Estos resultados podrían deberse a que en este sistema y en estas condiciones, la Deaminasa consume el PBG a una velocidad mayor que la de liberación de las porfirinas, acumulándose necesariamente el o los intermediarios polipirrólicos, los cuales pueden aún estar en parte

unidos a la enzima en tanto que otra parte, una vez alcanzado el grado de polimerización del tetrapirrilmetano podrían liberarse a la solución (Rossetti y col., 1977) para luego ciclarse lenta y no enzimáticamente formando el Urogen I. El intermediario tetrapirrilmetano libre podría identificarse con el amino-metil o hidroximetilbilano, en tanto que el unido a la enzima, podría corresponder a una forma más reactiva probablemente el azafulveno, de manera que el intermediario tetrapirrólico unido a la Deaminasa sería un complejo del tipo enzima-metilenpirrolenina (Figura IV.2.).

Con el objeto de comprobar la hipótesis anterior, es decir si había ocurrido formación de intermediarios, y de haber sido así, si éstos estaban unidos a la enzima o habían sido liberados a la solución o estábamos en presencia de ambas especies de intermediarios, se llevaron a cabo ensayos incubando los sobrenadantes obtenidos a los distintos tiempos y la correspondiente Deaminasa-Sepharosa separada de los mismos por centrifugación, bajo distintas condiciones según se indicó más arriba.

Los datos obtenidos (Tabla IV.1., sistemas 8 - 48 y Figura IV.1.B y C) demuestran que hubo formación de intermediarios y que éstos se encontraban presentes tanto en el sobrenadante, es decir en forma libre, como en la Sepharosa-enzima recuperada, es decir unidos a la proteína.

Observamos que la incubación de los sobrenadantes sin agregado alguno (Sistemas 8 - 12) (Figura IV.1.B) conteniendo sólo un remanente de 6-8  $\mu\text{g}$  de PBG y entre 0,014 y 0,370 nmoles totales de porfirinas que fueron deducidas a las medidas al final de la incubación, produjo cantidades crecientes de porfirinas que únicamente pueden haber derivado del intermediario tetrapirrilmetano presente en el sistema. La porfirina resultante fue 95 % URO I.

Cuando los sobrenadantes se incubaron en presencia de una cantidad adicional de Deaminasa soluble (sistemas 13 - 17) (Figura IV.1.B), fue llamativa la disminución de la cantidad de URO I formada, entre un 80-85 % con respecto a los valores anteriores. Esto podría deberse a que el intermediario tetrapirrilmetano libre es capaz de unirse a la Deaminasa formando un complejo enzima-intermediario bastante estable, probablemente a través de una unión covalente; de manera que, una vez unido el intermediario a la Deaminasa, en estas condiciones experimentales no ocurriría una liberación rápida y espontánea del intermediario



al medio, pues vemos que apenas se ha detectado un 15-20 % de la cantidad de porfirinas formadas antes por los sobrenadantes (sistemas 8 - 12).

Cuando esos mismos sobrenadantes se incubaron con un exceso de PBG (sistemas 18 - 22, Figura IV.1.B), éste no modificó sensiblemente la ciclación no enzimática del intermediario a uroporfirina y se confirma la presencia de cantidades crecientes de los mismos cuanto mayor fue el tiempo de incubación.

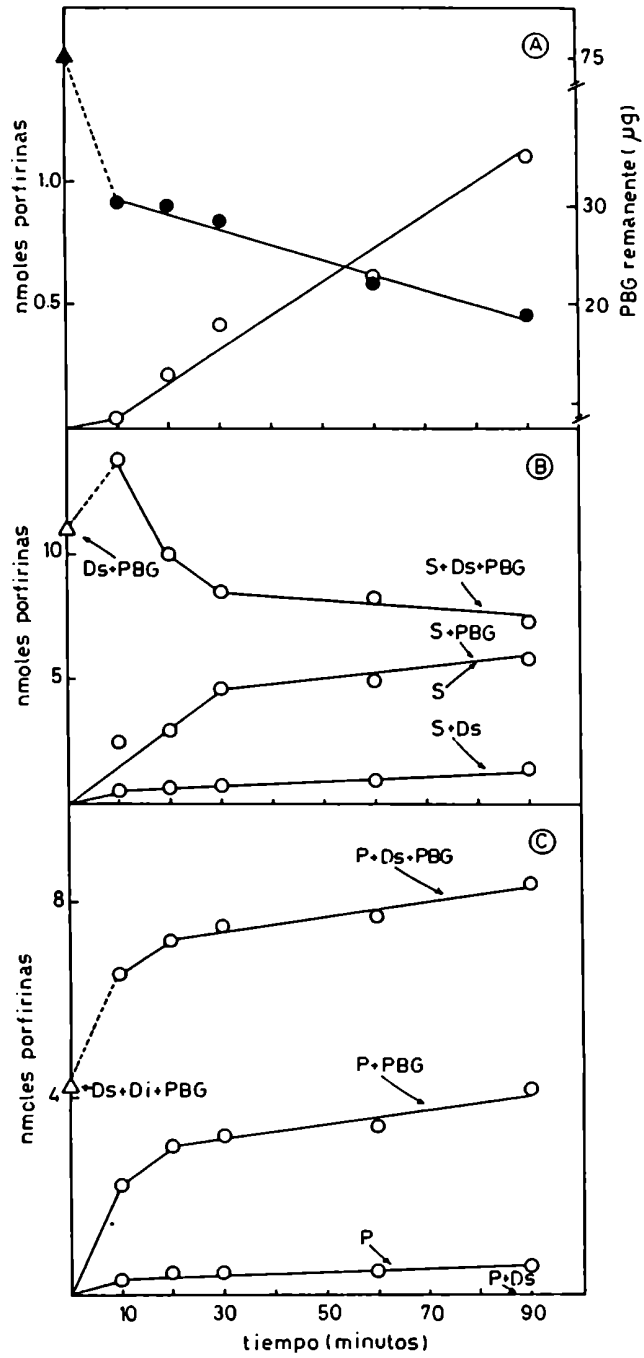
Los datos de los sistemas 23 a 27 y Figura IV.1.B, obtenidos por incubación de los sobrenadantes con Deaminasa y PBG, resultaron interesantes y sumamente ilustrativos de varios hechos. Vemos que con el sobrenadante de 10 minutos, S<sub>1</sub>, que contenía la menor cantidad de intermediario, se produjo un incremento en la formación total de porfirinas de la Deaminasa soluble; sin embargo cantidades mayores de intermediario provocaron una inhibición creciente de la actividad. Estos datos están de acuerdo con observaciones previas de nuestro laboratorio (Rossetti y col., 1977) que mostraban que según su concentración el intermediario libre era capaz de inhibir a estas enzimas. Vimos antes que este intermediario también podía unirse a la Deaminasa en forma estable; es posible que esta unión produzca un bloqueo parcial del sitio activo, de manera que cantidades mayores de intermediario podrían resultar en la inhibición de la Deaminasa según hemos observado experimentalmente por competición con el PBG. Alternativamente el intermediario podría unirse a otro sitio diferente del sitio activo que podría ser un sitio regulatorio y como consecuencia de esa unión podrían tener lugar cambios conformacionales que condujeran a una menor actividad de la enzima. En cuanto al consumo de PBG, prácticamente sólo quedó un 10 % de sustrato remanente, aunque ni en el control de actividad de la Deaminasa soluble (sistema 7) ni en estos casos, se obtuvo formación estequiométrica de porfirinas. Podría ser que también un exceso de PBG, inhibiera la enzima, como ya lo observáramos con anterioridad empleando la Deaminasa de eritrocitos humanos (Fumagalli y col., 1985). De manera que de estas experiencias surgiría que un exceso de intermediario y un exceso de PBG actuarían como inhibidores de la Deaminasa. Es posible que el efecto del exceso de PBG se deba a su vez a la formación de un exceso de intermediario, de forma tal que el verdadero inhibidor sería el intermediario.

Tabla IV.1.: Formación de intermediarios a partir de la Deaminasa de hígado de vaca inmovilizada sobre Sepharosa

SISTEMA	nmoles porf. totales	nmoles porf./mg prot.	Actividad relativa	$\mu R$ PBG <sub>c</sub>
1 S <sub>1</sub>	0,043	0,0015	-	44,88
2 S <sub>2</sub>	0,209	0,0072	-	44,50
3 S <sub>3</sub>	0,413	0,0142	-	46,50
4 S <sub>4</sub>	0,611	0,0210	-	52,42
5 S <sub>5</sub>	1,110	0,0380	-	55,42
6 D <sub>i</sub>	1,580	0,054	-	58,00
7 D <sub>s</sub>	10,498	1,740	100	49,55
8 S <sub>1</sub>	2,40			
9 S <sub>2</sub>	2,90			
10 S <sub>3</sub>	4,50			
11 S <sub>4</sub>	4,90			
12 S <sub>5</sub>	6,00			
13 S <sub>1</sub>	0,50			
14 S <sub>2</sub>	0,60			
15 S <sub>3</sub>	0,70			
16 S <sub>4</sub>	0,90			
17 S <sub>5</sub>	1,20			
18 S <sub>1</sub>	2,45			
19 S <sub>2</sub>	2,90			
20 S <sub>3</sub>	4,60			
21 S <sub>4</sub>	5,10			
22 S <sub>5</sub>	6,15			
23 S <sub>1</sub>	12,92		123	51,37
24 S <sub>2</sub>	10,07		97	50,86
25 S <sub>3</sub>	8,52		82	50,59
26 S <sub>4</sub>	8,27		79	52,64
27 S <sub>5</sub>	7,24		69	48,98
28 D <sub>s</sub> + D <sub>i</sub>	4,22		100	63,58
29 P <sub>1</sub>	0,30			
30 P <sub>2</sub>	0,45			
31 P <sub>3</sub>	0,45			
32 P <sub>4</sub>	0,50			
33 P <sub>5</sub>	0,60			
34 P <sub>1</sub>	ND			
35 P <sub>2</sub>	ND			
36 P <sub>3</sub>	ND			
37 P <sub>4</sub>	ND			
38 P <sub>5</sub>	ND			
39 P <sub>1</sub>	2,20		-	
40 P <sub>2</sub>	3,00		-	
41 P <sub>3</sub>	3,20		-	
42 P <sub>4</sub>	3,40		-	
43 P <sub>5</sub>	4,15		-	
44 P <sub>1</sub>	6,469	0,184	153	59,52
45 P <sub>2</sub>	7,235	0,206	172	59,68
46 P <sub>3</sub>	7,498	0,214	179	61,66
47 P <sub>4</sub>	7,667	0,219	183	61,97
48 P <sub>5</sub>	8,403	0,240	240	61,32

Los sistemas de incubación empleados en cada caso se describen en el texto. D<sub>i</sub>: Deaminasa-Sepharosa; D<sub>s</sub>: Deaminasa soluble, S: sobrenadante, P: precipitado separado por centrifugación de la suspensión Sepharosa-Deaminasa. En todos los casos para los cálculos de porfirinas formadas se restaron las sintetizadas (a partir de PBG) por los correspondientes controles. El isómero de la uroporfirina formada fue siempre aproximadamente 95% tipo I. ND: no detectable.

Figura IV.1.: Formación de intermediarios a partir de la Deaminasa de hígado de vaca inmovilizada sobre Sephara rosa



(○) Porphirinas en nmoles, (●) PBG remanente en µg. Otros detalles se indican en la leyenda de la Tabla IV.1.

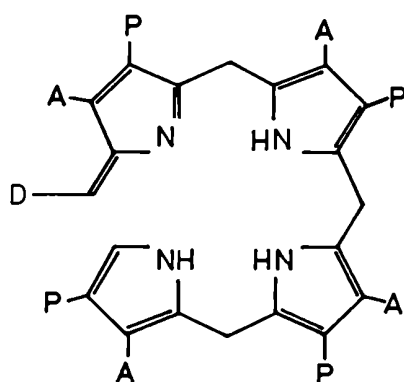


Figura IV.2.: Intermedia  
rio unido  
a la Deaminasa

Resultó también llamativo el resultado de la incubación de una mezcla de Sepharosa-Deaminasa y Deaminasa soluble. Con respecto al cálculo teórico, la actividad real de la mezcla fue de apenas un 34 %. Es posible que la concentración de intermediarios libres y unidos a la Sepharosa-Enzima generada por la enzima inmovilizada y la soluble en estas condiciones haya sido tan elevada como para inhibir en tal grado a la enzima soluble.

Las preparaciones de Sepharosa-Deaminasa separadas por centrifugación ( $P_1$  a  $P_5$ ) incubadas sin agregado alguno (sistema 29 - 33 y Figura IV.1.C) produjeron cantidades crecientes pero muy bajas de porfirinas: entre 0,3 y 0,6 nmoles de URO I. De estos datos sólo podríamos especular que el intermediario unido a la Deaminasa no se liberaría fácilmente de la misma, para luego ciclarse a uroporfirina.

Cuando esas mismas preparaciones  $P_1$  a  $P_5$  se incubaron con Deaminasa soluble (Sistemas 34 - 39, Figura IV.1.C) no se detectó formación de porfirinas en ningún caso. Aparentemente la pequeña cantidad liberada, según los resultados inmediatamente anteriores, se podría haber unido a la Deaminasa soluble, como vimos que ocurrió cuando los sobrenadantes se incubaron en presencia de esta enzima (Sistemas 13 - 17).

Un hallazgo interesante fue el obtenido incubando  $P_1$  a  $P_5$  con PBG (sistemas 39 - 43, Figura IV.1.C), apreciamos una nítida y creciente formación de URO I lo cual estaría indicando la presencia de intermediarios tetrapirrilmetano unidos a la

Sepharosa-Deaminasa, que se liberan en presencia de PBG, es también posible que luego de liberado el intermediario del sitio activo, se puedan formar cantidades adicionales de los mismos por entrada de nuevas moléculas de PBG, pero para la salida del tetrapirrimetano sería requisito la presencia de PBG.

La existencia del complejo enzima-intermediario en los sistemas  $P_1$  a  $P_5$ , se vió confirmada cuando los mismos se incubaron con Deaminasa soluble y PBG (sistemas 44 -48, Figura IV.1.C). Apreciamos un incremento relativo de la formación de URO I y actividad específica con respecto al control (sistema 28) que llega a 2 veces y media sólo atribuible a la presencia de intermediarios unidos a la Deaminasa-Sepharosa que se liberan en presencia de PBG. El consumo de sustrato fue del 80 % y es de notar que, como en otras experiencias no se obtuvo la formación estequiométrica de porfirinas de acuerdo al consumo registrado de PBG. Esto podría también deberse a una adsorción u oclusión irreversible del sustrato a la matriz de Sepharosa. Evidencias acerca de esto último se obtuvieron en el ensayo que describiremos luego.

De todas maneras, de este conjunto de experiencias podemos concluir que a partir de la preparación de Sepharosa-Deaminasa se obtienen intermediarios tetrapirrimetano lineales ordenados, una parte de los cuales se libera a la solución y la otra permanece unida en forma estable a la enzima. Para que el intermediario unido se libere hace falta PBG. El intermediario libre es capaz de unirse a la enzima nuevamente. Así cierto exceso de intermediario libre actúa como inhibidor de la Deaminasa. Estos hallazgos confirman nuestros resultados previos obtenidos con las enzimas de *E. gracilis* y nuestra idea de la formación de intermediarios mono-, di-, tri- y tetrapirrólicos unidos a la enzima, que sólo se liberan de la misma una vez alcanzada la longitud del tetrapirrimetano, por entrada de una nueva molécula de PBG. Además, confirman el hecho de que el tetrapirrimetano unido a la enzima es un mejor sustrato de la Isomerasa que el intermediario libre, el cual en concentraciones elevadas inhibe no sólo a su propia enzima, sino también al complejo (Rossetti y col., 1977).

#### IV.2. Obtención de intermediarios a partir de Deaminasa inmovilizada de *Rp. palustris*

La actividad de la preparación de Sepharosa-Deaminasa de hígado bovino es relativamente baja (0,054 nmoles de porfirinas/mg proteína) comparada con la soluble (1,75-2 nmoles/mg) y con una preparación de Sepharosa-Deaminasa de *Rp. palustris* (6,67 nmoles porfirinas/mg); en consecuencia, dadas las ventajas que ofrece el uso de la enzima inmovilizada, se empleó esta última para una serie de experiencias tendientes a detectar y aislar complejos estables de enzima-intermediarios, utilizando distintas relaciones molares de Deaminasa a PBG, con sustrato marcado con  $^{14}\text{C}$ .

Se ensayaron diferentes protocolos. En una experiencia se mezclaron en forma rápida a 4 °C volúmenes iguales (1 ml) de Sepharosa-Deaminasa y  $^{14}\text{C}$ -PBG en las relaciones 1:1, 1:2, 1:3 y 1:4 de moles de Deaminasa:moles de PBG\* (25 nmoles de Deaminasa:25 nmoles de PBG\* (6,5 µg); 25 nmoles de Deaminasa:50 nmoles de PBG\*, etc). Las mezclas se colocaron en columnas de 1x1,5 cm y se dejaron empaquetar normalmente (5 minutos). Luego se eluyeron con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8 obteniéndose los eluídos que denominamos  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$  y  $E_4$  respectivamente. A continuación se efectuó un lavado con 1 ml del mismo buffer y se recogieron los eluídos  $L_1$ ,  $L_2$ ,  $L_3$  y  $L_4$ . Posteriormente se desarmaron las columnas y se incubó su contenido (Sepharosa-Enzima) con un exceso de PBG frío (375 nmoles, 84 µg), durante dos horas a 37 °C. Una vez finalizada la incubación se separó la proteína por centrifugación obteniéndose los sobrenadantes  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  y  $S_4$ . Luego, la Sepharosa-Deaminasa procedente de la incubación fue lavada 3 veces con buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,8, 1 M en cloruro de sodio y se reunieron los lavados ( $L'_1$ ,  $L'_2$ ,  $L'_3$  y  $L'_4$ ).

En forma paralela se procesó un control conteniendo 1 ml de gel de Sepharosa y 100 nmoles de PBG\* (o sea, la cantidad correspondiente a la relación 1:4, E:PBG). Las fracciones obtenidas a partir de ese control, se denominaron, por analogía con las anteriores,  $E_5$ ,  $L_5$ ,  $S_5$  y  $L'_5$ .

Se incubó además otro control de la Sepharosa-Deaminasa con 375 nmoles de PBG frío y por supuesto, se efectuaron todos los blancos habituales.

En otra experiencia se procedió en forma análoga a la

descripta para la experiencia anterior, salvo las siguientes variaciones:

- a) En lugar de efectuar las mezclas rápidas, se empaquetó la Sepharosa-enzima en las columnas y se agregó luego el  $^{14}\text{C}$ -PBG en las relaciones establecidas.
- b) Tanto las cantidades de PBG\* como de Sepharosa-Deaminasa se duplicaron.
- c) El tiempo de incubación se redujo a 1 hora.

Los resultados obtenidos en la primera experiencia se muestran en la Tabla IV.2.

Según el mecanismo propuesto por Jordan y Berry (1981), si hubiera una velocidad de reacción diferencial para los 4 sitios de unión de PBG a la Deaminasa, deberíamos haber detectado los intermediarios estables enzima-PBG\*, enzima-(PBG\*)<sub>2</sub> y enzima-(PBG\*)<sub>3</sub>. Además, si tenemos en cuenta que una vez formado el intermediario enzima-(PBG\*)<sub>4</sub> se libera a la solución, en E<sub>4</sub> y L<sub>4</sub> sólo deberíamos haber observado la presencia de porfirinas marcadas y no de sustrato PBG.

En el caso del control, procesado solamente con gel de Sepharosa (sin enzima), todo el PBG agregado (100 nmoles) tendría que haberse recuperado en los eluidos E<sub>5</sub> + L<sub>5</sub> al igual que la marca.

Los datos obtenidos (Tabla IV.2.) revelan que, probablemente, debido a la alta actividad de la Deaminasa de *Rp. palustris*, las porfirinas se forman rápidamente a través de un mecanismo que parece ser del tipo propuesto por Battersby y col. (1983) según el cual la velocidad de unión de la primer molécula de PBG es igual a las restantes y solamente quedaría unido a la enzima un gran exceso de PBG. Por otra parte, debe observarse que en el control no se ha recuperado el PBG agregado originariamente, lo que nos indica que ha tenido lugar una adsorción no específica de aproximadamente el 50 % del sustrato al gel de Sepharosa. Esto constituye un grave inconveniente, difícil de solucionar y es obvio que por esta misma causa, no se ha recuperado tampoco, en ninguno de los casos, la marca total agregada inicialmente.

Si volvemos ahora a nuestra idea original y recordamos que esperábamos la formación de intermediarios estables enzima-PBG\*, enzima-(PBG\*)<sub>2</sub>, etc., los cuales deberían haber

quedado retenidos en el gel, entonces al incubar este último con exceso de PBG frío, en los sobrenadantes resultantes,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $S_3$  y también probablemente en los lavados correspondientes  $L'_1$ ,  $L'_2$  y  $L'_3$ , tendríamos que haber detectado formación de porfirinas marcadas en cantidades crecientes. En  $S_4 + L'_4$ , por supuesto, sólo se debería haber formado una cantidad de porfirinas no marcadas, equivalentes a las producidas por la fracción control gel-enzima (G-E).

Nuevamente, los resultados difieren de los esperados. Se observa que las fracciones  $S_1 + L'_1$ ,  $S_2 + L'_2$  ....  $S_4 + L'_4$ , formaron aproximadamente la misma cantidad de porfirinas y que además el producto no está marcado.

Nuestros hallazgos no confirman las experiencias de Jordan y Berry (1981) y en un principio esto podría deberse a que, si bien la mezcla entre la enzima insolubilizada y el sustrato se efectuó en forma rápida, el empaquetamiento posterior del gel-enzima en las columnas, resultó un proceso relativamente lento.

Por este motivo, se llevó a cabo otro ensayo introduciendo las modificaciones que se indicaron más arriba, pero los resultados obtenidos fueron similares a los recién descritos.

Sin embargo, de estas experiencias hemos obtenido una clara evidencia de que cuando se emplea como fuente de enzima el complejo Sepharosa-Deaminasa, cerca del 50 % del PBG queda retenido por el gel, explicándose así el hecho de que estamos midiendo un consumo de PBG elevado y no se formen las cantidades de porfirinas que corresponderían estequiométricamente a ese consumo.

#### IV.3. Acción de la Isomerasa sobre el intermediario tetrapirrilmetano y sobre la Deaminasa

Se ha propuesto que el intermediario tetrapirrilmetano o hidroximetilbilano formado por la Deaminasa es el sustrato de la Isomerasa. Con el objeto de comprobarlo en nuestros sistemas, se realizaron una serie de experiencias empleando preparaciones de Deaminasa e Isomerasa purificadas de *Rp. palustris* e hígado de vaca respectivamente.



Tabla IV.2.: Formación de intermediarios a partir de Sepharo  
sa-Deaminasa de *Rp. palustris*

FRACCION	nmoles porf.	$\mu\text{g}$ PBG remanente	cpm totales	cpm inicial	cpm recup.
E <sub>1</sub>	0,206	0,00	1.352	4.598	3.342
E <sub>2</sub>	0,314	0,32	2.162	9.195	5.919
E <sub>3</sub>	0,414	0,64	3.956	13.793	9.283
E <sub>4</sub>	0,531	1,35	4.630	18.390	8.075
E <sub>5</sub>	0,000	3,21	5.147	18.390	9.072
L <sub>1</sub>	0,207	0,31	1.846		
L <sub>2</sub>	0,343	1,05	3.392		
L <sub>3</sub>	0,299	0,44	4.927		
L <sub>4</sub>	0,250	1,06	3.025		
L <sub>5</sub>	0,000	6,72	3.485		
S <sub>1</sub>	16,037	5,59	144		
L' <sub>1</sub>	11,037	2,37			
S <sub>2</sub>	17,363	6,05	366		
L' <sub>2</sub>	10,678	2,28			
S <sub>3</sub>	17,657	7,60	400		
L' <sub>3</sub>	10,604	1,93			
S <sub>4</sub>	14,466	11,39	420		
L' <sub>4</sub>	9,346	2,61			
S <sub>5</sub>	0,075	37,26	440		
L' <sub>5</sub>	0,030	17,79			
G-E	23,677	3,80			
L.G-E	3,901	1,03		-	

PBG\*: 814 cpm/ $\mu\text{g}$

En primer lugar se debió verificar que el complejo híbrido de PBG-asa formado con Deaminasa de *Rp. palustris* e Isomerasa de hígado bovino, era funcional. La razón de estos ensayos es que es más conveniente y accesible obtener mayores cantidades de Isomerasa a partir de hígado bovino que de *Rp. palustris*, en tanto que la Deaminasa de *Rp. palustris* se prepara fácilmente y con muy alta actividad.

En esta experiencia se empleó la fracción Sobrenadante de calentamiento (D) correspondiente a la purificación de Deaminasa de *Rp. palustris* preparada según la metodología habitual. Como fuente de Isomerasa de hígado bovino (I) se utilizó la fracción 70-90% de saturación con sulfato de amonio correspondiente al esquema detallado en Materiales y Métodos.

Se incubaron mezclas de D + I en la relación 1:20 (mol:mol) considerando el peso molecular de la Deaminasa igual a 20.000 y el de la Isomerasa, 5.000.

De los datos obtenidos (Tabla IV.3.) puede aceptarse que la mezcla de enzimas provenientes de 2 fuentes diferentes es perfectamente funcional. Sin embargo se completó este ensayo, estudiando el comportamiento de distintas relaciones de Deaminasa de *Rp. palustris* e Isomerasa de hígado bovino. Los resultados se muestran en la Tabla IV.4.

Tabla IV.3.: Formación de uroporfirinógenos a partir de mezclas de Deaminasa de *Rp. palustris* e Isomerasa de hígado bovino

FRACCION	nmoles porf.	nmoles porf./mg prot.	% TIPO I	% TIPO III
D	54,39	89,90	80	20
I	0,11			
D + I (1:20)	58,13	16,03	30	70

El sistema de incubación contenía: enzima, 93 µg de PBG y buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 en un volumen final de 2,5 ml. El tiempo de incubación fue de 1 hora.  
(D): 1,21 mg/ml; (I): 2,65 mg/ml.

Tabla IV.4.: Relación Deaminasa: Isomerasa

RELACION D:I (mol:mol)	nmoles porf.	nmoles porf/mg prot.	TIPO ISOMERICO (%)	
			I	III
0:4	0,08	0,05	-	
1:0	27,79	76,13	100	-
1:0,1	26,08	69,67	80	20
1:0,25	26,00	66,96	60	40
1:0,5	22,73	55,21	50	50
1:1	22,23	48,53	30	70
1:2	17,24	31,42	20	80
1:3	17,00	26,34	20	80
1:4	16,90	22,88	20	80
1:5	16,24	19,51	20	80
1:10	16,94	10,69	20	80
1:20	16,67	7,46	20	80
1:30	15,99	5,05	30	70
1:40	16,70	4,07	20	80
1:60	16,75	2,80	30	70
1:80	16,51	2,10	30	70

El sistema de incubación contenía Deaminasa (2,4 mg/ml), Isomerasa (3,73 mg/ml), 90 µg de PBG, buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 en un volumen final de 2,5 ml. El tiempo de incubación fue de 1 hora.

Se aprecia una disminución de la actividad inicial de la Deaminasa a medida que aumenta la concentración relativa de Isomerasa, lo cual estaría sugiriendo cierto control sobre la Deaminasa por parte de la Isomerasa, que se traduce en una menor actividad de la primera, un hecho que ya hemos observado en *E. gracilis* (Rossetti y col., 1980), y que también se pone de manifiesto cuando el complejo de la PBG-asa se somete a calentamiento, en este caso se obtiene Deaminasa por destrucción de la Isomerasa termolábil, cuya actividad específica es varias veces superior a la del complejo (Kotler y col., 1987 b); es decir la Isomerasa también cumpliría un rol regulador sobre la actividad de la PBG-asa.

Empleando entonces preparaciones de Deaminasa de *Rp. palustris* (0,75 mg/ml) e Isomerasa de hígado bovino (7,35 mg/ml) se incubaron mezclas de D + I y los correspondientes controles de acuerdo al siguiente protocolo:

SISTEMA	D(ml)	I (ml)	PBG (ml)	Buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 (ml)
1	3,5		0,35	13,65
2	3,5	1,75	0,35	11,90
3		0,25	0,05	2,20
4			0,05	2,45

(PBG) = 60 µg/0,05 ml

En el sistema 1 se incubó D + PBG a 37 °C y se sacaron alícuotas a 2,5; 5; 10; 20; 30; 45 y 60 minutos.

En el sistema 2 se incubó D + PBG y a los 5 minutos de incubación a 37 °C se agregó la Isomerasa. Se tomaron alícuotas a los 10, 20, 30, 45 y 60 minutos.

En todos los casos se determinaron porfirinas formadas (tipo isomérico) y PBG remanente.

Los resultados obtenidos se ilustran en la Figura IV.3. En el caso del sistema conteniendo Deaminasa sola, el tipo isomérico fue siempre I. Puede apreciarse que el agregado de Isomerasa luego de 5 minutos de incubada la Deaminasa con PBG, no sólo acelera la reacción sino que también modifica el tipo isomérico, indicando que la Deaminasa ha formado un intermediario que puede ser convertido en urogen III por acción de la Isomerasa. Estos hallazgos estarían de acuerdo con datos empleando mezclas parecidas obtenidos por Battersby y col (1982).

En la experiencia anterior se comprobó que la Isomerasa puede utilizar como sustrato el producto de la reacción de la Deaminasa sobre el PBG; sin embargo, no arroja evidencias acerca de si se trata del intermediario libre o aún unido a la Deaminasa. Se llevó a cabo entonces un ensayo con el objeto de definir este aspecto. Para ello se obtuvo Deaminasa inmovilizada de hígado de vaca (14,64 mg de proteína/ml de gel) y

fracción 70-90 % de la misma fuente (5,56 mg de proteína/ml).

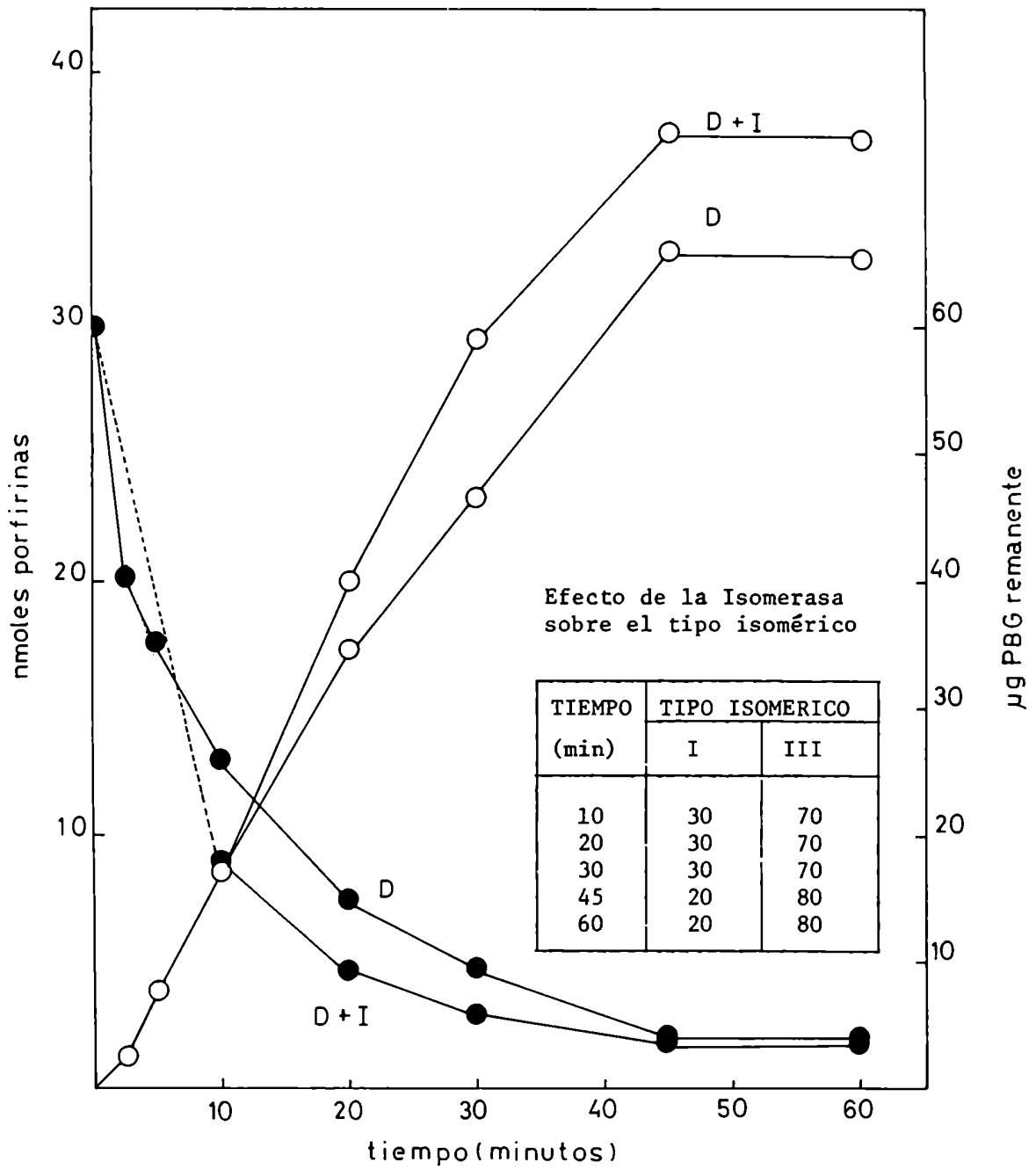


Figura IV.3.: Efecto de la Isomerasa sobre el intermediario y sobre la Deaminasa  
 (○) Porphirinas (nmoles), (●) PBG remanente (µg)

Se incubaron 8,5 ml de enzima inmovilizada resuspendida en 8,5 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 con 510 µg de PBG (0,85 ml). Transcurridos 10 minutos se separaron en forma rápida el sobrenadante y el complejo enzima-Sepharosa.

El sobrenadante se incubó rápidamente con 22,5 ml de Isomerasa durante 90 minutos (Sistema 1).

El gel-enzima se resuspendió en 22,5 ml de solución de Isomerasa y se incubó durante 90 minutos (Sistema 2).

Se empleó una relación Deaminasa:Isomerasa de 1:4 (mol:mol) dado que es la óptima para la formación de 100 % de URO III (los datos no se muestran).

Finalizada la incubación se separó el sobrenadante del sistema 2 por centrifugación. Tanto este sobrenadante como el sistema 1 se precipitaron con ácido, se filtraron y se determinaron porfirinas y tipo isomérico en el filtrado.

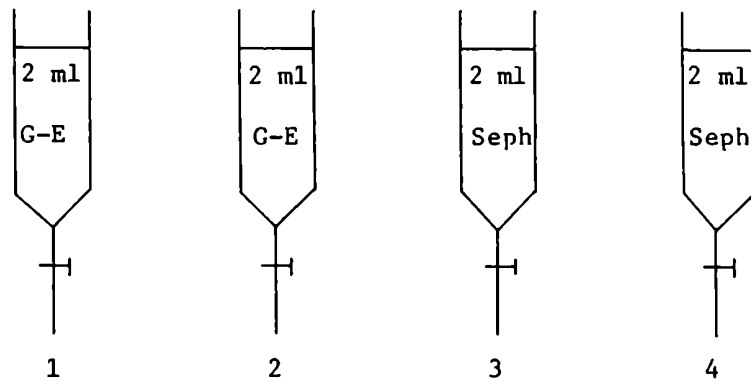
Se efectuaron además los controles correspondientes.

Ya habíamos demostrado que la Sepharosa-Deaminasa era capaz de formar intermediarios en forma libre y unidos a la enzima (Tabla IV.1, Figura IV.1.B y C); los datos de la Tabla IV.5 muestran ahora que la Isomerasa puede utilizar el intermediario libre presente en el Sobrenadante y también el unido a la Deaminasa, aunque a este último con mucha mayor eficiencia; lo cual podría deberse a que la interacción o asociación Deaminasa-Isomerasa favorecería la reacción de transferencia del producto de la Deaminasa a la enzima que lo emplea como sustrato. Sin embargo, hasta ahora no habíamos obtenido evidencias de la existencia de algún tipo de asociación entre ambas enzimas.

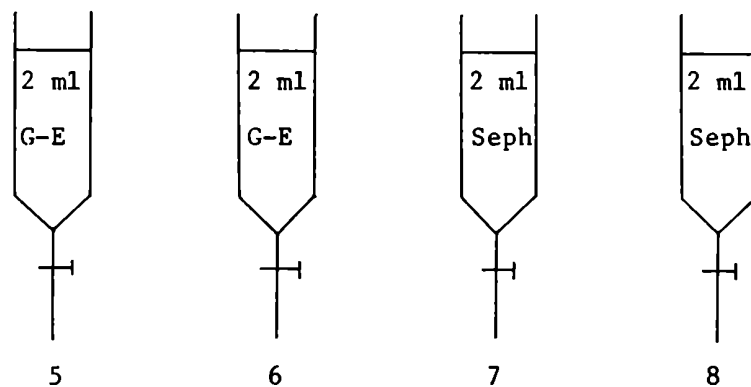
Con el objeto de establecer si se forma o no un complejo Deaminasa-Isomerasa se realizó la siguiente experiencia.

Se obtuvo Deaminasa inmovilizada de *Rp. palustris* (3,04 mg de proteína/ml de gel) e Isomerasa (fracción 70-90 % desalada de hígado de vaca) (10,34 mg/ml). Luego se armaron los sistemas que se detallan a continuación:

Relación  
1:20 (mol:mol)  
D:I



Relación  
1:40 (mol:mol)  
D:I



A cada columna se le hicieron pasar las mezclas que se especifican a continuación, a temperatura ambiente y controlando el tiempo de contacto de modo tal que fuera de 15 a 20 minutos. Finalizado el tiempo de contacto, se recogieron los eluidos a los que denominamos  $E_1$ ,  $E_2$ ...  $E_8$  y se lavaron las columnas con buffer hasta elución negativa de proteínas. Tanto de los eluidos como de los lavados se sacó una alícuota para medir proteínas y el resto se precipitó con ácido clorhídrico (c), se filtró y se midió el contenido de porfirinas y PBG remanente.

SISTEMA	I (ml)	PBG (ml)	Buffer (ml)
1	3	0,5	3,0
2	3	-	3,5
3	3	0,5	3,0
4	3	-	3,5
5	6	0,5	-
6	6	-	0,5
7	6	0,5	-
8	6	-	0,5

.(PBG) = 1.823  $\mu\text{g/ml}$ . Buffer Tris-HCl  
0,05 M pH 7,4

Por otra parte, se trataron en batch, durante 20 minutos a temperatura ambiente y con agitación las siguientes mezclas:

SISTEMA	RELACION D:I	I (ml)	GEL-ENZ (ml)	Buffer (ml)
9	1:20	3	2	3
10	1:40	6	2	

Finalizado el tratamiento, las mezclas se centrifugaron y a los sobrenadantes correspondientes se los denominó  $E_9$  y  $E_{10}$ . Estos sobrenadantes luego se incubaron en presencia de PBG. Los geles resultantes se lavaron con buffer hasta elución negativa de proteínas. Todas las fracciones solubles se trataron como en el caso anterior.

Los geles procedentes de las columnas 1, 2, 3, 5, 6, 7 y los procedentes del tratamiento en batch (9 y 10) se resuspendieron en igual volumen de buffer y con ellos se realizaron las siguientes incubaciones: 0,8 ml de gel resuspendido, 150  $\mu\text{g}$  de PBG y buffer en un volumen final de 3 ml durante 30 minutos.

El sistema de incubación para los eluidos  $E_9$  y  $E_{10}$  contenía 1 ml de eluido, 150  $\mu\text{g}$  de PBG y buffer en un volumen final



de 1,5 ml . El tiempo de incubación fue de 30 minutos.

Se efectuaron los controles y blancos necesarios: Control 1: Sepharosa-Deaminasa + I + PBG (relación 1:40); control 2: Sepharosa-Deaminasa + PBG; los cuales se incubaron en iguales condiciones que los geles.

Tabla IV.5.: Efecto de la Isomerasa sobre los intermedios formados por la Deaminasa

SISTEMA	nmoles porf.	% URO I	% URO III
1. Sobrenadante + I	3,22	25	75
2. Precipitado + I	29,51	20	80
3. Isomerasa			
4. Sobrenadante	3,00	100	0
5. Precipitado	2,10	100	0

De estos resultados (Tabla IV.6.) surge que no parece existir una fuerte asociación entre la Deaminasa y la Isomerasa, ya que luego de su pasaje por diferentes columnas de Sepharosa-Deaminasa y aún a través del gel mismo, no tuvo lugar retención significativa de la enzima, ya sea en presencia o ausencia de PBG. Sin embargo en el lapso de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (18 °C) y en presencia de PBG (columnas 1 y 5) se produjo una buena formación de porfirinas cuyo tipo isomérico está también indicando que hubo realmente interacción entre ambas enzimas.

Por otra parte cuando se determinó la actividad de los geles luego del tratamiento con Isomerasa, elución y lavado de los mismos (Tabla IV.7.) se observó que en todos los casos se obtuvo aproximadamente la misma formación de porfirinas, producto de la acción de la Sepharosa-Deaminasa, pues excepto en el control 1 (al cual se le había agregado Isomerasa), más del 90% de la porfirina resultante fue URO I. Se apreció una vez más en este grupo de experiencias, la retención del PBG por el gel de

Sepharosa (fracciones 3 y 7).

Tabla IV.6.: Contenido de porfirinas en los eluídos y lavados de las columnas de Sepharosa-Deaminasa o gel Sepharosa sembradas con Isomerasa

FRACCION	nmoles porf.	%TIPO ISOMERICO	
		I	III
E <sub>1</sub> + lavado	12,31	50	50
E <sub>3</sub> + lavado	1,10		
E <sub>5</sub> + lavado	29,88	25	75
E <sub>7</sub> + lavado	0,79	-	

En los eluídos E<sub>2</sub>, E<sub>4</sub>, E<sub>6</sub> y E<sub>8</sub> no se detectaron porfirinas.  
La determinación de la cantidad de proteína en los eluídos más lavados de las columnas 1 a 8 indicó una recuperación mayor del 90 % de la Isomerasa sembrada: 28 ± 2 mg (1 a 4) y 57 ± 3 mg (5 a 8)

En consecuencia de este conjunto de ensayos surge: i) que los complejos híbridos formados con Deaminasa e Isomerasa de diferentes fuentes son totalmente funcionales, lo cual sugiere que las zonas de interacción de ambas enzimas deben ser similares; ii) que la Isomerasa afecta o regula la actividad de la Deaminasa; iii) que la Isomerasa puede utilizar al producto de la Deaminasa como su sustrato, con mayor eficiencia cuando aún está unido a la enzima; iv) que no se forma un complejo estable Deaminasa-Isomerasa pero es muy posible que en condiciones naturales y en presencia de PBG, Deaminasa e Isomerasa formen una cupla en la cual ambas enzimas se encuentren físicamente muy cerca una de otra o aún asociadas, de manera que su interacción

sea más efectiva. La asociación entre Deaminasa e Isomerasa no parece entonces involucrar uniones covalentes y no es un requisito fundamental para su modo de acción ya que *in vitro* ambas pueden funcionar en forma independiente sobre sus respectivos sustratos. Enfatizamos, sin embargo, que *in vivo* no puede darse esta última situación, por lo cual las dos proteínas deben estar asociadas de alguna manera e interaccionar eficientemente en respuesta a las necesidades fisiológicas.

Tabla IV.7.: Actividad de los geles luego del tratamiento con Isomerasa

FRACCION	nmoles porf.	nmoles porf/mg prot.	µg PBG remanente.
1	20,93	17,44	22,00
2	22,17	18,48	21,91
3	0,05	-	105,97
4	-	-	-
5	21,09	17,58	22,11
6	21,00	17,50	24,48
7	0,07	-	124,74
8	-	-	-
9	20,22	16,85	33,68
10	21,55	17,96	31,03
Control 1	20,56	17,14	22,34
Control 2	22,45	18,40	31,03

En control 1: tipo isomérico 30 % I y 70 % III.  
 En control 2, 1, 2, 5, 6, 9 y 10: 90 % tipo I.

#### IV.4. Referencias

- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Gustafson-Potter, K.E.; Mc Donald, E. & Matcham, G.W.J. (1982), J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 2427.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.R.; Matcham, G.W.J.; Mc Donald, E. & Hollenstein, R. (1983), J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 3031.
- Fumagalli, S.A.; Kotler, M.L.; Rossetti, M.V. & Batlle, A. M. del C. (1985), Int. J. Biochem. 17 (4), 485.
- Jordan, P.M. & Berry, A. (1981), Biochem. J. 195, 177.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987 a), Int. J. Biochem. 19 (10), 981.
- Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1987 b), Comp. Biochem. Physiol. 87 B (3), 601.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970) FEBS lett. 6, (3), 285.
- Rossetti, M.V. (1978), Tesis de Doctorado (UBA).
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977), Int. J. Biochem. 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A.M. del C. (1977), Int. J. Biochem. 8, 781.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), Int. J. Biochem. 12, 761.
- Stella, A.M.; Parera, V.E.; Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971), Biochim. Biophys. Acta 252, 481.

## CAPITULO V

### MECANISMO DE ACCION PARA LA FORMACION ENZIMATICA DE LOS UROPORFIRINOGENOS I Y III

---

	Página
V.1. Mecanismo de acción	391
V.2. Referencias	396

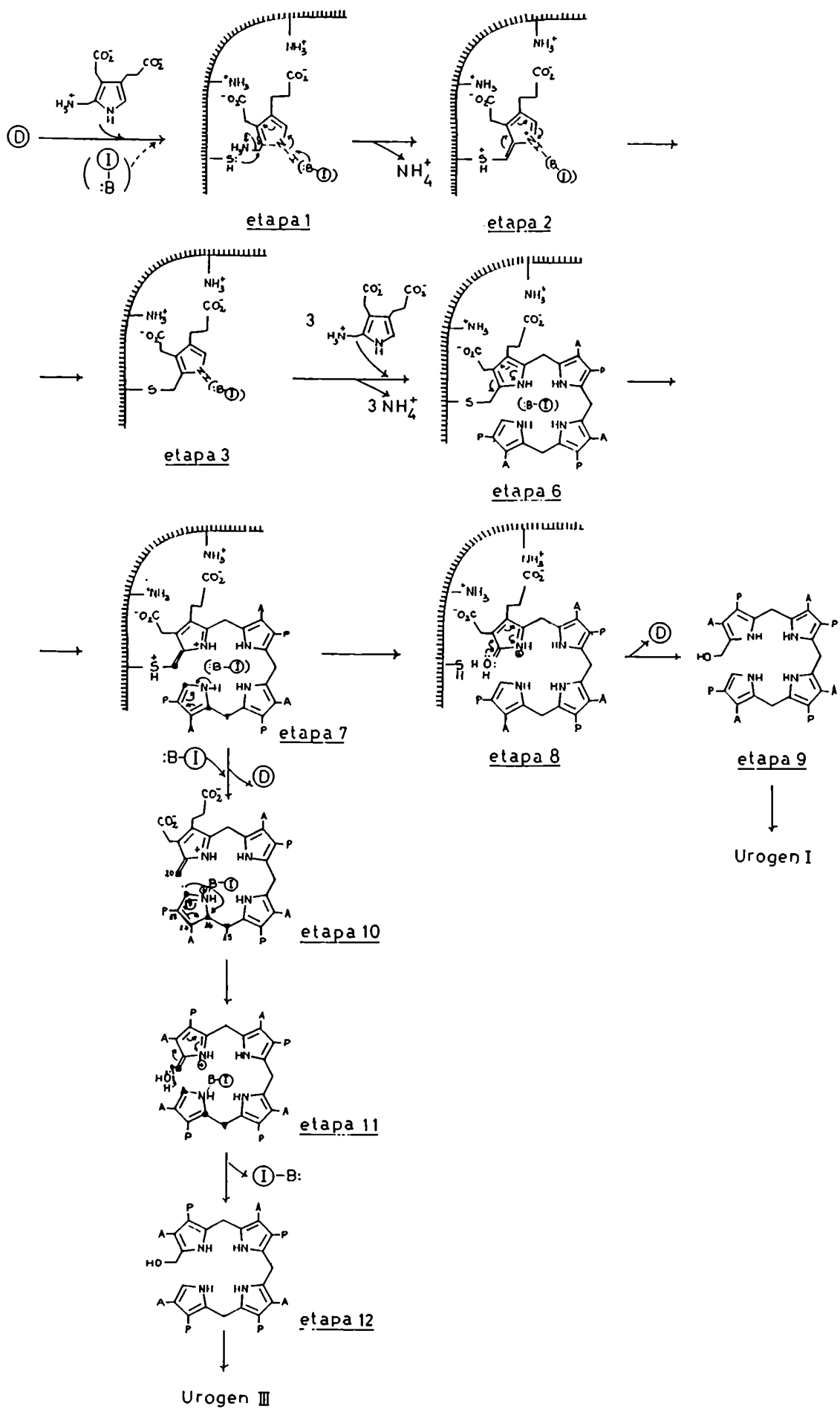
## V. MECANISMO DE ACCION PARA LA FORMACION ENZIMATICA DE LOS UROPORFIRINOGENOS I Y III

### V.1. Mecanismo de acción

Es notable la copiosa información existente acerca de la etapa del camino del hemo que conduce a la síntesis de uroporfirinógenos a partir del PBG, y correspondientemente son numerosísimos los mecanismos postulados para explicar la acción de las enzimas involucradas. Ya hace 11 años (Batlle y Rossetti, 1977), nuestro laboratorio hizo una extensa revisión de todos los datos experimentales existentes hasta ese momento, y en base a ellos postulamos un mecanismo que se ajustaba perfectamente a tales evidencias. Sin embargo, el empleo de nuevas técnicas y tejidos así como mejores equipos, ha proporcionado a posteriori valiosa información adicional que ha hecho necesario adaptar y actualizar aquel esquema teniendo en cuenta tanto los anteriores como los nuevos aportes experimentales. Como consecuencia de esta revisión, proponemos ahora el esquema ilustrado en la Figura V.1.

Existe hoy acuerdo en que por acción de la deaminasa sobre el PBG, se forma un tetrapirrilmetano lineal, no isomerizado, identificado por el grupo de Battersby como el hidroximetilbilano, que puede actuar como sustrato de la isomerasa, la cual invierte el anillo D del mismo y lo cicla a uroporfirinógeno III. En ausencia de la isomerasa, el hidroximetilbilano se cicla no enzimáticamente a uroporfirinógeno I.

De la obtención de diversos complejos de la deaminasa con su sustrato, del tipo  $D(\text{PBG})$ ,  $D(\text{PBG})_2$ ,  $D(\text{PBG})_3$ ,  $D(\text{PBG})_4$ ; bajo variadas condiciones experimentales, se ha establecido que el primer pirrol que se une a la deaminasa es el correspondiente al anillo A, y que esta unión es de tipo covalente (Battersby y col., 1979 a,b; 1983 a,b; Jordan y Seehra, 1979; Seehra y Jordan, 1980), las demás moléculas de PBG se van uniendo a la primera en el orden B, C y D hasta llegar a la longitud del tetrapirrilmetano; alcanzada esa etapa de polimerización, la entrada de una nueva molécula de PBG libera al medio o transfiere a la isomerasa el intermediario tetrapirrólico. En trabajos anteriores de nuestro laboratorio con las enzimas de *E. gracilis* (Rossetti y col., 1977) y en el presente estudio se han obtenido datos que apoyan este hecho.



**Figura V.1.:** Esquema para la formación enzimática de uroporfirino I y III a partir de PBG.

(D) y  $\curvearrowright$  = Deaminasa; (I)-B = isomerasa  
 ( $\blacktriangledown$ ) C<sub>15</sub>, ( $\blacktriangle$ ) C<sub>16</sub>, ( $\bullet$ ) C<sub>19</sub>, ( $\blacksquare$ ) C<sub>20</sub>.

También se sabía que tanto la deaminasa como el complejo de la PBG-asa, se comportaban como enzimas sulfhidríticas (Sancovich y col., 1969; Llambías y Batlle, 1971 a, b; Farmer y Hollebhone, 1984). Los típicos inhibidores de grupos sulfhidrilo afectaban en diferente grado el consumo de PBG y la formación de porfirinas. También había algunas evidencias acerca de la existencia de grupos ditioles necesarios para la actividad. Jordan y Shemin (1973) observaron asimismo que la deaminasa se inhibe reversiblemente con reactivos bloqueantes de restos sulfhidrilos.

Por otro lado, de estudios por espectroscopía RMN del complejo deaminasa-(PBG) se hallaron evidencias de un desplazamiento químico del hidrógeno 3 del metileno directamente unido a la proteína del orden de  $3,28 \pm 0,1$  ppm, valor cercano al  $\delta_H = 3,5 \pm 0,1$  correspondiente al producido teóricamente por tiometilpirroles sustituidos ( $-S-CH_2$ -pirrol) (Evans y col., 1986) sugiriendo que el grupo nucleofílico del sitio activo de la deaminasa que uniría a la primer molécula de PBG correspondería a un resto sulfhidrilo de una cisteína.

Por otra parte, también se demostró que ciertos ácidos dicarboxílicos y la 2-metoxi-5-nitrotropona (un reactivo específico de grupos amino libres proteicos) inhiben la deaminasa (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Sancovich y col., 1976). De estudios con la PBG-asa de *Rp. palustris* (Juknat, 1983) y en este trabajo, hemos encontrado que según las concentraciones relativas de PBG y fosfato, estos últimos iones también producen inactivación enzimática. Se ha propuesto que tanto los ácidos dicarboxílicos como los iones fosfato, podían inhibir la deaminasa por bloqueo de ciertos grupos positivos sobre la enzima por ejemplo  $\epsilon$ -aminos de lisina y a los cuales se unirían y orientarían las cadenas propiónica y acética del PBG. Recordemos también que el formaldehído, capaz de reaccionar también con residuos lisina proteicos, es un inhibidor de la deaminasa (Bogorad, 1958). Posteriormente, Pollack y Russell (1978) y Hart y col. (1984) también hallaron evidencias de la presencia de residuos básicos, de arginina o lisina en el sitio activo de la deaminasa. Finalmente, también Evans y col. (1986) de sus resultados con RMN, obtuvieron evidencias de la formación de una unión iónica entre el carboxilo del sustituyente propionato del PBG y un grupo básico de la enzima.

De manera que según ya lo habíamos propuesto en el



esquema de 1974, en la etapa 1 la primer molécula de PBG se uniría a la deaminasa a través de pares iónicos, entre el nitrógeno de residuos lisina o arginina y los carboxilos de las cadenas propiónico y acetato, y además se produciría la alquilación de un resto sulfhidrilo libre, con la eliminación de un equivalente mol de amonio, en una clásica reacción de desplazamiento, según lo demostraron Battersby y col. (1983 b). Por desplazamiento de cargas, se formaría primero un intermediario D-PBG, altamente reactivo de tipo pirrolenina (etapa 2) que rápidamente se estabilizaría luego de otro desplazamiento electrónico adoptando la estructura que se muestra en la etapa 3. Condensaciones subsiguientes cabeza-cola con nuevas moléculas de PBG llevarían a la formación de los complejos entre la deaminasa y los intermediarios di, tri y tetrapirrólicos (etapas 4 a 6), siguiendo para cada condensación la misma secuencia detallada para las etapas 1 a 3. Alcanzada la longitud del tetrapirrilmetano, este intermediario se encuentra unido al sitio activo de la deaminasa con una estructura altamente reactiva del tipo azafulveno (etapa 7). En este punto, la etapa siguiente en la liberación del tetrapirrol es la regeneración del grupo sulfhidrilo libre y la formación de una unión metileno. Así esa especie azafulveno altamente reactiva, en condiciones apropiadas puede reaccionar con agua endógena (etapa 8) y formar el hidroximetilbilano (etapa 9), que químicamente cicla a uroporfirinógeno I, o bien puede reaccionar con cualquier otro nucleófilo conveniente como amoníaco o hidroxilamina, que atrapa y libera de esa forma al intermediario de la enzima (Radmer y Bogorad, 1972; Davies y Neuberger, 1973; Battersby y col., 1983 b). Estos reactivos también son capaces por supuesto de atrapar y liberar las formas pirrolénicas de intermediarios mono, di y tripirrólicos. Se ha demostrado que el metilénpirrol no puede liberarse al medio como intermediario y luego hidratarse no enzimáticamente, sino que tanto su formación como su hidratación deben ocurrir sobre el sitio activo de la enzima (Jones y col., 1984).

Si bien la unión del PBG a la deaminasa puede ocurrir en ausencia de isomerasa, es probable que *in vivo*, en presencia del PBG, la isomerasa se asocie a la deaminasa, formando el complejo natural de la PBG-asa, en el cual la isomerasa podría interaccionar con el PBG a través de uno de sus restos básicos, cediendo o tomando electrones del o al hidrógeno de la molécula de PBG que está entrando a la deaminasa. Pero una vez formado

el intermediario de tipo azafulveno con la longitud de un tetrapirrilmetano, la isomerasa lo emplearía como sustrato, uniéndose al mismo, a través del pirrol D, al tiempo que la deaminasa se separaría para entrar en un nuevo ciclo de reacciones (etapa 10); por desplazamiento y reordenamiento electrónico, se produciría un intercambio de posiciones entre el carbono 19 y el carbono 16 resultando un intermediario aún con estructura del tipo metilénpirrol en el anillo A pero con el anillo D reordenado (etapa 11).

Análogamente a lo ya discutido para el azafulveno ordenado, aún en el sitio activo por reacción con agua endógena, se liberaría un hidroximetilbilano isomerizado (etapa 12) que se ciclaría rápidamente a uroporfirinógeno III, al tiempo que la isomerasa quedaría en condiciones de participar en una nueva secuencia de reacciones.

La detección y aislamiento de intermediarios tetrapirrilmetano tipo I y III a partir de *E. gracilis* (Rossetti y col., 1977) y el estudio de su comportamiento, ya sea en forma libre o unidos a las enzimas, frente a la deaminasa y la PBG-asa de la misma fuente apoyan la hipótesis aquí presentada acerca de la existencia de un intermediario reordenado de estructura del tipo azafulveno formado por acción de la isomerasa sobre el precursor no ordenado, de igual naturaleza, que actúa como sustrato de esta enzima.

## V.2. Referencias

- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Mc Donald, E. & Matcham, G. W. (1979 a), *Bioorg. Chem.* 8, 451.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Matcham, G.W. & Mc Donald, E. (1979 b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 539.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Matcham, G.W.; Mc Donald, E. & Hollenstein, R. (1983a), *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 3031.
- Battersby, A.R.; Fookes, C.J.; Hart, G.; Matcham, G.W. & Pandey, P.S. (1983 b), *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 3041.
- Bogorad, L. (1958), *J. Biol. Chem.* 233, 501.
- Davies, R.C. & Neuberger, A. (1973), *Biochem. J.* 133, 471.
- Evans, J.N.S.; Burton, G.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1986), *Biochemistry* 25, 905.
- Farmer, D.J. & Hollebhone, B.R. (1984), *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 62, 49.
- Hart, G.J.; Leeper, F.J. & Battersby, A.R. (1984), *Biochem. J.* 222, 93.
- Jones, C.; Jordan, P. & Akhtar, M. (1984), *J. Chem. Soc. PerkinTrans I*, 2625.
- Jordan, P.M. & Seehra, J.S. (1979), *FEBS lett.* 104, 364.
- Jordan, P.M. & Shemin, D. (1973), *J. Biol. Chem.* 248, 1019.
- Juknat, A.A. (1983), *Tesis de Doctorado*, UBA.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a), *Biochem. J.* 121, 327.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- Pollack, S. & Russell, C. (1978), *FEBS lett.* 90, 47.
- Radmer, R. & Bogorad, L. (1972), *Biochemistry* 11, 904.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A. & Batlle, A. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 781.
- Sancovich, H.A.; Batlle, A.M. del C. & Grinstein, M. (1969), *Biochim. Biophys. Acta* 191, 130.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 379.
- Seehra, J.S. & Jordan, P.M. (1980), *J. Am. Chem. Soc.* 102, 6841.

## CAPITULO VI

### MODELO PARA LA PBG-asa

---

	Página
VI.1. Acerca de la importancia de la formación de un complejo Deaminasa-Isomerasa en la efectiva canalización del intermediario tetrapirrólico. Modelo	397
VI.2. Referencias	403

## VI. MODELO PARA LA PBG-asa

### VI.1. Acerca de la importancia de la formación de un complejo Deaminasa-Isomerasa en la efectiva canalización del intermediario tetrapirrónico. Modelo

Por lo general la mayoría de las enzimas son gregarias. Muy pocas existen naturalmente como moléculas completamente independientes, sino que lo común es que formen agregados por asociación con moléculas similares (homopolímeros), como en el caso del ALA-D o con otras proteínas estructurales u otras enzimas (heteropolímeros), como sería justamente el caso de la PBG-asa. Las enzimas pueden existir como homopolímeros de un único tamaño, sea por ejemplo el hexámero, en estos casos la actividad catalítica es óptima y está exclusivamente asociada a ese polímero. Otro grupo de enzimas son homopolímeros que pueden existir como mezclas de dos o más tamaños de polímeros que se diferencian entre sí por su actividad catalítica relativa. En el 90% de estas enzimas, la actividad catalítica aumenta con el grado de polimerización y es óptima (o a veces sólo se detecta) en el polímero mayor. Esta asociación de subunidades generalmente conduce a una estructura cuaternaria con una actividad catalítica óptima y/o ciertas características regulatorias.

Las enzimas heteropolímeros pueden también hallarse en situaciones similares a las descritas para las anteriores, excepto que cada subunidad de aquellas está en éstas constituida por lo menos por una asociación de dos o más enzimas diferentes que llamaremos protómero.

En base a un análisis del comportamiento de las enzimas deaminasa, isomerasa y el complejo de ambas, PBG-asa, obtenidas a partir de distintas fuentes, hemos propuesto que la PBG-asa se puede encontrar al menos en tres formas moleculares diferentes, identificadas como tetrámeros, dímeros y monómeros, según el organismo; las formas de mayor actividad (eritrocitos de aves, Llambías y Batlle, 1971 a) corresponden al tetrámero, luego sigue el dímero (hígado bovino, Sancovich y col., 1976; *E. gracilis*, Rossetti y col., 1980) y el monómero (*E. gracilis*, Rossetti y col., 1980 y callos de soya, Llambías y Batlle, 1971 b).

Hemos definido al monómero o protómero como la estructura funcional mínima, correspondiente a un híbrido de peso molecular 25.000 (Rossetti y col., 1980), constituido por dos

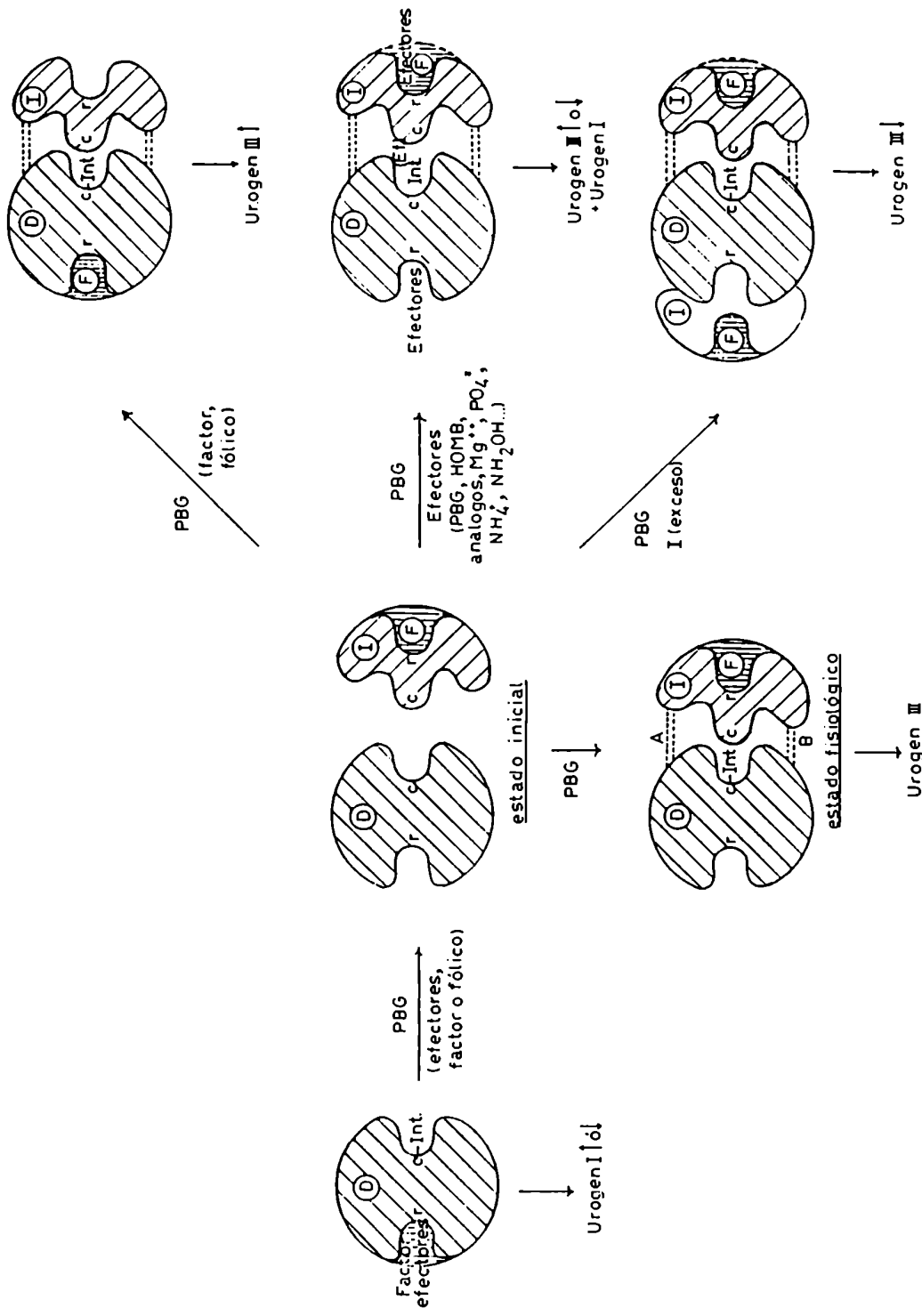
proteínas o enzimas diferentes en la relación de un mol de deaminasas (PM 20.000) a un mol de isomerasa (PM 5.000).

Los resultados obtenidos en este trabajo y en estudios previos sobre la PBG-asa de esta misma fuente (Juknat, 1983) confirman nuestra hipótesis y establecen que a la PBG-asa de *Rp. palustris* corresponde una estructura de tetrámero con máxima actividad catalítica.

Cuál es la ventaja, o por qué se forman estos polímeros. En el caso particular de la PBG-asa, pensamos que la formación del protómero ofrece a la célula o al organismo una ventaja fisiológica, permitiendo la "canalización" de un producto intermedio. Por "canalización" entendemos simplemente lo siguiente: en la reacción de formación del metabolito C a partir de A, el intermediario B no se libera del complejo enzimático en cantidades significativas como para poder formar un pool de intermediario libre B. Al respecto, debe recordarse que, durante largo tiempo, se había postulado la existencia de intermediarios polipirrólicos en la reacción de ciclotetramerización enzimática del PBG en uroporfirinógenos por acción del complejo PBG-asa (Batlle y Rossetti, 1977); sin embargo, fue recién en febrero de 1970 que nuestro laboratorio publicó la detección y aislamiento por primera vez, y en condiciones naturales de tales intermediarios polipirrólicos (Llambías y Batlle, 1970). A esos trabajos siguieron otros, también de nuestro grupo (Rossetti y Batlle, 1977) hasta que llegamos a los hallazgos de los laboratorios de Scott y Battersby hacia fines de los años 70 y comienzo de esta década.

Sabemos que en condiciones normales la síntesis de porfirinas se efectúa con gran eficiencia (95%), sólo se detectan muy pequeñas cantidades de precursores y porfirinas en fluidos, órganos y excreta, en tanto que la reacción de condensación del PBG por la PBG-asa ocurre con formación directa de uroporfirinógeno III sin acumulación de ningún tipo de intermediarios. Esto se puede atribuir entonces a que en presencia del PBG, una unidad de deaminasa se asocia con una unidad de isomerasa, para formar el llamado protómero (Figura VI.1).

Hemos observado que la asociación de ambas enzimas ocurre pero no involucra uniones de tipo covalente, y tal vez los puntos o zonas de contacto no sean muchos; pero si importen algunos residuos específicos que parecen ser comunes a las deaminasas e isomerasas obtenidas de distintas fuentes, dado que se



**Figura VI.1.1.:** Representación esquemática de los cambios en la conformación estructural de la Deaminasa (D) y del complejo de la PBG-asa, por asociación de la Deaminasa y la Isomerasa (I), en presencia del sustrato PBG y bajo diversas condiciones experimentales. c: sitio catalítico; r: sitio regulatorio; F: factor regulador; Int: intermediario(s); HOMB: hidroximetilbilano. A y B: sitios de contacto entre la I y la D.

han logrado formar protómeros híbridos funcionales con deaminasa e isomerasa provenientes de diferentes organismos.

En base también al estudio de la acción de distintos compuestos y sustratos o análogos de sustratos sobre las enzimas se pueden ubicar en cada enzima un sitio catalítico (c) y uno (o más) sitios regulatorios (r). Se ha demostrado también, con las enzimas de *E. gracilis*, la existencia de un factor regulador (F), de naturaleza pteridínica (Juknat y col., 1981, 1988 a, b) capaz de modificar la actividad de la deaminasa y del complejo en conjunto; el ácido fólico puede ejercer el mismo efecto estimulante (Juknat y col., 1981).

En consecuencia, se propone ahora, que la asociación de una unidad de deaminasa con una de isomerasa formaría un protómero activo, estabilizado por el PBG que entraría al sitio activo de la deaminasa para formar allí el intermediario tetra pirrilmetano, que sin necesidad de difundir al medio, se canalizaría directamente al sitio activo de la isomerasa, donde se convertiría en uroporfirinógeno III.

La formación entonces de esta estructura cuaternaria para este complejo bifuncional en el momento de la reacción, resulta en una canalización del intermediario con una máxima actividad. El mecanismo de canalización ha sido ya propuesto para otras enzimas (Gaertner y col., 1970; Lue y Kaplan, 1970; Matchett, 1974).

Esta asociación de ambas enzimas también está relacionada con las posibilidades de controlar o regular la formación de intermediarios y productos.

Dijimos que se conocen un buen número de compuestos que afectan la actividad de estas enzimas o del complejo en sí; la alteración de la actividad catalítica por efectores fisiológicos o no fisiológicos, puede explicarse también en base a alteraciones o cambios en la estructura cuaternaria del complejo, como se ha tratado de visualizar en el esquema de la Figura VI.1.

Siempre en presencia del PBG, pues recordemos que la hipótesis es que el PBG promovería la asociación de las dos enzimas, la unión del factor al sitio regulatorio sobre la deaminasa, estimula la formación del uroporfirinógeno III; por activación de la deaminasa, aumentaría la síntesis de intermediarios que canalizándose hacia la isomerasa generaría mayor cantidad de producto.



Se ha visto que un gran exceso de PBG, provoca una disminución de la actividad del complejo y aumento de la cantidad relativa de uroporfirinógeno I con respecto a uroporfirinógeno III. El PBG podría actuar por unión a otro sitio sobre la deaminasa distinto del catalítico que podría ser el regulatorio. Aclaremos una vez más que, por razones de simplicidad se ha representado esquemáticamente a un solo sitio r, aunque ello no significa que todos los efectores se unen a un mismo sitio, si no que obviamente es posible que exista más de un sitio regulatorio. Alternativamente un exceso de PBG podría producir un exceso de intermediarios que podrían liberarse al medio y volverse a unir a la deaminasa en otro sitio, pues también se ha observado que cantidades crecientes de hidroximetilbilano inhiben la deaminasa. Análogos del PBG, análogos del hidroximetilbilano e intermediarios di y tripírrilmetano libres también disminuyen la actividad enzimática, posiblemente por bloqueo del sitio activo o unión al regulatorio.

Dependiendo de la concentración de sustrato PBG, hemos encontrado que el magnesio a bajas concentraciones actúa como activador, en tanto que inhibe a altas. El primer efecto ha sido explicado en base a que el magnesio podría facilitar la asociación de las enzimas (Llambías y Batlle, 1971 a, b; Sancovich, 1972; Batlle y Rossetti, 1977) y también se ha propuesto que ciertos cationes divalentes como el magnesio podrían actuar en el sitio catalítico de la isomerasa (Scott y col., 1976).

Un hallazgo interesante de este trabajo y el de Juknat (1983) es la inhibición producida por el anión fosfato en determinadas condiciones y según la concentración de PBG, proponiéndose que el fosfato podría unirse al sitio activo y/o regulatorio de la deaminasa, alterando así su estructura y actividad.

El efecto de los iones amonio, hidroxilamina y otras bases sobre la actividad de estas enzimas es bien conocido, su acción es más inhibitoria sobre el consumo de PBG que sobre la formación total de porfirinas y el tipo de inhibición que produce es competitivo sobre la isomerasa y no competitivo sobre la deaminasa, postulándose que en la primera podría bloquearse el sitio activo, impidiendo la entrada del intermediario, aunque también podría unirse al sitio regulatorio, de unión del PBG. Recordemos que tanto el PBG como el amonio protegían a la isomerasa de su destrucción por calentamiento, sugiriéndose que ambos compuestos podrían unirse al mismo sitio sobre la enzima.

Por otro lado, debemos tener también en cuenta que estos nucleófilos son excelentes secuestrantes de la forma altamente activa del intermediario azafulveno, liberándolo al medio y reduciendo así su canalización hacia la isomerasa.

Se ha observado que la isomerasa también actúa como reguladora de la actividad de la deaminasa, hemos ya discutido el hecho de que esta última es más activa en ausencia que en presencia de la isomerasa, y se ha encontrado que un exceso de isomerasa disminuye aún más la actividad del complejo, probablemente por unión al sitio r.

Cuando la deaminasa está completamente libre de isomerasa, también existen una serie de efectores, incluyendo al mismo sustrato PBG, el factor, ácido fólico, hidroximetilbilano, análogos, intermediarios libres, magnesio, fosfato, bases amonio, hidroxilamina, que regulan su actividad por mecanismos parecidos a los recién propuestos para el caso en el cual esta enzima está acompañada de la isomerasa. Sin embargo, recordemos una vez más que la actividad de la deaminasa cuando está separada de la isomerasa es superior a la que tiene cuando forma el complejo y el producto de la reacción es únicamente uroporfirinógeno I.

## VI.2. Referencias

- Batlle, A.M. del C. & Rossetti, M.V. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 251.
- Gaertner, F.H.; Ericson, M.C. & De Moss, J.A. (1970), *J. Biol. Chem.* 245, 595.
- Juknat, A.A. (1983), Tesis de Doctorado, UBA.
- Juknat, A.A.; Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1981), *Int. J. Biochem.* 13, 343.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 a) *Z. Naturforsch.*, en prensa.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 b) *Z. Naturforsch.*, en prensa.
- Lue, P.F. & Kaplan, J.G. (1970), *Biochim. Biophys. Acta* 220, 365.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1970), *FEBS lett.* 6, 285.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 a) *Biochim. Biophys. Acta* 227, 180.
- Llambías, E.B.C. & Batlle, A.M. del C. (1971 b), *Biochem. J.* 121, 327.
- Matchett, W.H. (1974), *J. Biol. Chem.* 249 (13), 4041.
- Rossetti, M.V. & Batlle, A.M. del C. (1977), *Int. J. Biochem.* 8, 277.
- Rossetti, M.V.; Juknat, A.A.; Kotler, M.L.; Fumagalli, S.A. & Batlle, A.M. del C. (1980), *Int. J. Biochem.* 12, 761.
- Sancovich, H.A. (1972), Tesis de Doctorado, UBA.
- Sancovich, H.A.; Ferramola, A.M.; Batlle, A.M. del C.; Kivilevich, A. & Grinstein, M. (1976), *Acta Physiol. Latinoam.* 26, 379.
- Scott, A.I.; Ho, K.S.; Kajiwara, M. & Takahashi, T. (1976), *J. Am. Chem. Soc.* 98 (6), 1589.

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

---

	Página
VII.1. Aislamiento y propiedades de la Deaminasa de <i>Rp. palustris</i>	404
VII.2. Inmovilización de la Deaminasa	406
VII.3. Estructura cuaternaria	407
VII.4. Formación de intermediarios	408
VII.5. Mecanismo de acción	408
VII.6. Modelo para la PBG-asa	409

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el estudio de la conversión enzimática del PBG en uroporfirinógenos en *Rp. palustris* pueden resumirse de la siguiente manera:

### VII.1. Aislamiento y propiedades de la Deaminasa de *Rp. palustris*

Los ensayos iniciales comprendieron una serie de experiencias tendientes a determinar las condiciones óptimas para la detección, extracción y medición de la actividad de la Deaminasa de esta bacteria.

Se emplearon células de *Rp. palustris* crecidas 72 horas a la luz; cosechadas al finalizar la fase exponencial.

La proteína enzimática se extrajo por sonicación concentrándose la actividad en la fracción sobrenadante. Se determinó que la técnica de sonicación aplicada a una suspensión de células en buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8 durante 60 segundos a 14  $\mu$ , era la óptima.

Con el fin de obtener una preparación de Deaminasa libre de Isomerasa, se sometió a la fracción Sobrenadante de 27.000xg a un fraccionamiento salino con sulfato de amonio (35-55%). Esta fracción, una vez desalada se calentó a tiempos (5-25 minutos) y temperaturas (55 - 75 °C) variables obteniéndose un 90 % de uroporfirina I por calentamiento a 65 °C durante 5 minutos.

Empleando entonces la fracción Sobrenadante de calentamiento, se efectuaron mediciones de la actividad enzimática en función del tiempo, cantidad de sustrato y proteína y pH de la reacción. La formación de uroporfirina I resultó lineal durante la primera hora de incubación en tanto que el consumo de PBG mostró un perfil de tipo hiperbólico. La actividad de la Deaminasa en función del producto formado fue proporcional a la cantidad de enzima añadida al sistema, en un amplio rango (10-300  $\mu$ g de proteína). La curva de saturación por sustrato siguió un perfil michaeliano cuando la actividad se expresó como nmoles de porfirinas sintetizadas mientras que el consumo de PBG fue lineal en estas condiciones. Se determinó el pH óptimo de la reacción encontrándose un máximo a 7,6-7,8. En base a estos resultados se adoptó como sistema óptimo para la medición de la

actividad de la Deaminasa, una incubación de 30 minutos con buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,6-7,8; 80  $\mu\text{g}$  de proteína en 50  $\mu\text{l}$  del mismo buffer y 133  $\mu\text{M}$  de PBG.

Se desarrolló un procedimiento para la purificación de la Deaminasa a partir del Sobrenadante de 27.000xg, luego del cual se obtuvo una preparación con alta actividad, purificada 72 veces. Por pasaje a través de Sephadex G-100 se eluyó una fracción con actividad exclusiva de Deaminasa, a la cual le correspondió un PM de 74.000  $\pm$  7.400.

En cuanto a los estudios cinéticos, se encontró que la Deaminasa de *Rp. palustris* presenta un comportamiento michaeliano, con un Km de 22  $\mu\text{M}$  y una Vmax de 2,09 nmoles de porfirinas/30 minutos, para el producto formado y de  $2 \times 10^3$   $\mu\text{M}$  y  $2,24 \times 10^3$  nmoles de PBG/30 minutos, para el consumo de sustrato.

Se investigó además la acción del agregado de los iones magnesio, fosfato y amonio sobre la actividad enzimática. Se observó que el magnesio presenta efectos activantes e inhibitorios (no competitivo) a bajas y altas concentraciones respectivamente, es interesante notar que la existencia y magnitud de estos efectos depende de la concentración de PBG. Se ha propuesto que el magnesio a altas concentraciones podría actuar por unión a un sitio sobre la Deaminasa, bloqueando la liberación de los intermediarios tetrapirrólicos, lo que se traduciría en una disminución en la formación total de porfirinas, así como también en un menor consumo de PBG.

Fueron sumamente novedosos los resultados obtenidos empleando el ión fosfato. Se observó que éste inhibe incompetivamente a bajas concentraciones (1 y 10 mM) en tanto que a mayores, la cinética de la inhibición resultó no-competitiva. El fosfato actuó también como un inhibidor no-competitivo cuando se midió la velocidad en función del consumo de sustrato. Es posible que el fosfato actúe neutralizando parcial o totalmente ciertos grupos ( $\epsilon$ -amino, imidazol o guanidino) del sitio activo mediante la formación de complejos enzima-inhibidor y enzima-PBG-inhibidor a bajas y altas concentraciones de fosfato respectivamente.

En cuanto a la acción del amonio, se encontró que este ión inhibe no-competitivamente la formación de porfirinas sin tener efecto sobre el consumo de PBG. Aparentemente el amonio no tendría un sitio de unión sobre la Deaminasa, sin embargo

disminuye la cantidad total de porfirinas formadas. Esto podría atribuirse a la capacidad de esta base para reaccionar con los intermediarios mono, di y tripirrimetano nacientes formando un derivado que se liberaría de la enzima, reduciendo así la concentración de TPM.

## VII.2. Inmovilización de la Deaminasa

La Deaminasa purificada a partir de *Rp. palustris* y de hígado bovino, se unió covalentemente a un soporte de Sepharosa 4B.

En el primer caso, se llevaron a cabo experiencias tendientes a seleccionar las condiciones más apropiadas para el acople de la Deaminasa y para la medición de la actividad de la enzima una vez insolubilizada. Se encontró que 100 mg de BrCN/ml de Sepharosa, 7-8 mg de proteína/ml de Sepharosa activada y 14-16 horas de contacto, fueron las condiciones óptimas para la unión Deaminasa-Sepharosa. El sistema standard de incubación contenía: 0,6 mg de proteína; 133  $\mu$ M de PBG y buffer fosfato de sodio 0,05 M pH 7,4-7,8; el tiempo de reacción fue de 30 minutos.

Resultaron interesantes los estudios efectuados acerca de las propiedades de la Deaminasa insolubilizada de *Rp. palustris*. Se observó, que una misma preparación de enzima-Sepharosa podía usarse hasta 6 veces consecutivas conservando aún un 30 % de la actividad inicial. El sistema resultó muy estable frente al estacionamiento a 4 °C ya que luego de 35 días conservaba aún un 90 % de su actividad catalítica; la enzima soluble, en cambio, se inactivó totalmente luego de permanecer 22 días en iguales condiciones. Cuando se calentaron fracciones de Deaminasa a diferentes temperaturas (30 - 80 °C) la enzima inmovilizada resultó ser más estable que la soluble ya que por tratamiento hasta 70 °C durante 15 minutos, mantuvo un 45 % de su actividad inicial.

En el caso de la Deaminasa de hígado bovino, las condiciones óptimas para la unión de la enzima al gel de Sepharosa fueron: 200 mg de BrCN/ml gel, 20 mg de proteína/ml y un tiempo de acople de 10 - 14 horas.

La preparación de Deaminasa insolubilizada de hígado bovino también fue significativamente estable ya que conservó un 75 % de la actividad inicial luego de 2 meses de estacionamiento a 4 °C y por otro lado se ha podido emplear hasta 5 veces

consecutivas sin pérdida de actividad. Cuando se estudió la estabilidad en función de la temperatura se encontró que también la Deaminasa insolubilizada de esta fuente, es más estable que la soluble ; ambas enzimas exhibieron su máxima actividad a 40 °C. El pH óptimo para el complejo enzima-Sepharosa resultó ser 7,2-7,6.

### VII.3. Estructura cuaternaria

Se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de determinar si la urea ejercía algún efecto sobre la actividad de la Deaminasa (soluble e insolubilizada) de *Rp. palustris*. Se encontró que concentraciones crecientes de urea inactivaban en forma correspondiente la enzima soluble, alcanzando el 100 % para 2 M. Cuando se intentó revertir dicho efecto, solamente se logró un 25 % como máxima recuperación para el caso de las concentraciones más bajas de urea. Estos resultados indican que estaría ocurriendo una inactivación irreversible de la enzima, del orden de 75-80 %. Es probable entonces que la urea produzca la disociación de la Deaminasa en subunidades; sin embargo, luego de eliminado el agente disociante del medio, estas subunidades no pueden reasociarse, reconstituyendo totalmente la estructura existente en el oligómero nativo. Por cuanto se recupera un 25 % de la actividad original, este porcentaje podría corresponder al de aquellas subunidades que han llegado a reconstituir la enzima nativa, o bien a la actividad de cada subunidad aislada.

Cuando se trabajó con la enzima inmovilizada, la urea inhibió en forma irreversible, en un 50 %, la actividad de la misma. En este caso se propone que el tratamiento con urea lleva a la inactivación por desnaturalización, parcialmente reversible de la Deaminasa, sin disociación en subunidades. Esto último podría deberse a que, en las condiciones del ensayo, las subunidades se encuentran asociadas entre sí y además por enlaces covalentes con el soporte de Sepharosa.

Experiencias similares se efectuaron con la Deaminasa proveniente de hígado bovino. Los resultados obtenidos condujeron a conclusiones semejantes a las anteriores.



#### VII.4. Formación de intermediarios

Empleando Deaminasa soluble y/o inmovilizada proveniente según el caso, de *Rp. palustris* o hígado bovino e Isomerasa soluble de esta última fuente se llevaron a cabo experiencias con el fin de detectar la formación de intermediarios polipirrólicos y su posible incorporación a uroporfirinas, así como también estudiar la acción de la Isomerasa sobre la Deaminasa y los intermediarios tetrapirrilmetanos.

Este grupo de experiencias nos permitió concluir que:

- a) Utilizando una preparación de Sepharosa-Deaminasa se obtienen intermediarios tetrapirrilmetano lineales ordenados; parte de ellos se libera a la solución y otra permanece unida a la enzima en forma estable.
- b) Para que el intermediario unido se libere hace falta PBG.
- c) El intermediario libre es capaz de unirse a la enzima nuevamente; y un exceso de intermediario libre podría inhibir a la Deaminasa.
- d) Los complejos híbridos formados con Deaminasa e Isomerasa de diferentes fuentes son totalmente funcionales lo cual sugiere que las zonas de interacción de ambas enzimas deben ser similares.
- e) La Isomerasa afecta o regula la actividad de la Deaminasa.
- f) La Isomerasa puede utilizar al producto de la Deaminasa como su sustrato, con mayor eficiencia cuando aún está unido a la enzima.
- g) En condiciones naturales y en presencia de PBG, Deaminasa e Isomerasa formarían una dupla en la cual ambas enzimas estarían asociadas de manera que su interacción sea más efectiva.
- h) Deaminasa e Isomerasa pueden asociarse e interaccionar pero no parecen estar unidas covalentemente formando un complejo estable, dado que *in vitro* ambas pueden funcionar en forma independiente sobre sus respectivos sustratos.

#### VII.5. Mecanismo de acción

Teniendo en cuenta todas las evidencias experimentales

obtenidas hasta el presente y el aporte surgido de estos estudios, se propone un mecanismo de acción para la formación de uroporfirinógenos I y III, que se ajusta y tiene en cuenta a toda la información experimental disponible hasta el momento.

Una de las principales características de este mecanismo es la existencia de un intermediario altamente reactivo de tipo azafulveno, que se encuentra unido al sitio activo de la Deaminasa; éste en presencia de agua forma el hidroximetilbilano que se cicla químicamente a Urogen I. Por otra parte, ese mismo intermediario sería empleado como sustrato por la Isomerasa uniéndose a la misma a través del pirrol D; por desplazamiento y reordenamiento electrónico se obtendría un intermediario del tipo metilpirrol cuyo anillo D se encuentra ahora reordenado y que en presencia de agua se liberaría como hidroximetilbilano isomerizado capaz de ciclarse a Urogen III.

#### VII.6. Modelo para la PBG-asa

Se propone un modelo según el cual existe una asociación de una unidad de Deaminasa con una de Isomerasa, formando un protómero activo. Este protómero estaría estabilizado por el PBG que entraría al sitio activo de la Deaminasa para formar allí el intermediario tetrapirrimetano el cual, sin necesidad de difundir al medio se canalizaría directamente al sitio activo de la Isomerasa, para convertirse en Urogen III.

La formación de esta estructura cuaternaria para este complejo bifuncional en el momento de la reacción, resulta en una canalización del intermediario con una máxima efectividad.

El modelo propuesto se ajusta a los resultados experimentales encontrados estudiando la acción de una serie de efectores tales como análogos del sustrato, iones, intermediarios libres, ácido fólico y otros. Así, la asociación de ambas enzimas posibilitaría el control y regulación de la formación de intermediarios y productos acorde con las necesidades fisiológicas celulares.

# **ADDENDUM**

## ADDENDUM

### PORFOBILINOGENASA

#### - Purificación, propiedades y mecanismo de acción

En cuanto a la purificación y propiedades de las enzimas componentes del complejo PBG-asa, se incluyen en esta sección los hallazgos obtenidos por Hart y Battersby (1985). Estos autores purificaron la Uroporfirinógeno III cosintetasa de *E. gracilis* determinando para la misma un peso molecular de  $38.500 \pm 800$  por cromatografía en una columna de Sephadex G-100 y de  $31.000 \pm 800$  por electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio. Este peso molecular resultó ser mucho menor que el encontrado por Higuchi y Bogorad (1975) para la Cosintetasa de germen de trigo (PM = 62.000) pero fue similar al reportado por Kohashi y col. (1984) para la misma enzima de hígado de rata (PM = 42.000). Los resultados obtenidos en base a estudios cinéticos indicaron que el Km para el hidroximetilbilano estaba entre 12 - 40  $\mu\text{M}$ . El Urogen III actuó como un inhibidor aparentemente competitivo con respecto al hidroximetilbilano, con un valor de  $K_i$  de magnitud similar al Km para este compuesto. Por otra parte, los estudios de modificación de grupos aminoacídicos sugirieron que los residuos arginina serían esenciales para la actividad de la Cosintetasa de *E. gracilis*; los residuos lisina también podrían serlo, en tanto que histidina, cisteína y tirosina, no.

La Cosintetasa de *E. gracilis* no contiene ni requiere un cofactor folato, en contraposición a lo encontrado por Kohashi y col. (1984) y Christenson y col. (1986). En este sentido, Juknat y col. (1988 a) aislaron y purificaron un compuesto capaz de regular la actividad de la PBG-asa de *E. gracilis*. Estudios de espectroscopía de fluorescencia, I.R. y RMN indicaron que la estructura de este factor correspondía a la de una 6-biopterina (Juknat y col., 1988 b). Por otra parte, Christenson y col. (1986) estudiaron el efecto *in vitro* e *in vivo* de la sulfamerazina (SMZ) sobre la actividad de la Uroporfirinógeno III cosintetasa de hígado de rata. Sus hallazgos sugieren que la SMZ

interfiere en la interacción de URO-S y Cosintetasa, inhibiendo a esta última enzima en su capacidad de dirigir la formación de URO III. La adición de ácido fólico *in vitro* revierte esta inhibición. Así, las sulfonamidas, que poseen una estructura p-aminobenzoil en común con el ácido fólico, podrían interferir con un sitio regulatorio para la coenzima sobre la URO-S, siendo la coenzima folato provista por la Cosintetasa, de acuerdo con los hallazgos de Kohashi y col. (1984). Asimismo, Kotler y col. (1988 a) encontraron que la SMZ es capaz de inhibir *in vivo* la actividad de la URO-S de sangre de rata, produciendo además efectos activantes e inhibitorios sobre la biosíntesis de porfirinas en homogenatos de cerebro, dependiendo estos últimos del tiempo de incubación y del tiempo transcurrido luego de administrada la droga. En concordancia con los hallazgos de Christenson y col. (1986), Kotler y col. (1988 b) encontraron que el ácido fólico es capaz de revertir totalmente *in vitro* la inhibición producida por la SMZ sobre la Deaminasa de sangre de rata.

El grupo de Battersby (Hart y col., 1986) purificó hasta homogeneidad aparente la Porfobilinógeno Deaminasa de *Escherichia coli*. El peso molecular de esta enzima, calculado por el método de filtración en geles resultó ser de  $39.100 \pm 1.600$ . Estos autores efectuaron además estudios cinéticos que les permitieron calcular los valores de  $V_{max}$  y  $K_m$  para PBG en un rango de pH de 6,2 - 8,8 como así también los valores de pK de los grupos ionizables de la enzima y del complejo enzima-sustrato, involucrados en la actividad catalítica. En este trabajo se informa, por primera vez, la secuencia de aminoácidos N-terminal de la PBG-deaminasa (Glu-Leu-Asp-Asn-Val-Leu-Arg-Ile-Ala-Thr-) que por otra parte resultó ser muy distinta a la correspondiente a la misma enzima de *Euglena gracilis* (Hart y Battersby, resultados no publicados). A su vez, Smythie y Williams (1988) purificaron la PBG-deaminasa de eritrocitos humanos informando para la misma una cinética hiperbólica, una curva de tiempo para la síntesis de uroporfirinógenos presentando una fase lag y un peso molecular de 44.000 determinado por filtración en geles por Sephadex G-100. La enzima resultó ser monomérica y los diversos folatos ensayados no tuvieron efecto sobre la actividad de la misma.

Evans y col. (1986) estudiaron la estructura del complejo enzima-sustrato y el mecanismo de acción de la PBG-Deaminasa

empleando espectroscopía  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^3\text{H}$ -RMN. Así se detectó por primera vez el complejo enzima-Urogen I en los espectros de  $^3\text{H}$ -RMN y se propuso que el primer PBG alquilaría un grupo tiol libre con eliminación de amonio mientras la cadena propionato formaría un par iónico con residuos lisina o arginina de la enzima.

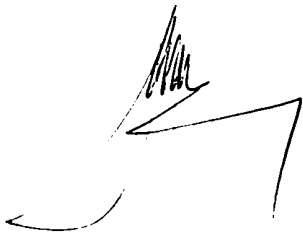
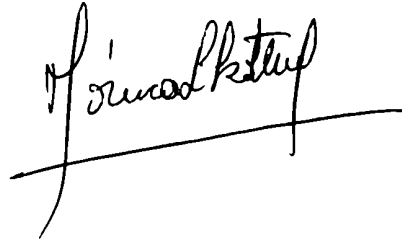
#### - Estudios genéticos

Ya en 1980, estudios con híbridos de células somáticas de ratón y humanos, revelaron que el locus para la Deaminasa humana, mapea en el cromosoma 11. Estos resultados fueron confirmados, extendiéndolos a híbridos de células similares conteniendo un único cromosoma 11 o varias deleciones del mismo (Meisler y col., 1981) e investigando la expresión de esta enzima en eritrocitos de pacientes con una trisomía en la región 11 qter. (De Verneuil y col., 1982), estableciéndose que la Deaminasa está codificada por un único gen estructural.

Otro grupo de investigadores (Raich y col., 1986) ha clonado y secuenciado el cDNA complementario del mRNA que codifica a la Deaminasa humana, empleándolo para estudiar las cantidades relativas del correspondiente mRNA presente en varios tejidos y líneas celulares. Se han hecho estudios similares a partir del mRNA que codifica a las formas humanas eritropoyéticas y no-eritropoyéticas de la Deaminasa (Grandchamp y col., 1987). La comparación de las secuencias revela que las dos especies de mRNA difieren en sus extremos 5', encontrándose que el peso molecular mayor para la isoenzima de tejido no-eritropoyético se debe a la presencia de un péptido adicional de 17 aminoácidos en el extremo N-terminal. Se ha propuesto entonces, que existe un único gen estructural para la Deaminasa que puede transcribirse por dos promotores diferentes, produciendo dos formas de mRNA para la Deaminasa de tejidos eritropoyéticos y no-eritropoyéticos, existiendo así una estricta expresión específica del tejido para esta enzima; en otras palabras, la producción de dos isoenzimas a partir de un único gen.

Recientemente, se ha clonado por primera vez el gen de la Deaminasa de una bacteria, se ha obtenido el cDNA de la Deaminasa de *E. coli* y establecido su secuencia de bases y de allí, la de aminoácidos, para la cual el peso molecular calculado ha sido del orden de 40.000 daltons (Jordan y col., 1986).

También, se ha clonado el gen de la Isomerasa humana (Desnick, 1987) lo cual abre enormes posibilidades en cuanto al estudio del establecimiento de las fallas genéticas en la PCE.

A stylized handwritten signature consisting of a series of vertical lines at the top, followed by a horizontal line that curves downwards on the left and upwards on the right.A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'J. Simón Pérez', with a long horizontal line extending from the bottom of the signature.

## Referencias

- Christenson, W.R.; Reddy, V.R. & Piper, W.R. (1986), *Life Sci.* 38, 1679.
- Desnick, R. (1987) Xth Ann. Intl. Meet. Tetrapyrrole Group, England.
- De Verneuil, H.; Phung, N.; Nordmann, Y.; Allard, D.; Leprince, F.; Jerome, H.; Aurias, A. & Rethore, M.O. (1982), *Hum. Genet.* 60, 212.
- Evans, J.N.S.; Burton, G.; Fagerness, P.E.; Mackenzie, N.E. & Scott, A.I. (1986), *Biochemistry* 25, 905.
- Grandchamp, B.; De Verneuil, H.; Beaumont, C.; Chretien, S.; Walter, O. & Nordmann, Y. (1987), *Eur. J. Biochem.* 162, 105.
- Hart, G.J. & Battersby, A.R. (1985), *Biochem. J.* 232, 151.
- Hart, G.J.; Abell, C. & Battersby, A.R. (1986), *Biochem. J.* 240, 273.
- Higuchi, M. & Bogorad, L. (1975), *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 244, 401.
- Jordan, P.M.; Marshall, L. & Thomas, S. (1986), "Porphyrins and Porphyrins" (Nordmann, Y., ed.) *Coloquie INSERM (John Libbey Eurotext Ltd.)* vol. 134, p. 83.
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 a) *Z. Naturforsch* (en prensa).
- Juknat, A.A.; Dörnemann, D. & Senger, H. (1988 b) *Z. Naturforsch* (en prensa).
- Kohashi, M.; Clement, R.P.; Tse, J. & Piper, W. (1984) *Biochem. J.* 220, 755.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa, S.R. & Batlle, A.M. del C. (1988 a) *Med. Sci. Res.* 16, 323.
- Kotler, M.L.; Juknat, A.A.; Correa, S.R. & Batlle, A.M. del C. (1988 b) en preparación.
- Meisler, M.; Wanner, L.; Kao, F.T. & Jones, C. (1981), *Cytogenet. Cell Genet.* 31, 124.
- Raich, N.; Romeo, P.H.; Dubart, A.; Beaupain, D.; Cohen-Solal, M. & Goossens, M. (1986), *Nucleic Acids Res.* 14 (15), 5955.
- Smythie, E. & Williams, D.C. (1988), *Biochem. J.* 251, 237.